

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DO GENÓTIPO E FENÓTIPO EM PACIENTES BRASILEIROS COM
HIPERFENILALANINEMIAS E DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

RAFAEL HENCKE TRESBACH

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em **Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Co-orientadora: Dr^a. Fernanda Sperb-Ludwig

Porto Alegre

Novembro de 2021

A presente tese foi desenvolvida nas dependências do Laboratório BRAIN (*Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*), localizado no Serviço de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Assim como nas dependências do Serviço de Genética Médica, da Unidade de Pesquisa Laboratorial e do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O trabalho contou com financiamento das agências CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA, INaGeMP e Rede DXB.

**Dedico essa tese à minha avó, Nina (*in
memorian*) e à minha mãe, Patrícia.**

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento vai para os pacientes e seus familiares, que doaram um pouco de si para a realização deste trabalho. Muitos de vocês não colherão benefícios diretos, mas com sua participação permitem que outras pessoas se beneficiem dos resultados desse estudo no futuro.

À Professora Ida Schwartz, agradeço principalmente pela oportunidade de trabalhar contigo. Por ter aceito um aluno de fora, de outra área da Genética para orientar. Muito aprendi contigo nesses anos de doutorado. Por sempre ouvir e apontar os caminhos, questionar e me fazer refletir. E não só isso, mas também, a pensar em diferentes maneiras de explicar as coisas. Às vezes, simplificando o que poderia ser complexo. Mas no final, tudo deu certo e aqui estamos.

À Fernanda Sperb pela co-orientação, troca de ideias e ensinamentos. À Tássia Tonon, por toda a ajuda neste trabalho. Ao Professor Rodrigo Braun, pela parceria no desenvolvimento desse trabalho e pela ajuda com as modelagens.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório BRAIN. E aos amigos que fiz no BRAIN. Em especial, à Dévora, por tudo. Pela amizade, cafés, parcerias, ajudas... sem esquecer de outros amigos que se destacaram, como: Amanda, Cristal, Natan, Júlia, Juliana, Alexia, Soraia, Jurema, Vivian, Mariana, Karina... A IC Natháli que me ajudou um pouco na etapa final dessa tese. Ao pessoal do grupo de pesquisa Avaliação de Tecnologias de Saúde em Genética Clínica, em especial: Tatiéle, Fernanda Bittencourt, Bruna e Vaneisse. Aos colegas do Centro de Pesquisa Experimental, pelas parcerias no café, conversas e momentos de descontração.

À equipe do Ambulatório de Genética e Erros Inatos do Metabolismo (Zona 18), o meu muito obrigado pela ajuda nos momentos que foram necessárias novas coletas de amostras de pacientes, em especial à Dra. Carolina de Souza. À equipe de Nutrição Metabólica, em especial à Lilia Refosco, por me permitirem participar do projeto maravilhoso de criar e apresentar receitas novas para os nossos pacientes.

À UFRGS e ao PPGBM, pela oportunidade de fazer parte de um dos melhores programas de pós-graduação na área da genética do país. Agradeço especialmente quem financiou a execução desse trabalho e principalmente, a CAPES, a qual fomentou a bolsa de estudos que me permitiu realizar esse trabalho.

Ao CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA pelo apoio financeiro neste trabalho. Aos professores do PPGBM, pelos ensinamentos transmitidos. E deixo aqui registrado um agradecimento especial à Professora Lavínia Schüller Faccini, que de certa forma, inspirou a escolha pela genética médica, em uma palestra que assisti em 2010.

Ainda, não posso esquecer de agradecer a umas pessoas maravilhosas que ajudam tanto nos trâmites burocráticos. Pelo PPGBM, é o Elmo Cardoso. No CPE, o Everaldo. E no SGM, a Zeniara e a Tania. Ao pessoal da UPL, em especial Marina, Patricia Koehler, Clévia e Hugo. Por todo o suporte e discussões durante a realização de experimentos nas unidades compartilhadas do CPE.

Ao Professor Juliano Boldo, pela amizade e por ter me incentivado a correr atrás de um sonho e mesmo longe, estar disposto a conversar e a ajudar.

À Aline, que sempre esteve disponível para conversar, tomar uns mates, cozinhar juntos, compartilhar conquistas e frustrações. Uma amizade da graduação para a vida!

Aos amigos da vida, não posso deixar de agradecer. São tantos que participaram, alguns longe, outros perto. Sei que vou esquecer alguns nomes, mas, posso dizer que se destacaram: Bruna, Deborah, Augusto, Melise, Alessandra, Rose, Rebeca, Guilherme, Carlo, Lucieli, Leticia, Roberta, Lari, Alexis, Fernanda, Rodrigo e Marjorie... À "tia" Claudinha, agradeço por sempre ter palavras de incentivo e por transmitir um alto astral muito bom quando converso contigo.

Ao João, por tudo. Por sempre me ajudar, estar perto, ouvir, conversar, discutir ciência... Por ter paciência comigo, principalmente nos momentos em que o mundo vira de cabeça pra baixo. E estar disposto a encarar várias empreitadas. Certamente, estamos aprendendo muito juntos.

Aos meus pais, em especial, a minha mãe, meu maior exemplo. Aquela que nessa altura da vida, está realizando seu sonho (assim como estou realizando o meu). Sempre disposta a ouvir, incentivar, conversar, me mandar fotos dos nossos bebês Neil e Jimi para alegrar meu dia. Aos familiares, agradeço a compreensão das minhas ausências nestes últimos anos.

“Someone told me long ago
There's a calm before the storm
I know, it's been comin' for some time
When it's over, so they say
It'll rain a sunny day
I know, shinin' down like water

I wanna know, have you ever seen the rain?
I wanna know, have you ever seen the rain
Comin' down on a sunny day?
[...]

Have You Ever Seen The Rain?

From the album Pendulum – by Creedence Clearwater Revival
(Writer: John Fogerty, 1971)

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES	9
2	LISTA DE FIGURAS	12
3	LISTA DE TABELAS	13
4	RESUMO	14
5	ABSTRACT	17
6	INTRODUÇÃO	19
6.1	Erros Inatos do Metabolismo	19
6.2	Aminoacidopatias	20
6.2.1	Distúrbios do metabolismo da fenilalanina	21
6.2.1.1	Fenilcetonúria	21
6.2.1.2	Deficiência de Tetrahydrobiopterina	27
6.2.1.3	Defeitos no gene <i>DNAJC12</i>	31
6.2.2	Distúrbios do metabolismo da leucina, isoleucina e valina	32
6.2.2.1	Doença da Urina do Xarope do Bordo	33
6.2.2.2	Deficiência de E3 e o Gene <i>DLD</i>	38
6.2.2.3	PP2Cm e o Gene <i>PPM1K</i>	39
6.3	Transportador LAT1	39
7	JUSTIFICATIVA	41
8	OBJETIVOS	43
8.1	Objetivos Gerais	43
8.2	Objetivos específicos	43
9	CAPÍTULO 1 - Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients	44
10	CAPÍTULO 2 - Molecular analysis of Brazilian tetrahydrobiopterin deficiency patients	59
11	CAPÍTULO 3 - Maple Syrup Urine Disease diagnosis in Brazilian patients by massive parallel sequencing	60
12	DISCUSSÃO	61

13 CONCLUSÕES	65
14 PERSPECTIVAS	67
15 REFERÊNCIAS	68
16 APÊNDICES	79
16.1 Apêndice I – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – projeto 2015-0556	79
16.2 Apêndice II – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – projeto 2018-0533	86
16.3 Apêndice III – Produção científica, pôsteres, apresentações em eventos e prêmios relacionados à tese.....	93
17 ANEXOS.....	105
17.1 Anexo A – Carta de aprovação do projeto 2015-0556 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ..	105
17.2 Anexo B - Carta de aprovação do projeto 2018-0533 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ..	111

1 LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES

%	Por cento
α	Letra grega alfa
AAV	<i>Adeno-associated viruses</i> , ou vírus adeno-associados
ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
BCAA	<i>Branched-chain amino acids</i> , ou aminoácidos de cadeia ramificada
BCAK	<i>Branched-chain α-ketoacids</i> , ou α -cetoácidos de cadeia ramificada
BCKD BCKDC	ou <i>Branched-chain α-ketoacid dehydrogenase complex</i> , ou complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada
<i>BCKDHA</i>	Gene da subunidade E1 α do complexo BCKD
<i>BCKDHB</i>	Gene da subunidade E1 β do complexo BCKD
<i>BCKDK</i>	Gene da quinase da BCKD
BH4	Co-fator tetrahidrobiopterina
BIA	<i>Bacterial inhibition assay</i> , ou teste de inibição bacteriana
BioPKU	Banco de dados de genótipos de PKU
CoA	Coenzima A
CRISPR- Cas	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated protein</i>
<i>DBT</i>	Gene da dihidrolipoamida transacilase de cadeia ramificada (E2)
DHPR	Enzima dihidropteridina quinoide reductase
<i>DLD</i>	Gene da dihidrolipoamida desidrogenase (E3)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAJ	Proteína contendo domínio DnaJ, da família HSP40
DNAJC12	<i>DnaJ (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 12</i> , ou membro 12 da subfamília C de homólogos da DnaJ (HSP40)
<i>DNAJC12</i>	Gene codificador da cochaperona DNAJC12
E1 α	Subunidade α da desidrogenase dos alfa cetoácidos de cadeia ramificada
E1 β	Subunidade β da desidrogenase dos alfa cetoácidos de cadeia ramificada
E2	Componente dihidrolipoil transacilase da desidrogenase dos alfa cetoácidos de cadeia ramificada

E3	Componente dihidrolipoamida desidrogenase da desidrogenase dos alfa cetoácidos de cadeia ramificada
EC	<i>Enzyme commission number</i> , ou nomenclatura e classificação de enzimas
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FDA	U.S. Food and Drug Administration, agência de regulamentação de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América
GC	Cromatografia gasosa
<i>GCH1</i>	Gene codificador da enzima GTP ciclohidrolase I
<i>GCHFR</i>	Gene codificador da GFRP
GFRP	Proteína regulatória de <i>feedback</i> da enzima GTP ciclohidrolase I
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GTPCH1	Enzima GTP ciclohidrolase I
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
Ile	Aminoácido Leucina
kb	Quilobase
kDa	QuiloDalton
LAT1	<i>L-type / large neutral amino acid transporter 1</i> , ou transportador 1 de aminoácidos do tipo L / neutros
Leu	Aminoácido leucina
LNAAs	Aminoácidos longos neutros
mRNA	RNA mensageiro
MS	<i>Mass spectrometry</i> , ou espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
MSUD	<i>Maple Syrup Urine Disease</i> , ou Doença da Urina do Xarope do Bordo
NADH	Coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAH	Enzima fenilalanina hidroxilase
<i>PAH</i>	Gene codificador da enzima fenilalanina hidroxilase
PAHvdb	Banco de dados de variantes do gene <i>PAH</i>
PAL	Enzima fenilalanina amônia liase
<i>PCBD1</i>	Gene codificador da enzima pterina-4- α -carbinolamina desidratase
PCD	Enzima pterina-4- α -carbinolamina desidratase
PEG	Polietilenoglicol
PEG-PAL	<i>PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase</i> , ou fenilalanina amônia liase recombinante pegilada

Phe	Aminoácido fenilalanina
PKU	<i>Phenylketonuria</i> , ou fenilcetonúria
PNDdb	Banco de dados de variantes dos genes relacionados com outros tipos de hiperfenilalaninemias genéticas
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PP2Cm	Proteína mitocondrial fosfatase 2C
<i>PPM1K</i>	Gene codificador da proteína mitocondrial fosfatase 2C
PTPS	Enzima 6-piruvoil tetrahydropterina sintase
<i>PTS</i>	Gene codificador da enzima 6-piruvoil tetrahydropterina sintase
<i>QDPR</i>	Gene codificador da enzima dihydropteridina quinoide reductase
RNA	Ácido ribonucléico
SCL7	Solute Carrier Family 7, ou família 7 dos carreadores de soluto
SLC7A5	<i>Solute Carrier Family 7 Member 5</i> , ou membro 5 da família 7 dos carreadores de soluto
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> , ou polimorfismos de nucleotídeos simples
<i>SPR</i>	Gene codificador da enzima sepiapterina reductase
SR	Enzima sepiapterina reductase
Tyr	Aminoácido tirosina
Val	Aminoácido valina
β	Letra grega beta

2 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica da fenilalanina no fígado.	22
Figura 2. Via metabólica do cofator BH ₄	28
Figura 3. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada Leucina, Isoleucina e Valina.	33
Figura 4. Estrutura do complexo da BCKD, com suas subunidades, a sua fosfatase reguladora e a enzima quinase reguladora.....	35

3 LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fenótipos bioquímicos da fenilcetonúria e seus respectivos níveis de fenilalanina.	24
Tabela 2. Diferentes fenótipos da deficiência de BH ₄ e seus respectivos genes.	29
Tabela 3. Fenótipos da deficiência de BH ₄ e seus respectivos biomarcadores diagnósticos.	30
Tabela 4. Relação de genes relacionados com a deficiência de BH ₄ , suas respectivas enzimas, éxons e número de variantes descritas nos bancos de dados PNDdb e HGMD.	30
Tabela 5. Classificação de MSUD de acordo com o fenótipo e suas manifestações clínicas.	36
Tabela 6. Classificação fenotípica de MSUD de acordo com o gene afetado.	37

4 RESUMO

Introdução: As Aminoacidopatias são um grupo de Erros Inatos do Metabolismo onde defeitos em enzimas do metabolismo de aminoácidos causam o acúmulo de substratos metabólicos, que podem ser extremamente neurotóxicos. Entre as Aminoacidopatias, temos as Hiperfenilalaninemias Genéticas, que incluem a Fenilcetonúria, causada por variantes bialélicas do gene *PAH*, que codifica a fenilalanina hidroxilase, enzima responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina. Temos ainda, a Deficiência de Tetrahydrobiopterina, que ocorre por defeitos nas vias de síntese *de novo* ou de reciclagem da tetrahydrobiopterina, um cofator da fenilalanina hidroxilase, entre outras enzimas. A via metabólica da Tetrahydrobiopterina é codificada pelos genes *GCH1*, *GCHFR*, *PTS*, *PCBD1*, *QDPR* e *SPR*. Variantes patogênicas nestes genes levam ao funcionamento incorreto desta via e conseqüentemente, defeitos nos neurotransmissores produzidos a partir dela. E também, as Hiperfenilalaninemias Genéticas podem ser causadas pela presença de variantes patogênicas no gene *DNAJC12*. Além das Hiperfenilalaninemias genéticas, temos a Doença da Urina do Xarope do Bordo, onde a via do complexo da desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, codificada pelos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* está defeituosa, levando ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, além dos seus respectivos α -cetoácidos. **Objetivos gerais:** I. Realizar o diagnóstico molecular de pacientes com suspeita clínica e/ou bioquímica de Hiperfenilalaninemias e Doença da Urina do Xarope do Bordo através de sequenciamento massivo paralelo; II. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com Fenilcetonúria; II. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com Deficiência de Tetrahydrobiopterina; e III. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com Doença da Urina do Xarope do Bordo. **Metodologia:** Esse estudo é transversal e possui uma amostragem por conveniência. Foram incluídos pacientes com diagnóstico bioquímico de Fenilcetonúria, Deficiência de Tetrahydrobiopterina e Doença da Urina do Xarope do Bordo. Para a análise genética, foi realizado o sequenciamento massivo paralelo na plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine™,

utilizando painel de genes contendo os genes envolvidos nestas três doenças (*PAH*, *GCHFR*, *GCH1*, *PTS*, *QDPR*, *PCBD1*, *SPR*, *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT*). A análise de variantes ocorreu nos softwares Enlis Genome Research e Ion Reporter™. A análise da profundidade do sequenciamento foi realizada no software IGV. Os bancos de dados PAHvdb, PNDdb, HGMD, Clinvar, gnomAD e ABraOM foram utilizados. A patogenicidade das variantes foi determinada pelos critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics*. Dados clínicos foram obtidos através de revisão de prontuários. Variantes novas e conflituosas foram analisadas pelo sequenciamento automatizado de Sanger. A associação genótipo-fenótipo, quando possível, foi efetuada com o apoio do banco de dados BioPKU e de informações da literatura. A modelagem molecular foi realizada utilizando-se sequências da proteína selvagem do Protein Data Bank, com os softwares DeepView, I-TASSER e FoldX 5.0. **Resultados:** Nos 33 pacientes não relacionados com Fenilcetonúria, foram identificadas 26 variantes patogênicas diferentes, sendo uma nova (c.524C>G), está classificada como potencialmente patogênica. As variantes mais frequentes encontradas foram c.1315+1G>A (n = 8/66), c.473G>A (n = 6/66), e c.1162G>A (n = 6/66). Na Deficiência de Tetrahydrobiopterina, foram analisados quatro pacientes (duas irmãs), nos quais se identificou seis variantes no gene *PTS*, destas três novas: c.84-2A>G, c.134A>T e c.403A>G. A última prevista como potencialmente patogênica, enquanto as demais são classificadas como patogênicas. Nos dezoito pacientes com a Doença da Urina do Xarope do Bordo analisados, foram encontradas 21 variantes, sendo sete novas: c.1237C>T no gene *BCKDHA* e c.80_90dup, c.384delA, c.478A>T, c.528C>G, c.977T>C e c.1039-2A>G no gene *BCKDHB*. Todas as variantes novas foram classificadas como patogênicas. Não foram encontradas variantes frequentes nos pacientes analisados. A maioria das variantes encontradas se concentram no gene *BCKDHB*. **Conclusões:** Foram encontradas 26 variantes no gene *PAH*, incluindo uma variante nova e com isso se evidencia a heterogeneidade alélica do gene *PAH*. Em 27,7% dos pacientes, que não haviam realizado o teste de responsividade a tetrahydrobiopterina, foi possível obter a provável responsividade de acordo com os dados disponíveis no banco de dados BioPKU. Ainda, 30,3% dos pacientes corroboraram os dados disponíveis no banco de dados e 12,1% dos pacientes

apresentaram divergência em relação aos dados disponíveis no banco. Na Deficiência de Tetrahydrobiopterina, foi possível complementar o diagnóstico de três pacientes, todos com alterações no gene *PTS* e três variantes novas foram identificadas. No entanto, não foi possível realizar as associações genótipo-fenótipo nestes pacientes. Por fim, os pacientes com a Doença da Urina do Xarope do Bordo mostraram um perfil genético heterogêneo, com variantes nos três principais genes causadores da doença. No total, 21 variantes foram identificadas, sete novas. Associações genótipo-fenótipo neste gene não foram possíveis devido a heterogeneidade alélica e divergências entre as informações clínicas dos pacientes por conta do diagnóstico tardio.

5 ABSTRACT

Introduction: Aminoacidopathies are a group of inborn errors of metabolism, caused by deficiency in enzymes involved in amino acid metabolism, which lead to the accumulation of the substrate, whom can be extremely neurotoxic. Between the aminoacidopathies, there are the genetic hyperphenylalaninemia, which comprises phenylketonuria, a disease caused by biallelic variants in the *PAH* gene. This gene encodes the phenylalanine hydroxylase, the enzyme that converts phenylalanine into tyrosine. We also have the tetrahydrobiopterin deficiency, a cofactor to the phenylalanine hydroxylase and other enzymes. This condition can be caused by pathogenic variants in genes involved in the tetrahydrobiopterin biosynthesis or regeneration (e.g.: *GCH1*, *GCHFR*, *PTS*, *PCBD1*, *QDPR*, and *SPR*), leading to defects in neurotransmitters generated after this pathway. Besides the genetic hyperphenylalaninemia, there is the maple syrup urine disease, caused by variants in the genes that encodes elements of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKDC) pathway (e.g., *BCKDHA*, *BCKDHB*, and *DBT*), leading to the accumulation of the branched-chain amino acids leucine, isoleucine and valine, and their respective α -ketoacids. **Aims:** I. Perform the molecular diagnosis of the patients with clinical or biochemical suspect of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease through massive parallel sequencing; II. Characterization of the genetic profile from a sample of phenylketonuria's Brazilian patients; III. Characterization of the genetic profile from a sample of Brazilian patients diagnosed with tetrahydrobiopterin deficiency; and IV. Characterization of the genetic profile of the maple syrup urine disease Brazilian patients. **Methodology:** This is a transversal study, with a convenience sample. We included patients with biochemical diagnosis of phenylketonuria, tetrahydrobiopterin deficiency, and maple syrup urine disease. For the genetic analysis, we performed the massive parallel sequencing in the Ion Torrent Personal Genome Machine™ platform, using a gene panel containing the genes for the diseases previously described. The variant filtering was performed in the Enlis Genome Research and Ion Reporter™ software. IGV software was used to the detection of the depth of sequencing. The databases PAHvdb, PNDdb, HGMD, ClinVar, gnomAD, and

ABraOM were consulted. The pathogenicity of the variants was determined by the American College of Medical Genetics and Genomics criteria. Novel and conflicting variants were analyzed by automated Sanger sequencing. Genotype-phenotype association, when it was possible, was performed using the BioPKU database and literature review. Molecular modelling was performed with the wild type protein sequence from Protein Data Bank and the softwares DeepView, I-TASSER, and FoldX 5.0. **Results:** In the phenylketonuria's patients, 26 different pathogenic variants were identified, and of those, one variant (c.524C>G) was novel and classified as likely pathogenic. The most frequent variants found were c.1315+1G>A (n = 8/66), c.473G>A (n = 6/66), and c.1162G>A (n = 6/66). In the four patients with tetrahydrobiopterin deficiency analyzed (two siblings), six variants of the *PTS* gene were found, three of them novel: c.84-2A>G, c.134A>T, and c.403A>G. The first two variants were classified as pathogenic and the last one as likely pathogenic. In the eighteen patients diagnosed with maple syrup urine disease, 21 variants were found and of those, seven were novel: c.1237C>T in the *BCKDHA* gene, and c.80_90dup, c.384delA, c.478A>T, c.528C>G, c.977T>C, and c.1039-2A>G in the *BCKDHB* gene. All the variants were classified as pathogenic. We did not find frequent variants in the analyzed patients and most of them were found located in the *BCKDHB* gene. **Conclusions:** Our study shows high allelic heterogeneity in the *PAH* gene, with 26 variants in the *PAH* gene, including a novel variant. Using data from BioPKU it was possible to infer the tetrahydrobiopterin responsivity of 27.7% of the patients, that did take the responsivity test. On 30.3% of the patients, the BioPKU data corroborated with the biochemical assay while for 12.1% it did not. In the tetrahydrobiopterin deficiency it was possible to complement the diagnosis of three patients, all with alterations in the *PTS* gene and three novel variants were identified. However, it was not possible to establish a genotype-phenotype association for these patients. At least, patients with the maple syrup urine disease presented a more heterogeneous genetic profile, with variants found in the three main related genes. In total, 21 variants were identified, including seven novel. Genotype-phenotype association was not established in these patients as there was allelic heterogeneity, and divergence between the patients' medical story due to the late diagnosis'.

6 INTRODUÇÃO

6.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) consistem em um grupo de doenças genéticas em que há a interrupção do metabolismo de algum substrato por defeito total ou parcial nas enzimas, seus cofatores ou proteínas auxiliares, levando ao acúmulo celular destes substratos, à deficiência de produtos intermediários críticos, deficiência de produtos específicos ou o excesso de produtos nocivos oriundos de vias metabólicas intermediárias. O termo erros inatos do metabolismo foi utilizado pela primeira vez em 1908, por Sir Archibald Garrod, na descrição das doenças genéticas alcaptonúria, albinismo, pentosúria e cistinúria e ainda trouxe a relação com a herança Mendeliana. A herança dos EIM é usualmente autossômica recessiva ou ligada ao X. Poucas doenças apresentam herança autossômica dominante (Lanpher et al. 2006; Arnold 2018).

Apesar de raros, os EIM em conjunto apresentam um número significativo de doenças, que podem ser pleiotrópicas e envolver qualquer órgão ou sistema, e podem ser associados com um risco agudo de descompensação metabólica (Hoffmann et al. 2017).

Os EIM podem ser divididos, de acordo com Saudubray et al. (2019), em: grupo 1 – moléculas pequenas; grupo 2 – moléculas complexas (ambos subdivididos em acúmulo e deficiência); e grupo 3 – desordens de metabolismo energético primário.

O acúmulo anormal de compostos tóxicos, como pequenas moléculas, próximo ao defeito na via metabólica leva ao desenvolvimento de condições por intoxicação aguda ou progressiva. Este grupo engloba EIMs de catabolismo de aminoácidos (aminoacidopatias), como as hiperfenilalaninemias genéticas, a doença da urina do xarope do bordo, homocistinúria e também outras doenças como distúrbios do ciclo da ureia, acidúrias orgânicas, galactosemias, entre outros. A deficiência de pequenas moléculas por sua vez, engloba todos os defeitos de carreadores de moléculas essenciais devido ao defeito do transporte de uma molécula essencial através da membrana celular. Em se tratando de aminoácidos, o paradigma aqui se dá por defeitos no carreador para o cérebro, o LAT1, que

ocorre por variantes patogênicas no gene *SLC7A5*, resultando no transporte defeituoso de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (Scalise et al. 2018; Saudubray et al. 2019).

Já os EIMs de moléculas complexas resultam na interrupção do metabolismo de moléculas que não são solúveis em água ou difusíveis. Alguns exemplos dessas moléculas são glicogênio, esfingolipídeos, fosfolipídeos, glicosaminoglicanos, oligossacarídeos, glicoproteínas, ácidos nucleicos, entre outros. O processo de metabolização dessas moléculas ocorre em organelas como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas sinápticas, com vias metabólicas que envolvem diferentes organelas e requerem transportadores proteicos (Saudubray et al. 2019).

E por fim, os EIMs de metabolismo energético primário envolvem defeitos em processos de geração energética, sendo as principais, as doenças mitocondriais. Há também a categoria de defeitos energéticos do citoplasma e de carreadores moleculares e moléculas energéticas (Saudubray et al. 2019).

Atualmente, há cerca de 1596 EIMs, divididos em 24 categorias (Ferreira et al. 2021). Mundialmente, a prevalência dos EIMs é de 50,9 para cada 100.000 recém nascidos vivos (Waters et al. 2018).

6.2 Aminoacidopatias

As aminoacidopatias são um grupo de EIMs onde a conversão de um aminoácido para o seu produto correspondente não ocorre por defeitos em uma enzima ou cofator da via metabólica, resultando no acúmulo deste aminoácido na célula (Wasim et al. 2018). Entre os diferentes tipos de aminoacidopatias, temos alguns grupos que envolvem enzimas mitocondriais, como os defeitos na desidrogenase dos alfa cetoácidos de cadeia ramificada, que leva à Doença da Urina do Xarope do Bordo ou em defeitos na ornitina aminotransferase, que leva à atrofia girata da coroide (Hoffmann et al. 2017). Ambas as doenças são aminoacidopatias por não envolverem metabólitos ativados por coenzimas A (CoA). Esse critério também distingue aminoacidopatias de acidúrias orgânicas (Vaidyanathan et al. 2011).

6.2.1 Distúrbios do metabolismo da fenilalanina

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido aromático essencial para seres humanos, possuindo um papel chave na síntese de tirosina (Tyr), catecolaminas, dopamina, noradrenalina e adrenalina (Bender 2012; Blanco and Blanco 2017). A obtenção de fenilalanina em seres humanos se dá principalmente pela alimentação (Blanco and Blanco 2017).

Condições que levam ao acúmulo de Phe acima dos limites normais (120 $\mu\text{mol/L}$) no organismo são classificados como hiperfenilalaninemias. As hiperfenilalaninemias podem ocorrer por fatores genéticos, levando a doenças como fenilcetonúria, deficiência de tetrahydrobiopterina (BH_4) ou hiperfenilalaninemia devido a variantes patogênicas no gene *DNAJC12*.

6.2.1.1 Fenilcetonúria

Em 1934, Ivar Asbjørn Følling se deparou com um caso de duas irmãs com retardo mental severo. Ele testou a urina das irmãs com cloreto férrico e encontrou a presença de corpos cetônicos, que posteriormente veio a identificar como ácido fenilpirúvico. O composto até então era novo na natureza e Følling chegou a conclusão de que ele se originou do metabolismo da fenilalanina dietética e denominou a condição de oligofrenia fenilpirúvica (Følling 1994).

O trabalho com o ácido fenilpirúvico continuou com Lionel Penrose, que descreveu o padrão de herança desta doença, como mendeliano recessivo. Penrose ainda fez um paralelo de seu trabalho com o trabalho de Garrod e assim, passou a denominar a condição de oligofrenia fenilpirúvica como fenilcetonúria (Penrose 1935).

O aminoácido Phe é convertido em Tyr no fígado, pela enzima fenilalanina hidroxilase (Figura 1; PAH, EC 1.14.16.1) (Blau and van Spronsen 2014). A enzima PAH depende ainda, do cofator BH_4 , da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), de oxigênio, ferro e hidrogênio molecular para realizar a conversão da Phe em Tyr. Há ainda a presença da proteína *DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C12* (DNAJC12) agindo como uma cochaperona (van Spronsen et al. 2021). A enzima PAH possui estrutura tetramérica, com subunidades de 52 kDa, compostas de um domínio regulatório (resíduos 1-110), com uma cauda N-terminal não estruturada (resíduos 1-29), um domínio catalítico

(resíduos 111-410) e um domínio de oligomerização (resíduos 411-452), o qual é responsável pela dimerização e subsequente tetramerização da PAH (Flydal et al. 2019). A PAH é codificada pelo gene *PAH*, localizado no cromossomo 12, com 90 kb e 13 éxons (Blau 2016). A PKU possui um padrão de herança autossômico recessivo e variantes patogênicas no gene *PAH* levam a defeitos na formação da enzima PAH e resultam numa condição clínica conhecida como fenilcetonúria (PKU, OMIM #261600) (van Spronsen et al. 2017). Atualmente, há cerca de 1.282 variantes descritas para o gene *PAH* no banco de dados PAHvdb (<http://www.biopku.org/>) e 1.117 variantes patogênicas descritas no banco de dados *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (Stenson et al. 2017).

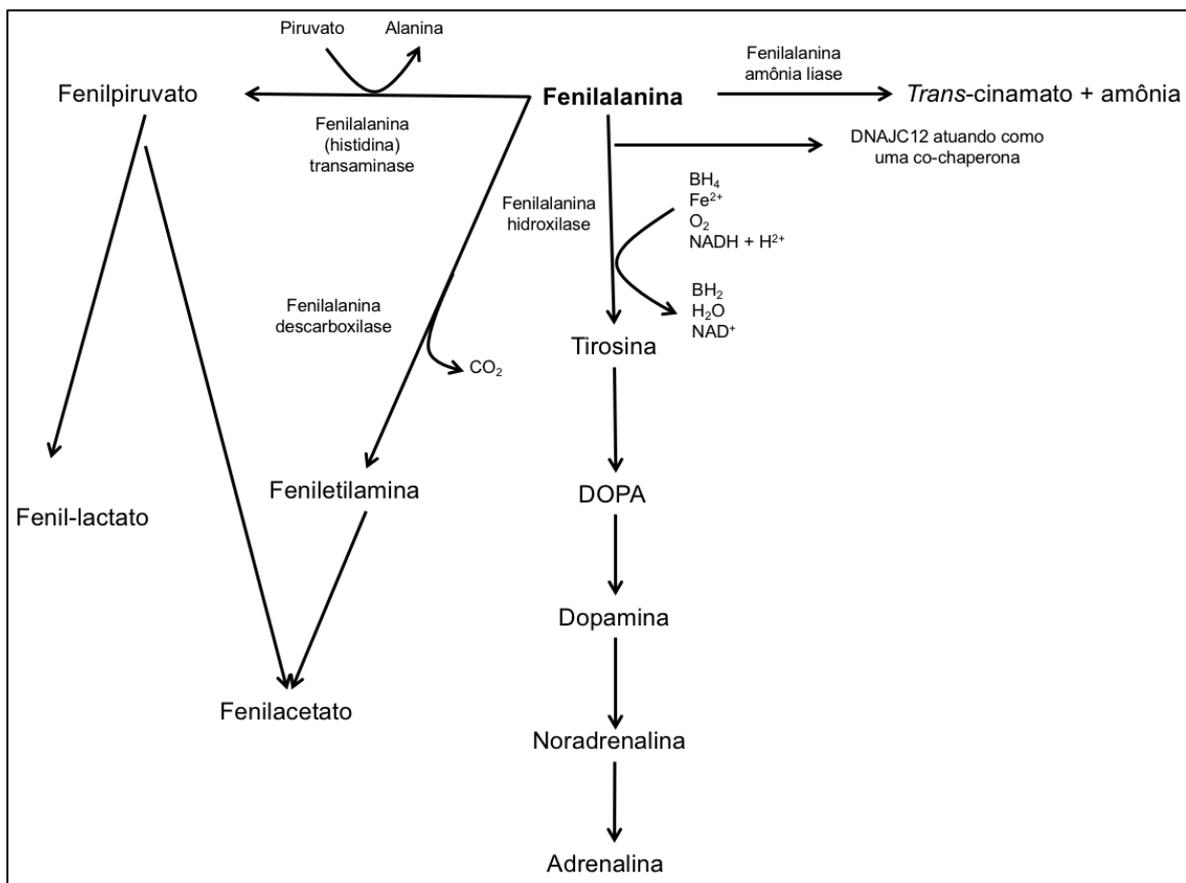


Figura 1. Rota metabólica da fenilalanina no fígado. A reação de conversão de fenilalanina em tirosina é feita pela enzima fenilalanina hidroxilase, a qual utiliza o cofator tetrahydrobiopterina, NADH, ferro, hidrogênio e oxigênio molecular. O DNAJC12 age como uma co-chaperona. A rota alternativa da fenilalanina envolve a conversão deste aminoácido em seus metabólitos secundários, o fenilpiruvato, fenil-lactato e fenilacetato. Ainda, há em plantas e algumas bactérias, fungos e leveduras, a via da fenilalanina amônia liase, que resulta em trans-cinamato e amônia. Adaptado de Blau and van Spronsen (2014); Al Hafid and Christodoulou (2015); van Spronsen et al. (2021).

Variantes patogênicas causadoras de PKU têm frequências diferentes de acordo com a região. No mundo, a variante mais frequente é a p.Arg408Trp, com

frequência alélica de 22,2% (Hillert et al. 2020). Na Europa e em populações da Alemanha esta variante também é comum, abrangendo de 24,6% e 36% dos casos de PKU (Aulehla-Scholz and Heilbronner 2003; Hillert et al. 2020). No Brasil, esta variante está presente em 6,8% dos casos de PKU (Hillert et al. 2020). No mundo, ainda há as variantes c.1066-11G>A (6,4%) e p.Arg261Gln (5,5%) apontadas como as mais prevalentes (Hillert et al. 2020).

O diagnóstico de PKU, realizado até então pelo teste colorimétrico através de uma solução de cloreto férrico, apresentou um salto com o trabalho de Robert Guthrie, que desenvolveu um método para o diagnóstico de PKU, utilizando um teste de inibição bacteriana (BIA), com o objetivo de realizar a triagem de um grande número de crianças em relação aos níveis sanguíneos de Phe (Følling 1994). Este teste pode ser aplicado facilmente em todo o mundo graças ao desenvolvimento dos papéis filtro que foram utilizados como meio de transporte para o sangue neonatal (os cartões de Guthrie) (Chace and Hannon 2016). O BIA consistia na comparação do padrão de crescimento bacteriano, que ocorre com a presença de Phe no meio. A Phe compete com o inibidor de crescimento bacteriano e permite o crescimento bacteriano, e o tamanho das zonas de crescimento bacteriano será comparado com padrões de amostras de sangue. Entretanto, este teste é semiquantitativo e apresenta problemas como a interferência no crescimento bacteriano por conta da presença de antibióticos no sangue (Bodamer 2010).

A triagem neonatal e o diagnóstico de PKU evoluíram bastante desde então. Após o sucesso do teste BIA, com o avanço das tecnologias de diagnóstico e detecção, veio o ensaio fluorimétrico para a fenilalanina, o qual permitiu uma automação no diagnóstico de PKU. Outros métodos analíticos que surgiram foram a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), ambos laboriosos e demorados. Estes dois métodos podem ser acoplados a um espectrômetro de massas (MS), permitindo um sistema mais poderoso de detecção (HPLC-MS e GC-MS), porém apresentam problemas de tempo e praticidade de uso. Atualmente, o método de diagnóstico de PKU considerado padrão ouro, é o espectrômetro de massas em *tandem* (MS/MS), que detecta a Phe e a Tyr, e ainda oferece uma sensibilidade maior em relação aos outros métodos. O MS/MS utiliza o princípio de que a Phe é o substrato e a Tyr é o produto da via metabólica e com

isso, a razão entre os dois é necessária para obter uma confiabilidade maior na análise (Chace and Hannon 2016). No Brasil, até recentemente, o programa nacional de triagem neonatal (PNTN) englobava apenas uma aminoacidopatia, a PKU (Brasil. Ministério da Saúde. 2001; Brasil. Ministério da Saúde. 2016). Somente no ano atual, a triagem neonatal irá englobar as hiperfenilalaninemias de uma forma geral (Brasil 2021).

A prevalência da PKU mundial é em média de 1:10.000 recém-nascidos, enquanto na Europa varia entre 1:850-112.000 recém-nascidos vivos (República de Carachai-Circássia, Rússia e Finlândia, respectivamente) (van Spronsen et al. 2021). Nos Estados Unidos da América, a prevalência é de 1:10.000 recém-nascidos vivos (Hillert et al. 2020). No Brasil, a prevalência é de 1:25.000 recém-nascidos vivos e na região Sul, a prevalência varia entre 1:12.000-16.000 recém nascidos vivos (Trevisan et al. 2015; Vieira Neto et al. 2018).

A PKU pode ser classificada em diferentes fenótipos, de acordo com os níveis plasmáticos de Phe. Na Tabela 1, estão indicados os tipos de PKU e seus níveis correspondentes de Phe. A hiperfenilalaninemia leve até 360 $\mu\text{mol/L}$ usualmente não requer tratamento (Hillert et al. 2020).

Tabela 1. Fenótipos bioquímicos da fenilcetonúria e seus respectivos níveis de fenilalanina.

Fenótipo	Níveis de Phe
Normal	50-120 $\mu\text{mol/L}$ ou 0,8-2 mg/dL
Hiperfenilalaninemia leve	120-600 $\mu\text{mol/L}$ ou 2-10 mg/dL
PKU Leve	600-1.200 $\mu\text{mol/L}$ ou 10-20 mg/dL
PKU Clássica	>1.200 $\mu\text{mol/L}$ ou >20 mg/dL

Fonte: Blau et al. (2010); Hillert et al. (2020); van Spronsen et al. (2021).

O primeiro tratamento para PKU foi proposto por Horst Bickel e Louis I. Woolf em 1953, consistindo de uma dieta com restrição de alimentos com Phe e suplementação de aminoácidos, vitaminas, minerais, elementos traços e ácidos graxos essenciais. A dieta mostrou melhorias em alguns sintomas de PKU, como as convulsões epiléticas (Woolf and Adams 2020). O tratamento evoluiu desde então.

Atualmente, o tratamento padrão para a PKU consiste em uma dieta restrita em alimentos altamente proteicos (como carnes, peixes, ovo, queijos derivados de leite animal, nozes, sementes, aveia, quinoa, trigo, cevada, soja, lentilhas e feijões,

aspartame, gelatinas, e outros), com o uso de fórmula metabólica livre de Phe, que irá fornecer os demais aminoácidos e outros compostos essenciais para que o organismo funcione corretamente. A dieta da PKU é uma das mais restritivas e a adesão ao tratamento costuma ser estressante para as famílias (MacDonald et al. 2020).

Alternativas ao tratamento dietético vem sido estudadas desde 1980, com o primeiro estudo descrevendo a possibilidade do uso da fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5) como uma alternativa a enzima PAH defeituosa, uma opção de terapia de substituição enzimática. A PAL utiliza a fenilalanina como substrato para produzir trans-cinamato e amônia (Figura 1) (Hoskins et al. 1980). No entanto, o primeiro estudo clínico com a PAL foi ocorrer apenas em 2014. O maior problema da PAL, como uma opção de tratamento, é a imunogenicidade, que precisa ser contornada para que a enzima recombinante chegue ao seu alvo e possa exercer seu papel (Sarkissian and Gámez 2005). Para resolver esse problema, entrou em cena o polietilenoglicol (PEG), que tem a função de proteger a PAL do reconhecimento imune e posterior degradação pelo sistema imunológico, permitindo com que a PAL chegue ao seu alvo. A PAL com o uso de PEG passa a ser denominada PEG-PAL (Gámez et al. 2005). O primeiro ensaio clínico envolvendo a PEG-PAL foi realizado em 2014 e demonstrou a segurança e eficácia da rAVPAL-PEG na redução da concentração de Phe no sangue (Longo et al. 2014). Em 2018, a agência de regulamentação de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA) aprovou um composto que utiliza o PEG-PAL como tratamento para a PKU, a pegvaliase.

Em 1999, foi descoberto que o cofator BH₄ em alguns pacientes com PKU, desempenhou um papel na redução dos níveis plasmáticos de Phe, abrindo um potencial terapêutico para a PKU (Kure et al. 1999). Estudos posteriores demonstraram que o BH₄ desempenha uma função de chaperona farmacológica, prevenindo defeitos no dobramento da PAH e sua degradação (Pey et al. 2004; Hole et al. 2016). Além disso, o dicloridrato de sapropterina, um análogo do BH₄, também demonstrou aumento da atividade enzimática da PAH em alguns genótipos (Heintz et al. 2013). Testes para avaliar a responsividade ao BH₄ foram desenvolvidos e estes testes podem ser feitos em dois tempos: 24h ou 48h. Se a

redução da Phe plasmática é igual ou maior a 30% após o período do teste, o paciente é considerado responsivo. Do contrário, o paciente é considerado não-responsivo (Fiege and Blau 2007; Utz et al. 2012; Blau and van Spronsen 2014).

Com a descoberta da ação desempenhada pelo BH₄ como uma chaperona farmacológica e de que esta é influenciado pelo genótipo, abriu-se as portas para estudos da correlação genótipo-fenótipo em PKU. Bancos de dados para as HPAs genéticas foram criados e essa informação foi centralizada dentro da plataforma BioPKU (<http://biopku.org/>), que engloba não apenas dados sobre variantes do gene *PAH* no banco PAHvdb, mas também dados sobre o genótipo e fenótipo de pacientes, no banco BioPKUdb. Os outros bancos disponíveis dentro desta plataforma serão abordados mais para frente. O BioPKUdb engloba dados a partir da literatura e inclusão pelos pesquisadores, desde as variantes do gene *PAH*, incluindo os genótipos de cada paciente, o tipo de PKU, a responsividade ao BH₄, a região do mundo onde aquele genótipo foi localizado e dados sobre a predição da atividade da enzima PAH, responsividade ao BH₄ e valores de associação alelo-fenótipo (Wettstein et al. 2015; Garbade et al. 2019). Atualmente, o BioPKUdb tem aproximadamente 17.804 registros de casos de PKU.

Outros tratamentos promissores para a PKU envolvem a terapia gênica e de mRNA, bem como probióticos. Através de sistemas de CRISPR-Cas, realizando um reparo direto no DNA, foi possível restaurar mais de 20% da atividade da enzima PAH em modelos de ratos com fenilcetonúria (Villiger et al. 2018). Outra forma de terapia gênica que apresenta potencial, mas ainda está longe de ser aplicada em testes clínicos é o uso vetores de vírus adeno-associados (AAV). Ratos Pah^{enu2} (que apresentam um quadro similar a PKU clássica), após serem injetados com AAV portando a versão correta do gene PAH, passaram a ter níveis normais de Phe e Tyr pelo resto de suas vidas (Ahmed et al. 2020). Outra metodologia que poderá gerar um novo tratamento para PKU no futuro é o uso de nanopartículas lipídicas carreando moléculas de mRNA do gene *PAH*. Protegido por essas nanopartículas, o mRNA pode ser absorvido no fígado, onde hepatócitos podem utiliza-lo para produzir a forma funcional da enzima. Estudos animais demonstraram a eficácia desse método para outros EIMs como a galactosemia e a doença de Fabry, mas ainda não há estudos publicados utilizando esta metodologia com PKU

(van Spronsen et al. 2021). Os probióticos, por sua vez, são bactérias e leveduras vivas que podem ter papel modulador na microbiota intestinal, inclusive na prevenção e tratamento de algumas doenças (Butel 2014). Está em estudos clínicos a utilização do probiótico geneticamente modificado, SYN1618, contendo genes que expressam enzimas capazes de metabolizarem a Phe em condições anóxicas no intestino de mamíferos. Em modelos de ratos, esse probiótico demonstrou a redução de 38% de Phe em comparação com os controles. Esse probiótico converte a Phe em transcinamato, o qual é excretado na urina (Isabella et al. 2018).

6.2.1.2 Deficiência de Tetrahydrobiopterina

A BH₄ é um cofator para diversas vias metabólicas, incluindo as vias de biossíntese e degradação de alguns aminoácidos, como a fenilalanina, tirosina, triptofano, arginina e também de vias do sistema de óxido nítrico, sendo que estas vias estão também envolvidas na síntese de neurotransmissores e como consequência, defeitos na via da BH₄ podem levar a defeitos nos neurotransmissores (Thöny et al. 2000; Foroozani et al. 2015).

A BH₄ em nossas células tem duas origens: pela via *de novo*, onde ocorre a síntese da BH₄ a partir de um sinal de *feedback* pela GFPR (proteína regulatória do *feedback* da GTP ciclohidrolase 1) que regula a atividade da enzima GTP ciclohidrolase 1 (GTPCH, EC 3.5.4.16), esta converte GTP (trifosfato de guanosina) em trifosfato de 7,8-dihidroneopterina. Este produto por sua vez, é processado pela enzima 6-piruvil tetrahydropterina sintase (PTPS, EC 4.2.3.12), originando o novo produto, 6-piruviltetrahydrobiopterina. Este produto então, dará origem à BH₄, através da ação da enzima sepiapterina reductase (SR, EC 4.1.1.17). Após a ação da BH₄ nas vias metabólicas, o produto resultante, pterina-4-carbinolamina, pode ser reciclado pela via de reciclagem. Na via de reciclagem, a pterina-4-carbinolamina é reciclada em dihydrobiopterina quinoide pela enzima pterina-4- α -carbinolamina desidratase (PCD, EC 4.2.1.96) e este produto será enfim transformado em BH₄ pela enzima dihydropteridina quinoide reductase (DHPR, EC 1.5.1.34) (Figura 2) (Himmelreich et al. 2021).

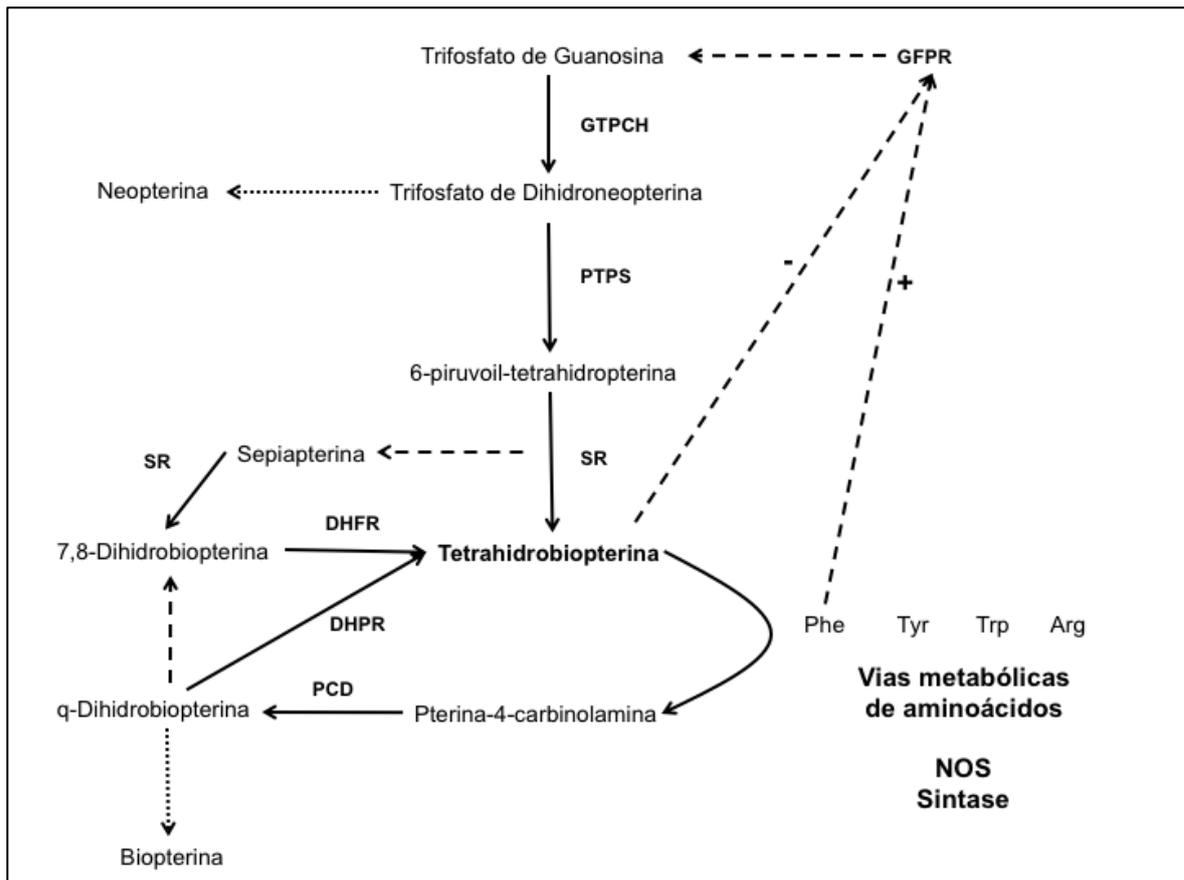


Figura 2. Via metabólica do cofator BH₄, que pode ser obtido de duas formas, através da síntese de novo, onde um sinal de feedback é enviado pela proteína regulatória da GTPCH e inicia-se a síntese da BH₄ a partir de uma molécula de GTP e a via de reciclagem, onde a pterina-4-carbinolamina, produto resultante da ação da BH₄ nas vias metabólicas, é reciclado novamente em BH₄. GFPR: proteína regulatória do *feedback* da GTP ciclohidrolase 1. GTPCH: GTP ciclohidrolase 1. PTPS: 6-piruvil tetrahidropterina sintase. SR: sepiapterina reductase. PCD: pterina-4- α -carbinolamina desidratase. DHPR: dihidropteridina quinóide reductase. DHFR: dihidrofolato redutase. Phe: fenilalanina. Tyr: tirosina. Trp: triptofano. Arg: arginina. NOS: óxido nítrico. Adaptado de Blau and Erlandsen (2004).

Por conta das diferentes enzimas participantes da via metabólica da BH₄, a deficiência de uma destas enzimas leva à deficiência de BH₄ e ainda, podemos classificar a deficiência de BH₄ de acordo com a enzima deficiente (Tabela 2).

As deficiências de BH₄ apresentam manifestações clínicas em comum, como a deficiência de dopamina e o desequilíbrio de outros neurotransmissores como serotonina, norepinefrina ou epinefrina no sistema nervoso central. O diagnóstico diferencial se dá por sintomas como hipotonia, desenvolvimento motor e cognitivo comprometido, distúrbios do movimento (distonias), bradicinesia, rigidez extrapiramidal e instabilidade postural. (Opladen et al. 2020).

Tabela 2. Diferentes fenótipos da deficiência de BH₄ e seus respectivos genes.

Fenótipo	Gene afetado
Deficiência de GTPCH (AR: OMIM #233910 e AD: OMIM #128230)	<i>GCH1</i>
Deficiência de PTPS (OMIM #261640)	<i>PTS</i>
Deficiência de PCD (OMIM #264070)	<i>PCBD1</i>
Deficiência de DHPR (OMIM #261630)	<i>QDPR</i>
Distonia dopa-responsiva devido à deficiência de SR (OMIM #612716)	<i>SPR</i>

AR: Autossômica recessiva. AD: autossômica dominante. Fonte: Opladen et al. (2020).

Todas as formas da deficiência de BH₄ possuem herança autossômica recessiva, com exceção da deficiência de GTPCH, que possui além do padrão de herança autossômico recessivo, o padrão de herança autossômico dominante (Opladen et al. 2020).

A prevalência da deficiência de BH₄ mundial é desconhecida, mas sabe-se que 1-2% dos casos de HPAs genéticas são devido a deficiência de BH₄. Ainda, a enzima que está mais frequentemente alterada é a PTPS, em 54-60% dos casos de deficiência de BH₄, seguido pela deficiência de DHPR (Longo 2009; Opladen et al. 2020). No Brasil, um estudo encontrou 40% dos casos envolvendo a enzima PTPS e relatou a falta de estudos sobre a frequência da deficiência de BH₄ na população brasileira, porém, na região sul do Brasil, a incidência da deficiência de BH₄ é de aproximadamente 1:400.000 e no Estado de Minas Gerais, a frequência é bem menor, 2,1:1.000.000 recém nascidos vivos (Jardim et al. 1994; Souza et al. 2018). Ainda, a deficiência de BH₄ não fazia parte do PNTN, o qual realizava a triagem apenas da fenilcetonúria (Brasil. Ministério da Saúde. 2001). O diagnóstico das deficiências de BH₄ dá-se pela medição das biopterinas e neopterinas na urina e da atividade da DHPR em sangue no papel filtro (Tabela 3) (Blau and van Spronsen 2014).

O tratamento da deficiência de BH₄ usualmente envolve a terapia de reposição com a levodopa e o 5-hidroxitriptofano. Em alguns casos, ácido fólico, agonistas da melatonina e dopamina podem ser necessários para um melhor resultado do tratamento (Opladen et al. 2020).

Tabela 3. Fenótipos da deficiência de BH₄ e seus respectivos biomarcadores diagnósticos.

Fenótipo	Neopterinina	Biopterina	Primapterina	Atividade de DHPR
Deficiência de GTPCH	Diminuída	Diminuída	Não alterada	Não alterada
Deficiência de PTPS	Aumentada	Diminuída	Não alterada	Não alterada
Deficiência de PCR	Aumentada	Diminuída ou normal	Aumentada	Não alterada
Deficiência de DHPR	Normal	Aumentada ou normal	Não alterada	Reduzida

Fonte: Werner et al. (2011); Opladen et al. (2020).

Na Tabela 4, temos um resumo dos genes envolvidos com a deficiência de BH₄ e suas características.

Tabela 4. Relação de genes relacionados com a deficiência de BH₄, suas respectivas enzimas, éxons e número de variantes descritas nos bancos de dados PNDdb e HGMD.

Gene	Enzima	Éxons	Variantes – PNDdb	Variantes - HGMD
<i>GCH1</i>	GTPCH	6	327	272
<i>PTS</i>	PTPS	6	198	134
<i>QDPR</i>	DHPR	7	141	70
<i>SPR</i>	SPR	3	104	31
<i>PCBD1</i>	PCBD	4	32	11
<i>GCHFR</i>	Proteína GTPFR	3	0	0

Fonte: PNDdb (<http://www.biopku.org/>) e Stenson et al. (2017).

Estudos de identificação de variantes patogênicas para deficiência de BH₄ existem em diferentes populações, porém, dados sobre prevalência de variantes patogênicas em populações na literatura foram encontrados somente para populações orientais. O gene *PTS* apresenta variantes patogênicas frequentes na população asiática: p.Asn52Ser, p.Pro87Ser, p.Lys91Arg, p.Asn96Asn e c.84-291A>G. Já as variantes p.Phe20Leu e p.Glu81Glu são específicas nas populações das Filipinas e do Japão (Liu et al. 1998; Thöny and Blau 2006; Chiu et al. 2012; Himmelreich et al. 2021). Variantes patogênicas comuns em pacientes caucasianos não foram detectadas na população chinesa (Liu et al. 1998). Em populações árabes, a deficiência de PTPS é relativamente comum, com a variante p.Met80Val sendo a mais frequente (Almannai et al. 2019). Já na Rússia, a variante patogênica mais comum é p.Thr106Met (32%) (Gundorova et al. 2021). No gene *QDPR*, a variante p.Arg221Ter está presente em 27,8% dos pacientes chineses (Lu et al. 2014). Curiosamente, não foram encontrados relatos de variantes patogênicas

prevalentes nos genes *GCH1*, *PCBD1*, *SPR* e *GCHFR* sugerindo que a maioria das mutações nestes genes sejam privadas entre as famílias (Horvath et al. 2008; Himmelreich et al. 2021).

6.2.1.3 Defeitos no gene *DNAJC12*

O gene *DNAJC12* codifica uma cochaperona pertencente à família HSP40 (*Heat Shock Protein 40*), que é altamente conservada entre todos os organismos. A *DNAJC12* é uma proteína HSP40 do tipo III, também conhecida como proteína da subfamília C, que inclui ao menos 23 membros, e esta possui especificidade para os substratos que são designados para estas proteínas (Kampinga and Craig 2010). HSP40 são também conhecidas como DnaJ, por possuírem um domínio J que é responsável pela ligação e recrutamento de chaperonas da família HSP70/DnaK. A família HSP70 é responsável pelo controle da proteostase celular, como o dobramento de cadeias de proteínas nascentes, importação de proteínas para organelas, além de desempenhar um papel na recuperação de proteínas agregadas e na montagem de múltiplos complexos proteicos (Dekker et al. 2015; Radons 2016). Ao mesmo tempo, a proteína *DNAJC12* também interage com as enzimas PAH (Figura 1), tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, entre outras (Anikster et al. 2017).

A primeira descrição de HPA por deficiência de *DNAJC12* (OMIM #606060) foi feita em 2017 por Anikster e colaboradores e esta é classificada como uma HPA leve e imita a deficiência de BH₄, com perfil normal de pterinas e apresentando sintomas como distúrbios progressivos do movimento, distonia proeminente e déficit cognitivo (Anikster et al. 2017; Blau et al. 2018; van Spronsen et al. 2021).

O gene *DNAJC12* está localizado no cromossomo 10, possui 5 éxons e possui 17 variantes patogênicas descritas no banco de dados HGMD e 18 variantes descritas no banco de dados PNDdb (<http://www.biopku.org/>) (Stenson et al. 2017). Em casos de HPA leve, sem achados bioquímicos e moleculares de PKU ou de deficiência de BH₄, recomenda-se realizar a análise molecular do gene *DNAJC12* (Anikster et al. 2017; Blau et al. 2018).

A proteína *DNAJC12* ainda apresenta indícios de agir como uma modificadora da PKU, levando a estabilização e desestabilização da PAH em diferentes níveis de acordo com a variante apresentada pelo paciente (Gallego et

al. 2020). Esse papel pode explicar as inconsistências na correlação genótipo-fenótipo, bem como, na responsividade ao BH₄. Há evidências de que a DNAJC12 ajuda a melhorar a estabilidade da enzima PAH em pacientes com as variantes patogênicas p.Leu48Ser, p.Ile65Thr e p.Arg261G1, ao contrário do que ocorre com as variantes p.Glu280Lys, p.Leu348Val e p.Val388Met (Gallego et al. 2020). Variantes de troca de sentido de *PAH* levam a diferentes graus de desestabilização conformacional (Gersting et al. 2008).

6.2.2 Distúrbios do metabolismo da leucina, isoleucina e valina

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) são aminoácidos essenciais, importantes para a síntese de proteínas (Conway and Hutson 2016). Porém, diferente de outros aminoácidos, eles não possuem metabólitos únicos, e são metabolizados em metabólitos intermediários comuns. A Leu é cetogênica e irá resultar na formação de acetil CoA e acetoacetado, enquanto a Ile é cetogênica e glucogênica, resultando em succinil CoA (em bactérias, ela irá resultar em propionil CoA). Por serem altamente hidrofóbicos, os BCAAs possuem um papel importante no dobramento de proteínas globulares e na interação entre proteínas de membrana e lipídeos. Um exemplo de sua importância é o motivo zíper de leucina, essencial na interação de proteínas com o DNA. Leu geralmente leva a cadeia proteica a formar α -hélices, enquanto Ile e Val formam folhas β -pregadas (Bender 2012).

Os BCAAs são metabolizados pela via do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDC, EC 1.2.4.4), onde começa com a transaminação da Leu, Ile e Val, resultando nos seus respectivos α -cetoácidos, que são convertidos em suas respectivas CoA pelo BCKDC, e este é regulado pelo PP2Cm (Figura 3) (Brosnan and Brosnan 2006; Conway and Hutson 2016; Sperringer et al. 2017).

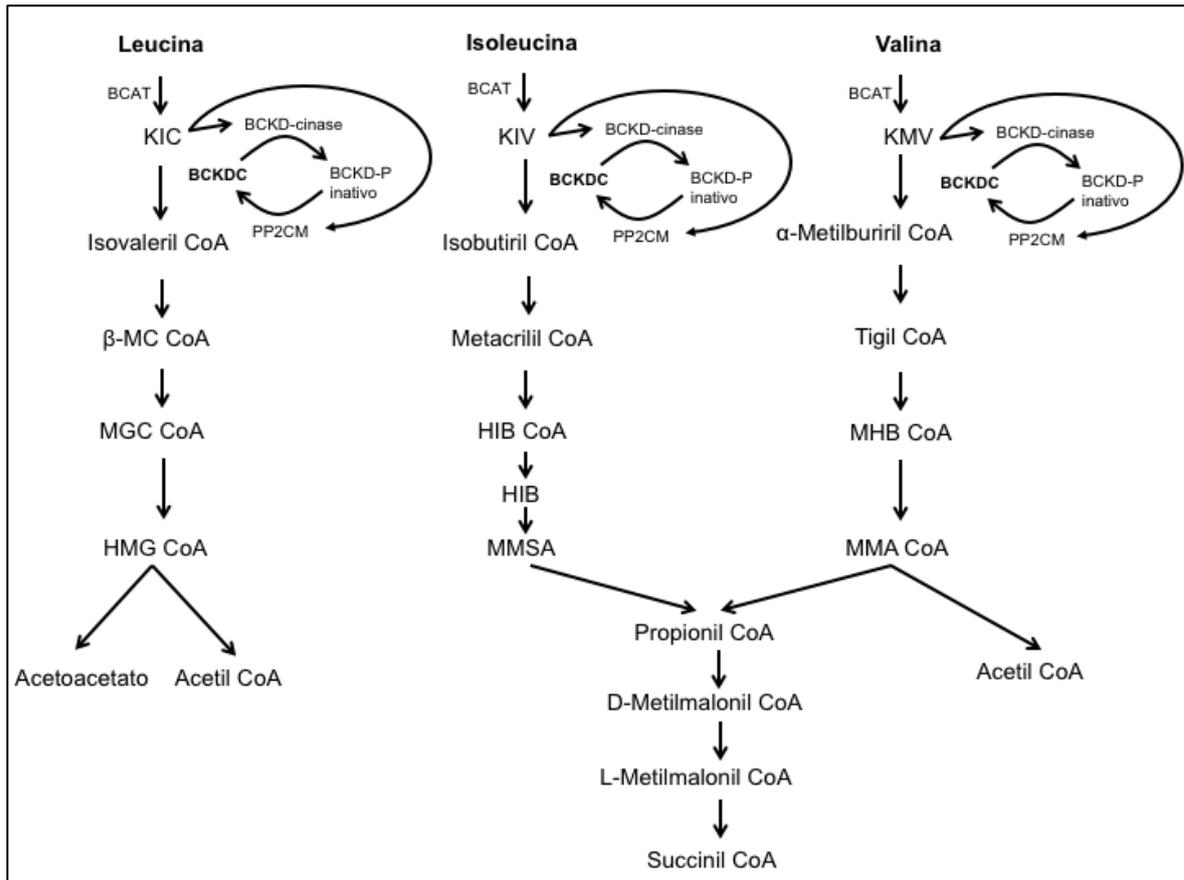


Figura 3. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada Leucina, Isoleucina e Valina. A metabolização destes aminoácidos começa pela transaminação, resultando nos seus respectivos α -cetoácidos. Após, a desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDC), que é regulada pela fosfatase PP2Cm, realiza a conversão destes α -cetoácidos em suas respectivas CoA. Adaptado de (Sperringer et al. 2017).

Defeitos genéticos na via metabólica do BCKDC resultam na Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD, OMIM # 248600) ou numa forma branda de MSUD, causada pela deficiência de PPM1K, o gene da PP2Cm.

6.2.2.1 Doença da Urina do Xarope do Bordo

A MSUD (do inglês *Maple Syrup Urine Disease*) foi descrita pela primeira vez em 1954 por Menkes e colaboradores. Quatro irmãos chamaram-lhes a atenção por apresentarem sintomas neurológicos de severidade progressiva, que se iniciou na primeira semana de vida e resultou no óbito aos três meses do início dos sintomas. Uma característica marcante desta doença, é um cheiro bem similar ao de xarope do bordo na urina dos pacientes e outros sintomas observados foram edema cerebral, convulsões, espasticidade e problemas respiratórios. (MENKES et al. 1954). Com base nisso, a doença passou a ser chamada de doença da urina do

açúcar do bordo. Posteriormente, os pesquisadores vieram a identificar os compostos presentes na urina dos pacientes com MSUD como sendo os BCAAs Leu, Ile e Val e seus correspondentes α -cetoácidos e com isso, a doença também recebeu o nome de leucinose, cetoacidúria de cadeia ramificada ou cetonúria de cadeia ramificada (MENKES 1959).

Em 1960, Dancis e colaboradores demonstraram que o bloqueio que leva a MSUD está localizado na descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. A transaminação dos BCAAs não é afetada e posteriormente, vieram a descobrir que a descarboxilação dos três α -cetoácidos de cadeia ramificada ocorre na mitocôndria, no BCKDC (Dancis et al. 1960; Chuang 1998). A maior parte da atividade dessa via metabólica ocorre no músculo (54-66%), fígado e rins (9-13% em cada), e atividade considerável no cérebro (9-20%) (Mazariegos et al. 2012).

A MSUD ocorre por defeitos na via do BCKDC, que é um complexo proteico composto por três componentes catalíticos: a desidrogenase dos α -cetoácidos (E1), a dihidrolipoil transacilase (E2) e a dihidrolipoamida desidrogenase (E3) (Figura 4). O componente E1 ainda é composto por duas subunidades, a E1 α , que é codificada pelo gene *BCKDHA* que possui 9 éxons e 129 variantes descritas no banco de dados HGMD, e a E1 β , codificada pelo gene *BCKDHB*, com 11 éxons e 160 variantes descritas no HGMD. Ainda, o componente E2 é codificado pelo gene *DBT* (*dihydrolipoamide branched chain transacylase*), com 11 éxons e 95 variantes patogênicas descritas no banco de dados HGMD, e o componente E3, pelo gene *DLD*, que será abordado em outra seção (Stenson et al. 2017; Phipps et al. 2019).

O diagnóstico de MSUD é feito por análise quantitativa através de MS/MS e cromatografia de aminoácidos ou pela análise do biomarcador aloisoleucina. Este biomarcador não é detectado em indivíduos hígidos ou com outras condições clínicas que possam vir a elevar os níveis plasmáticos de BCAA, porém a aloisoleucina muitas vezes não é corretamente detectada em recém-nascidos. Outros testes que podem confirmar o diagnóstico de MSUD são as análises de BCAAs e seus respectivos α -cetoácidos na urina (Phipps et al. 2019). A gravidade da MSUD está relacionada à neurotoxicidade dos aminoácidos acumulados, especialmente a leucina e seu α -cetoácido (Chiong et al. 2016). Uma das consequências do acúmulo de leucina é a hipoglicemia, devido à excessiva

produção de insulina, estimulada por esse aminoácido (Barschak et al. 2008). De outro lado, há pouca toxicidade associada com o aumento dos níveis de isoleucina e valina em comparação com leucina (Brunetti-Pierri et al. 2011).

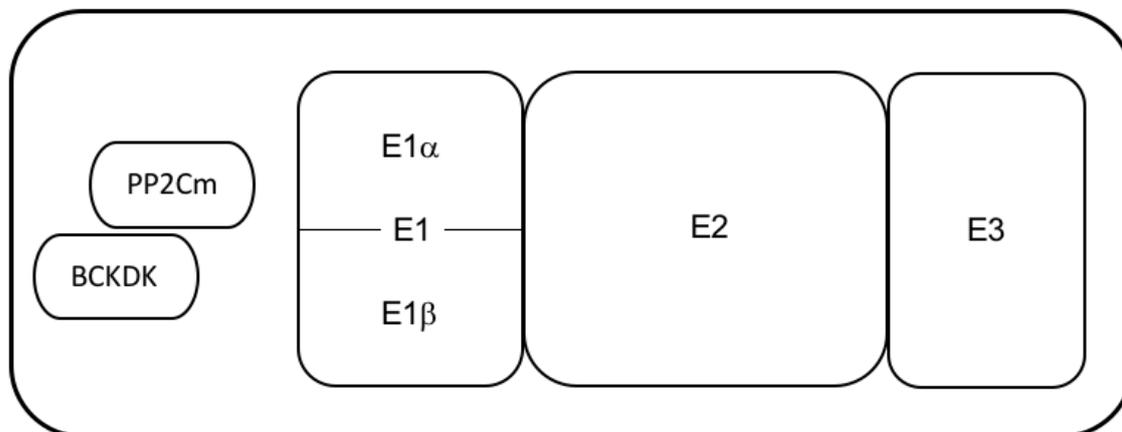


Figura 4. Estrutura do complexo da BCKD, com suas subunidades, a sua fosfatase reguladora e a enzima quinase reguladora. Adaptado de: Chuang (1998); Blackburn et al. (2017).

Até o ano atual, a MSUD não estava incluída no PNTN e por conta disso, vários pacientes possuem diagnóstico tardio e sequelas neurológicas irreversíveis (Brasil. Ministério da Saúde. 2001). A inclusão da MSUD na triagem neonatal vai permitir com que o diagnóstico seja realizado de maneira uniforme no país, evitando subdiagnósticos e atrasos no tratamento (Brasil 2021).

A frequência mundial de MSUD é de 1:185.000 recém nascidos vivos (Chapman et al. 2018), porém, em algumas populações a frequência é muito maior. Por exemplo, nos Antigos Mennonitas a incidência é de 1:358 e na população da Galícia, na Espanha, a incidência é de 1:52.541 recém nascidos vivos (Puffenberger 2003; Couce et al. 2015). Na população brasileira, Herber et al. (2015) relata que há casos não diagnosticados no país e por conta disso, a incidência reportada de MSUD é menor do que a esperada. Não há dados recentes sobre a prevalência de MSUD na população brasileira (Margutti et al. 2020).

A MSUD apresenta duas classificações fenotípicas da doença: a primeira, de acordo com a gravidade fenotípica (Tabela 5) e a segunda, de acordo com o gene defeituoso (Tabela 6).

O fenótipo mais comum e severo de MSUD é o clássico (Phipps et al. 2019). Entre os fenótipos de MSUD, a deficiência de E3 apresenta alguns sintomas

distintos dos demais, sendo causada por defeitos no gene *DLD* e por isso será abordada em uma seção a parte.

Tabela 5. Classificação de MSUD de acordo com o fenótipo e suas manifestações clínicas.

Fenótipo	Manifestações clínicas
Clássico	Início neonatal, cheiro de xarope do bordo (similar ao cheiro de açúcar queimado) no cerúmen e urina, má alimentação, irritabilidade, letargia, opistótono, distonia focal, letargia, coma e falha respiratória central.
Intermediário ou variante	Cheiro de xarope do bordo no cerúmen e urina, atraso no crescimento, má alimentação, irritabilidade, atrasos no desenvolvimento e encefalopatia.
Intermitente	Crescimento e desenvolvimento inicial normal, porém podem ocorrer descompensações episódicas que podem ser graves.
Responsivo à tiamina	Similar ao fenótipo intermitente.
Deficiência de E3	Acidose láctica, atraso no desenvolvimento, com disfunção neurológica de início posterior ou doença hepática isolada em adultos, hipotonia e convulsões.

Fonte: Burrage *et al.* (2014); Conway; Hutson (2016); Strauss; Puffenberger; Morton (2013).

A MSUD ocorre por variantes patogênicas bialélicas nos genes do BCKDC e a herança destas variantes é autossômica recessiva. Excetuando algumas populações onde há efeito fundador, não há registros formais de variantes comuns da MSUD na população brasileira, apenas em populações específicas como os Antigos Mennonitas e os Judeus Ashkenazis (Edelmann *et al.* 2001; Kuhl *et al.* 2017; Margutti *et al.* 2020). Entre os genes do BCKDC, a maioria das variantes patogênicas reportadas concentra-se no gene *BCKDHB*, seguido pelo gene *BCKDHA* e pelo gene *DBT*, padrão observado na população brasileira também (Nellis and Danner 2001; Henneke *et al.* 2003; Park *et al.* 2011; Margutti *et al.* 2020). A única exceção reportada foi na coorte de 30 pacientes portugueses, onde o gene *BCKDHA* foi o mais frequentemente mutado, seguido pelo gene *DBT* e pelo *BCKDHB* (Quental *et al.* 2008).

O tratamento para a MSUD é uma dieta com a redução de BCAAs na alimentação e suplementação com fórmula contendo tiamina e livre de BCAAs, de

forma a manter os níveis plasmáticos dentro do estipulado pelo tratamento: Leu entre 75-200 $\mu\text{Mol/L}$ em pacientes <5 anos e 75-300 $\mu\text{Mol/L}$ nos pacientes <5 anos; Ile e Val entre 200-400 $\mu\text{Mol/L}$ (Frazier et al. 2014; Herber et al. 2015). Conforme a fase da doença, o tratamento pode variar, sendo a fase aguda a que exige um tratamento mais agressivo, visando à redução dos níveis de leucina (Herber et al. 2015).

Tabela 6. Classificação fenotípica de MSUD de acordo com o gene afetado.

Fenótipo	Gene afetado
E1 α ou IA	<i>BCKDHA</i>
E1 β ou IB	<i>BCKDHB</i>
E2 ou II	<i>DBT</i>
E3 ou III	<i>DLD</i>
IV ou cinase	<i>BCKDK</i>
V ou fosfatase PP2Cm	<i>PPM1K</i>

Fonte: Chuang (1998).

Quando o paciente apresenta alterações no gene que codifica o componente E2, ele pode apresentar responsividade à tiamina, de acordo com o seu genótipo e quando há a responsividade, o paciente deve receber a correta suplementação desta vitamina na dieta (Frazier et al. 2014; Phipps et al. 2019). Há ainda alguns genótipos associados com formas severas da doença, porém há estudos reportando dificuldades no estabelecimento de associações genótipo-fenótipo, e mesmo pacientes que em teoria deveriam apresentar responsividade à tiamina não se mostraram responsivos (Flaschker et al. 2007; Gupta et al. 2015).

Entre as alternativas para tratamento da MSUD está o fenilbutirato de sódio, que pode ser utilizado como um adjuvante que leva ao aumento do fluxo residual na via BCKDC, alterando a enzima E1, e a administração de norleucina, a qual supõe-se que inibe a atividade da transaminase de cadeia longa, além de competir com a leucina na passagem pela barreira hematoencefálica (Zinnanti et al. 2009; Brunetti-Pierri et al. 2011). Em modelos animais, ainda, a administração de antioxidantes mostra melhorias na perda de memória geralmente associada ao estresse oxidativo causado pelo acúmulo dos metabólitos da MSUD (Scaini et al. 2012). O estresse oxidativo na MSUD também pode ser tratado através da L-carnitina, sendo uma potencial terapia adjuvante para a doença (Mescka et al.

2011). No entanto, os tratamentos acima ainda não estão disponíveis no país. Existe também a possibilidade de transplante hepático, a qual já é uma realidade no Brasil, utilizado principalmente em pacientes com frequentes descompensações metabólicas, as quais podem ocorrer independente da adesão ao tratamento. Pacientes que foram submetidos ao transplante hepático apresentam melhoras nos níveis de BCAAs e aumento na tolerância para a leucina. A efetividade do transplante mostra que, prover de 9 a 13% da atividade do complexo do BCKAD é suficiente para levar a homeostase dos BCAAs (Badell et al. 2013). O ponto chave desse tratamento é a possibilidade de transplante dominó: os pacientes com MSUD podem doar seu fígado para outros pacientes que estejam na fila para transplante hepático, de acordo com a compatibilidade. Isso faz com que outros pacientes não portadores de MSUD sejam beneficiados com esta opção terapêutica (Burrage et al. 2014). No entanto, Mazariegos *et al.* (2012) reportam que o transplante hepático não reverte os danos neurológicos causados pela doença.

6.2.2.2 Deficiência de E3 e o Gene *DLD*

A deficiência de E3 foi descrita primeiramente por Robinson et al. (1977) e resulta em deficiência de desidrogenase dos cetoácidos combinada, sendo o mais severo dos fenótipos de MSUD (Chuang et al. 2006).

A enzima dihidrolipoamida desidrogenase, que compõe a subunidade E3 do BCKDC é codificada pelo gene *DLD* (*dihydrolipoamide dehydrogenase*). Esta enzima, além de ser um componente comum do BCKDC, faz parte do complexo da piruvato desidrogenase e do complexo da desidrogenase do α -cetoglutarato (Chuang et al. 2006). Variantes patogênicas neste gene levam a deficiência de E3 (OMIM #248600). Esta deficiência é extremamente rara e seu fenótipo apresenta algumas características que o diferem do quadro geral de MSUD, como acidose láctica, hipoglicemia e síndrome de Leigh (Ambrus and Adam-Vizi 2018).

O gene *DLD* caracteriza-se por possuir 14 éxons e 30 variantes patogênicas descritas no banco de dados HGMD (Stenson et al. 2017). A taxa de carreadores da deficiência de E3 é em judeus Ashkenazi, 1:94-1:110 e a frequência da doença é de 1:35.000-1:48.000 (Scott et al. 2010).

6.2.2.3 PP2Cm e o Gene *PPM1K*

O gene *PPM1K* codifica uma proteína fosfatase 1K dependente de Mg^{2+}/Mn^{2+} que também é conhecida como PP2Cm, proteína fosfatase mitocondrial tipo 2C (Pan et al. 2015). A proteína PP2Cm está exclusivamente localizada na fração solúvel da matriz mitocondrial e modula o funcionamento dessa organela, bem como, a abertura da permeabilidade do poro de transição da membrana mitocondrial, que é crítico na regulação da morte celular (Lu et al. 2009). Tanto que a perda da PP2Cm leva a apoptose e ao desenvolvimento cardíaco anormal em *zebrafish* (Lu et al. 2007). Além de sua função de fosfatase do BCKDC, a PP2Cm é um regulador chave no catabolismo dos BCAAs, interagindo com a subunidade E2 (Figura 3) (Zhou et al. 2012).

O gene *PPM1K* possui 7 éxons e têm atualmente 4 variantes patogênicas descritas no banco de dados HGMD (Stenson et al. 2017). Polimorfismos (SNPs) na sequência codificadora de *PPM1K* podem alterar significativamente a atividade desta fosfatase ou a responsividade do BCKD (Zhou et al. 2012). Variantes patogênicas neste gene podem ainda causar uma forma leve de MSUD (OMIM #611065), bem como, levar a um aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio e assim ativar cascatas específicas de sinalização celular de estresse (Oyarzabal et al. 2013).

6.3 Transportador LAT1

Os aminoácidos neutros longos (LNAAs) são fenilalanina, tirosina, triptofano, treonina, metionina, valina, isoleucina, leucina e histidina (van Spronsen et al. 2009). O transporte dos LNAAs para o cérebro pela barreira hematoencefálica e placenta ocorre através do transportador de aminoácidos neutros independente de sódio e pH LAT1, que é codificado pelo gene *SLC7A5*. LAT1 pertence à família 7 dos carreadores de solutos (SLC7), família esta que possui 15 membros em humanos, dois dos quais são pseudogenes. As 13 proteínas desta família são classificadas em dois subgrupos, os transportadores de aminoácidos catiônicos e as subunidades *light* (LATs) dos transportadores de aminoácidos heterodiméricos (Scalise et al. 2018).

O sistema heterodímero possui duas subunidades, uma subunidade leve, LAT1, e uma subunidade pesada, CD98, que é codificada pelo gene *SLC3A2*. Este

sistema realiza o transporte de Histidina, Isoleucina, Metionina, Cisteína, Valina, Leucina, Treonina, Fenilalanina, Tirosina e Triptofano, bem como, catalisa o transporte dos hormônios da tireóide T3 e T4, do precursor da dopamina, L-DOPA, bem como de compostos exógenos que são relacionados com aminoácidos, como as drogas melfalano, baclofeno e gabapentina (Prasad et al. 1999; Napolitano et al. 2017; Scalise et al. 2018).

Com 10 éxons, o gene *SLC7A5* possui 7 variantes patogênicas descritas no banco de dados HGMD (Stenson et al. 2017). Apesar de existirem estudos envolvendo o LAT1 e PKU, ainda não está muito clara a correlação entre variantes no gene *SLC7A5* e PKU, visto que nenhuma das variantes identificadas alteraram os resíduos de aminoácidos ou levaram a formação de novos sítios de *splicing* em pacientes com PKU (Zhang et al. 2020). Entretanto, Bik-Multanowski et al. (2021) relatam que o polimorfismo rs113883650 pode influenciar na quantidade de Phe no cérebro de pacientes com PKU, podendo ser um dos fatores responsáveis pela diferença interindividual da vulnerabilidade cerebral a toxicidade por Phe, porém estudos em grupos maiores de pacientes são necessários para que esta hipótese seja comprovada.

7 JUSTIFICATIVA

Os EIMs são doenças genéticas onde uma enzima defeituosa leva ao acúmulo do substrato e a ausência do seu produto, sendo este substrato muitas vezes neurotóxico. O diagnóstico dos EIMs de aminoácidos é feito usualmente pela medida dos aminoácidos, de um biomarcador ou de moléculas correspondentes no sangue ou na urina dos pacientes, através de MS/MS, método considerado o padrão ouro.

Para os EIMs, em especial as aminoacidopatias, o diagnóstico precoce é de extrema importância, pois os sintomas neurológicos são irreversíveis e o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, a fim de evitar o desenvolvimento e progressão destes sintomas. Ainda, vários EIMs têm sintomas clínicos similares e métodos diagnósticos que permitam a análise de múltiplas doenças podem vir a ser importantes para que haja um ganho de tempo nesse processo e conseqüentemente, conclusão da saga da investigação, um processo que pode vir a ocorrer com algumas doenças genéticas. Os painéis gênicos oferecem uma oportunidade de se analisar mais de 100 doenças em uma única rodada e ainda, a pesquisa molecular pode ter um papel complementar com o diagnóstico bioquímico, sendo que a incorporação do MPS no algoritmo de diagnóstico pode aumentar a acurácia desse processo (Reid et al. 2016; Ghosh et al. 2017).

No caso das deficiências de BH₄, não há a realização no Brasil da medição da atividade de DHPR e da biopterina e neopterina. Já na MSUD, não há a medição da aloisoleucina disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) ou no Serviço de Informações sobre Erros Inatos do Metabolismo e na Rede Doença da Urina do Xarope do Bordo, e o diagnóstico é feito pela medição dos níveis de Leu e Val no sangue e pela medição dos ácidos orgânicos na urina.

Apesar de o padrão ouro ser o diagnóstico bioquímico, alternativas para o diagnóstico são importantes. A análise do genótipo permite a obtenção de mais informações sobre os fenótipos das doenças, bem como, alternativas de tratamento no caso dos pacientes com genótipo responsivo ao BH₄. No entanto, a análise genética pelo método de sequenciamento automatizado de Sanger, apesar de ser considerado o padrão ouro para análises genéticas, é extremamente laborioso e

custoso (Cao et al. 2014). Metodologias que possibilitem a análise de múltiplos genes, como o sequenciamento massivo paralelo (MPS), são úteis para que a análise possa ser realizada de maneira menos onerosa, rápida e eficaz. Abordagens dirigidas de análise genômica como os painéis gênicos permitem que a sensibilidade do método diagnóstico aumente (Remec et al. 2021).

Ainda, variantes patogênicas pouco descritas ou não descritas devem ser analisadas de forma criteriosa, a fim de classificá-las da melhor forma, principalmente com os critérios do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG), descritos em Richards et al. (2015).

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivos Gerais

- I. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com fenilcetonúria;
- II. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com deficiência de tetrahydrobiopterina;
- III. Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com doença da urina do xarope do bordo.

8.2 Objetivos específicos

- i) Caracterizar as variantes presentes no gene *PAH*, causador de fenilcetonúria, em uma amostra de pacientes brasileiros;
- ii) Realizar a associação das alterações moleculares observadas no fenótipo de pacientes com fenilcetonúria com o desfecho de responsividade à tetrahydrobiopterina;
- iii) Caracterizar as variantes presentes nos genes *PTS*, *GCH1*, *QDPR*, *PCBD*, *GCHFR* e *SPR* causadores das deficiências de tetrahydrobiopterina em pacientes brasileiros;
- iv) Realizar a associação entre os genótipos e os fenótipos da deficiência de tetrahydrobiopterina;
- v) Determinar as variantes presentes nos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* em uma amostra de pacientes brasileiros com MSUD;
- vi) Caracterizar a associação entre genótipo e fenótipo de pacientes com MSUD.

9 **CAPÍTULO 1 - Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients**

Artigo publicado na revista Genes (Basel).

Citação: **Tresbach RH**, Sperb-Ludwig F, Ligabue-Braun R, Tonon T, de Oliveira Cardoso MT, Heredia RS, da Silva Rosa MTA, Martins BC, Poubel MO, da Silva LCS et al. (2021) Phenylketonuria diagnosis by massive parallel sequencing and genotype-phenotype association in brazilian patients. Genes (Basel) 12:1–12. doi: 10.3390/genes12010020

Article

Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients

Rafael Hencke Tresbach ^{1,2}, Fernanda Sperb-Ludwig ^{1,2,*}, Rodrigo Ligabue-Braun ^{3,4}, Tássia Tonon ^{1,5}, Maria Teresinha de Oliveira Cardoso ^{6,7,8}, Romina Soledad Heredia ^{6,7}, Maria Teresa Alves da Silva Rosa ^{6,7}, Bárbara Cátia Martins ^{6,7}, Monique Oliveira Poubel ^{6,7}, Luiz Carlos Santana da Silva ⁹, François Maillot ¹⁰ and Ida Vanessa Doederlein Schwartz ^{1,2,5,11,12}

- ¹ BRAIN Laboratory (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil; tresbach@gmail.com (R.H.T.); tassitonon@gmail.com (T.T.); idadschwartz@gmail.com (I.V.D.S.)
 - ² Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil
 - ³ Graduate Program in Biological Sciences (PPGBio), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil; ligabue.braun@gmail.com
 - ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil
 - ⁵ Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil
 - ⁶ Serviço de Triagem Neonatal de Brasília, Brasília, DF 70684-831, Brazil; doencasraras.ses@gmail.com (M.T.d.O.C.); romina.rh@gmail.com (R.S.H.); mariateresagene@yahoo.com.br (M.T.A.d.S.R.); barbaracatiam@gmail.com (B.C.M.); monolivepoubel@gmail.com (M.O.P.)
 - ⁷ Hospital de Apoio de Brasília, Unidade de Genética, Brasília, DF 70684-831, Brazil
 - ⁸ Faculdade de Medicina, Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF 71966-700, Brazil
 - ⁹ Laboratory of Inborn Errors of Metabolism, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil; lcass@ufpa.br
 - ¹⁰ CHRU et université de Tours, INSERM 1253 "iBrain", 37032 Tours, France; francois.maillot@univ-tours.fr
 - ¹¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil
 - ¹² Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil
- * Correspondence: fsperb@hcpa.edu.br



Citation: Tresbach, R.H.; Sperb-Ludwig, F.; Ligabue-Braun, R.; Tonon, T.; de Oliveira Cardoso, M.T.; Heredia, R.S.; da Silva Rosa, M.T.A.; Martins, B.C.; Poubel, M.O.; da Silva, L.C.S.; et al. Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients. *Genes* **2021**, *12*, 20. <https://dx.doi.org/10.3390/genes12010020>

Received: 27 November 2020

Accepted: 22 December 2020

Published: 25 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Phenylketonuria (PKU) is a common inborn error of amino acid metabolism in which the enzyme phenylalanine hydroxylase, which converts phenylalanine to tyrosine, is functionally impaired due to pathogenic variants in the *PAH* gene. Thirty-four Brazilian patients with a biochemical diagnosis of PKU, from 33 unrelated families, were analyzed through next-generation sequencing in the Ion Torrent PGM™ platform. Phenotype–genotype correlations were made based on the BioPKU database. Three patients required additional Sanger sequencing analyses. Twenty-six different pathogenic variants were identified. The most frequent variants were c.1315+1G>A ($n = 8/66$), c.473G>A ($n = 6/66$), and c.1162G>A ($n = 6/66$). One novel variant, c.524C>G (p.Pro175Arg), was found in one allele and was predicted as likely pathogenic by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria. The molecular modeling of p.Pro175Arg indicated that this substitution can affect monomers binding in the PAH tetramer, which could lead to a change in the stability and activity of this enzyme. Next-generation sequencing was a fast and effective method for diagnosing PKU and is useful for patient phenotype prediction and genetic counseling.

Keywords: next-generation sequencing; molecular diagnosis; phenylketonuria; phenylalanine hydroxylase; *PAH*

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU, OMIM #261600) is an autosomal recessive inborn error of metabolism in which the conversion of phenylalanine (Phe) to tyrosine by the phenylalanine hydroxylase (EC 1.14.16.1) is defective, resulting in partial or total inactivity of the conversion due to biallelic variants in the *PAH* gene [1]. Untreated Phe accumulation leads to irreversible neurological effects, such as impaired cognitive development in children and seizures [2].

The treatment for PKU consists of Phe-free dietary management and supplementation with the Phe-free metabolic formula [3,4]. The use of sapropterin dihydrochloride may be also recommended for tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsive patients [5].

In Brazil, the public health system neonatal screening program performs biochemical screening for PKU by the detection of Phe in dried blood spots (DBS). If the results are abnormal, an additional blood sample is requested to confirm the diagnosis and begin treatment. The confirmatory test includes the measurement of blood Phe and tyrosine concentrations [6].

The *PAH* gene comprises 13 exons and 12 introns, resulting in a 452-residue protein. Worldwide, about 1188 variants in the *PAH* gene have been described in the PAHvdb (<http://www.biopku.org>) and about 1013 variants in the Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [7]. The molecular investigation is sometimes the key to concluding the diagnosis of PKU and, consequently, assists in improving the treatment. The gold standard for gene variant detection in PKU patients is Sanger sequencing, which is costly and time-consuming [8]. Next-generation sequencing allows massive parallel deep-level sequencing, i.e., analyzing the entire exome or a targeted gene panel, which results in increased diagnostic sensitivity, faster sequencing and an inexpensive process [9]. *PAH* genotype data can be used for the prediction of BH₄ responsiveness [9].

This study aimed to perform a molecular diagnosis of Brazilian PKU patients through massive parallel sequencing to confirm the diagnosis and obtain new data that can improve the choice of treatment for some patients.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

A total of 34 (33 nonrelated) nonconsanguineous PKU patients were recruited (female = 18, classic PKU = 22, mild PKU = 10, and undefined PKU type = 2), of whom 7 had complete previous genotyping, and 7 had incomplete previous genotyping. Of the total cohort, 23 patients were seen at the HCPA Medical Genetics Service (Porto Alegre, Rio Grande do Sul-RS, Brazil), and 11 were seen at the Hospital de Apoio de Brasília Neonatal Service on Newborn Screening, Genetics Unit (Distrito Federal-DF, Brazil).

For the patients from RS, a BH₄ deficiency was previously excluded by the measurement of 6,7-dihydropteridine reductase (DHPR) activity in the blood or DBS and of biopterins and neopterins in urine or DBS. Information such as the Phe level at diagnosis, age at diagnosis, age at treatment initiation, BH₄ responsiveness [10,11], and previous genotyping diagnosis of the patients were obtained retrospectively from the medical records.

2.2. DNA Extraction and Sequencing

Total blood samples were collected, and DNA extraction was performed with an Easy-DNA gDNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were quantified in Qubit (Thermo Fisher Scientific).

A targeted gene panel was designed using the Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific) to include all the exonic regions and intron–exon boundaries of the *PAH* gene and of the genes causing BH₄ deficiencies (*GCH1*, *GCHFR*, *PTS*, *PCBD1*, *QDPR*, and *SPR*). Genomic DNA libraries were prepared using an Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific), followed by purification with magnetic beads (AMPure beads). The samples were sequenced in an Ion Torrent PGM Platform (Thermo Fisher Scientific, server

version 5.0, Waltham, MA, USA), with a minimal coverage of 250X at the Unidade de Pesquisa Laboratorial (Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Massive parallel sequencing data were analyzed using Torrent Suite 5.0.5 (Thermo Fisher Scientific) to perform the base-calling procedure. IGV 2.8.2 [12] was used for detection of the depth of sequencing and coverage failures that could suggest deletions. Variants were filtered by Enlis Genome Research (Enlis Genomics, Berkeley, CA, USA) and Ion Reporter software (Thermo Fisher Scientific), as well as the following databases: ClinVar, Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific (PAHvdb) [9], and Human Gene Mutation Database.

Novel, conflicting and phase undetermined variants were confirmed by automated Sanger sequencing in an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The results were analyzed in Chromas 2.6.1 (Technelysium, South Brisbane, Australia), and NM_000277.3 and NP_000268.1 were used as the reference sequences.

Previous genotypes were identified through the Sanger sequencing method.

2.3. Pathogenicity Determination and Prediction

To determine the pathogenicity of the novel variant, the following variables were considered: allele frequency < 1% in gnomAD [13] and ABraOM [14]. The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines for interpreting variants were used [15].

2.4. Genotype–Phenotype Analysis

Genotype–phenotype associations were made through BioPKU database entries [16] and biochemical classification (classic, mild, or undefined PKU), as previously described by Nalin et al. [17], using as the main criteria the Phe level at diagnosis (classic: >1200 $\mu\text{Mol/L}$ and mild: 360–1200 $\mu\text{Mol/L}$).

2.5. Molecular Modeling

The tridimensional structure of wild-type phenylalanine hydroxylase was taken from Protein Data Base (PDB) ID 6HYC [18], which also served as a template for tetramer reconstruction. The point mutations were modeled with DeepView [19], while the frameshift and early stop codon variants were modeled with I-TASSER [20]. FoldX 5.0 (AnalyseComplex command) was used to inspect the possible differences in binding affinity between monomers in the PAH tetramer. The differences between the energies of the mutant and wild-type proteins ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{mut}} - \Delta G_{\text{wt}}$) were considered significant above 1.6 kcal/mol. This value corresponds to twice the intrinsic standard deviation of FoldX [21] and should significantly affect the stability of the variant [22].

3. Results

The clinical, biochemical, and genotypic results are presented in Table 1. The sample's median age at diagnosis was 37 [interquartile (IQ) 27–60] days. For the RS patients, the median age at diagnosis was 81.4 (IQ 26.5–88) days and 41 (IQ 34–45.5) days for the DF patients.

Table 1. Summary of the included phenylketonuria (PKU) patients, including genotypes and clinical information.

Patient	State	Gender	First Phe Level (μMol/L)	Age at Diagnosis (Days)	Age at Treatment Starting (Days)	Type of PKU	NGS Genotype	Previous Genotype	Type of PKU According to BioPKU ¹	BH4 Responsiveness According to the Test	BH4 Responsiveness According to BioPKU ²
1 *	RS	F	1566	26	26	C	c.1222C>T(;)1222C>T p.Arg408Trp(;)Arg408Trp	c.1222C>T(;)1222C>T p.Arg408Trp(;)Arg408Trp	Classic (1832/1845)	NP	No (95/98) Yes (2/98) Slow (1/98)
2 **	RS	M	847	28	58	M	c.524C>G(;)754C>T p.(Pro175Arg(;)Arg252Trp	c.754C>T(;)? p.Arg252Trp(;)?	NA	No ****	NA
3	RS	F	1784	36	36	C	c.1042C>G(;)1315+1G>A p.Leu348Val(;)?	c.1042C>G(;)1315+1G>A p.Leu348Val(;)?	Classic (11/16)	NP	No (5/6)Yes (1/6)
4	RS	F	1478	43	43	C	c.932T>C(;)1315+1G>A p.Leu311Pro(;)?	c.1315+1G>A(;) p.?(;)?	Classic (2/2)	NP	NA
5	RS	M	417	28	50	M	c.1162G>A(;)1169A>G p.Val388Met(;)Glu390Gly	c.1162G>T(;)? p.Val388Met(;)?	Mild (8/12)	NP	Yes (11/11)
6	RS	F	375	32	66	M	p.Gln355_Tyr356insGlyLeuGln (;)Glu390Gly	NP	Mild (8/14)	NP	Yes (8/8)
7 **	RS	M	NA	60	60	U	c.842+1G>A(;)1162G>A p.(?)Val388Met	c.842+1G>A(;)1162G>Ap.? (;)Val388Met	NA	No ****	NA
8	RS	F	562	74	82	M	c.1169A>G(;)1222C>T p.Glu390Gly(;)Arg408Trp	NP	Mild (54/84)	Yes	Yes (23/23)
9	RS	M	1845	102	102	M	c.722G>A(;)1222C>T p.Arg241His(;)Arg408Trp	c.1222C>T(;)1222C>T p.Arg408Trp(;)Arg408Trp	Mild (25/28)	No *****	Yes (3/6) Slow (2/6) No (1/6)
10 *	RS	M	877	128	156	M	c.473G>A(;)1162G>A p.Arg158Gln(;)Val388Met	c.1162G>A(;)? p.Val388Met(;)?	Classic (5/7)	No	Yes (2/3) Slow (1/3)
11 ***	RS	M	1022	195	292	M	c.[1241A>G];[1042C>G] p.[Leu348Val];[Tyr414Cys]	NP	Mild (4/5)	Yes ****	Yes (3/3)
12	RS	F	3245	5	44	C	c.745C>T(;)838G>A p.Leu249Phe(;)Glu280Lys	NP	Classic (1/1)	NP	NA
13	RS	F	1361	15	19	C	c.754C>T(;)1222C>T p.Arg252Trp(;)Arg408Trp	c.1222C>T(;)? p.Arg408Trp(;)?	Classic (103/103)	NP	No (4/4)
14 ***	RS	F	1736	16	16	C	c.[473G>A];[1055delG] p.[Arg158Gln];[Gly352ValfsTer48]	NP	Classic (1/1)	NP	NA
15	RS	F	2329	24	24	C	c.712A>C(;)814G>T p.Thr238Pro(;)Gly272Ter	NP	Classic (1/1)	NP	NA
16	RS	M	2716	27	27	C	c.194T>C(;)472C>T p.Ile65Thr(;)Arg158Trp	c.194T>C(;) p.Ile65Thr(;)?	Classic (2/2)	NP	No (1/1)
17	RS	M	1697	30	30	C	c.754C>T(;)1024delG p.Arg252Trp(;)Ala342HisfsTer58	NP	NA	NP	NA
18 **	RS	F	2178	27	48	C	c.754C>T(;)1315+1G>A p.Arg242Trp(;)?	c.1315+1G>A(;) p.?(;)?	Classic (9/9)	NP	No (1/1)
19	RS	M	2904	73	101	M	c.473G>A(;)1162G>A p.Arg158Gln(;)Val388Met	NP	Classic (5/7)	NP	No (2/3) Slow (1/3)

Table 1. Cont.

Patient	State	Gender	First Phe Level (μMol/L)	Age at Diagnosis (Days)	Age at Treatment Starting (Days)	Type of PKU	NGS Genotype	Previous Genotype	Type of PKU According to BioPKU ¹	BH4 Responsiveness According to the Test	BH4 Responsiveness According to BioPKU ²
20	RS	M	2323	4	17	C	c.1222C>T(;)1315+1G>A p.Arg408Trp(?)	c.1222C>T(;)1315+1G>A p.Arg408Trp(?)	Classic (265/265)	NP	No (40/40)
21	RS	M	2081	227	233	C	c.473G>A(;)1315+1G>A p.Arg158Gln	NP	Classic (29/29)	No ****	No (6/6)
22.1 ****	RS	M	1455	670	670	C	c.782G>A(;)1315+1G>A p.Arg261Gln(?)	c.782G>A(;)1315+1G>A p.Arg261Gln(?)	Classic (47/66)	No ****	No (24/25) Slow (1/25)
22.2 ****	RS	M	2196	2555	2677	C	c.782G>A(;)1315+1G>A p.Arg261Gln(?)	c.782G>A(;)1315+1G>A p.Arg261Gln(?)	Classic (47/66)	No ****	No (24/25) Slow (1/25)
23	DF	M	1978	39	39	C	c.754C>T(;)1066-11G>A p.Arg252Trp(; Gln355_Tyr356insGlyLeuGln	NP	Classic (19/19)	No	No (6/6)
24	DF	M	1857	18	22	C	c.168+5G>A(;)782G>A p.?(;)Arg261Gln	NP	Mild (4/5)	Slow	Yes (2/2)
25	DF	M	768	47	47	M	c.184delC(;)1169A>G p.Leu62Ter(;)Glu390Gly	NP	NA	Yes	NA
26	DF	F	344	41	41	M	c.184delC(;)1169A>G p.Leu62Ter(;)Glu390Gly	NP	NA	Yes	NA
27	DF	F	3133	38	38	C	c.1066-11G>A(;)1066-11G>A p.Gln355_Tyr356insGlyLeuGln(;)Gln355_Tyr356insGlyLeuGln	NP	Classic (420/427)	Yes	No (107/114) Slow (7/114)
28	DF	F	1724	41	41	C	c.728G>A(;)728G>A p.Arg243Gln(;)Arg243Gln	NP	Classic (140/141)	No	No (13/14) Slow (1/14)
29	DF	F	1936	44	44	C	c.441+5G>T(;)473G>A p.Arg158Gln(?)	NP	Classic (20/21)	No	No (9/12) Slow (3/12)
30	DF	F	2299	22	22	C	c.184delC(;)184delC p.Leu62Ter(;)Leu62Ter	NP	NA	No	NA
31	DF	F	1754	57	57	C	c.473G>A(;)782G>A p.Arg158Gln(;)Arg261Gln	NP	Mild (21/36)	Yes	Yes (8/13) No (4/13) Slow (1/13)
32	DF	F	NA	60	NA	U	c.1162G>A(;)1162G>A p.Val388Met(;)Val388Met	NP	Classic (23/41)	Yes	Yes (9/15) No (4/15) Slow (2/15)
33	DF	F	1361	30	30	C	c.782G>A(;)1315+1G>A p.Arg261Gln(?)	NP	Classic (47/66)	Yes	No (24/25) Slow (1/25)

Notes: In bold: novel variant, NP: not performed, NA—not available, C: classic, M: mild, and U: undefined. ¹—The most frequent type in the BioPKU database. ²—The most frequent responsiveness phenotype informed of in the BioPKU. *—This patient had genotype validation by Sanger sequencing; ** These patients were previously described in [23]. *** Allelic phase confirmed by parents' analysis. **** These patients are siblings. ***** The BH4 responsiveness results were described by [10]. ***** The BH4 responsiveness results were described by [11]. NGS: next-generation sequencing.

A total of 26 different pathogenic variants were found in the *PAH* gene (Table 2). One was a novel variant c.524C>G (p.Pro175Arg), five were located at the intron–exon boundaries, and twenty were found in exonic regions (Figure 1). The majority ($n = 6$) of the pathogenic variants were found in exon 7. For the other BH₄ metabolism-related genes, no pathogenic variants were found.

Table 2. Variants found in 33 unrelated PKU patients, their references, and American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification.

Allele	Protein	Location	Reference	ACMG	Effect
c.168+5G>A	p.?	I 2	[24]	PP5	VUS
c.184delC	p.Leu62Ter	E 3	[25]	PVS1, PM2, PP3, PM4	Pathogenic
c.194T>C	p.Ile65Thr	E 3	[26]	PS3, PP2, PP5	Likely pathogenic
c.441+5G>T	p.?	I 4	[24]	PP5	VUS
c.472C>T	p.Arg158Trp	E 5	[27]	PS1, PP2, PP3, PP5	Likely pathogenic
c.473G>A	p.Arg158Gln	E 5	[28]	PS1, PP2, PP3, PP5	Likely pathogenic
c.524C>G	p.(Pro175Arg)	E 6	This article	PM2, PM5, PP2, PP3	Likely pathogenic
c.712A>C	p.Thr238Pro	E 7	[29]	PM2, PP2, PP3, PP5	VUS
c.722G>A	p.Arg241His	E 7	[30]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.728G>A	p.Arg243Gln	E 7	[31]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.745C>T	p.Leu249Phe	E 7	[32]	PS1, PP2, PP3, PP5	Likely pathogenic
c.754C>T	p.Arg252Trp	E 7	[33]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.782G>A	p.Arg261Gln	E 7	[33]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.814G>T	p.Gly272Ter	E 7	[34]	PVS1, PM4, PP3, PP5	Pathogenic
c.838G>A	p.Glu280Lys	E 7	[35]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.842+1G>A	p.?	I 7	[36]	PVS1, PP5	VUS
c.932T>C	p.Leu311Pro	E 9	[37]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.1024delG	p.Ala342HisfsTer58	E 10	[38]	PVS1, PM2, PM4, PP3, PP5	Pathogenic
c.1042C>G	p.Leu348Val	E 10	[26]	PS3, PP2, PP3, PP5	Likely pathogenic
c.1055delG	p.Gly352ValfsTer48	E 10	[39]	PVS1, PM4, PP3, PP5	Pathogenic
c.1066-11G>A	p.Gln355_Tyr356insGlyLeuGln	I 10	[40]	PS3, PP5	VUS
c.1162G>A	p.Val388Met	E 11	[41]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.1169A>G	p.Glu390Gly	E 11	[42]	PS3, PS1, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.1222C>T	p.Arg408Trp	E 12	[43]	PS3, PP2, PP3, PP5	Likely pathogenic
c.1241A>G	p.Tyr414Cys	E 12	[44]	PS1, PS3, PP2, PP3, PP5	Pathogenic
c.1315+1G>A	p.?	I 12	[45]	PVS1, PP5	VUS

Notes: E: exon and I: intron. The most frequent variant was c.1315+1G>A (8/66, 11.7%), followed by c.473G>A (6/66, 8.8%) and c.1162G>A (6/66, 8.8%). In the RS patients, the most common variants were c.1315+1G>A (7/44, 15.2%), c.1222C>T (6/44, 13%), c.473G>A (4/44, 8.7%), c.754C>T (4/44, 8.7%), and c.1162G>A (4/44, 8.7%). In the DF patients, c.184delC (4/22, 18.1%), c.782G>A (3/22, 13.6%), and c.1066-11G>A (3/22, 13.6%) were the most common variants.

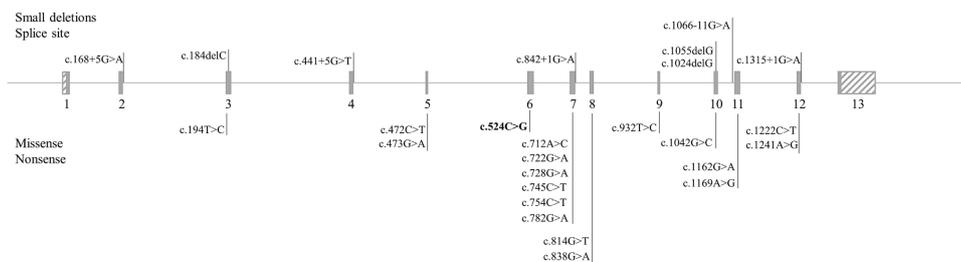


Figure 1. *PAH* exon structure, and the location of the variants found in the patient sample.

Of the 14 patients without a BH₄ responsiveness test, the results of nine were predicted through the BioPKU database: two were responsive, and seven were nonresponsive. Of the total cohort, the results of ten agreed with the BioPKU data. Two RS patients (patients 2 and 7) presented a genotype not described in the BioPKU database [46] and were nonresponsive to BH₄, according to the biochemical test [10,11]. Also, three DF patients (patients 26, 27 and 31) presented a genotype not described at BioPKU database, being two responsive and one nonresponsive, respectively.

The novel variant c.524C>G was found in patient 20, located on exon 6 of the *PAH*. The ACMG criteria fulfilled by the variant were PM2, PM5, PP2, and PP3, resulting in a likely pathogenic classification. In addition, the patient's clinical information was consistent with classic PKU.

As shown in Figure 2, the novel variant c.524C>G resulted in a proline being substituted with an arginine in position 175, which is located in the catalytic domain of the PAH protein. This variant does not promote structural alterations in the protein. In the combination of variants p.(Pro175Arg) and p.Arg252Trp, found in the genotype of patient 2, a small portion of monomers showed higher affinity between the subunits than the wild-type complex. The molecular modeling analysis of PAH variants p.Thr238Pro and p.Gly272Ter, found in patient 14, showed differences in the interaction energy between monomers in the PAH tetramer, and most of the different tetramers showed significantly lower affinity than the wild-type (Table S1).

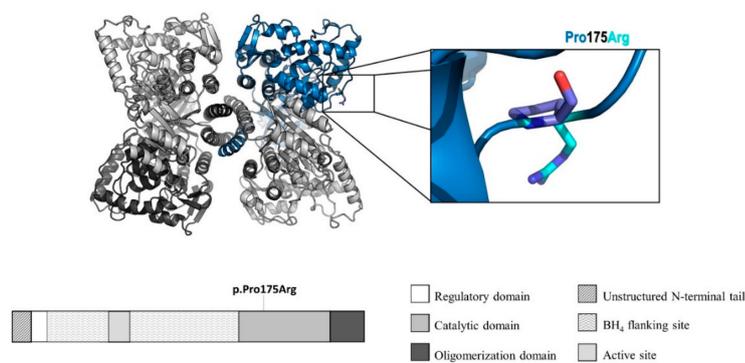


Figure 2. Molecular modeling and protein structure of the PAH enzyme, with the protein location of the novel variant p.Pro175Arg. Adapted from Flydal et al. [18].

4. Discussion

PKU is the most common IEM, and its incidence ranges between 1:850–112,000 in Europe (Karachay-Cherkessia Republic (Russia) and Finland, respectively), to 1:10,000 live births in the USA [47]. In Brazil, its incidence is 1:25,000 live births [48], while, in Southern Brazil, its incidence is 1:12,000–16,000 [49]. PKU has been included in Brazil's newborn screening program since 2001 [50]. Despite this screening program, our sample's median age at diagnosis was higher than the Brazilian Ministry of Health recommendations, i.e., up to 28 days of age [6]. A reason for this high median age at diagnosis is the difficulties in the execution of the program, which was implemented only in 2001. Some of our patients were born before that, when each Brazilian state performed a different screening and not all states included PKU in their newborn screening program. This is the reason behind the outstandingly late diagnosis of patients 22.1 and 22.2, diagnosed only after the development of severe symptoms. Besides that, this family is very interesting, since the oldest brother (22.2), who was diagnosed after—and because of—the youngest brother, presented a milder neurological phenotype.

The *PAH* gene analysis by massive parallel sequencing is a fast, cost-effective, and accurate alternative for the genetic diagnosis of PKU [8,51]. Due to its large size and heterogeneity, similar symptoms are caused by alterations in more than one gene, as in the differential diagnosis of BH₄ deficiency and *DNAJC12* gene variants. In PKU, especially, a less time-consuming diagnosis can be helpful to avoid the development of neurological symptoms to help predict BH₄ responsiveness and to facilitate a differential diagnosis [52].

In this study, the patients' molecular diagnosis agreed in every case with the diagnosis based on biochemical and clinical observations, which confirms the effectiveness of this

methodology. We identified variants that were not covered in the previous genotyping analysis. In patient 9, for example, the error in previous genotyping could have been the result of a lack of specificity or coverage of the implemented technique or a lack of analysis of the parents' genotypes.

The most frequent variant found in the patients, c.1315+1G>A, was described as a common pathogenic variant in different Northern European populations, especially in Germany [53]. The second-most frequent variant, p.Arg158Gln, is also common in European populations, including Southern Italy and Eastern Europe [53]. The third-most prevalent variant found, p.Val388Met, is described as common in the Iberian Peninsula (5.7% in Spain and 19% in Portugal) and has a high frequency in Brazil (9%) and Chile (13%) [54].

The second-most frequent variant in RS patients, p.Arg408Trp, is also common in German populations (24.6%) [55]. In Southern Brazil, the predominance of European ancestry (77.7%) can explain these findings [56]. A previous study of the RS population found p.Ile65Thr (19.5%), c.169-13T>G (9.7%), p.Arg261Ter (9.7%), p.Arg261Gln (9.7%), p.Val388Met (9.7%), and p.Arg408Trp (9.7%) to be the most frequent variants in this population [23]. However, the frequency of these variations differed in the present study: p.Ile65Thr (2.1%), p.Arg261Gln (4.3%), p.Val388Met (8.7%), p.Arg408Trp (13%), and the variants c.169-13T>G and p.Arg261Ter were not found. Nevertheless, the small sample size in the previous study should be taken into consideration ($n = 16$). The variants p.Arg261Gln and c.1066-11G>A, frequent in patients from DF, have also been described as the most common variants in Portugal [53]. In the DF, which is in the Midwestern region of Brazil, the population's ancestry shows a mixture of Southeastern and Northeastern Brazilian populations, with significant European (63%) and African (24.1%) ancestries [57].

A previous study by Acosta et al. (2001) [58] in a Brazilian population (a mixture of Southern, Southeastern, Northeastern, and Midwestern regions) described the most frequent of the pathogenic variants as c.1066-11G>A (17.4%), p.Arg261Gln (12.2%), p.Val388Met (9.1%), p.Arg252Trp (6.5%), and p.Arg270Lys (4.8%) [58]. Of these variants, only p.Arg270Lys was not found in the present study. The variants p.Arg261Gln, p.Val388Met, and c.1066-11G>A are also frequent in the States of Mato Grosso do Sul and Minas Gerais [59–61]. The most common pathogenic variants in Argentina and Chile were p.Arg261Gln (10.6%) and p.Val388Met (17.2%), respectively [62,63].

The novel variant p.Pro175Arg involves the substitution of a proline for an arginine. The hydrophobic amino acid proline has particular properties: its side chain is connected to the protein backbone. However, unlike proline, which does not display main-chain conformation, arginine, a charged amino acid, is usually found in protein-active or protein-binding sites [64]. The variant is located in the catalytic domain, although not in a hotspot region with highly destabilizing pathogenic variants between residues 238–330 [18]. The molecular modeling analysis indicates that this substitution can affect the binding between monomers in the PAH tetramer, which could lead to a change in the stability and activity of this enzyme. Another variant, p.Arg252Trp, has 1% of the PAH activity [65] and is related to the classic PKU.

5. Conclusions

The correlation of many variations in the genotypes and their resulting phenotypes is already available in public databases. Thus, a fast genotype diagnosis of PKU patients can help with treatment outcomes. Genotyping is a helpful way to understand how phenylalanine hydroxylase is altered in a patient, the impact of this specific alteration to the enzyme, and the enzyme's level of residual activity with these variants. Additionally, genotyping can help with the patients whose genotypes have information of the BH₄ responsiveness; when these patients are responsive, the supplementation with BH₄ leads to the enhancement of residual PAH activity, with a chaperone-like effect on a misfolding enzyme subunit [66].

This study presents a summary of the clinical and genetic data of 33 unrelated patients from two different regions of Brazil, which confirmed the diagnosis of PAH deficiency in every case. A novel variant was found in the *PAH* gene.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/1/20/s1>, Table S1. Differences in binding affinity between monomers in the PAH tetramer in patients 2 and 14 as predicted by the program FoldX 5.0. Interaction energy (ΔG) between monomers A to D calculated using combinations of the alleles 1 and 2 found in each patient. Differences between the energies of mutant and wild-type proteins ($\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$) above 1.6 kcal/mol should significantly affect the stability of the tetramer.

Author Contributions: Conceptualization, R.H.T.; F.S.-L.; T.T.; I.V.D.S.; methodology, R.H.T.; F.S.-L.; T.T.; I.V.D.S.; validation, R.H.T.; formal analysis, R.H.T.; F.S.-L.; R.L.-B.; T.T.; M.T.d.O.C.; R.S.H.; M.T.A.d.S.R.; B.C.M.; M.O.P.; L.C.S.d.S.; F.M.; I.V.D.S.; investigation, R.H.T.; F.S.-L.; T.T.; I.V.D.S.; resources, I.V.D.S.; data curation, R.H.T.; F.S.-L.; T.T.; writing—original draft preparation, R.H.T.; F.S.-L.; I.V.D.S.; writing—review and editing, R.H.T.; F.S.-L.; R.L.-B.; T.T.; M.T.d.O.C.; R.S.H.; M.T.A.d.S.R.; B.C.M.; M.O.P.; L.C.S.d.S.; F.M.; I.V.D.S.; supervision, F.S.-L. and I.V.D.S.; project administration, R.H.T.; F.S.-L.; T.T.; I.V.D.S.; funding acquisition, F.S.-L.; T.T.; I.V.D.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the FIPE-HCPA (process number 2015-0556), National Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil), National Council of Technological and Scientific Development (CNPq-Brazil), and the UFRGS Graduate Program in Genetics and Molecular Biology.

Institutional Review Board Statement: This observational, cross-sectional study, with a convenience sampling strategy, was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Research Ethics Committee (no. 2015-0556). All patients recruited for this study or their legal guardians provided written informed consent.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study or their legal guardians provided written informed consent.

Acknowledgments: The authors would like to thank the patients and legal guardians for participating in this study. We also thank Nenad Blau, who helped us in performing the exclusion of BH_4 deficiencies in the patients from RS.

Conflicts of Interest: The authors report no conflict of interest.

References

- Blau, N.; Van Spronsen, F.J.; Levy, H.L. Phenylketonuria. *Lancet* **2010**, *376*, 1417–1427. [[CrossRef](#)]
- Kochhar, J.S.; Chan, S.Y.; Ong, P.S.; Kang, L. Clinical therapeutics for phenylketonuria. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2012**, *2*, 223–237. [[CrossRef](#)]
- van Spronsen, F.J. Phenylketonuria: A 21st century perspective. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6*, 509–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Al Hafid, N.; Christodoulou, J. Phenylketonuria: A review of current and future treatments. *Transl. Pediatr.* **2015**, *4*, 304–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Muntau, A.C.; Röschinger, W.; Habich, M.; Demmelmair, H.; Hoffmann, B.; Sommerhoff, C.P.; Roscher, A.A. Tetrahydrobiopterin as an Alternative Treatment for Mild Phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 2122–2132. [[CrossRef](#)]
- Brasil Ministério da Saúde. *Triagem Neonatal Biológica*; Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2016; ISBN 9788533424074.
- Stenson, P.D.; Mort, M.; Ball, E.V.; Evans, K.; Hayden, M.; Heywood, S.; Hussain, M.; Phillips, A.D.; Cooper, D.N. The Human Gene Mutation Database: Towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum. Genet.* **2017**, *136*, 665–677. [[CrossRef](#)]
- Cao, Y.Y.; Qu, Y.J.; Song, F.; Zhang, T.; Bai, J.L.; Jin, Y.W.; Wang, H. Fast clinical molecular diagnosis of hyperphenylalaninemia using next-generation sequencing-based on a custom AmpliSeq™ panel and Ion Torrent PGM sequencing. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *113*, 261–266. [[CrossRef](#)]
- Blau, N.; Shen, N.; Carducci, C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: State of the art. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 655–671. [[CrossRef](#)]
- Giugliani, L.; Sitta, A.; Vargas, C.R.; Santana-da-Silva, L.C.; Nalin, T.; Saraiva-Pereira, M.L.; Giugliani, R.; Schwartz, I.V.D. Responsividade à tetrahydrobiopterina em pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase. *J. Pediatr.* **2011**, *87*, 245–251. [[CrossRef](#)]

11. Nalin, T.; Perry, I.D.S.; Sitta, A.; Vargas, C.R.; Saraiva-Pereira, M.L.; Giugliani, R.; Blau, N.; Schwartz, I.V.D. Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH 4) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *104*, S80–S85. [[CrossRef](#)]
12. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Wenger, A.M.; Zehir, A.; Mesirov, J.P. Variant review with the integrative genomics viewer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, e31–e34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, P.; Gauthier, L.D.; et al. The Mutational Constraint Spectrum Quantified from Variation in 141, 456 Humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [[CrossRef](#)]
14. Naslavsky, M.S.; Yamamoto, G.L.; de Almeida, T.F.; Ezquina, S.A.M.; Sunaga, D.Y.; Pho, N.; Bozoklian, D.; Sandberg, T.O.M.; Brito, L.A.; Lazar, M.; et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum. Mutat.* **2017**, *38*, 751–763. [[CrossRef](#)]
15. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Garbade, S.F.; Shen, N.; Himmelreich, N.; Haas, D.; Trefz, F.K.; Hoffmann, G.F.; Burgard, P.; Blau, N. Allelic phenotype values: A model for genotype-based phenotype prediction in phenylketonuria. *Genet. Med.* **2019**, *21*, 580–590. [[CrossRef](#)]
17. Nalin, T.; Perry, I.D.S.; Refosco, L.F.; Oliveira Netto, C.B.; de Souza, C.F.M.; Vieira, T.A.; Picon, P.D.; Schwartz, I.V.D. Phenylketonuria in the Public Health System: Assessment of Adherence. *Clin. Biomed. Res.* **2010**, *30*, 225–232.
18. Flydal, M.L.; Alcorlo-Pagés, M.; Johannessen, F.G.; Martínez-Caballero, S.; Skjærven, L.; Fernandez-Leiro, R.; Martínez, A.; Hermoso, J.A. Structure of full-length human phenylalanine hydroxylase in complex with tetrahydrobiopterin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *166*, 11229–11234. [[CrossRef](#)]
19. Johansson, M.U.; Zoete, V.; Michielin, O.; Guex, N. Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*. [[CrossRef](#)]
20. Zheng, W.; Zhang, C.; Bell, E.W.; Zhang, Y. I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Futur. Gener. Comput. Syst.* **2019**, *99*, 73–85. [[CrossRef](#)]
21. Guerois, R.; Nielsen, J.E.; Serrano, L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: A study of more than 1000 mutations. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 369–387. [[CrossRef](#)]
22. Ferreira, P.; Sant’Anna, O.; Varejão, N.; Lima, C.; Novis, S.; Barbosa, R.V.; Caldeira, C.M.; Rumjanek, F.D.; Ventura, S.; Cruz, M.W.; et al. Structure-based analysis of A19D, a variant of transthyretin involved in familial amyloid cardiomyopathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82484. [[CrossRef](#)]
23. Da Santana Silva, L.C.; Santos Carvalho, T.; Da Brito Silva, F.; Morari, L.; Aguirres Fachel, Â.; Pires, R.; Farret Refosco, L.; Desnick, R.J.; Giugliani, R.; Saraiva Pereira, M.L.; et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *79*, 17–24. [[CrossRef](#)]
24. Zekanowski, C.; Nowacka, M.; Cabalska, B.; Bal, J. Molecular basis of mild hyperphenylalaninaemia in Poland. *J. Med. Genet.* **1997**, *34*, 1035–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Daniele, A.; Cardillo, G.; Pennino, C.; Carbone, M.T.; Scognamiglio, D.; Correr, A.; Pignero, A.; Castaldo, G.; Salvatore, F. Molecular Epidemiology of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency in Southern Italy: A 96% Detection Rate with Ten Novel Mutations. *Ann. Hum. Genet.* **2007**, *71*, 185–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Eisensmith, R.C.; Woo, S.L.C. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemia: Mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Mutat.* **1992**, *1*, 13–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yamashita, K.; Takarada, Y.; Otsuka, N.; Kagawa, S.; Matsuoka, A.; Kalanin, J. Genetic diagnosis of phenylketonuria: Identification of the mutations of phenylalanine hydroxylase gene by PCR direct sequencing. *Rinsho Byori.* **1992**, *40*, 1060–1066.
28. Dworniczak, B.; Aulehla-Scholz, C.; Horst, J. Phenylketonuria: Detection of a frequent haplotype 4 allele mutation. *Hum. Genet.* **1989**, *84*, 95–96. [[CrossRef](#)]
29. Dworniczak, B.; Kalaydjieva, L.; Pankoke, S.; Aulehla-Scholz, C.; Allen, G.; Horst, J. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: A mutation hot spot? *Hum. Mutat.* **1992**, *1*, 138–146. [[CrossRef](#)]
30. Guldberg, P.; Romano, V.; Ceratto, N.; Bosco, P.; Ciuna, M.; Indelicato, A.; Mollica, F.; Meli, C.; Giovannini, M.; Riva, E. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: Implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. *Hum. Mol. Genet.* **1993**, *2*, 1703–1707. [[CrossRef](#)]
31. Wang, T.; Okano, Y.; Eisensmith, R.C.; Lo, W.H.Y.; Huang, S.-Z.; Zeng, Y.-T.; Yuan, L.-F.; Liu, S.-R.; Woo, S.L.C. Missense mutations prevalent in orientals with phenylketonuria: Molecular characterization and clinical implications. *Genomics* **1991**, *10*, 449–456. [[CrossRef](#)]
32. Zschocke, J.; Graham, C.A.; Carson, D.J.; Nevin, N.C. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: A rapid stepwise approach. *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *57*, 1311–1317. [[PubMed](#)]
33. Abadie, V.; Lyonnet, S.; Maurin, N.; Berthelon, M.; Caillaud, C.; Giraud, F.; Mattei, J.F.; Rey, J.; Rey, F.; Munnich, A. CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria. *Genomics* **1989**, *5*, 936–939. [[CrossRef](#)]
34. Svensson, E.; Andersson, B.; Hagenfeldt, L. Two mutations within the coding sequence of the phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Genet.* **1990**, *85*, 300–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Lyonnet, S.; Caillaud, C.; Rey, F.; Berthelon, M.; Frézal, J.; Rey, J.; Munnich, A. Molecular genetics of phenylketonuria in Mediterranean countries: A mutation associated with partial phenylalanine hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**, *44*, 511–517.
36. Dianzani, I.; Forrest, S.M.; Camaschella, C.; Saglio, G.; Ponzzone, A.; Cotton, R.G. Screening for mutations in the phenylalanine hydroxylase gene from Italian patients with phenylketonuria by using the chemical cleavage method: A new splice mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **1991**, *48*, 631–635.
37. Lichter-Konecki, U.; Konecki, D.S.; DiLella, A.G.; Brayton, K.; Marvit, J.; Hahn, T.M.; Trefz, F.K.; Woo, S.L.C. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency Caused by a Single Base Substitution in an Exon of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2881–2885. [[CrossRef](#)]
38. Guldberg, P.; Rey, F.; Zschocke, J.; Romano, V.; François, B.; Michiels, L.; Ullrich, K.; Hoffmann, G.F.; Burgard, P.; Schmidt, H.; et al. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 71–79. [[CrossRef](#)]
39. Rozen, R.; Mascisch, A.; Lambert, M.; Laframboise, R.; Scriver, C.R. Mutation profiles of phenylketonuria in Quebec populations: Evidence of stratification and novel mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **1994**, *55*, 321–326.
40. Dworniczak, B.; Aulehla-Scholz, C.; Kalaydjieva, L.; Bartholomé, K.; Grudda, K.; Horst, J. Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: The major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. *Genomics* **1991**, *11*, 242–246. [[CrossRef](#)]
41. Guldberg, P.; Henriksen, K.F.; Güttler, F. Molecular Analysis of Phenylketonuria in Denmark: 99% of the Mutations Detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Genomics* **1993**, *17*, 141–146. [[CrossRef](#)]
42. Guldberg, P.; Henriksen, K.F.; Thöny, B.; Blau, N.; Güttler, F. Molecular Heterogeneity of Nonphenylketonuria Hyperphenylalaninemia in 25 Danish Patients. *Genomics* **1994**, *21*, 453–455. [[CrossRef](#)]
43. DiLella, A.G.; Marvit, J.; Brayton, K.; Woo, S.L. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* **1987**, *327*, 333–336. [[CrossRef](#)]
44. Okano, Y.; Eisensmith, R.C.; Güttler, F.; Lichter-Konecki, U.; Konecki, D.S.; Trefz, F.K.; Dasovich, M.; Wang, T.; Henriksen, K.; Lou, H.; et al. Molecular Basis of Phenotypic Heterogeneity in Phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1232–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. DiLella, A.G.; Kwok, S.C.M.; Ledley, F.D.; Marvit, J.; Woo, S.L.C. Molecular Structure and Polymorphic Map of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry* **1986**, *25*, 743–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Romani, C.; Palermo, L.; MacDonald, A.; Limback, E.; Hall, S.K.; Geberhiwot, T. The impact of phenylalanine levels on cognitive outcomes in adults with phenylketonuria: Effects across tasks and developmental stages. *Neuropsychology* **2017**, *31*, 242–254. [[CrossRef](#)]
47. Hillert, A.; Anikster, Y.; Belanger-Quintana, A.; Burlina, A.; Burton, B.K.; Carducci, C.; Chiesa, A.E.; Christodoulou, J.; Đorđević, M.; Desviat, L.R.; et al. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* **2020**, *107*, 234–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Vieira Neto, E.; Maia Filho, H.S.; Monteiro, C.B.; Carvalho, L.M.; Tonon, T.; Vanz, A.P.; Schwartz, I.V.D.; Ribeiro, M.G. Quality of life and adherence to treatment in early-treated Brazilian phenylketonuria pediatric patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2018**, *51*, 1–10. [[CrossRef](#)]
49. Trevisan, L.M.; Nalin, T.; Tonon, T.; Veiga, L.M.; Vargas, P.; Krug, B.C.; Leivas, P.G.C.; Schwartz, I.V.D. Access to treatment for phenylketonuria by judicial means in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cien. Saude Colet.* **2015**, *20*, 1607–1616. [[CrossRef](#)]
50. Ministério da Saúde do Brasil. *Portaria No 822, de 06 de Junho de 2001*; Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2001.
51. Li, N.; Jia, H.; Liu, Z.; Tao, J.; Chen, S.; Li, X.; Deng, Y.; Jin, X.; Song, J.; Zhang, L.; et al. Molecular characterisation of phenylketonuria in a Chinese mainland population using next-generation sequencing. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15769. [[CrossRef](#)]
52. Karačić, I.; Meili, D.; Sarnavka, V.; Heintz, C.; Thöny, B.; Ramadža, D.P.; Fumić, K.; Mardešić, D.; Barić, I.; Blau, N. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **2009**, *97*, 165–171. [[CrossRef](#)]
53. Zschocke, J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 345–356. [[CrossRef](#)]
54. Desviat, L.R.; Pérez, B.; De Lucca, M.; Cornejo, V.; Schmidt, B.; Ugarte, M. Evidence in Latin America of recurrence of V388M, a phenylketonuria mutation with high in vitro residual activity. *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *57*, 337–342. [[PubMed](#)]
55. Aulehla-Scholz, C.; Heilbronner, H. Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 399–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pena, S.D.J.; di Pietro, G.; Fuchshuber-Moraes, M.; Genro, J.P.; Hutz, M.H.; de Kehdy, F.S.G.; Kohlrusch, F.; Magno, L.A.V.; Montenegro, R.C.; Moraes, M.O.; et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. de Souza, A.M.; Resende, S.S.; de Sousa, T.N.; de Brito, C.F.A. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.* **2019**, *42*, 495–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Acosta, A.X.; Silva, W.A.; Carvalho, T.M.; Gomes, M.; Zago, M.A. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 122–130. [[CrossRef](#)]
59. Costa, R.D.; Galera, B.B.; Rezende, B.C.; Venâncio, A.C.; Galera, M.F. Identification of mutations in the PAH gene in PKU patients in the state of Mato Grosso. *Rev. Paul. Pediatr.* **2020**, *38*. [[CrossRef](#)]

60. dos Santos, L.L.; Magalhães, M.D.C.; Reis, A.D.O.; Starling, A.L.P.; Januário, J.N.; da Fonseca, C.G.; de Aguiar, M.J.B.; Carvalho, M.R.S. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genet. Mol. Res.* **2006**, *5*, 16–23.
61. Santos, L.L.; Castro-Magalhães, M.; Fonseca, C.G.; Starling, A.L.P.; Januário, J.N.; Aguiar, M.J.B.; Carvalho, M.R.S. PKU in Minas Gerais State, Brazil: Mutation Analysis. *Ann. Hum. Genet.* **2008**, *72*, 774–779. [[CrossRef](#)]
62. Enacán, R.E.; Miñana, M.N.; Fernandez, L.; Valle, M.G.; Salerno, M.; Fraga, C.I.; Santos-Simarro, F.; Prieto, L.; Lapunzina, P.; Specola, N.; et al. Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Genotyping in PKU Argentine Patients. *J. Inborn Errors Metab. Screen.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
63. Hamilton, V.; Santa María, L.; Fuenzalida, K.; Morales, P.; Desviat, L.R.; Ugarte, M.; Pérez, B.; Cabello, J.F.; Cornejo, V. Characterization of Phenylalanine Hydroxylase Gene Mutations in Chilean PKU Patients. In *JIMD Reports*; Springer: Heidelberg, Germany, 2018; Volume 4, pp. 71–77. ISBN 978-3-642-32441-3.
64. Betts, M.J.; Russell, R.B. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2006; Volume 9, pp. 311–342. ISBN 9780470026199.
65. Dobrowolski, S.F.; Heintz, C.; Miller, T.; Ellingson, C.; Ellingson, C.; Özer, I.; Gökçay, G.; Baykal, T.; Thöny, B.; Demirkol, M.; et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *102*, 116–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sarkissian, C.N.; Gamez, A.; Scott, P.; Dauvillier, J.; Dorenbaum, A.; Scriver, C.R.; Stevens, R.C. Chaperone-Like Therapy with Tetrahydrobiopterin in Clinical Trials for Phenylketonuria: Is Genotype a Predictor of Response. In *JIMD Reports*; Springer: Heidelberg, Germany, 2011; Volume 4, pp. 59–70. ISBN 978-3-642-32441-3.

Scheme 1. Differences in binding affinity between monomers in the PAH tetramer in patients 2 and 14 as predicted by the program FoldX 5.0. Interaction energy (ΔG) between monomers A to D calculated using combinations of the alleles 1 and 2 found in each patient. Differences between the energies of mutant and wild-type proteins ($\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$) above 1.6 kcal/mol should significantly affect the stability of the tetramer.

Energies data.							$\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt}$.						
Patient													
2. p.Pro175Arg(:)Arg252Trp..													
	AB	AC	AD	BC	BD	CD	1222	AB	AC	AD	BC	BD	CD
1222	-46.523	-8.438	-0.343	-0.195	-5.842	-42.918	1222	-0.539	-0.974	-0.042	-0.029	-0.408	-1.357
2122	-48.010	-8.624	-0.315	-0.232	-6.116	-44.107	2122	-2.026	-1.161	-0.014	-0.065	-0.682	-2.547
2212	-46.876	-8.592	-0.348	-0.212	-5.923	-42.796	2212	-0.893	-1.129	-0.047	-0.045	-0.489	-1.236
2221	-47.380	-8.333	-0.338	-0.237	-5.774	-43.346	2221	-1.396	-0.87	-0.038	-0.07	-0.34	-1.786
1122	-46.739	-8.440	-0.344	-0.21	-5.838	-42.988	1122	-0.755	-0.977	-0.043	-0.043	-0.404	-1.427
1212	-46.614	-8.427	-0.342	-0.219	-5.894	-42.710	1212	-0.63	-0.963	-0.042	-0.053	-0.46	-1.150
1221	-46.645	-7.871	-0.341	-0.178	-6.111	-43.995	1221	-0.661	-0.408	-0.04	-0.012	-0.677	-2.434
2112	-47.519	-8.780	-0.362	-0.239	-6.136	-43.197	2112	-1.535	-1.317	-0.062	-0.073	-0.702	-1.636
2121	-48.936	-7.985	-0.367	-0.235	-6.210	-43.796	2121	-2.953	-0.521	-0.066	-0.069	-0.776	-2.235
2211	-48.755	-8.658	-0.348	-0.202	-6.321	-42.816	2211	-2.772	-1.194	-0.047	-0.035	-0.887	-1.256
1112	-46.739	-8.443	-0.321	-0.21	-6.126	-42.685	1112	-0.755	-0.979	-0.02	-0.043	-0.693	-1.124
1121	-46.739	-8.333	-0.341	-0.192	-5.766	-44.178	1121	-0.755	-0.869	-0.04	-0.026	-0.332	-2.617
2111	-47.738	-8.610	-0.339	-0.239	-5.926	-43.069	2111	-1.755	-1.147	-0.038	-0.073	-0.492	-1.509
1211	-46.885	-8.432	-0.351	-0.23	-5.903	-42.991	1211	-0.901	-0.968	-0.05	-0.064	-0.469	-1.431
1111	-46.739	-8.441	-0.344	-0.21	-5.889	-42.979	1111	-0.755	-0.977	-0.043	-0.043	-0.455	-1.419
2222	-47.882	-8.129	-0.344	-0.215	-5.888	-43.082	2222	-1.899	-0.665	-0.043	-0.048	-0.454	-1.521
WT	-45.984	-7.464	-0.301	-0.166	-5.434	-41.560							
Patient													
14 p.Arg158Gln(:)Gly352ValfsTer48													
	AB	AC	AD	BC	BD	CD	1222	AB	AC	AD	BC	BD	CD
1222	-13.504	-0.31	-0.036	0.006	-0.092	-4.755	1222	32.480	7.154	0.265	0.172	5.341	36.805
2122	-2.238	-0.531	0.001	-0.04	-0.038	-4.418	2122	43.746	6.933	0.302	0.126	5.396	37.142
2212	-4.133	0.09	0.004	-0.021	-0.111	-14.279	2212	41.851	7.554	0.305	0.145	5.322	27.281
2221	-4.133	-0.4	-0.038	0.001	-0.082	-14.457	2221	41.850	7.063	0.263	0.167	5.352	27.103

1122	-48.328	0,103	-0,012	-0,076	-0,024	-4.134	1122	-2.345	7.567	0,289	0,09	5.410	37.426
1212	-13.565	-8.426	-0,03	-0,072	-0,085	-14.433	1212	32.419	-0,962	0,271	0,094	5.348	27.128
1221	-13.613	-0,033	-0,552	0,004	-0,059	-7.001	1221	32.371	7.430	-0,251	0,171	5.375	34.560
2112	-3.617	0,014	0,001	-0,588	-0,092	-15.995	2112	42.367	7.477	0,302	-0,421	5.342	25.566
2121	-5.948	-0,49	-0,08	-0,066	-6.369	-5.050	2121	40.035	6.973	0,221	0,1	-0,935	36.511
2211	-4.133	0,367	-0,078	-0,012	0,028	-42.931	2211	41.851	7.830	0,223	0,155	5.461	-1.370
1112	-47.619	-8.370	-0,052	-0,282	-0,04	-13.244	1112	-1.635	-0,906	0,249	-0,116	5.394	28.316
1121	-46.868	0,105	-0,717	-0,083	-6.316	-4.620	1121	-0,884	7.568	-0,416	0,083	-0,882	36.940
2111	-8.452	-0,42	-0,083	-0,485	-6.255	-44.368	2111	37.532	7.044	0,218	-0,319	-0,821	-2.807
1211	-13.906	-8.124	-0,111	-0,096	-0,017	-43.545	1211	32.077	-0,661	0,19	0,07	5.417	-1.985
1111	-46.027	-8.071	-0,343	-0,236	-5.897	-44.191	1111	-0,043	-0,608	-0,042	-0,07	-0,463	-2.630
2222	-4.133	-0,35	-0,001	-0,001	-0,08	-3.595	2222	41.850	7.113	0,3	0,166	5.354	37.965
WT	-45.984	-7.464	-0,301	-0,166	-5.434	-41.560							

Note: Differences above 1.6 kcal/mol are considered significant. Differences above -1.6 kcal/mol suggests more affinity between subunits than the wild-type. Differences above +1.6 kcal/mol suggests less affinity between subunits than the WT.

10 CAPÍTULO 2 - Molecular analysis of Brazilian tetrahydrobiopterin deficiency patients

Artigo em preparo.

**11 CAPÍTULO 3 - Maple Syrup Urine Disease diagnosis in Brazilian patients
by massive parallel sequencing**

Artigo em preparo.

12 DISCUSSÃO

As aminoacidopatias são doenças genéticas raras, que levam ao acúmulo de aminoácidos por defeitos nas vias metabólicas destes aminoácidos. Vários pacientes deste estudo apresentam fenótipos graves, principalmente os pacientes com diagnóstico bioquímico de MSUD e deficiência de BH₄, e isso ocorre devido a estas doenças não estarem ainda incluídas no PNTN durante o ano do nascimento dos pacientes (Brasil. Ministério da Saúde. 2001). Salvo no caso dos pais que optam pela triagem neonatal expandida através do sistema privado de saúde, o diagnóstico destas doenças costuma ser tardio, o que leva ao desenvolvimento de sintomas neurológicos irreversíveis.

Mesmo depois de um diagnóstico clínico, a análise genética pode prover informações de extrema importância no prognóstico da doença, com associações genótipo-fenótipo. A combinação destas duas abordagens permite que se obtenha um diagnóstico mais completo para os pacientes. No caso da PKU, estas associações estão melhor estabelecidas em comparação com as da deficiência de BH₄ e da MSUD.

Na MSUD, por exemplo, a história clínica de um paciente não é o melhor parâmetro para se utilizar na correlação genótipo-fenótipo, pois devido ao diagnóstico tardio, ocorre uma deterioração neurológica maior, bem como, irregularidades nas concentrações dos BCAAs, que também são influenciadas pela má aderência à dieta (Campanholi et al. 2021). Outros autores reportam também que o baixo número amostral pode ser um empecilho na hora de estabelecer a associação genótipo-fenótipo, assim como, divergências entre os dados disponíveis na literatura e os genótipos e informações clínicas obtidas (Gupta et al. 2015; Fang et al. 2021). Mesmo para PKU, que possui um banco de dados bem estabelecido e curado, é necessária atenção na hora de considerar as informações disponíveis no banco, pois há genótipos com um tamanho amostral baixo ou informações conflitantes, por exemplo.

Abordagens massivas de sequenciamento são importantes no diagnóstico de doenças multigênicas, permitindo a análise global dos vários genes envolvidos nestas doenças, o que resulta em uma economia de tempo, principalmente com a

utilização de abordagens direcionadas como o uso dos painéis gênicos (Yubero et al. 2016). Atualmente, o padrão ouro de diagnóstico molecular para genes conhecidos ainda é o sequenciamento automatizado de Sanger da variante em questão (Trujillano et al. 2014; Remec et al. 2021). O maior dilema do MPS é escolher a melhor abordagem, seja ela por genoma complexo, exoma ou painéis gênicos. Com base nestas opções, uma abordagem direcionada, com poucos genes ainda parece ser a melhor opção, quando se leva em consideração o tempo de diagnóstico e o volume de dados gerados. O NGS se mostra uma opção melhor que o sequenciamento automatizado de Sanger para análise de múltiplos genes e é necessário sempre otimizar o processo e ter em mente as limitações destas técnicas (Remec et al. 2021).

No entanto deve-se sempre levar em consideração os fatores restritivos destas técnicas e das plataformas utilizadas, buscando metodologias eficazes para superar obstáculos e com isso, concluir o diagnóstico molecular do paciente. Fatores como processo laborioso e demorado, problemas com fragmentos longos de DNA, análise de um gene por vez, além do custo alto para se analisar por completo os genes envolvidos com as doenças são desafios no sequenciamento automatizado de Sanger (Cao et al. 2014; Totomoch-Serra et al. 2017). O sequenciamento através da plataforma Ion Torrent PGM™, apesar de permitir a análise de múltiplos genes em uma única rodada, apresenta alguns pontos que devem ser levados em consideração na análise dos resultados: baixa cobertura de regiões, o que leva à perda de dados; problemas com homopolímeros; regiões com cobertura parcial; regiões de difícil amplificação pelo painel; e ainda, não-anelamento de primers devido a presença de polimorfismos na região de anelamento (Park et al. 2016; Silva et al. 2017). Variantes em regiões não codificadoras podem acabar não sendo detectadas, pois usualmente, os painéis gênicos cobrem aproximadamente 20-30 pares de base (bp) de cada extremidade dos éxons e há alguns casos na literatura de variantes distantes dessas posições, que devem ser levadas em consideração na hora de analisar os dados obtidos.

As diretrizes atuais para o uso de MPS no diagnóstico genético não definem parâmetros para direcionamento concreto da análise confirmatória e por conta disso, o uso do sequenciamento automatizado de Sanger é necessário para a

validação dos achados pelo MPS, sendo um passo importante na rotina do diagnóstico molecular. Entretanto, esse tipo de rotina acaba sendo custoso e menos eficaz no processo do diagnóstico genético pelo MPS, ainda mais que o sequenciamento automatizado de Sanger não é a prova de falhas. Ainda, é sugerido que se ocorrer discrepâncias entre ambas as técnicas, o MPS não deve ser considerado prioritariamente o culpado pelo erro (De Cario et al. 2020). É imprescindível que os dados gerados por ambas as técnicas sejam analisados de forma criteriosa, para que o diagnóstico seja concluído da maneira mais correta possível.

A escolha dos genes a serem incluídos no painel deu-se através de pesquisa pelos genes mais frequentemente alterados nas doenças em estudo. Os principais genes envolvidos com as HPAs genéticas estão presentes no painel. O envolvimento do gene *DNAJC12* nas HPAs genéticas foi descrito em 2017 (Anikster et al. 2017) e estes pacientes apresentam características clínicas como um perfil característico de deficiência de neurotransmissores. No caso da MSUD, o gene *DLD* não foi incluído por apresentar um fenótipo distinto em relação aos sintomas causados pelas alterações nos outros três genes que compõem a estrutura do BCKD. Os genes reguladores por sua vez, também têm um quadro clínico próprio. Já as variantes patogênicas no gene *BCKDK*, codificador da quinase resultam em um quadro de autismo, epilepsia, retardo mental, e redução de BCAAs (Novarino et al. 2012), o que distingue defeitos neste gene do quadro clínico usual de MSUD. O gene *PPM1K*, por sua vez, apresenta um baixo número de casos e variantes patogênicas identificadas. Os painéis permitem a análise dos principais genes envolvidos com as suas doenças-alvo, geralmente isto já permite o diagnóstico genético. Nos casos em que nenhum desses principais suspeitos apresente uma variante correspondente ao quadro observado, ampliar-se a análise através de outras metodologias e buscando incluir outros genes que possam estar envolvidos.

Importante também, identificar e interpretar indícios de situações atípicas que as plataformas de MPS possam oferecer, como o de deleções massivas. Para que estas possam ser verificadas por meio das metodologias mais adequadas, como a *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) ou microarranjos.

Outro ponto importante é o caso das variantes não descritas, que devem ser criteriosamente analisadas para que sua patogenicidade venha a ser estabelecida corretamente, seguindo as determinações do ACMG (Richards et al. 2015). As variantes devem ser pesquisadas não só nas bases de dados disponíveis das doenças, como também em bases curadas de variantes patogênicas e em bancos de dados populacionais, como o gnomAD (*Genome Aggregation Database*), que possui 125.748 sequências de exomas e 15.708 genomas completos, de indivíduos não-relacionados, que foram sequenciados por conta de diferentes estudos populacionais e de doenças (Karczewski et al. 2020) e o ABraOM (Arquivo Brasileiro Online de Mutações), que é um banco de dados populacional, com uma coorte de 1.171 idosos de diferentes etnias do Brasil (Naslavsky et al. 2020). Sempre que possível, a análise da fase das variantes deve ser efetuada. Num cenário ideal, a conclusão da classificação das variantes novas, se dará por ensaios funcionais, como pela técnica de mutagênese sítio-dirigida seguida da expressão *in vitro* da proteína mutante.

13 CONCLUSÕES

As conclusões da presente tese serão apresentadas abaixo, relacionadas de acordo com os objetivos específicos propostos.

i) Caracterizar as variantes presentes no gene *PAH*, causador de fenilcetonúria, em uma amostra de pacientes brasileiros;

Foram encontradas 26 diferentes variantes patogênicas no gene *PAH*, incluindo uma variante nova potencialmente patogênica (p.Pro175Arg). Com isso, evidencia-se a heterogeneidade alélica do gene *PAH*. A variante mais frequentemente encontrada foi a c.1315+1G>A, que também é frequente em populações do Norte da Europa, especialmente a Alemanha. A prevalência das variantes encontradas difere daquela relatada para outras populações de pacientes brasileiros, e que poderia ser explicada pelas diferentes origens étnicas das mesmas.

ii) Realizar a associação das alterações moleculares observadas no fenótipo de pacientes com fenilcetonúria com o desfecho de responsividade à tetrahydrobiopterina;

A análise genética permitiu determinar a provável responsividade ao BH₄ em 27,2% dos pacientes que não haviam realizado o teste de responsividade. Outros 30,3% dos pacientes tiveram seus dados do teste de responsividade corroborados com os dados genéticos disponíveis no banco de dados BioPKU. Porém, 12,1% dos pacientes apresentaram divergência entre o resultado do teste de responsividade ao BH₄ e a informação do BioPKU. Por fim, em 15,1% dos pacientes não foi possível obter informações a respeito da associação genótipo-fenótipo por conta da ausência de dados dos genótipos encontrados nesses pacientes, no banco de dados BioPKU. Nosso estudo contribuiu para a inclusão de maiores informações a respeito de associação genótipo-fenótipo de fenilcetonúria no banco de dados BioPKU.

iii) Caracterizar as variantes presentes nos genes *PTS*, *GCH1*, *QDPR*, *PCBD*, *GCHFR* e *SPR* causadores das deficiências de tetrahydrobiopterina em pacientes brasileiros;

Foi possível complementar o diagnóstico de três pacientes com deficiência de tetrahydrobiopterina, todos com diagnóstico prévio bioquímico de deficiência de PTPS. Os pacientes, como esperado, apresentaram alteração no gene *PTS*, sem variantes comuns. Foram identificadas três variantes novas sendo estas c.84-2A>G, p.Asn45Ile e p.Thr135Ala, o que contribui para a caracterização da heterogeneidade alélica da deficiência de PTPS.

iv) Realizar a associação entre os genótipos e os fenótipos da deficiência de tetrahydrobiopterina;

As associações genótipo-fenótipo neste trabalho não foram possíveis por conta do tamanho amostral pequeno, por existir divergências nos achados clínicos, decorrentes do diagnóstico tardio dos pacientes e da presença de variantes novas em todos os pacientes.

v) Determinar as variantes presentes nos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* em uma amostra de pacientes brasileiros com MSUD;

O perfil genético dos pacientes com MSUD mostrou-se heterogêneo, com variantes identificadas nos três genes relacionados à doença. Um total de 21 variantes diferentes foram identificadas, sete delas novas: p.Tyr413His no gene *BCKDHA* e p.Pro27=fsTer75, p.Ile129LeufsTer101, p.Ile160Phe, p.Asn176Lys, p.Leu326Pro e c.1039-2A>G no gene *BCKDHB*. O gene mais afetado foi o *BCKDHB* (57,1% pacientes), o que está de acordo com o reportado na literatura. Não foram identificadas variantes patogênicas frequentes nos pacientes.

vi) Caracterizar a associação entre genótipo e fenótipo de pacientes com MSUD.

Não foi possível estabelecer associações específicas entre genótipo e fenótipo de pacientes com MSUD, devido à heterogeneidade alélica e divergências entre as informações clínicas por conta de diagnóstico tardio dos pacientes. Associações genótipo-fenótipo nos pacientes com MSUD devem ser analisadas com cuidado, pois o diagnóstico tardio pode levar à falta de confiabilidade nas associações.

14 PERSPECTIVAS

A presente pesquisa permitiu a compreensão de aspectos genéticos da fenilcetonúria, deficiência de tetrahydrobiopterina e da doença da urina do xarope do bordo. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho também permitiram a realização de novos questionamentos, a serem os próximos passos para a continuidade desta pesquisa:

- I. A realização de análises funcionais das novas variantes patogênicas encontradas, para caracterizá-las e concluir a determinação de patogenicidade;
- II. A análise de variantes patogênicas fora das regiões-alvo do painel gênico, de forma a concluir os casos em aberto;
- III. A análise dos casos de suspeita de deleção através da técnica de MLPA ou de microarranjo para a análise de possíveis deleções de éxons inteiros;
- IV. Análise dos genes *SLC7A5*, *DNAJC12*, *PPM1K* e *BCKDK* para a procura de possíveis variantes patogênicas e polimorfismos que possam vir a ser modificadores de fenótipo;
- V. Mapeamento da história natural e origem das principais variantes do gene *PAH* em pacientes Brasileiros através de haplótipos.

15 REFERÊNCIAS

- Ahmed SS, Rubin H, Wang M, Faulkner D, Sengooba A, Dollive SN, Avila N, Ellsworth JL, Lamppu D, Lobikin M et al. (2020) Sustained Correction of a Murine Model of Phenylketonuria following a Single Intravenous Administration of AAVHSC15-PAH. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 17:568–580. doi: 10.1016/j.omtm.2020.03.009
- Al Hafid N and Christodoulou J (2015) Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl Pediatr* 4:304–17. doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.10.07
- Almannai M, Felemban R, Saleh MA, Faqeih EA, Alasmari A, AlHashem A, Mohamed S, Sunbul R, Al-Murshedi F, AlThihli K et al. (2019) 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase Deficiency: Review and Report of 28 Arab Subjects. *Pediatr Neurol* 96:40–47. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.02.008
- Ambrus A and Adam-Vizi V (2018) Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism. *Neurochem Int* 117:5–14. doi: 10.1016/j.neuint.2017.05.018
- Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thöny B, Shen N, Guarani V, Meissner T, Mayatepek E, Trefz FK et al. (2017) Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet* 100:257–266. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.002
- Arnold GL (2018) Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present. *Ann Transl Med* 6:467–467. doi: 10.21037/atm.2018.11.36
- Aulehla-Scholz C and Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 21:399–400. doi: 10.1002/humu.9116
- Badell IR, Hanish SI, Hughes CB, Hewitt WR, Chung RT, Spivey JR and Knechtle SJ (2013) Domino liver transplantation in maple syrup urine disease: A case report and review of the literature. *Transplant Proc* 45:806–809. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.04.031
- Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M and Vargas CR (2008) Maple syrup urine disease in treated patients: Biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41:317–324. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.11.015
- Bender DA (2012) Amino acid metabolism. John Wiley & Sons
- Bik-Multanowski M, Bik-Multanowska K, Betka I and Madetko-Talowska A (2021) The rs113883650 variant of SLC7A5 (LAT1) gene may alter brain phenylalanine content in PKU. *Mol Genet Metab Reports* 27:100751. doi: 10.1016/j.ymgmr.2021.100751
- Blackburn PR, Gass JM, Pinto e Vairo F, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, Klee EW, Atwal PS, Pinto F, Macklin S et al. (2017) Maple syrup urine disease: Mechanisms and management. *Appl Clin Genet* 10:57–66. doi: 10.2147/TACG.S125962

- Blanco A and Blanco G (2017) Amino Acid Metabolism. *Med Biochem* 367–399. doi: 10.1016/B978-0-12-803550-4.00016-1
- Blau N (2016) Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat* 37:508–515. doi: 10.1002/humu.22980
- Blau N and Erlandsen H (2004) The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 82:101–111. doi: 10.1016/j.ymgme.2004.03.006
- Blau N, Martinez A, Hoffmann GF and Thöny B (2018) DNAJC12 deficiency: A new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninurias. *Mol Genet Metab* 123:1–5. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.11.005
- Blau N and van Spronsen FJ (2014) Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Heidelberg, pp 3–21
- Blau N, Van Spronsen FJ and Levy HL (2010) Phenylketonuria. *Lancet* 376:1417–1427. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0
- Bodamer OA (2010) Screening for phenylketonuria. *Ann Nestle* 68:53–57. doi: 10.1159/000312812
- Brasil. Ministério da Saúde. (2001) Portaria Nº 822, de 06 de junho de 2001. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil
- Brasil. Ministério da Saúde. (2016) Triagem neonatal biológica. Ministério da Saúde, Brasília
- Brasil (2021) LEI Nº 14.154, DE 26 DE MAIO DE 2021.
- Brosnan JT and Brosnan ME (2006) Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation. *J Nutr* 136:207S–11S.
- Brunetti-Pierri N, Lanpher B, Erez A, Ananieva EA, Islam M, Marini JC, Sun Q, Yu C, Hegde M, Li J et al. (2011) Phenylbutyrate therapy for maple syrup urine disease. *Hum Mol Genet* 20:631–640. doi: 10.1093/hmg/ddq507
- Burrage LC, Nagamani SCS, Campeau PM and Lee BH (2014) Branched-chain amino acid metabolism: From rare Mendelian diseases to more common disorders. *Hum Mol Genet* 23:1–8. doi: 10.1093/hmg/ddu123
- Butel MJ (2014) Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect* 44:1–8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002
- Campanholi DRR, Margutti AVB, Silva WA, Garcia DF, Molfetta GA, Marques AA, Schwartz IVD, Cornejo V, Hamilton V, Castro G et al. (2021) Molecular basis of various forms of maple syrup urine disease in Chilean patients. *Mol Genet Genomic Med* 9:1–11. doi: 10.1002/mgg3.1616
- Cao YY, Qu YJ, Song F, Zhang T, Bai JL, Jin YW and Wang H (2014) Fast clinical molecular diagnosis of hyperphenylalaninemia using next-generation sequencing-based on a custom AmpliSeq™ panel and Ion Torrent PGM sequencing. *Mol Genet Metab* 113:261–266. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.10.004

- Chace DH and Hannon WH (2016) Technological Journey From Colorimetric to Tandem Mass Spectrometric Measurements in the Diagnostic Investigation for Phenylketonuria. *J Inborn Errors Metab Screen* 4:232640981667173. doi: 10.1177/2326409816671733
- Chapman KA, Gramer G, Viall S and Summar ML (2018) Incidence of maple syrup urine disease, propionic acidemia, and methylmalonic aciduria from newborn screening data. *Mol Genet Metab Reports* 15:106–109. doi: 10.1016/j.ymgmr.2018.03.011
- Chiong MAD, Tan MA, Cordero CP, Fodra EGD, Manliguis JS, Lopez CP and Dalmacio LMM (2016) Plasma amino acid and urine organic acid profiles of Filipino patients with maple syrup urine disease (MSUD) and correlation with their neurologic features. *Mol Genet Metab Reports* 9:46–53. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.10.004
- Chiu Y-H, Chang Y-HY-C, Chang Y-HY-C, Niu D-M, Yang Y-L, Ye J, Jiang J, Okano Y, Lee DH, Pangkanon S et al. (2012) Mutation spectrum of and founder effects affecting the PTS gene in East Asian populations. *J Hum Genet* 57:145–152. doi: 10.1038/jhg.2011.146
- Chuang DT (1998) Maple syrup urine disease: It has come a long way. *J Pediatr* 132:17–23. doi: 10.1016/s0022-3476(98)70523-2
- Chuang DT, Chuang JL and Wynn RM (2006) Branched-Chain Amino Acids : Metabolism , Physiological Function , and Application Lessons from Genetic Disorders of Branched-Chain Amino. *J Nutr* 243–249.
- Conway ME and Hutson SM (2016) BCAA Metabolism and NH₃ Homeostasis. In: Schousboe A and Sonnewald U (eds) *The Glutamate / Glutamine Cycle*, 13th ed. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 99–132
- Couce ML, Ramos F, Bueno MA, Díaz J, Meavilla S, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A and García-Cazorla A (2015) Evolution of maple syrup urine disease in patients diagnosed by newborn screening versus late diagnosis. *Eur J Paediatr Neurol* 19:652–659. doi: 10.1016/j.ejpn.2015.07.009
- Dancis J, Hutzler J and Levitz M (1960) Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *BBA - Biochim Biophys Acta* 43:342–343. doi: 10.1016/0006-3002(60)90448-0
- De Cario R, Kura A, Suraci S, Magi A, Volta A, Marcucci R, Gori AM, Pepe G, Giusti B and Sticchi E (2020) Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? *Front Genet* 11:1–8. doi: 10.3389/fgene.2020.592588
- Dekker SL, Kampinga HH and Bergink S (2015) DNAJs: More than substrate delivery to HSPA. *Front Mol Biosci* 2:1–8. doi: 10.3389/fmolb.2015.00035
- Edelmann L, Wasserstein MP, Kornreich R, Sansaricq C, Snyderman SE and Diaz GA (2001) Maple syrup urine disease: Identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 69:863–868. doi: 10.1086/323677
- Fang X, Zhu X, Feng Y, Bai Y, Zhao X, Kong X and Liu N (2021) Genetic analysis

by targeted next-generation sequencing and novel variation identification of maple syrup urine disease. doi: 10.21203/RS.3.RS-221149/V1

Ferreira CR, Rahman S, Keller M and Zschocke J (2021) An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis* 44:164–177. doi: 10.1002/jimd.12348

Fiege B and Blau N (2007) Assessment of Tetrahydrobiopterin (BH4) Responsiveness in Phenylketonuria. *J Pediatr* 150:627–630. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.02.017

Flaschker N, Feyen O, Fend S, Simon E, Schadewaldt P and Wendel U (2007) Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 30:903–909. doi: 10.1007/s10545-007-0579-x

Flydal MI, Alcorlo-Pagés M, Johannessen FG, Martínez-Caballero S, Skjærven L, Fernandez-Leiro R, Martinez A and Hermoso JA (2019) Structure of full-length human phenylalanine hydroxylase in complex with tetrahydrobiopterin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 166:11229–11234. doi: 10.1073/pnas.1902639116

Følling I (1994) The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr* 83:4–10. doi: 10.1111/j.1651-2227.1994.tb13440.x

Foroozani H, Abiri M, Salehpour S, Bagherian H, Sharifi Z, Alaei MR, Khatami S, Azadmeh S, Setoodeh A, Rejali L et al. (2015) Molecular Characterization of QDPR Gene in Iranian Families with BH4 Deficiency: Reporting Novel and Recurrent Mutations. *JIMD Rep* 21:123–128. doi: 10.1007/8904_2015_441

Frazier DM, Allgeier C, Homer C, Marriage BJ, Ogata B, Rohr F, Splett PL, Stenbridge A and Singh RH (2014) Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: An evidence- and consensus-based approach. *Mol Genet Metab* 112:210–217. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.05.006

Gallego D, Leal F, Gámez A, Castro M, Navarrete R, Sanchez-Lijarcio O, Vitoria I, Bueno-Delgado M, Belanger-Quintana A, Morais A et al. (2020) Pathogenic variants of DNAJC12 and evaluation of the encoded co-chaperone as a genetic modifier of hyperphenylalaninemia. *Hum Mutat*. doi: 10.1002/humu.24026

Gámez A, Sarkissian CN, Wang L, Kim W, Straub M, Patch MG, Chen L, Striepeke S, Fitzpatrick P, Lemontt JF et al. (2005) Development of pegylated forms of recombinant *Rhodosporidium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol Ther* 11:986–989. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.02.013

Garbade SF, Shen N, Himmelreich N, Haas D, Trefz FK, Hoffmann GF, Burgard P and Blau N (2019) Allelic phenotype values: a model for genotype-based phenotype prediction in phenylketonuria. *Genet Med* 21:580–590. doi: 10.1038/s41436-018-0081-x

Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, Lagler FB, Sommerhoff CP, Roscher AA and Muntau AC (2008) Loss of Function in Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *Am J Hum Genet* 83:5–17. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.05.013

Ghosh A, Schlecht H, Heptinstall LE, Bassett JK, Cartwright E, Bhaskar SS,

Urquhart J, Broomfield A, Morris AA, Jameson E et al. (2017) Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing. *Arch Dis Child* archdischild-2017-312738. doi: 10.1136/archdischild-2017-312738

Gundorova P, Kuznetcova IA, Baydakova G V., Stepanova AA, Itkis YS, Kakaulina VS, Alferova IP, Lyazina L V., Andreeva LP, Kanivets I et al. (2021) BH4-deficient hyperphenylalaninemia in Russia. *PLoS One* 16:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0249608

Gupta D, Bijarnia-Mahay S, Saxena R, Kohli S, Dua-Puri R, Verma J, Thomas E, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Deb R et al. (2015) Identification of mutations, genotype-phenotype correlation and prenatal diagnosis of maple syrup urine disease in Indian patients. *Eur J Med Genet* 58:471–478. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.08.002

Heintz C, Cotton RGH and Blau N (2013) Tetrahydrobiopterin, its Mode of Action on Phenylalanine Hydroxylase, and Importance of Genotypes for Pharmacological Therapy of Phenylketonuria. *Hum Mutat* 34:927–936. doi: 10.1002/humu.22320

Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Müller M, Schadewaldt P, Gärtner J and Wendel U (2003) Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 22:417–417. doi: 10.1002/humu.9187

Herber S, Schwartz IVD, Nalin T, Oliveira Netto CB, Camelo Junior JS, Santos ML, Ribeiro EM, Schüler-Faccini L and Souza CFM de (2015) Maple syrup urine disease in Brazil: A panorama of the last two decades. *J Pediatr (Rio J)* 91:292–298. doi: 10.1016/j.jped.2014.08.010

Hillert A, Anikster Y, Belanger-Quintana A, Burlina A, Burton BK, Carducci C, Chiesa AE, Christodoulou J, Đorđević M, Desviat LR et al. (2020) The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *Am J Hum Genet* 107:234–250. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.06.006

Himmelreich N, Blau N and Thöny B (2021) Molecular and metabolic bases of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab* 133:123–136. doi: 10.1016/j.ymgme.2021.04.003

Hoffmann GF, Zschocke J and Nyhan WL (2017) *Inherited Metabolic Diseases*. doi: 10.1007/978-3-662-49410-3

Hole M, Jorge-Finnigan A, Underhaug J, Teigen K and Martinez A (2016) Pharmacological chaperones that protect tetrahydrobiopterin dependent aromatic amino acid hydroxylases through different mechanisms. *Curr Drug Targets* 15:1515–1526. doi: 10.2174/1389450117666160307143512

Horvath GA, Stockler-Ipsiroglu SG, Salvarinova-Zivkovic R, Lillquist YP, Connolly M, Hyland K, Blau N, Rupar T and Waters PJ (2008) Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: Evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms. *Mol Genet Metab* 94:127–131. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.01.003

Hoskins J, Jack G, Peiris RD, Starr DT, Wade H, Wright E and Stern J (1980) ENZYMATIC CONTROL OF PHENYLALANINE INTAKE IN PHENYLKETONURIA.

Lancet 315:392–394. doi: 10.1016/S0140-6736(80)90944-7

Isabella VM, Ha BN, Castillo MJ, Lubkowitz DJ, Rowe SE, Millet YA, Anderson CL, Li N, Fisher AB, West KA et al. (2018) Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria. *Nat Biotechnol* 36:857–867. doi: 10.1038/nbt.4222

Jardim LB, Giugliani R, Coelho JC, Dutra-Filho CS and Blau N (1994) Possible high frequency of tetrahydrobiopterin deficiency in South Brazil. *J Inherit Metab Dis* 17:223–229. doi: 10.1007/BF00711622

Kampinga HH and Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:579–592. doi: 10.1038/nrm2941

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP et al. (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581:434–443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7

Kuhl A, Van Calcar S, Baker M, Seroogy CM, Rice G and Scott Schwoerer J (2017) Development of carrier testing for common inborn errors of metabolism in the Wisconsin Plain population. *Genet Med* 19:352–356. doi: 10.1038/gim.2016.104

Kure S, Hou D-C, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y and Narisawa K (1999) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 135:375–378. doi: 10.1016/S0022-3476(99)70138-1

Lanpher B, Brunetti-Pierri N and Lee B (2006) Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet* 7:449–459. doi: 10.1038/nrg1880

Liu T-T, Hsiao K-J, Lu S-F, Wu S-J, Wu K-F, Chiang S-H, Liu X-Q, Chen R-G and Yu W-M (1998) Mutation analysis of the 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase gene in Chinese hyperphenylalaninemia caused by tetrahydrobiopterin synthesis deficiency. *Hum Mutat* 11:76–83. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:1<76::AID-HUMU12>3.0.CO;2-W

Longo N (2009) Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 32:333–342. doi: 10.1007/s10545-009-1067-2

Longo N, Harding CO, Burton BK, Grange DK, Vockley J, Wasserstein M, Rice GM, Dorenbaum A, Neuenburg JK, Musson DG et al. (2014) Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 384:37–44. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61841-3

Lu D-Y, Ye J, Han L-S, Qiu W-J, Zhang H-W, Zhou J-D, Bao P-Z, Zhang Y-F and Gu X-F (2014) QDPR gene mutation and clinical follow-up in Chinese patients with dihydropteridine reductase deficiency. *World J Pediatr* 10:219–226. doi: 10.1007/s12519-014-0496-7

Lu G, Ren S, Korge P, Choi J, Dong Y, Weiss J, Koehler C, Chen JN and Wang Y (2007) A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates

the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes Dev* 21:784–796. doi: 10.1101/gad.1499107

Lu G, Sun H, Korge P, Koehler CM, Weiss JN and Wang Y (2009) Chapter 14 Functional Characterization of a Mitochondrial Ser/Thr Protein Phosphatase in Cell Death Regulation. *Acta Pharmacologica Sinica*. pp 255–273

MacDonald A, van Wegberg AMJ, Ahring K, Beblo S, Bélanger-Quintana A, Burlina A, Campistol J, Coşkun T, Feillet F, Giżewska M et al. (2020) PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. *Orphanet J Rare Dis* 15:171. doi: 10.1186/s13023-020-01391-y

Margutti AVB, Silva WA, Garcia DF, de Molfetta GA, Marques AA, Amorim T, Prazeres VMG, Boy da Silva RT, Miura IK, Seda Neto J et al. (2020) Maple syrup urine disease in Brazilian patients: variants and clinical phenotype heterogeneity. *Orphanet J Rare Dis* 15:1–11. doi: 10.1186/s13023-020-01590-7

Mazariegos G V., Morton DH, Sindhi R, Soltys K, Nayyar N, Bond G, Shellmer D, Shneider B, Vockley J and Strauss KA (2012) Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: Long-term follow-up in 37 patients and comparative united network for organ sharing experience. *J Pediatr* 160:116-121.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.06.033

MENKES JH (1959) Maple syrup disease; isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* 23:348–53.

MENKES JH, HURST PL and CRAIG JM (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462–7.

Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M et al. (2011) In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 26:21–28. doi: 10.1007/s11011-011-9238-x

Napolitano L, Galluccio M, Scalise M, Parravicini C, Palazzolo L, Eberini I and Indiveri C (2017) Novel insights into the transport mechanism of the human amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). Probing critical residues for substrate translocation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1861:727–736. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.01.013

Naslavsky M, Scliar M, Yamamoto G, Wang J, Zverinova S, Karp T, Nunes K, Ceroni JR, Carvalho D, Simões CE et al. (2020) Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). doi: 10.21203/RS.3.RS-85969/V1

Nellis MM and Danner DJ (2001) Gene Preference in Maple Syrup Urine Disease. *Am J Hum Genet* 68:232–237. doi: 10.1086/316950

Novarino G, El-Fishawy P, Kayserili H, Meguid N a, Scott EM, Schroth J, Silhavy JL, Kara M, Khalil RO, Ben-Omran T et al. (2012) Mutations in BCKD-kinase Lead to a Potentially Treatable Form of Autism with Epilepsy. *Science* (80-) 338:394–397. doi: 10.1126/science.1224631

Opladen T, López-Laso E, Cortès-Saladelafont E, Pearson TS, Sivri HS, Yildiz Y,

Assmann B, Kurian MA, Leuzzi V, Heales S et al. (2020) Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Orphanet J Rare Dis* 15:1–30. doi: 10.1186/s13023-020-01379-8

Oyarzabal A, Martínez-Pardo M, Merinero B, Navarrete R, Desviat LR, Ugarte M and Rodríguez-Pombo P (2013) A Novel Regulatory Defect in the Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Complex Due to a Mutation in the PPM1K Gene Causes a Mild Variant Phenotype of Maple Syrup Urine Disease. *Hum Mutat* 34:355–362. doi: 10.1002/humu.22242

Pan BF, Gao C, Ren SX, Wang Y Bin, Sun HP and Zhou MY (2015) Regulation of PP2Cm expression by miRNA-204/211 and miRNA-22 in mouse and human cells. *Acta Pharmacol Sin* 36:1480–1486. doi: 10.1038/aps.2015.119

Park H, Lee DH, Hong YH, Kang DH, Lee YK, Song J, Lee S, Kim J, Ki C and Lee Y (2011) Three Korean Patients with Maple Syrup Urine Disease: Four Novel Mutations in the BCKDHA Gene. *Hum Mutat* 41:167–173.

Park K, Park S, Lee E, Park J, Park J, Park H, Lee S and Kim J (2016) A Population-Based Genomic Study of Inherited Metabolic Diseases Detected Through Newborn Screening. *Ann Lab Med* 36:561–572.

Penrose LS (1935) Inheritance of Phenylpyruvic Amentia (Phenylketonuria). *Lancet* 226:192–194. doi: 10.1016/S0140-6736(01)04897-8

Pey AL, Pérez B, Desviat LR, Martínez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gámez A, Stevens RC, Thórolfsson M, Ugarte M et al. (2004) Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 24:388–399. doi: 10.1002/humu.20097

Phipps WS, Jones PM and Patel K (2019) Amino and organic acid analysis: Essential tools in the diagnosis of inborn errors of metabolism, 1st ed. *Adv Clin Chem*. doi: 10.1016/bs.acc.2019.04.001

Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH and Ganapathy V (1999) Human LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport Function. *Biochem Biophys Res Commun* 255:283–288. doi: 10.1006/bbrc.1999.0206

Puffenberger EG (2003) Genetic heritage of the Old Order Mennonites of southeastern Pennsylvania. *Am J Med Genet - Semin Med Genet* 121 C:18–31. doi: 10.1002/ajmg.c.20003

Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F et al. (2008) Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 94:148–156. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.02.008

Radons J (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 21:379–404. doi: 10.1007/s12192-016-0676-6

Reid ES, Papandreou A, Drury S, Boustred C, Yue WW, Wedatilake Y, Beesley C, Jacques TS, Anderson G, Abulhoul L et al. (2016) Advantages and pitfalls of an extended gene panel for investigating complex neurometabolic phenotypes. *Brain*

139:2844–2854. doi: 10.1093/brain/aww221

Remec ZI, Trebusak Podkrajsek K, Repic Lampret B, Kovac J, Groselj U, Tesovnik T, Battelino T and Debeljak M (2021) Next-Generation Sequencing in Newborn Screening: A Review of Current State. *Front Genet.* doi: 10.3389/fgene.2021.662254

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–423. doi: 10.1038/gim.2015.30

Robinson BH, Taylor J and Sherwood WG (1977) Deficiency of Dihydrolipoyl Dehydrogenase (a Component of the Pyruvate and α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complexes): A Cause of Congenital Chronic Lactic Acidosis in Infancy. *Pediatr Res* 11:1198–1202. doi: 10.1203/00006450-197712000-00006

Sarkissian CN and Gámez A (2005) Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab* 86:22–26. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.06.016

Saudubray JM, Mochel F, Lamari F and Garcia-Cazorla A (2019) Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: A practical guide for clinicians. *J Inherit Metab Dis* 42:706–727. doi: 10.1002/jimd.12086

Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F, Domingui D, Pescador B, Comim CM, Schuck PF, Ferreira GC et al. (2012) Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res* 231:92–96. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.004

Scalise M, Galluccio M, Console L, Pochini L and Indiveri C (2018) The human SLC7A5 (LAT1): The intriguing histidine/large neutral amino acid transporter and its relevance to human health. *Front Chem* 6:1–12. doi: 10.3389/fchem.2018.00243

Scott SA, Edelmann L, Liu L, Luo M, Desnick RJ and Kornreich R (2010) Experience with carrier screening and prenatal diagnosis for 16 Ashkenazi Jewish genetic diseases. *Hum Mutat* 31:1240–1250. doi: 10.1002/humu.21327

Silva FC, Torrezan GT, Brianese RC, Stabellini R and Carraro DM (2017) Pitfalls in genetic testing: a case of a SNP in primer-annealing region leading to allele dropout in BRCA1. *Mol Genet Genomic Med* 5:443–447. doi: 10.1002/mgg3.295

Souza CAA de, Alves MRA, Soares R del L, Kanufre V de C, Rodrigues V de M, Norton R de C, Starling ALP and Aguiar MJB de (2018) BH4 deficiency identified in a neonatal screening program for hyperphenylalaninemia. *J Pediatr (Rio J)* 94:170–176. doi: 10.1016/j.jped.2017.04.005

Sperringer JE, Addington A and Hutson SM (2017) Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res* 42:1–13. doi: 10.1007/s11064-017-2261-5

Stenson PD, Mort M, Ball E V., Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD and Cooper DN (2017) The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 136:665–677. doi:

10.1007/s00439-017-1779-6

Strauss K, Puffenberger E and Morton D (2013) Maple syrup urine disease. GeneReviews® [Internet]

Thöny B, Auerbach G and Blau N (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347 Pt 1:1–16. doi: 10.1042/0264-6021:3470001

Thöny B and Blau N (2006) Mutations in the BH 4 -metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat* 27:870–878. doi: 10.1002/humu.20366

Totomoch-Serra A, Marquez MF and Cervantes-Barragán DE (2017) Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research* 6:1–7. doi: 10.12688/f1000research.11610.1

Trevisan LM, Nalin T, Tonon T, Veiga LM, Vargas P, Krug BC, Leivas PGC and Schwartz IVD (2015) Access to treatment for phenylketonuria by judicial means in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cien Saude Colet* 20:1607–1616. doi: 10.1590/1413-81232015205.08302014

Trujillano D, Perez B, González J, Tornador C, Navarrete R, Escaramis G, Ossowski S, Armengol L, Cornejo V, Desviat LR et al. (2014) Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninurias using high-throughput targeted sequencing. *Eur J Hum Genet* 22:528–534. doi: 10.1038/ejhg.2013.175

Utz JRJ, Lorentz CP, Markowitz D, Rudser KD, Diethelm-Okita B, Erickson D and Whitley CB (2012) START, a double blind, placebo-controlled pharmacogenetic test of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 105:193–197. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.10.014

Vaidyanathan K, Narayanan MP and Vasudevan DM (2011) Organic acidurias: An updated review. *Indian J Clin Biochem* 26:319–325. doi: 10.1007/s12291-011-0134-2

van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N and Bosch AM (2021) Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Prim* 7:1–19. doi: 10.1038/s41572-021-00267-0

van Spronsen FJ, Hoeksma M and Reijngoud DJ (2009) Brain dysfunction in phenylketonuria: Is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inher Metab Dis* 32:46–51. doi: 10.1007/s10545-008-0946-2

van Spronsen FJ, van Wegberg AM, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, Burlina A, Campistol J, Feillet F, Gizewska M et al. (2017) Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8587:1–14. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30320-5

Vieira Neto E, Laranjeira F, Quelhas D, Ribeiro I, Seabra A, Mineiro N, d. M. Carvalho L, Lacerda L and G. Ribeiro M (2018) Mutation analysis of the PAH gene in phenylketonuria patients from Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mol Genet Genomic Med* 6:575–591. doi: 10.1002/mgg3.408

Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, Ringnalda F, Pogliano CB, Allegri G,

- Fingerhut R, Häberle J, Matos J, Robinson MD et al. (2018) Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat Med* 24:1519–1525. doi: 10.1038/s41591-018-0209-1
- Wasim M, Awan FR, Khan HN, Tawab A, Iqbal M and Ayesha H (2018) Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. *Biochem Genet* 56:7–21. doi: 10.1007/s10528-017-9825-6
- Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S and Rudan I (2018) Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. *J Glob Health*. doi: 10.7189/jogh.08.021102
- Werner ER, Blau N and Thöny B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J* 438:397–414. doi: 10.1042/BJ20110293
- Wettstein S, Underhaug J, Perez B, Marsden BD, Yue WW, Martinez A and Blau N (2015) Linking genotypes database with locus-specific database and genotype–phenotype correlation in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 23:302–309. doi: 10.1038/ejhg.2014.114
- Woolf LI and Adams J (2020) The Early History of PKU. *Int J Neonatal Screen* 6:9–12. doi: 10.3390/IJNS6030059
- Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla À, Pérez-Dueñas B, Campistol J, Ribes A, Palau F, Artuch R, Armstrong J et al. (2016) Targeted next generation sequencing in patients with inborn errors of metabolism. *PLoS One* 11:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0156359
- Zhang J, Xu Y, Li D, Fu L, Zhang X, Bao Y and Zheng L (2020) Review of the Correlation of LAT1 With Diseases: Mechanism and Treatment. *Front Chem* 8:1–15. doi: 10.3389/fchem.2020.564809
- Zhou M, Lu G, Gao C, Wang Y and Sun H (2012) Tissue-specific and nutrient regulation of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase phosphatase, protein phosphatase 2Cm (PP2Cm). *J Biol Chem* 287:23397–23406. doi: 10.1074/jbc.M112.351031
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF and Flanagan JM (2009) Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain* 132:903–918. doi: 10.1093/brain/awp024

16 APÊNDICES

16.1 Apêndice I – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – projeto 2015-0556

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PACIENTES ADULTOS)**

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, do projeto: **“Caracterização Genética e da Associação Genótipo-Fenótipo nas Hiperfenilalaninemias: um estudo baseado no Sequenciamento de Nova Geração”**.

Investigador Responsável: Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre/RS. Tel: 51-33598011.

As Hiperfenilalaninemias são um grupo de doenças genéticas, que são aquelas doenças causadas por defeitos nos genes presentes em nossas células, associadas a aumento persistente dos níveis de fenilalanina no sangue. Esse grupo de doenças pode ser dividido em dois, em um deles nós temos pacientes que apresentam alterações no gene chamado PAH, este gene é uma pequena parte do nosso DNA que tem a função de produzir a enzima fenilalanina hidroxilase. Essa enzima é responsável por se ligar a fenilalanina e transformá-la em outras moléculas importantes para as nossas células.

O outro grupo apresenta pacientes que também tem aumento da fenilalanina no sangue, mas esses tem um problema diferente. A enzima fenilalanina hidroxilase, aquela que se liga a fenilalanina, recebe uma ajuda de outra molécula para realizar sua função, a Tetrahydrobiopterina. Sem a ajuda desta última a fenilalanina hidroxilase não funciona corretamente. A tetrahydrobiopterina é formada por uma quantidade grande de outras enzimas em um processo complexo, que conta com outros seis genes. O problema em qualquer um destes genes pode ocasionar problemas na síntese da tetrahydrobiopterina, que por sua vez levará ao funcionamento incorreto da fenilalanina hidroxilase e por fim ao aumento do aminoácido fenilalanina no sangue.

Os níveis elevados desse aminoácido são tóxicos para o cérebro e por isso podem ocasionar retardo mental e problemas de comportamento. O diagnóstico e o tratamento precoces previnem estas manifestações. O tratamento é feito sempre buscando diminuir os níveis de fenilalanina no sangue, pode ser realizado através do uso de fórmulas metabólicas especiais sem a fenilalanina, de dieta pobre em fenilalanina e também administrando a Tetrahydrobiopterina sintética para os pacientes.

Estudos recentes demonstraram que alguns pacientes com Hiperfenilalaninemias melhoram com o tratamento da Tetrahydrobiopterina e alguns não. Então vamos fazer esse estudo com o objetivo de analisar todos os genes que participam da produção das

enzimas que estão envolvidas na doença e descobrir quais são os problemas que os pacientes do Brasil que respondem ao tratamento com tetrahydrobiopterina, tanto os que não respondem, possuem em seus genes.

A sua participação é voluntária consistirá na coleta de dados de prontuário, como por exemplo, idade, tipo de Hiperfenilalaninemia e valores de fenilalanina plasmática, e coleta de 5 mL de sangue.

O participante ou responsável não precisa pagar nenhum tipo de taxa para participar da pesquisa. Os participantes voluntários da pesquisa não receberão qualquer forma de pagamento pela participação na pesquisa. É garantido o direito de recusar participar do projeto, além do direito de retirar o consentimento em qualquer momento sem causar qualquer prejuízo à assistência e aos tratamentos que estiverem sendo, ou vierem a ser, dispensados a você e à sua família no Hospital.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa e a realização de coleta de sangue de 5mL.

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

Cabe salientar que esse estudo talvez não traga benefícios para você, mas pode contribuir para um melhor entendimento desta doença e a melhorar, futuramente, o acompanhamento e tratamento dos pacientes com Hiperfenilalaninemias.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis (ver acima).

Salientamos que a identificação de uma mutação causadora de doença pode ter repercussões para o indivíduo, bem como para seus familiares. Caso seja necessário, o participante e os familiares serão encaminhados ao aconselhamento genético.

Em relação ao armazenamento e utilização de algum material que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou (marcar com um X):

que este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que você seja consultado, revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros.

que este material não poderá ser armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

Em relação aos resultados desse estudo, você declara que (marcar com um X):

quer receber os resultados.

não quer receber os resultados.

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através do telefone: (51) 3359-8011. Caso necessário, você pode contatar o Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do telefone: (51) 3359- 7640 de segunda-feira à sexta-feira, das 8 horas até as 17 horas, localizado no 2º andar na sala 2227 do HCPA

Caso você decida participar deve assinar este documento em duas vias, sendo que uma ficará com você e a outra via ficará com a pesquisadora responsável.

Data: ___/___/_____

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: ___/___/_____

Pesquisador Nome: _____

Pesquisador Assinatura: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE e ESCLARECIDO - PACIENTES

Projeto: **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DA ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS HIPERFENILALANINEMIAS: UM ESTUDO BASEADO NO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Pesquisador responsável: **Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-3359 8011.

Nome do paciente: _____

Prezado paciente (ou responsável),

As Hiperfenilalaninemias são um grupo de doenças genéticas associadas a aumento persistente dos níveis do aminoácido fenilalanina no sangue. Esse grupo de doenças pode ser dividido em duas classes, uma delas é causada por alterações no gene chamado *PAH*, este gene é uma pequena parte do nosso DNA que tem a função de produzir a enzima fenilalanina hidroxilase. A segunda classe de doenças dentro das Hiperfenilalaninemias é causada por alterações em outros seis genes, *SPR*, *GCHFR*, *PCDB*, *QDPR*, *GCHI* e *PTS*. Todos estes participam da produção de uma molécula chamada Tetrahydrobiopterina, que é importante para que a enzima fenilalanina hidroxilase funcione corretamente. O problema em qualquer um destes genes pode ocasionar o aumento do aminoácido fenilalanina no sangue.

Os níveis elevados desse aminoácido são tóxicos para o cérebro e podem ocasionar retardo mental e problemas de comportamento. O diagnóstico e o tratamento precoces previnem estas manifestações. O tratamento é feito através do uso de fórmulas metabólicas especiais, de dieta pobre em fenilalanina e também administrando a Tetrahydrobiopterina para os pacientes.

Estudos recentes demonstraram que alguns pacientes melhoram com o tratamento com Tetrahydrobiopterina e outros não, e que aqueles que apresentam melhora têm algumas alterações bem específicas no DNA. Então vamos fazer esse estudo com o objetivo de analisar todos os genes que participam da produção das moléculas que estão envolvidas nessa doença e descobrir quais são as alterações no DNA que aqueles pacientes que melhoram com o tratamento de Tetrahydrobiopterina apresentam.

Serão coletados dados de prontuário, como por exemplo, idade, tipo de Hiperfenilalaninemia e valores de fenilalanina plasmática. Também será necessária a coleta de 05 mL de sangue do paciente para que possamos realizar as análises no DNA para identificar as alterações. Você pode concordar ou não com a realização destes exames. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado.

Em relação a estas coletas, você declara que autorizou a coleta de (marcar com um X):

1. () 5 mL de sangue para a análise dos genes envolvidos nas Hiperfenilalaninemias.
2. () eu não autorizei a coleta acima relacionada.

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

1. () que este material poderá ser armazenado por cinco anos e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros. Após cinco anos, este material será obrigatoriamente descartado.
2. () que este material não poderá ser armazenado por cinco anos e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado, sendo obrigatoriamente descartado.
- 3.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz (Fone: (51) 9901 7418 ou 3359 8011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, você pode entrar em

contato com o Comitê de Ética em Pesquisado HCPA, que aprovou esse projeto, através do telefone (51) 3359 7640.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

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

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

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

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

Data: ___/___/___

Paciente: _____

Responsável legal: _____

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

Data: ___/___/___

Pesquisador: _____

**16.2 Apêndice II – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – projeto
2018-0533**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 52087415.3.0000.5327

Título do Projeto: Diagnóstico da Doença da Urina do Xarope do Bordo: Perfil genético, molecular e a correlação entre o genótipo e o fenótipo de pacientes brasileiros

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é compreender melhor os mecanismos genéticos envolvidos na Doença da Urina do Xarope do Bordo, analisando todos os genes que participam da produção das enzimas dessa doença nos pacientes brasileiros. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: coleta de 5 mL de sangue e coleta de dados do prontuário.

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

Esse estudo pode não trazer benefícios diretos a você, porém, poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e a melhorar o acompanhamento e tratamento de pacientes com Doença da Urina do Xarope do Bordo, beneficiando futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pelo telefone (51) 33598011 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 52087415.3.0000.5327

Título do Projeto: Diagnóstico da Doença da Urina do Xarope do Bordo: Perfil genético, molecular e a correlação entre o genótipo e o fenótipo de pacientes brasileiros.

Pesquisador responsável: **Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-3359 8011.**

Nome do participante: _____

Prezado participante ou responsável

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é compreender melhor quais são as alterações nos genes que causam a Doença da Urina do Xarope do Bordo, e como elas causam a doença nos pacientes brasileiros. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A Doença da Urina do Xarope do Bordo é uma doença genética, isso significa que é causada por defeitos presentes nos genes em nossas células. Os genes são pequenas regiões no nosso DNA que tem funções específicas para o bom funcionamento das nossas células e por isso são muito importantes para a nossa saúde. Os pacientes com Doença da Urina do Xarope do Bordo apresentam esses defeitos em genes que afetam a atividade das enzimas.

Ainda não entendemos muito bem como essas enzimas funcionam, nem sabemos como os defeitos que os pacientes apresentam nos genes causam a doença. Nos últimos anos muitos desses defeitos foram encontrados e estudos com essas informações ajudaram a melhorar o nosso entendimento sobre a doença, mas precisamos continuar procurando por esses defeitos para conseguirmos entender totalmente o funcionamento das enzimas.

Se você aceitar participar da pesquisa, você terá que doar 5 mL de sangue venoso (equivalente a um pequeno tubo) para análise do DNA e coleta de informações do seu prontuário. O DNA terá a sua sequência analisada para identificar as mutações que causam a doença.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Esse estudo pode não trazer benefícios diretos a você, mas, poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e melhorar o diagnóstico, o acompanhamento e tratamento de pacientes com a Doença da Urina do Xarope do Bordo, beneficiando futuros pacientes.

O resultado dos exames será informado a você após o término completo da pesquisa (previsão de 2 anos). Cabe salientar que a identificação dos defeitos do DNA presentes em um dos genes que ocasionam estas doenças pode ser importante para o aconselhamento genético da sua família e para o diagnóstico pré-natal, e caso necessário, esse aconselhamento será realizado pela pesquisadora responsável sem qualquer custo para você.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Os procedimentos envolvidos neste estudo serão efetuados no momento de consulta de rotina no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não sendo necessários quaisquer deslocamentos extras do participante.

Caso ocorra algum problema ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, pelo tempo necessário, de forma integral e gratuita.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

AUTORIZAÇÕES

Você autorizou:

A coleta de 5 mL de sangue para a procura de defeitos nos genes causadores da Doença da Urina do Xarope do Bordo.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

() Sim

() Não

Se você permitir, o material coletado que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, serão armazenados e poderão ser utilizados, em estudos aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. Em relação ao armazenamento e utilização do DNA que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou:

() que este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros.

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

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pelo telefone (51) 3359-8011 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

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

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

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

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____.

Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo e que não terá

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

custos por participar do mesmo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que assinou duas vias deste consentimento, e que uma ficou em seu poder.

Data: ___/___/____

Paciente:

Responsável legal: _____

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

Data: ___/___/____

Pesquisador: _____

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 4 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

16.3 Apêndice III – Produção científica, pôsteres, apresentações em eventos e prêmios relacionados à tese



Evaluation of plasma biomarkers of inflammation in patients with maple syrup urine disease

Giselli Scaini¹ · Tássia Tonon^{2,3} · Carolina F. Moura de Souza⁴ · Patricia F. Schuck⁵ · Gustavo C. Ferreira⁶ · João Quevedo⁷ · João Seda Neto⁸ · Tatiana Amorim⁹ · Jose S. Camelo Jr¹⁰ · Ana Vitoria Barban Margutti¹⁰ · Rafael Hencke Tresbach^{2,11} · Fernanda Sperb-Ludwig^{2,11} · Raquel Boy¹² · Paula F. V. de Medeiros¹³ · Ida Vanessa D. Schwartz^{4,11} · Emilio Luiz Streck¹

Received: 9 August 2017 / Revised: 27 March 2018 / Accepted: 11 April 2018 / Published online: 8 May 2018
© SSIEM 2018

Abstract

Maple syrup urine disease (MSUD) is an autosomal recessive inherited disorder that affects branched-chain amino acid (BCAA) catabolism and is associated with acute and chronic brain dysfunction. Recent studies have shown that inflammation may be involved in the neuropathology of MSUD. However, these studies have mainly focused on single or small subsets of proteins or molecules. Here we performed a case-control study, including 12 treated-MSUD patients, in order to investigate the plasmatic biomarkers of inflammation, to help to establish a possible relationship between these biomarkers and the disease. Our results showed that MSUD patients in treatment with restricted protein diets have high levels of pro-inflammatory cytokines [IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and IL-6] and cell adhesion molecules [sICAM-1 and sVCAM-1] compared to the control group. However, no significant alterations were found in the levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, and IL-10 between healthy controls and MSUD patients. Moreover, we found a positive correlation between number of metabolic crisis and IL-1 β levels and sICAM-1 in MSUD patients. In conclusion, our findings in plasma of patients with MSUD suggest that inflammation may play an important role in the pathogenesis of MSUD, although this process is not directly associated with BCAA blood levels. Overall, data reported here are consistent with the working hypothesis that inflammation may be involved in the pathophysiological mechanism underlying the brain damage observed in MSUD patients.

Communicated by: Eva Morava

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10545-018-0188-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Emilio Luiz Streck
emiliostreck@gmail.com

¹ Laboratório de Bioenergética e Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma, SC 88806-000, Brazil

² BRAIN Laboratory (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Post Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

⁶ Laboratório de Neuroquímica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁷ Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

⁸ Hospital Sirio Libanes, São Paulo, Brazil

⁹ Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), Salvador, Brazil

¹⁰ Pediatrics Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

¹¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

¹² Pediatrics Department, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

¹³ Unidade Acadêmica de Medicina, Hospital Universitário Alcides Carneiro, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brazil

Diagnóstico genético diferencial de hiperfenilalaninemias e da doença da urina do xarope do bordo: abordagem utilizando painel de genes na plataforma Ion Torrent

Rafael Hencke Tresbach^{1,2}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Tássia Tonon^{2,3}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,3,4}

¹ – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS; ² – Laboratório BRAIN, CPE, HCPA; ³ – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, UFRGS; ⁴ – Serviço de Genética Médica, HCPA.

Introdução

Hiperfenilalaninemias genéticas (HPA) podem ser causadas por variantes patogênicas no gene fenilalanina hidroxilase (PKU, gene *PAH*) ou em genes codificadores de seu cofator tetrahydrobiopterina (deficiência de BH₄, genes *PTS*, *GCH1*, *GCHFR*, *QDPR*, *PCBD1* e *SPR*). A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é devida a diminuição da desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, codificada pelos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT*. Ambas as doenças possuem tratamento e o diagnóstico evita a progressão de desfechos neurológicos. O sequenciamento na plataforma Ion Torrent com painéis de genes permite analisar múltiplos genes de forma ágil, colaborando para o diagnóstico precoce.

Objetivos

Realizar o diagnóstico genético de HPA por PKU ou deficiência de BH₄ e DXB através da plataforma Ion Torrent.

Métodos

Amostragem e genes analisados (n=24 pacientes não-relacionados)

PKU	• Genes <i>PAH</i>	• 15 pacientes • 4 com genótipo prévio • 5 com genótipo parcial	Somente as mutações mais frequentes
Def. de BH ₄	• Genes <i>GCH1</i> , <i>GCHFR</i> , <i>PTS</i> , <i>QDPR</i> , <i>PCBD1</i> e <i>SPR</i>	• 3 pacientes	
DXB	• Genes <i>BCKDHA</i> , <i>BCKDHB</i> e <i>DBT</i>	• 6 pacientes • 1 com genótipo prévio • 2 com pais consanguíneos	Somente as regiões codificantes

Metodologia



Resultados

Foi possível obter o genótipo de 19 pacientes (n=24). Os resultados do NGS estão descritos na tabela 1. No total, foram encontradas 24 variantes (PKU=14; def. de BH₄=5; e DXB=5) e 5 variantes novas (PKU=1; def. de BH₄=2; e DXB=2). A predição de patogenicidade das novas variantes está descrita na tabela 2.

Tabela 1. Pacientes avaliados pela técnica de NGS e seus genótipos.

Paciente	Genótipo	Gene	Doença	Consanguinidade
1	c.[1222C>T];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
2	c.[1315+1G>A];[754C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
3	c.[1315+1G>A];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
4	c.[1162G>A];[473G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
5	c.[1222C>T];[722G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
6	c.[1042C>G];[1315+1G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
7	c.[1169A>G];[1162G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
8	c.[1169A>G];[1066-11G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
9	c.[1222C>T];[754C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
10	c.[1222C>T];[1169A>G]	<i>PAH</i>	PKU	Não
11	c.[754C>T];[524C>G]	<i>PAH</i>	PKU	Não
12	c.[1315+1G>A];[473G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
13	c.[814G>T];[712A>C]	<i>PAH</i>	PKU	Não
14	c.[1241A>G];[1042C>G];[1042C>G]	<i>PAH</i>	PKU	Não
15	c.[1055delG];[473G>A];[1055delG]	<i>PAH</i>	PKU	Não
16	c.[260C>T];[403A>G]	<i>PTS</i>	Def. de BH ₄	Não
17	c.[134A>T];[317C>T]	<i>PTS</i>	Def. de BH ₄	Não
18	c.[84-2A>G];[?]	<i>PTS</i>	Def. de BH ₄	Não
19	c.[853C>T];[853C>T]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Sim
20	c.[392G>T];[392G>T]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Não
21	c.[79_80insCTGGCGCGGGG];[79_80insCTGGCGCGGGG]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Sim
22	c.[498G>C];[595_395delAG]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Não
23	c.[?];[?]	?	DXB	Não
24	c.[?];[?]	?	DXB	Não

Variantes em negrito são novas.

Tabela 2. Predição de patogenicidade das novas variantes.

Genótipo	Gene	Predição
c.524C>G	<i>PAH</i>	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -8.75 (Deleterious) SIFT: 0.001 (Damaging)
c.134A>T	<i>PTS</i>	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -7.25 (Deleterious) SIFT: 0.000 (Damaging)
c.403A>G	<i>PTS</i>	PolyPhen-2: 0.990 (Probably damaging) PROVEAN: -4.75 (Deleterious) SIFT: 0.002 (Damaging)
c.392G>T	<i>BCKDHB</i>	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -7.84 (Deleterious) SIFT: 0.000 (Damaging)
c.79_80insCTGGCGCGGGG	<i>BCKDHB</i>	MutationTaster: predita como causadora de doença. Mutação frameshift: códon de parada prematuro na posição 57.

Discussão e Conclusões

O método de NGS mostra-se rápido e eficaz para o diagnóstico de doenças com mais de um gene ou de várias doenças simultaneamente.

O diagnóstico foi concluído para 19 pacientes. Para os demais, limitações da técnica serão avaliadas. Resultados serão validados por sequenciamento de Sanger nos pacientes sem diagnóstico genético prévio.

CEP/CEUA
CEP/HCPA: 2015-0556.

Apoio Financeiro
CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA, iNaGeMP, Rede DXB.

Diagnóstico genético de hiperfenilalaninemias e da doença da urina do xarope do bordo através do uso de painel de genes por sequenciamento de nova geração

Rafael Hencke Tresbach^{1,2}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Tássia Tonon^{2,3}, Iida Vanessa Doerderlein Schwartz^{1,2,3,4}

¹ – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS; ² – Laboratório BRAIN, CPE, HCPA; ³ – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, UFRGS; ⁴ – Serviço de Genética Médica, HCPA.

INTRODUÇÃO

Hiperfenilalaninemias genéticas podem ser causadas por variações nas vias metabólicas da fenilalanina hidroxilase (gene *PAH*), responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina, resultando na condição chamada fenilcetonúria (PKU) ou na via do seu cofator (genes *PTS*, *GCHI*, *GCHFR*, *PCBD1*, *QDPR* e *SPR*), a tetrahydrobiopterina, levando a um quadro de deficiência de BH₄ (BH₄ def.). Defeitos nestas vias levam ao desenvolvimento de sintomas neurológicos, quando não tratados.

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é uma condição clínica onde há defeitos na via do complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada (genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT*). Nessa condição, os pacientes apresentam um odor característico que lembra o xarope do bordo na urina, bem como, sintomas neurológicos, devido ao acúmulo plasmático dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina.

OBJETIVOS

O presente estudo visa avaliar o diagnóstico genético de HPA causado por PKU ou deficiência de BH₄ e DXB através de sequenciamento de nova geração (NGS).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos 13 pacientes (PKU n=7; BH₄ def. n=2 e DXB n=4) não relacionados, sendo desses, 8 (PKU n=7; BH₄ def. n=0 e DXB n=1) pacientes com diagnóstico prévio. O DNA foi extraído de amostras de sangue com Easy-DNA gDNA Purification Kit (Thermo Fisher) e sequenciado em plataforma IonTorrent (Thermo Fisher), utilizando painel que inclui os seguintes genes: *PAH*, *PTS*, *GCHI*, *GCHFR*, *PCBD1*, *QDPR* e *SPR* (HPA) e *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* (DXB). Variantes foram filtradas com o software Enlis Genome Research (Enlis). A análise de bioinformática foi realizada de forma cegada em relação ao diagnóstico bioquímico e genético prévio. Dados sobre prevalência populacional de variantes foram obtidos dos bancos de dados ExAC Browser e ABraOM.

Predição de patogenicidade foi realizada utilizando as plataformas PolyPhen-2, PROVEAN e SIFT. A sequência da proteína selvagem foi obtida do banco de dados NCBI. O software GenScan foi utilizado para a predição de estrutura gênica a partir do mRNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na tabela 1. Foram identificadas quinze variantes, sendo uma nova.

A variante nova foi avaliada através de preditores de patogenicidade, os quais demonstraram seu caráter patogênico (tabela 2).

No caso das hiperfenilalaninemias, foram encontradas duas variantes patogênicas frequentes: c. [1315+1G>A] (ExAC: 0,03%; ABraOM: 0,08%) e c.[1222C>T] (ExAC: 0,06%; ABraOM: 0,08%). Ambas as mutações estão relacionadas com o fenótipo de fenilcetonúria clássica, na forma grave da doença.



Figura 1. Predição da estrutura gênica, a partir do mRNA, do gene *PTS*. Acima, a forma selvagem (WT) e abaixo, a predição da alteração estrutural do mRNA em consequência da alteração c.[84-2A>G].

Tabela 1. Genótipos dos pacientes avaliados por NGS.

Paciente	Genótipo	Gene	Doença	Consanguinidade
1	c.[260C>T];[403A>G]	<i>PTS</i>	BH ₄ def.	Não
2	c.[853C>T];[853C>T]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Sim
3	c.[?];[?]	?	?	Não
4*	c.[498G>C];[595_396delAG]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Não
5*	c.[1162G>A];[473G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
6*	c.[1315+1G>A];[754C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
7*	c.[1315+1G>A];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
8*	c.[1222C>T];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU	Não
9*	c.[1222C>T];[722G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
10	c.[392G>T];[392G>T]	<i>BCKDHB</i>	DXB	Não
11*	c.[84-2A>G];[?]	<i>PTS</i>	BH ₄ def.	Não
12*	c.[84-2A>G];[?]	<i>PTS</i>	BH ₄ def.	Não
13*	c.[1042C>G];[1315+1G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não
14*	c.[1169A>G];[1162G>A]	<i>PAH</i>	PKU	Não

*Pacientes relacionados. **Negrito: variante nova.** ^apacientes com genótipo prévio por Sanger.

Tabela 2. Predição de patogenicidade da nova variante encontrada, c.[392G>T].

Preditor	Escore	Predição
PolyPhen-2	1,000	Possivelmente patogênica
PROVEAN	-7,84	Deletéria
SIFT	0,000	Patogênica

No caso da hiperfenilalaninemia por deficiência de BH₄, foram encontradas variantes apenas no gene *PTS*, que normalmente é responsável por 60% dos casos da doença. A alteração c.[84-2A>G] está em sítio de *splicing*, acarretando em ampla alteração estrutural (figura 1).

No paciente 9, o genótipo prévio obtido pelo método de Sanger c.[1222C>T];[1222C>T] foi discordante em relação ao genótipo encontrado com o NGS c.[1222C>T];[722G>A]. Esse paciente possui uma PKU leve, o que, de acordo com o banco de dados BioPKU, condiz com o genótipo encontrado pelo NGS e isso é fortalecido pelo paciente não ser filho de pais consanguíneos. O genótipo prévio é condizente com uma PKU clássica.

Nos demais pacientes (4, 7, 8 e 13) o NGS confirmou o diagnóstico prévio por método de Sanger.

Os pacientes com alelos não encontrados necessitam ser estudados caso a caso. Esses pacientes estão enquadrados na limitação da técnica de NGS, que é de 2%. Uma das razões para tal ocorrência, é a possibilidade de variantes nas regiões dos *primers* do NGS, o que resulta em não amplificação dessas regiões. A análise genética será concluída através do sequenciamento de Sanger.

No banco de dados ExAC, a única variante descrita entre as encontradas no presente trabalho é a c.[853T>C], cuja frequência é 0,0008%. Os pacientes sem diagnóstico prévio terão seus resultados validados pelo método de Sanger.

Os pacientes com alelos não encontrados serão avaliados por outras metodologias.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível identificar variantes nos genes causadores de HPA e DXB em pacientes brasileiros através de um único painel de genes por NGS. A técnica auxiliou na conclusão de diagnósticos genéticos que foram inconclusivos pelo método de Sanger. Este diagnóstico permite a análise de doenças multigênicas em menor tempo, possibilitando o correto tratamento e prevenção dos sintomas neurológicos.



Ribeirão Preto, 12 de julho de 2018.

Prezado(a) Rafael Hencke Tresbach,

A Comissão Organizadora e a Comissão Científica do **INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS 2018**, tem o prazer de informá-lo(a) que o trabalho de sua autoria, intitulado *“Next-generation sequencing as an approach to the diagnosis of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease in Brazilian patients”* foi selecionado para apresentação oral no Simpósio abaixo, durante o congresso.

Using Big Data Sets to Understand Human Diseases

Chair: Michel S. Naslavsky, IB/USP, São Paulo, SP

Using population genetic data to explore the noncoding genome

Julia di Iulio, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Next NGS approaches to unsolved patients: Telethon Undiagnosed Program

Vincenzo Nigro, Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) & University of Campania
Luigi Vanvitelli, Italy

The Online Archive of Brazilian Variants (ABraOM) and its advantages in molecular diagnosis analyses and population genomics studies

Michel S. Naslavsky, IB/USP, São Paulo, SP

Next-generation sequencing as an approach to the diagnosis of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease in Brazilian patients

Rafael Hencke Tresbach, UFRGS, Porto Alegre, RS

Para tanto V.Sa. deverá entregar sua apresentação na sala Slide Desk no dia anterior ao Simpósio. A apresentação deverá ser feita em inglês, bem como suas projeções. Informamos ainda que deverá fixar seu painel no local apropriado.

Acuse o recebimento deste email.

Carta em anexo.

Comissão Organizadora - ICG2018

Sociedade Brasileira de Genética

Rua Capitão Adélmio Norberto da Silva, 736

CEP 14025-670 – Ribeirão Preto, SP

Tel: (16) 3621-8540

E-mail contato@sbg.org.br



SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva 736 - Alto da Boa Vista
14025-670 Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fone/Fax: 16 3621-8540
E-mail: contato@sbg.org.br

Ribeirão Preto, 1 de Agosto de 2018.

Prezado(a) Rafael Hencke Tresbach,

A Comissão Organizadora do XXII International Congress of Genetics (ICG) e a Comissão Julgadora do *Registration Awards*, tem o prazer de informá-lo(a) que o trabalho de sua autoria, intitulado “**Next-generation sequencing as an approach to the diagnosis of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease in Brazilian patients**” foi selecionado como ganhador do prêmio Região Sul e terá o reembolso no valor da sua inscrição. O valor do prêmio será depositado em sua conta e seu material do Congresso deverá ser retirado na secretaria do Evento para recolhermos assinatura do recibo para a prestação de contas.

Para maiores informações entre em contato conosco pelo email contato@sbg.org.br

Atenciosamente,

Diretoria
Sociedade Brasileira de Genética
2016/2018



2018 International
CONGRESS OF GENETICS
GENETICS FOR A WORLD IN EVOLUTION



Next-generation sequencing as an approach to the diagnosis of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease in Brazilian patients

Rafael Hencke Tresbach, MSc
Fernanda Sperb-Ludwig, PhD
Tássia Tonon, MSc
Ida Vanessa Doederlein Schwartz, MD, PhD



Next-generation sequencing as an approach to the diagnosis of genetic hyperphenylalaninemia and maple syrup urine disease in Brazilian patients

Rafael Hencke Tresbach^{1,2}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Tássia Tonon^{2,3}, Ida Vanessa Doerderlein Schwartz^{1,2,3,4}

¹ – Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS; ² – BRAIN Laboratory (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences), CPE, HCPA; ³ – Post-Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS; ⁴ – Medical Genetics Service, HCPA.

INTRODUCTION

Genetic hyperphenylalaninemia (HPA) is a condition caused by pathogenic variants in the coding gene of phenylalanine hydroxylase, which leads to a disease called phenylketonuria (PKU); or in genes of the co-factor of this enzyme, the tetrahydrobiopterin, that results in a disease called BH4 deficiency.

Maple syrup urine disease (MSUD) is a disease caused by mutations in genes of the pathway of branched-chain alpha-keto acids dehydrogenase complex.

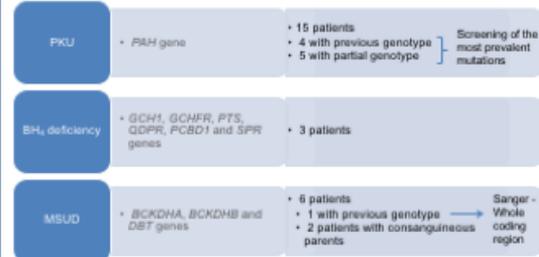
All these conditions lead to severe neurological symptoms, and early diagnosis is very important to prevent or avoid the progression of these symptoms. For this reason, next-generation sequencing (NGS) might be a better approach to make the genetic diagnosis of these patients in a shorter period of time.

OBJECTIVE

This study aims to access genetic diagnosis of HPA and MSUD using next-generation sequencing (NGS).

METHODOLOGY

Genes analyzed and Sample (n=24 non-related patients)



CONCLUSION

NGS may be a fast and effective method for diagnosis of diseases with more than one gene and more than one disease in one round only. Some issues found on this technique application can be avoided using Sanger sequencing to find the variants. NGS panel

This method allows the diagnosis of genetic diseases in a short period of time, leading to early treatment and minimizing the effects of neurological symptoms, which are irreversible.

RESULTS AND DISCUSSION

Of 24 patients, we obtained the complete genotype of 19 patients. NGS results are described in Table 1. We found in total 24 variants (PKU=14; BH₄ def.=5; and MSUD=5) and 5 novel variants (PKU=1; BH₄ def.=2; and MSUD=2).

Table 1. Patients evaluated genotype by NGS.

Patient	Genotype	Gene	Disease
1	c.[1222C>T][1222C>T]	PAH	PKU
2	c.[1315+1G>A][754C>T]	PAH	PKU
3	c.[1315+1G>A][1222C>T]	PAH	PKU
4	c.[1162G>A][473G>A]	PAH	PKU
5	c.[1222C>T][722G>A]	PAH	PKU
6	c.[1042C>G][1315+1G>A]	PAH	PKU
7	c.[1169A>G][1162G>A]	PAH	PKU
8	c.[1169A>G][1095-11G>A]	PAH	PKU
9	c.[1222C>T][754C>T]	PAH	PKU
10	c.[1222C>T][1169A>G]	PAH	PKU
11	c.[754C>T][524C>G]	PAH	PKU
12	c.[1315+1G>A][473G>A]	PAH	PKU
13	c.[814G>T][712A>C]	PAH	PKU
14	c.[1241A>G:1042C>G];c.[1042C>G]	PAH	PKU
15	c.[1055delG:473G>A];c.[1055delG]	PAH	PKU
16	c.[260C>T][403A>G]	PTS	BH4 def.
17	c.[134A>T][317C>T]	PTS	BH4 def.
18	c.[84-2A>G][?]	PTS	BH4 def.
19*	c.[863C>T][853C>T]	BCKDHB	MSUD
20	c.[392G>T][392G>T]	BCKDHB	MSUD
21*	c.[79_80insCTGGCGCGGGG];c.[79_80insCTGGCGCGGGG]	BCKDHB	MSUD
22	c.[498G>C][595_395delAG]	BCKDHB	MSUD
23	c.[?][?]	?	MSUD
24	c.[?][?]	?	MSUD

*patient with consanguineous parents. Variants in bold are novel.

In PKU, most frequent alleles found were c.1222C>T (6/30) and c.1315+1G>A (4/30). In patients 14 and 15, NGS technique detected three alleles. These variants are described as pathogenic and we will validate this result in patients and parents through Sanger sequencing.

In patients with BH₄ deficiency, we found variants only in PTS gene. Despite the fact of MSUD have three genes involved with the disease, in the patients analyzed until now, we found variants only in BCKDHB gene. In two patients with biochemical diagnosis of MSUD, no pathogenic variants were found.

Of the novel variants, we have in table 2 the results of pathogenicity prediction.

Table 2. Pathogenicity prediction of the new variants.

Genotype	Gene	Prediction
c.524C>G	PAH	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -8.75 (Deleterious) SIFT: 0.001 (Damaging)
c.114A>T	PTS	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -7.25 (Deleterious) SIFT: 0.000 (Damaging)
c.403A>G	PTS	PolyPhen-2: 0.990 (Probably damaging) PROVEAN: -4.75 (Deleterious) SIFT: 0.002 (Damaging)
c.392G>T	BCKDHB	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -7.84 (Deleterious) SIFT: 0.000 (Damaging)
c.79_80insCTGGCGCGGGG	BCKDHB	MutationTaster: predicted as disease causing. This frameshift mutation modifies splice site and a premature stop codon is believed to occur in position 57.

Phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiencies: genetic diagnosis based on next-generation sequencing

Rafael Hencke Tresbach^{1,2}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Tássia Tonon^{2,3}, Ida Vanessa Doerderlein Schwartz^{1,2,3,4}
 1 Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS; 2 BRAIN Laboratory (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences), CPE, HCPA; 3 Post-Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS; 4 Medical Genetics Service, HCPA.
 E-mail: hencke.tresbach@ufrgs.br

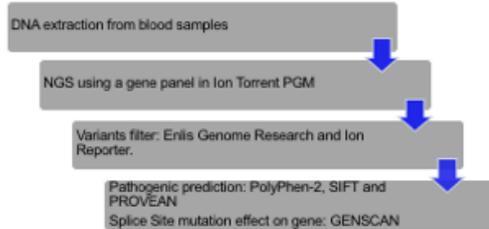
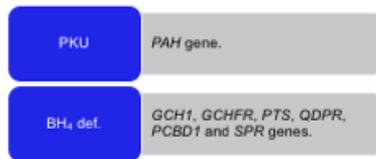
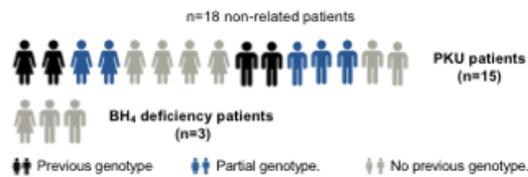
BACKGROUND

Genetic hyperphenylalaninemia (HPA) is caused by phenylketonuria (PKU), a condition due to mutations in phenylalanine hydroxylase (*PAH* gene), or by defects in the synthesis/recycling of the cofactor tetrahydrobiopterin (BH_4 deficiency: *GCH1*, *GCHFR*, *PTS*, *QDPR*, *PCBD1* and *SPR* genes), or by DNAJC12-associated hyperphenylalaninemia (*DNAJC12* gene).

OBJECTIVE

To validate the genetic diagnosis for PKU and BH_4 deficiencies by next-generation sequencing (NGS).

METHODS



RESULTS

Fifteen patients had their genotype concluded (PKU=13; BH_4 def.=2). In all patients, we found twenty variants, three of them are novel (PKU=1; BH_4 def.=2). All patients genotypes are presented in table 1.

In PKU patients, four had previous genotype and these, only three have their genotype matched.

In the patient 18, prediction of splice site mutation in GENSCAN resulted in alterations in exons 2 and 3 of wild type *PTS*, with 5 exons, as showed in figure 1.

Of the novel variants, all are predicted as pathogenic, as showed in table 2.

Table 1. Genotype of PKU and BH_4 patients evaluated by NGS.

Patient	Genotype	Gene	Disease
1	c.[1222C>T];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU
2	c.[1315+1G>A];[754C>T]	<i>PAH</i>	PKU
3	c.[1315+1G>A];[1222C>T]	<i>PAH</i>	PKU
4	c.[1162G>A];[473G>A]	<i>PAH</i>	PKU
5	c.[1222C>T];[722G>A]	<i>PAH</i>	PKU
6	c.[1042C>G];[1315+1G>A]	<i>PAH</i>	PKU
7	c.[1169A>G];[1162G>A]	<i>PAH</i>	PKU
8	c.[1169A>G];[1066-11G>A]	<i>PAH</i>	PKU
9	c.[1222C>T];[754C>T]	<i>PAH</i>	PKU
10	c.[1222C>T];[1169A>G]	<i>PAH</i>	PKU
11	c.[754C>T];[524C>G]	<i>PAH</i>	PKU
12	c.[1315+1G>A];[473G>A]	<i>PAH</i>	PKU
13	c.[814G>T];[712A>C]	<i>PAH</i>	PKU
14	c.[1241A>G;1042C>G];[1042C>G]	<i>PAH</i>	PKU
15	c.[1055delG;473G>A];[1055delG]	<i>PAH</i>	PKU
16	c.[260C>T];[403A>G]	<i>PTS</i>	BH_4 def.
17	c.[134A>T];[317C>T]	<i>PTS</i>	BH_4 def.
18	c.[84-2A>G];[?]	<i>PTS</i>	BH_4 def.

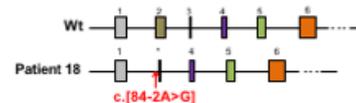


Figure 1. Prediction of the *PTS* gene structure. Above, the wild type and below, the splice site variant found in the patient 18. Boxes represents exons. * - altered exon.

Table 2. Prediction of the novel variants found in Brazilian patients.

Genotype	Gene	Prediction
c.524C>G	<i>P0AH</i>	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -8.75 (Deleterious) SIFT: 0.001 (Damaging)
c.134A>T	<i>PTS</i>	PolyPhen-2: 1.000 (Probably damaging) PROVEAN: -7.25 (Deleterious) SIFT: 0.000 (Damaging)
c.403A>G	<i>PTS</i>	PolyPhen-2: 0.990 (Probably damaging) PROVEAN: -4.75 (Deleterious) SIFT: 0.002 (Damaging)

DISCUSSION

The NGS is a fast and effective method to diagnose patients. In this work, we are able to elucidate the genotype of 15/18 patients.

Patient 5 have discordant NGS and previous genotype. We believe that the NGS genotype is correct due to genotype-phenotype association and this patient present a mild PKU form.

About the patient 18, we will perform analysis in cDNA to confirm the result of prediction. Only one allele was found in this patient. We will sequence the coding region and the cDNA of the *PTS* gene to identify the second allele.

CONCLUSION

NGS is a fast and effective method to elucidate diseases with common clinical and biochemical symptoms.

All the results will be validated by Sanger sequencing. Further analysis will be performed in patients without the two alleles identified.

SUPPORT: CAPES, CNPq, FAPERGS and FIPE/HCPA.

Genetic Hyperphenylalaninemia and Maple Syrup Urine Disease in Brazilian patients: development of diagnosis using gene panels and next-generation sequencing

Rafael Hencke Tresbach, MSc
Fernanda Sperb-Ludwig, PhD
Tássia Tonon, PhD
Ida Vanessa Doederlein Schwartz, MD, PhD

Buenos Aires, 15 de Mayo de 2019

Por cuanto el trabajo

GENETIC HYPERPHENYLALANINEMIA AND MAPLE SYRUP URINE DISEASE IN BRAZILIAN PATIENTS: DEVELOPMENT OF DIAGNOSIS USING GENE PANELS AND NEXT-GENERATION SEQUENCING

Tresbach RH, Sperb-Ludwig F, Tonon T, Schwartz IVD - Brasil

Ha sido presentado en la modalidad **COMUNICACIÓN ORAL**

Se extiende el presente certificado que lo acredita.


Dra. Carolina Fischinger M. de Souza
Presidente: Comité Científico
Errores Innatos del Metabolismo


Dr. José E. Abdenur
Presidente
SLEIMPN 2019


Dr. Gustavo J. C. Bórrajo
Presidente: Comité Científico
Pesquisa Neonatal

Diagnóstico genético da Doença da Urina do Xarope do Bordo através de sequenciamento massivo paralelo

Rafael Hencke Tresbach^{1,2}, Mariana Lopes dos Santos^{2,3}, Tássia Tonon^{2,4}, Carolina Fischinger Moura de Souza⁵, Fernanda Sperr-Ludwig^{1,2}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,4,5}

1 – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS; 2 – Laboratório BRAN, CPE, HCPA; 3 – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA); 4 – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, UFRGS; 5 – Serviço de Genética Médica, HCPA.

Introdução

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) caracteriza-se pela atividade reduzida do complexo enzimático da desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (figura 1), codificado pelos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT*. O diagnóstico precoce é importante para a condução terapêutica e prevenção de sintomas neurológicos irreversíveis, uma vez que esta doença não está incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal. O sequenciamento massivo paralelo (MPS) na plataforma Ion Torrent com painéis de genes permite analisar múltiplos genes de forma ágil, colaborando para o diagnóstico molecular precoce.

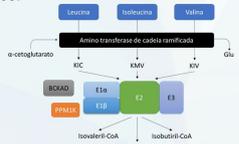


Figura 1. Via metabólica do complexo enzimático da desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada. Os aminoácidos leucina, isoleucina e valina sofrem transaminação pela amino transferase de cadeia ramificada e os respectivos alfa-cetoácidos (KIC, KMV e KIV) sofrem descarboxilação oxidativa, catalizado pelo complexo BCKAD. KIC: ácido alfa-cetoisocaproílico; KIV: ácido alfa-cetoisovalérico; KMV: ácido alfa-ceto-beta-metilvalérico; Glu: glutamato; BCKAD: desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada. Adaptado de: Blackburn, et al (2017).

Objetivos

Realizar o diagnóstico molecular da DXB por sequenciamento massivo paralelo (MPS).

Métodos

Foram incluídos 13 pacientes não relacionados com diagnóstico bioquímico de DXB. Um paciente tinha diagnóstico molecular e 3 são filhos de pais consanguíneos. A metodologia está representada na figura 2.

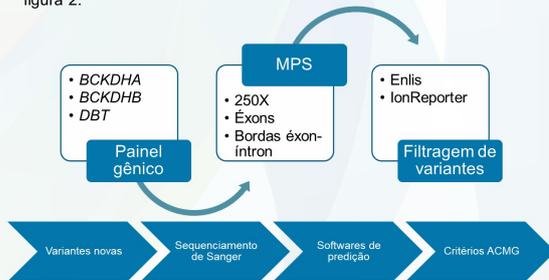


Figura 2. Representação da metodologia adotada no estudo. MPS: sequenciamento massivo paralelo; ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics.

Resultados

O genótipo foi concluído em 11 pacientes (n=13) e os resultados do MPS estão descritos na tabela 1. Foram encontradas 22 variantes, 15 de ocorrência única (*BCKDHA*=2; *BCKDHB*=9; *DBT*=4) e 7 variantes novas: p.[His247Leufs*83] e p.[Tyr413His] (*BCKDHA*), p.[Pro27Leufs*60], p.[Gly131Val], p.[Ile160Phe], p.[Asn176Lys] e p.[Leu326Pro] (*BCKDHB*).

A predição de patogenicidade das novas variantes está descrita na tabela 2. Os pacientes 4 e 11 não tiveram o diagnóstico concluído, um deles teve apenas um dos alelos encontrado e o outro não apresentou cobertura dos exons 2, 3 e 4 para o gene *BCKDHA* no MPS e pelo método de Sanger.

Tabela 1. Pacientes avaliados pela técnica de NGS e seus genótipos.

Paciente	Genótipo	Gene	Consanguinidade
1	c.[740_741insT];[740_741insT] p.[His247Leufs*83];[His247Leufs*83]	<i>BCKDHA</i>	ND
2	c.[1237T>C];[1237T>C] p.[Tyr413His];[Tyr413His]	<i>BCKDHA</i>	ND
3	c.[79_80insCTGGCGGGGG];[79_80insCTGGCGGGGG] p.[Pro27fs];[Pro27fs]	<i>BCKDHB</i>	ND
4	c.[109_484del];[109_484del]	<i>BCKDHB</i>	Não
5	c.[392G>T];[392G>T] p.[Gly131Val];[Gly131Val]	<i>BCKDHB</i>	Não
6	c.[478A>T];[478A>T] p.[Ile160Phe];[Ile160Phe]	<i>BCKDHB</i>	Sim
7*	c.[498G>C];[595_596delAG] p.[Lys166Asn];[Pro200Ter]	<i>BCKDHB</i>	Não
8	c.[528C>G];[977T>C] p.[Asn176Lys];[Leu326Pro] c.[853C>T];[853C>T]	<i>BCKDHB</i>	ND
9	p.[Arg285Ter];[Arg285Ter] c.[634C>T];[634C>T]	<i>BCKDHB</i>	Sim
10	p.[Gln212Ter];[Gln212Ter] c.[670G>T];[670G>T]	<i>DBT</i>	ND
11	p.[Glu224Ter];[Glu224Ter] c.[827C>T];[?] p.[Phe276Cys];[?]	<i>DBT</i>	ND
12	c.[1209+5G>C];[1209+5G>C]	<i>DBT</i>	ND
13	c.[1209+5G>C];[1209+5G>C]	<i>DBT</i>	Sim

Em negrito: mutações novas; * - paciente com genótipo prévio; ND - não disponível.

Tabela 2. Predição de patogenicidade das novas variantes.

Genótipo	Gene	Predição	Critérios ACMG
c.[1237T>C]	<i>BCKDHA</i>	PolyPhen-2: pathogenic MutationTaster: pathogenic	PM2, PP3, PP4
c.[392G>T]	<i>BCKDHB</i>	PolyPhen-2: pathogenic MutationTaster: pathogenic	PM6, PP3, PP4
c.[478A>T]	<i>BCKDHB</i>	PolyPhen-2: pathogenic MutationTaster: pathogenic	PM2, PM6, PP4, PP3
c.[528C>G]	<i>BCKDHB</i>	PolyPhen-2: pathogenic MutationTaster: pathogenic	PS1, PM2, PM5, PM6, PP3, PP4
c.[977T>C]	<i>BCKDHB</i>	PolyPhen-2: pathogenic MutationTaster: pathogenic	PM2, PM6, PP3, PP4

Discussão e Conclusão

A paciente 7 foi previamente analisada através do sequenciamento automatizado de Sanger por Scaini, et al (2018) e o genótipo prévio coincide com o genótipo encontrado pelo MPS. Na paciente 11, há a possibilidade de *allele dropout* (ausência de amplificação pela presença de polimorfismos nas regiões dos primers) e por isso os exons 5, 6 e 7 do gene *DBT* serão reavaliados pelo método de Sanger. A paciente 4 sugere uma provável deleção de parte do gene, já descrita em Quental, et al (2008) e o mRNA será avaliado para conclusão do genótipo. Regiões não cobertas dos genes *BCKDHB* e *DBT* (>2% e >4% dos genes, respectivamente) também poderão ser avaliadas em casos não concluídos.

O MPS foi eficiente e mostrou-se uma ferramenta de diagnóstico rápida e precisa para elucidar as variantes causadoras de DXB.



Referências:

- Blackburn, P.R. et al. The Application of Clinical Genetics, 2017. DOI: 10.2147/TCG.S125962
- Scaini, G., et al. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2018. DOI: 10.1007/s10545-018-0188-x
- Quental, S. et al. Molecular Genetics and Metabolism, 2008. DOI: 10.1016/j.ymgme.2008.02.008



Promoção



CEP/CEUA
CEP/HCPA: 2018-0533.
Apoio Financeiro
CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA, INaGeMP, Rede DXB.

De: **Kirsten Ahring** <kirsten.ahring@regionh.dk>
Date: ter., 21 de set. de 2021 às 15:06
Subject: ESPKU abstract
To: ischwartz@hcpa.edu.br <ischwartz@hcpa.edu.br>

Dear Ida Schwartz,

On behalf of the Scientific Advisory Committee, I am pleased to inform you that the abstract with the title:

“Genetic Hyperphenylalaninemias: Experience with differential diagnosis through massive parallel sequencing :

The programme will allow 10 minutes in total per speaker, 6 minutes for the oral presentation and 4 minutes for

The meeting is likely to be by zoom and we will send you further details 7 days before the meeting takes place.

Please confirm your acceptance to me by responding to this e-mail.

Thank you in advance and looking forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Kirsten Kiær Ahring

Secretary of the Scientific Advisory Committee

ESPKU



Genetic Hyperphenylalaninemias: Experience with differential diagnosis through massive parallel sequencing in South Brazil

Rafael Hencke Tresbach, MSc
Fernanda Sperb-Ludwig, PhD
Ida Vanessa Doederlein Schwartz, MD, PhD

17 ANEXOS

17.1 Anexo A – Carta de aprovação do projeto 2015-0556 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização genética e da associação genótipo-fenótipo nas Hiperfenilalaninemias: um estudo baseado no Sequenciamento de Nova Geração

Pesquisador: Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52087415.3.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.813.419

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Este projeto faz parte da linha de pesquisa sobre caracterização de aspectos relacionados a doenças monogênicas raras que podem ser translacionados para a compreensão e tratamento das doenças multifatoriais, e toma como modelo as Hiperfenilalaninemias, grupo de doenças genéticas caracterizadas pela ocorrência de defeitos na hidroxilação da fenilalanina. O mínimo requerido pelo nosso organismo para metabolização normal da fenilalanina, processo que ocorre no fígado e nos rins, é a enzima fenilalanina hidroxilase (EC 1.14.16.1), o substrato L-fenilalanina, oxigênio e o isômero 6R do cofator tetrahydrobiopterina (BH4). Por se tratar de uma doença com tratamentos dietéticos e medicamentosos disponíveis, que são dependentes do correto diagnóstico para escolha da conduta clínica, o incremento dos métodos diagnósticos dessas doenças e o entendimento dos processos que desencadeiam as complicações associadas podem colaborar tanto para a melhoria da assistência desses pacientes, quanto para gerar hipóteses aplicáveis ao tratamento de doenças mais prevalentes. O produto inovador a ser desenvolvido no projeto ora apresentado é um chip que permite o diagnóstico genético preciso e de forma mais rápida dessas condições.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.813.419

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos gerais

- 1) Desenvolver a construção de um painel de genes de forma a padronizar e a disponibilizar o diagnóstico genético para pacientes brasileiros com Hiperfenilalaninemias por sequenciamento de nova geração;
- 2) Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com Hiperfenilalaninemias, por meio da determinação das mutações patogênicas e polimorfismos dos genes causadores da doença;
- 3) Associar as alterações moleculares ao fenótipo observado nestes pacientes, principalmente em relação ao desfecho responsividade ao BH4.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar as variantes presentes nos genes PAH, PTS, GCH1, QDPR, PCBD, GCHFR, SPR e LAT1 causadores das Hiperfenilalaninemias em pacientes brasileiros;
- 2) Relacionar os achados genéticos ao fenótipo observado nos pacientes;
- 3) Caracterizar a existência de alterações genéticas modificadoras de fenótipo para as Hiperfenilalaninemias a partir do estudo de irmãos afetados pela doença;
- 4) Associar os achados genéticos quanto à responsividade dos pacientes ao BH4.
- 5) Demonstrar a patogenicidade das novas variantes com sentido trocado porventura encontradas por meio da pesquisa em 100 alelos controles normais e análise in silico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

Os dados a serem obtidos neste projeto, e o seu tratamento teórico e estatístico por parte da equipe proponente, caracterizada por seu aspecto interdisciplinar, certamente terão impacto científico, e sobre o acompanhamento e tratamento de pacientes com HPA e sobre o SUS. Os resultados esperados encontram-se abaixo relacionados:

- 1) Geração de dados inéditos sobre correlações genótipo-fenótipo e sobre a relação genótipo-responsividade ao BH4;

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.813.419

- 2) Aumento da compreensão dos mecanismos que provocam os diferentes fenótipos, de forma a permitir o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e/ou para contribuir para o uso racional da terapia existente;
- 3) Conhecimento a cerca do perfil molecular dos pacientes brasileiros, através da identificação e caracterização de variantes, que permitirá a determinação das frequências gênicas para os diferentes tipos de HPA;
- 4) Desenvolvimento de teste robusto, rápido, completo e mais custo benefício do que as técnicas utilizadas no presente momento para o diagnóstico genético das HPA;
- 5) Divulgação dos resultados preliminares em congressos da área de genética e medicina, nacionais e internacionais;
- 6) Elaboração de artigos científicos, a serem publicados em periódicos de circulação internacional (artigo 1 – Desenvolvimento do diagnóstico molecular de Hiperfenilalaninemias através de sequenciamento de nova geração; artigo 2 – Perfil molecular dos pacientes brasileiros com Hiperfenilalaninemias e a correlações genótipo-fenótipo de alterações patogênicas e não patogênicas e responsividade ao BH4; artigo 3 – revisão a cerca dos aspectos genéticos e metabólicos das Hiperfenilalaninemias).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A relevância do estudo está bem fundamentada em proposta inovadora e relevante.

A amostra será composta por pacientes provenientes do ambulatório do SGM-HCPA, e seus pais. Além disso, serão convidados pacientes de outros centros de referência do Brasil, por meio de mensagem eletrônica a ser divulgada em lista de emails destinada aos profissionais de saúde brasileiros que trabalham na área da genética clínica e da triagem neonatal.

A amostragem será por conveniência. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (comunicação pessoal), existem aproximadamente 2000 pacientes com HPA-PAH (80 acompanhados no SGM-HCPA) no país e 30 pacientes com deficiência de BH4 (5 acompanhados no SGM-HCPA). Estima-se a inclusão de aproximadamente 100 pacientes com diagnóstico HPA-PAH (pelo menos 30 com genótipo já determinado e pelo menos 30 com teste de responsividade ao BH4 realizado) e de 15 pacientes com diagnóstico de deficiência de BH4.

O número de pacientes previsto já inclui possíveis perdas relacionadas ao critério de exclusão e não concordância em participar do estudo. Será coletado sangue dos pais para confirmação do estado in cis ou trans das variantes encontradas nos pacientes.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Página 03 de 05

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.813.419

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 1.388.846 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 25/10/2016. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLE de 25/10/2016 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_633070.pdf	25/10/2016 11:03:25		Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_pronto.docx	25/10/2016 11:02:15	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Página 04 de 05

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 1.813.419

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_HPA_pos_parecer.docx	25/10/2016 11:01:40	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Outros	Termo_de_consentimento_LIVRE_e_ES CLARECIDO_responsaveis.docx	25/10/2016 11:00:29	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_LIVRE_e_ES CLARECIDO_novo_adultos.docx	25/10/2016 10:58:26	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Outros	delegacao_funcao_2.pdf	26/11/2015 16:31:56	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Outros	delegacoes_de_funcao.pdf	26/11/2015 16:31:22	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	26/11/2015 15:03:56	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 09 de Novembro de 2016

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

17.2 Anexo B - Carta de aprovação do projeto 2018-0533 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico da Doença da Urina do Xarope do Bordo: Perfil genético, molecular e a correlação entre o genótipo e o fenótipo de pacientes brasileiros

Pesquisador: Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 99923318.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.175.683

Apresentação do Projeto:

Este projeto faz parte da linha de pesquisa sobre caracterização de aspectos relacionados a doenças monogênicas raras que podem ser translacionados para a compreensão e tratamento das doenças multifatoriais, e toma como modelo a Doença da Urina do Xarope do Bordo, caracterizada pela existência de defeitos no complexo enzimático dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, os quais são responsáveis pela conversão da leucina, isoleucina e valina no organismo. Por se tratar de uma doença com tratamentos dietéticos e medicamentosos disponíveis, que são dependentes do correto diagnóstico para escolha da conduta clínica, o incremento dos métodos diagnósticos dessas doenças e o entendimento dos processos que desencadeiam as complicações associadas podem colaborar tanto para a melhoria da assistência desses pacientes, quanto para gerar hipóteses aplicáveis ao tratamento de doenças mais prevalentes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

A1) Desenvolver um painel de genes de forma a padronizar e disponibilizar o diagnóstico genético para pacientes brasileiros com DXB por sequenciamento de nova geração;

A2) Caracterizar o perfil populacional de uma amostra de pacientes brasileiros com DXB;

A3) Caracterizar o perfil genético de uma amostra de pacientes brasileiros com DXB, por meio da determinação das mutações patogênicas e polimorfismos dos genes causadores da doença;

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.175.683

A4) Correlacionar as alterações moleculares ao fenótipo observado nos pacientes com DXB.

Objetivo Secundário:

B1) Através de análise molecular dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT, que estão envolvidos na DXB por sequenciamento de nova geração, desenvolver um método diagnóstico preciso e rápido;

B2) Determinar as frequências genótípicas da DXB para pacientes brasileiros;

B3) Caracterizar as mutações e polimorfismos presentes nos genes causadores de DXB em pacientes brasileiros;

B4) Relacionar os achados genéticos aos fenótipos observados nos pacientes;

B5) Caracterizar a existência de alterações genéticas modificadoras de fenótipo para a DXB.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). Os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Benefícios: Os dados a serem obtidos neste projeto, e o seu tratamento teórico e estatístico por parte da equipe proponente, caracterizada por seu aspecto interdisciplinar, certamente terão impacto científico, e sobre o acompanhamento e tratamento de pacientes com HPA e sobre o SUS. Os resultados esperados encontram-se abaixo relacionados: 1) Geração de dados inéditos sobre correlações genótipo-fenótipo dos pacientes com a Doença da Urina do Xarope do Bordo; 2) Aumento da compreensão dos mecanismos que provocam os diferentes fenótipos, de forma a permitir o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e/ou para contribuir para o uso racional da terapia existente; 3) Conhecimento a cerca do perfil molecular dos pacientes brasileiros, através da identificação e caracterização de variantes, que permitirá a determinação das frequências gênicas para os diferentes tipos de DXB; 4) Desenvolvimento de teste robusto, rápido, completo e com melhor custo-benefício do que as técnicas utilizadas no presente momento para o diagnóstico genético da DXB; 5) Divulgação dos resultados preliminares em congressos da área de genética e medicina, nacionais e internacionais;

6) Elaboração de artigos científicos, a serem publicados em periódicos de circulação internacional (artigo 1 – revisão sobre os aspectos genéticos da Doença da Urina do Xarope do Bordo; artigo 2 – Perfil molecular e correlação genótipo-fenótipo dos pacientes brasileiros com Doença da Urina do Xarope do Bordo).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa de análise de dados clínico, bioquímicos e genéticos de casos com diagnóstico de Doença da urina do Xarope de Bordo.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.175.683

Será realizada análise dos 3 genes envolvidos na patologia (BCKDHA, BCKDHB e DBT) por NGS e confirmação por Sanger. Serão recrutados 50 paciente do SGM do HCPA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE para menores e maiores de idade.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.123.743 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 19/02/2019. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado após recomendações da CONEP.

Projeto e TCLEs versões adicionadas em 19/02/2019.

Parecer liberado Ad-Referendum anterior à data prevista de relatoria, após pesquisadores atenderem recomendações da CONEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1229789.pdf	19/02/2019 13:35:06		Aceito
Outros	carta_resposta_CONEP_2.docx	19/02/2019 13:26:30	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_NGS_DXB_2.docx	19/02/2019 13:26:14	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declara_infra_2018.pdf	19/02/2019 13:25:58	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	19/02/2019 13:25:51	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_5.doc	19/02/2019 13:25:31	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_adultos_5.doc	19/02/2019	Rafael Hencke	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.175.683

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adultos_5.doc	13:25:24	Tresbach	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_2.pdf	19/02/2019 13:25:11	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Outros	carta_resposta_CEP_2.docx	23/01/2019 14:43:59	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Outros	carta_resposta_CEP.docx	05/11/2018 09:54:12	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	01/10/2018 15:35:19	Rafael Hencke Tresbach	Aceito
Declaração de Pesquisadores	delegacao_funcoes.pdf	01/10/2018 15:19:37	Rafael Hencke Tresbach	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 27 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Página 04 de 04