

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE DA
FENILALANINA HIDROXILASE EM
FENILCETONÚRICOS DO SUL DO BRASIL**

Luiz Carlos Santana da Silva

Porto Alegre

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE DA
FENILALANINA HIDROXILASE EM FENILCETONÚRICOS DO
SUL DO BRASIL**

Luiz Carlos Santana da Silva

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani
Co-Orientadora: Profª. Drª. Maria Luiza Saraiva Pereira**

**Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor**

Porto Alegre

2000

"Eu vou ser veterinário, porque eu sou da família da natureza."

(Criança com fenilcetonúria diagnosticada precocemente)

"O conhecimento leva à humildade" (Asbjörn Fölling)

De fato, a realização deste estudo proporcionou inúmeras novidades e reflexões sobre a HPA por deficiência de PAH. Uma relação de cumplicidade foi criada entre o pesquisador e o pesquisado, que em muitas vezes se manifestou em curiosidade e solidariedade, angústia e compaixão. Saber aceitar ao "*não, o DNA é meu*" é compreender que o conhecimento convive com a oposição de pensamentos. A informação contida no DNA dos pacientes revelou uma pequena parte oculta das alterações moleculares no gene da PAH. Ainda falta muito para esta história acabar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé e a preparação espiritual que me auxiliaram em muitas ocasiões.

À minha amada guerreira mulher Patricya Benthes Marques, pelo amor, carinho, compreensão e ajuda espiritual, os quais reforçaram a minha autoestima e credibilidade e foram cruciais para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pela minha existência e os ensinamentos que ajudaram a moldar a minha personalidade.

Aos meus irmãos, pela amizade e solidariedade de todos e pelo aumento da família.

Ao Prof. Roberto Giugliani, pela oportunidade, paciência, ajuda e amizade

À Profa. Maria Luiza Pereira, pela orientação e por ter acreditado na minha capacidade.

Aos Profs. Lauro Cunha, Manoel Cid e Georgina Lobato, pelo estímulo que me deram para iniciar a pós-graduação.

Às amigas Andréia Sopelsa, Fernanda Scalco e Kristiane Michelin, pelo consolo, apoio e estímulo constantes.

À Maira Burin e Eduardo Lewis, pela companhia e iniciação no laboratório.

Ao inesquecível amigo Inaldo Noronha (*in memoriam*), pelos conselhos que serão sempre úteis.

Aos companheiros de trabalho Tiago Carvalho, Fernanda B. da Silva, Liana Morari e Angela Fachel, pela grande ajuda, aprendizado e cooperação.

Aos colaboradores Ricardo Pires, Lilia Refosco, Patrícia Asthon-Prolla, Vânia Hirakata, Moacir Wajner, Janice Coelho, Clara Dorneles, Clarice Alho e Angelina Acosta, pelos esclarecimentos e troca de idéias essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Bruce Duncan, pela ajuda e favores prestados.

Aos ex-residentes Antônio Henrique Nogueira, Ida Vaneza Schwartz e Carolina Moura de Souza, pelo auxílio e compreensão durante a coleta de dados e material.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Antônio, Luciane, Ana Paula, Luciene, Leonor, Cléia, Fábio, Carla, Márcia, Ursula e Sandra, pela descontração e experiência.

Ao pessoal da secretaria Liliane Kuhn, Jacira Purper, Zeniara Lompa e Fabrício Barbosa, pela disponibilidade e solicitude.

À Marilda Lopes Duarte, pelas gentilezas e o bom humor.

Aos pacientes e suas famílias, pela cooperação e participação neste trabalho.

Às fontes financiadoras de pesquisa CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE-HCPA e PRONEX-MCT.

Ao Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da UFPa, por ter apostado em mim.

A todos os membros do Serviço de Genética Médica do HCPA, pela simpatia e o carisma que me proporcionaram no decorrer destes anos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da UFRGS, pela confiança e paciência.

Ao estado do Rio Grande do Sul, pelo conhecimento proporcionado.

Ao estado do Pará, pelas raízes culturais.

A todos que colaboraram de uma forma direta ou indiretamente para a realização desta tese de doutorado, e ao mesmo tempo, para o meu aperfeiçoamento profissional e emocional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XIX
RESUMO	XXI
ABSTRACT	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Erros inatos do metabolismo	2
1.2 Aminoácidos	3
1.3 Distúrbios do metabolismo da fenilalanina	4
1.3.1 Fenilalanina	4
1.3.2 Sistema de hidroxilação da fenilalanina	5
1.3.3 Estrutura da fenilalanina hidroxilase humana	7
1.3.4 Hiperfenilalaninemias (HPA)	8
1.3.4.1 HPA por deficiência do cofator BH ₄	8
1.3.4.2 HPA por deficiência de PAH	8
a) A descoberta	10
b) Terapia dietética e triagem neonatal	10
c) Aspectos clínicos e bioquímicos	11
d) Diagnóstico laboratorial e diagnóstico pré-natal	13
1.4 Aspectos moleculares do gene da PAH	15
1.4.1 Caracterização do gene da PAH	15

a)	Localização gênica	15
b)	DNA complementar (cDNA)	15
c)	Organização estrutural do gene	16
d)	Regulação do gene da PAH	18
e)	Homologia entre hidroxilases dependentes do cofator BH ₄	19
f)	Haplótipos no <i>locus</i> da PAH	20
g)	Mutações no gene da PAH	22
1.5	Correlação genótipo-fenótipo	27
1.6	Frequência de HPA por deficiência de PAH	29
1.6.1	Evidência do efeito fundador/deriva genética	30
1.6.2	Seleção de heterozigotos	32
1.7	Estudos de estrutura e função no gene da PAH	33
1.7.1	Análise de expressão das mutações	33
1.7.2	Modelos animais para fenilcetonúria	36
1.7.3	Estudos de cristalização e análise da estrutura tridimensional da PAH	37
1.8	Tratamento	38
1.9	Justificativa	40
2.	OBJETIVOS	42
3.	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Material	45
3.1.1	Pacientes com HPA por deficiência de PAH	45
3.1.2	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	46
3.1.3	Aspectos éticos	46
3.1.4	Coleta e armazenamento das amostras	48
a)	Pacientes e heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	48
b)	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	48
3.1.5	Reagentes químicos	49
3.1.6	Nucleotídeos	50

3.1.7	Marcadores de peso molecular	50
3.1.8	Enzimas	51
3.1.9	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	51
3.1.10	Equipamentos	51
3.1.11	Soluções	53
3.2	Métodos	58
3.2.1	Protocolo laboratorial	58
a)	Pacientes com HPA por deficiência de PAH	58
b)	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	60
3.2.2	Dosagem de Phe no plasma	61
3.2.3	Dosagem de Tyr no plasma	61
3.2.4	Isolamento de DNA genômico a partir do sangue	62
3.2.5	Quantificação de DNA	63
3.2.6	Purificação do DNA extraído	63
3.2.7	Amplificação de fragmentos do gene da PAH pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	64
3.2.8	Análise dos produtos amplificados em gel de agarose	69
3.2.9	Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)	69
a)	Fundamentação	69
b)	Coloração do gel com nitrato de prata	70
3.2.10	Análise por digestão com endonucleases de restrição	71
3.2.11	Eletroforese dos produtos de digestão	72
3.2.12	Seqüenciamento direto	73
3.2.13	Correlação genótipo - fenótipo	73
a)	Pacientes com HPA por deficiência de PAH	73
b)	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	74
3.2.14	Análise estatística	74
a)	Pacientes com HPA por deficiência de PAH	74
b)	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	75

4. RESULTADOS	76
4.1 Detecção da mutação V388M	77
4.2 Análise de fragmentos de DNA pela técnica de SSCP	79
4.2.1 Fragmento 1	79
4.2.2 Fragmento 2	80
4.2.3 Fragmento 3	81
4.2.4 Fragmento 4	81
4.2.5 Fragmento 5	84
4.2.6 Fragmento 6	85
4.2.7 Fragmento 7	86
4.2.8 Fragmento 8	87
4.2.9 Fragmento 9	88
4.2.10 Fragmento 10	89
4.2.11 Fragmento 11	90
4.2.12 Fragmento 12	91
4.2.13 Fragmento 13	91
4.2.14 Resumo das alterações encontradas pela técnica de SSCP	94
4.3 Detecção de mutações específicas	94
4.3.1 Detecção da mutação I65T	95
4.3.2 Detecção da mutação R252W	97
4.3.3 Detecção da mutação R261X	98
4.3.4 Detecção da mutação R261Q	99
4.3.5 Detecção da mutação IVS10nt-11g>a	100
4.3.6 Detecção da mutação R408W	101
4.3.7 Detecção da mutação, IVS12nt1g>a	102
4.4 Seqüenciamento direto de fragmentos do gene da PAH	104
4.4.1 Identificação de mutação no fragmento 1	104
4.4.2 Identificação de mutação no fragmento 2	105
4.4.3 Identificação de mutação no fragmento 3	106
4.4.4 Identificação de mutação no fragmento 4	106
4.4.5 Identificação de mutação no fragmento 5	107
4.4.6 Identificação de mutação no fragmento 7	108
4.4.7 Identificação de mutação no fragmento 11	108
4.4.8 Identificação de mutação no fragmento 12	110

4.4.9	Identificação de alterações novas	111
4.4.10	Identificação de polimorfismos no gene da PAH	111
4.5	Freqüências das mutações e polimorfismos encontrados	114
4.6	Correlação da análise molecular com os aspectos clínicos e bioquímicos dos pacientes com HPA por deficiência de PAH	117
4.6.1	Pacientes com diagnóstico precoce	117
4.6.2	Pacientes com diagnóstico tardio	117
4.6.3	Classificação fenotípica dos pacientes quanto à quantidade de Phe tolerada na dieta controlada	118
4.6.4	Avaliação do efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe	118
4.7	Efeito de uma sobrecarga de aspartame sobre o genótipo de heterozigotos para HPA por deficiência de PAH	119
5.	DISCUSSÃO	128
5.1	Detecção de mutações comuns	129
5.2	Identificação de mutações raras e polimorfismos	130
5.3	Identificação de mutações novas	131
5.4	Freqüência das mutações e polimorfismos no gene da PAH	132
5.5	Distribuição das mutações e polimorfismos no gene da PAH	137
5.6	Sensibilidade dos métodos moleculares	138
5.7	Correlação genótipo-fenótipo	141
5.7.1	Pacientes com HPA por deficiência de PAH	141
a)	Correlação genótipo-fenótipo: presente estudo x dados da literatura	141
b)	Distribuição das mutações por fenótipo	142
c)	Genótipos x sintomas clínicos	144
d)	Genótipos x parâmetros clínicos e bioquímicos	145
d.1)	Correlação genótipo-fenótipo: pacientes com diagnóstico precoce	146
d.2)	Correlação genótipo-fenótipo: pacientes com diagnóstico tardio	147
d.3)	Pacientes com diagnóstico precoce x pacientes com diagnóstico tardio	148
d.4)	Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe	149

e)	Inconsistência na correlação genótipo-fenótipo	150
5.7.2	Pacientes com HPA por deficiência de PAH apresentando mutação I65T	151
5.7.3	Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	152
5.8	Aspectos étnicos	153
5.9	Considerações finais	155
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	158
6.1	Conclusões	159
6.1.1	Em relação à análise molecular	159
6.1.2	Em relação à correlação genótipo x fenótipo	160
6.1.3	Em relação aos aspectos étnicos	162
6.1.4	Protocolo laboratorial sugerido para a detecção de mutações em pacientes com fenilcetonúria.	162
6.2	Perspectivas	164
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
8.	ANEXOS	188
8.1	Anexo 1: Carta convite para participar do estudo "Identificação e Caracterização Molecular de Mutações e Polimorfismos no Gene da Fenilalanina Hidroxilase em Fenilcetonúricos do Sul do Brasil	189
8.2	Anexo 2: Fichas com os dados dos pacientes	190
8.3	Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido	191
8.4	Anexo 4: Carta convite para participar do estudo "Avaliação de um Teste de Sobrecarga de Aspartame para a detecção de Heterozigotos para a Fenilcetonúria.	192
8.5	Anexo 5: Resumo da evolução clínica dos pacientes	193
8.6	Anexo 6: Artigo - " <i>Aspartame loading test in PKU heterozygous individuals bearing severe and moderate mutations</i> ".	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP:	adenina monofosfato
AMY-1:	amilase 1
AMY-2:	amilase 2
AP-2:	proteína ativadora 2
ARP:	atividade residual prevista
APS:	persulfato de amônia
BH₂:	dihidrobiopterina
BH₄:	tetrahidrobiopterina
BSA:	<i>bovine serum albumine</i> (albumina sérica bovina)
°C:	graus Celsius
CAP:	sítio de início da transcrição
CAT:	cloranfenicol acetil transferase
cDNA:	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂:	dióxido de carbono
COS:	células renais de macaco verde africano
CRE:	<i>cyclic AMP response element</i> (elemento parcialmente responsivo ao AMP cíclico)
CRIM:	<i>cross-reacting immunologic material</i> (material imunologicamente relacionado a determinado epítipo/proteína).
5HT:	5-hidroxitriptofânio
dATP:	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP:	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
ddATP:	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP:	2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
ddGTP:	2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
ddTTP:	2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
ddNTP:	didesoxinucleotídeos trifosfato
dGTP:	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DGGE:	<i>desnaturing gradient gel electrophoresis</i> (análise por eletroforese em gel com gradiente desnaturante)
DHPR:	dihidropteridina redutase
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
dNTP:	desoxinucleotídeos trifosfato
DTT:	ditiotreitól
dTTP:	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
EC:	enzyme classification (classificação das enzimas)
EDTA:	ácido etileno diamino tetra acético
EEG:	eletroencefalograma
EIM:	erros inatos do metabolismo
ENU:	N-etil-N-nitrosouréia

F-ddATP:	fluoresceína-12-2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
F-ddCTP:	fluoresceína-12-2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
F-ddGTP:	fluoresceína-12-2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
F-ddUGP:	fluoresceína-12-2',3'-didesoxiuracila 5'-trifosfato
fs:	<i>frameshift</i> (mudança de leitura)
g:	grama
GRE:	<i>glucocorticoid response element</i> (elementos parcialmente responsivos a glicocorticóides)
GTPCH:	guanosina trifosfato ciclodrolase
HCl:	ácido clorídrico
HPA:	hiperfenilalaninemia
IVAS:	infecção das vias aéreas superiores
IVS:	<i>intervinient sequence</i> (seqüência interventoras = íntrons)
kb:	quilobase
KCl:	cloreto de potássio
kDa:	quilodaltons
L:	litro
L-Dopa:	L-dopamina
M:	molar
MDE:	<i>mutation detection enhancement</i> (ativador na detecção de mutações)
MgCl₂:	cloreto de magnésio
µg:	micrograma
µg/mL:	micrograma por mililitro
µL:	microlitro
mg:	miligrama
mg/mL:	miligrama/mililitro
mL:	mililitro
min:	minuto
mM:	milimolar
MRI:	imagem de ressonância magnética
mRNA:	Ácido ribonucléico mensageiro
NaOH:	hidróxido de sódio
ng:	nanograma
PAH:	fenilalanina-4-hidroxilase humana
Pah:	fenilalanina-4-hidroxilase de rato
PAHdb:	banco de dados do consórcio de análise de mutações no gene da PAH
PAL:	fenilalanina amônia liase
pb:	pares de base
PCD:	pterina-4a-carbinolamina desidratase
PCR:	reação em cadeia de polimerase

PEPI:	<i>Computer Programs for Epidemiologist, Version 3.0</i> (programa estatístico para epidemiologistas, versão 3.0)
PGM1:	fosfoglicomutase-1
pH:	logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio de uma solução aquosa
PKU:	fenilcetonúria
pmol/μL:	picomol por microlitro
PTPS:	6-piruvoil-tetrahydropterina sintetase
p/v:	peso/volume
QI:	coeficiente de inteligência
qsp:	quantidade suficiente para
RDNPM:	retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor
RFLP:	<i>restriction fragment length polymorphisms</i> (polimorfismos do comprimento de fragmento de restrição)
RM:	retardo mental
RMO:	retardo da maturação óssea
RNA:	Ácido ribonucléico
rpm:	rotação por minuto
[α³⁵S]dATP:	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato marcada radioativamente
SDS:	dodecilsulfato de sódio
SNP:	<i>single nucleotide polymorphisms</i> (sistema de polimorfismo de um só nucleotídeo)
SPSS:	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (programa estatístico para ciências sociais)
SSCP:	<i>single strand conformational polymorphism analysis</i> (análise de polimorfismos conformacionais em fita única de DNA)
STR:	<i>short tandem repeats</i> (repetições curtas em tandem)
Taq DNA polimerase:	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE:	tampão tris-borato-EDTA
TCA:	ácido tricloroacético
TE:	tampão tris-EDTA
TEMED:	tetrametiletilenodiamina
TH:	tirosina 3-monoxigenase
Tris:	tris-(hidroximetil)-aminoetano
TPH:	triptofânio 5-monoxigenase
UTR:	<i>untranslated region</i> (região não traduzida)
U/μL:	unidades por microlitro
V:	volts
VNTR:	<i>variable number tandem repeats</i> (número variável de repetições em tandem)
v/v:	volume por volume
W:	watts

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.1:	Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvido	3
Tabela 1.2:	Tamanho dos exons e dos íntrons do gene da PAH	17
Tabela 1.3:	Algumas associações entre mutações e haplótipos em diferentes grupos étnicos	23
Tabela 1.4:	Distribuição das alterações na seqüência gênica da PAH	24
Tabela 1.5:	Freqüência de mutações no gene da PAH em diferentes populações	25
Tabela 1.6:	ARP da PAH para as mutações de interesse para este estudo	35

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1:	Caracterização da amostra estudada	47
Tabela 3.2:	Relação de reagentes químicos utilizados neste estudo	49
Tabela 3.3:	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados neste estudo	52
Tabela 3.4:	Relação dos equipamentos utilizados neste estudo	53
Tabela 3.5:	Protocolo básico para as reações de amplificação por PCR	64
Tabela 3.6:	Condições usadas nas reações de amplificação	64
Tabela 3.7:	Fragmentos do gene da PAH submetidos à análise de SSCP	70
Tabela 3.8:	Protocolo de digestão com endonucleases de restrição	72
Tabela 3.9:	Dados de interpretação para a detecção das mutações I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt-11g>a, V388M, IVS12nt1g>a e R408W.	72

4. RESULTADOS

Tabela 4.1:	Distribuição das alterações no gene da PAH identificadas por SSCP	94
Tabela 4.2:	Mutações encontradas no gene da PAH nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH analisados neste estudo	114
Tabela 4.3:	Polimorfismos encontrados no gene da PAH nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH analisados neste estudo	115
Tabela 4.4:	Frequência das mutações encontradas no gene da PAH nos 30 pacientes (55 alelos sem os casos consangüíneos) com HPA por deficiência de PAH dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina	115
Tabela 4.5:	Frequência dos polimorfismos encontrados no gene da PAH nos 30 pacientes com deficiência de PAH do Rio Grande do Sul e Santa Catarina	116
Tabela 4.6:	Genótipos encontrados nos 30 pacientes com deficiência de PAH	116
Tabela 4.7:	Correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de ARP dos pacientes com diagnóstico precoce de HPA por deficiência de PAH	121
Tabela 4.8:	Correlação dos parâmetros clínicos e bioquímicos com os valores de ARP dos pacientes com diagnóstico tardio de HPA por deficiência de PAH	122
Tabela 4.9:	Classificação fenotípica dos pacientes diagnosticados precoce e tardiamente com HPA por deficiência de PAH.	123
Tabela 4.10:	Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe após uma sobrecarga de Phe em 17 pacientes com HPA por deficiência de PAH	124
Tabela 4.11:	Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe após uma sobrecarga de Phe: Classificação fenotípica dos 17 pacientes com HPA por deficiência de PAH	126
Tabela 4.12:	Efeito do teste de sobrecarga oral de aspartame (100 mg/kg) em heterozigotos para HPA por deficiência de PAH portadores de mutações graves ou moderadas e controles normais	127

5. DISCUSSÃO

Tabela 5.1:	Freqüência dos tipos de alteração no gene da PAH	133
Tabela 5.2:	Freqüência alélica relativa de mutações encontradas no gene da PAH em diferentes populações	135
Tabela 5.3:	Correlação genótipo-fenótipo: presente estudo e dados da literatura	142
Tabela 5.4:	Principais sintomas clínicos nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH	145
Tabela 5.5:	Mutações e origem étnica dos pacientes com HPA por deficiência de PAH	154

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1:	Rota metabólica da fenilalanina	6
Figura 1.2:	Gene e proteína da PAH	18

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3.1:	Protocolo laboratorial inicial empregado no estudo dos pacientes com HPA por deficiência de PAH	59
Figura 3.2:	Protocolo laboratorial empregado na análise de heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH	60
Figura 3.3:	Seqüência do gene da PAH humana	65

4. RESULTADOS

Figura 4.1:	Detecção da mutação V388M	78
Figura 4.2:	Análise por SSCP do fragmento 1	79
Figura 4.3:	Análise por SSCP do fragmento 2	80
Figura 4.4:	Análise por SSCP do fragmento 3	82
Figura 4.5:	Análise por SSCP do fragmento 4	83
Figura 4.6:	Análise por SSCP do fragmento 5	84
Figura 4.7:	Análise por SSCP do fragmento 6	85
Figura 4.8:	Análise por SSCP do fragmento 7	86
Figura 4.9:	Análise por SSCP do fragmento 8	87
Figura 4.10:	Análise por SSCP do fragmento 9	88
Figura 4.11:	Análise por SSCP do fragmento 10	89
Figura 4.12:	Análise por SSCP do fragmento 11	90
Figura 4.13:	Análise por SSCP do fragmento 12	92

Figura 4.14: Análise por SSCP do fragmento 13	93
Figura 4.15: Detecção da mutação I65T	96
Figura 4.16: Detecção da mutação R252W	97
Figura 4.17: Detecção da mutação R261X	98
Figura 4.18: Detecção da mutação R261Q	99
Figura 4.19: Detecção da mutação IVS10nt-11g>a	100
Figura 4.20: Detecção da mutação R408W	101
Figura 4.21: Detecção da mutação IVS12nt1g>a	103
Figura 4.22: Seqüenciamento do fragmento 1 do gene da PAH	104
Figura 4.23: Seqüenciamento do fragmento 2 do gene da PAH	105
Figura 4.24: Seqüenciamento do fragmento 3 do gene da PAH	106
Figura 4.25: Seqüenciamento do fragmento 4 do gene da PAH	107
Figura 4.26: Seqüenciamento do fragmento 5 do gene da PAH	107
Figura 4.27: Seqüenciamento do fragmento 7 do gene da PAH	109
Figura 4.28: Seqüenciamento do fragmento 11 do gene da PAH	110
Figura 4.29: Seqüenciamento do fragmento 12 do gene da PAH	110
Figura 4.30: Seqüenciamento do fragmento 13 do gene da PAH	112
Figura 4.31: Seqüenciamento do gene da PAH: identificação de polimorfismos.	112
Figura 4.32: Comparação entre os parâmetros bioquímicos de diagnóstico e tratamento.	125

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Figura 6.1: Protocolo laboratorial sugerido para a detecção das mutações em pacientes com fenilcetonúria.	163
---	-----

RESUMO

A Hiperfenilalaninemia (HPA) decorrente da deficiência da fenilalanina hidroxilase (PAH) é um distúrbio metabólico herdado de modo autossômico recessivo. O gene da PAH localiza-se na região q22-q24.1 do cromossomo 12 e abrange 90 kb de DNA dividido em 13 exons, os quais codificam um mRNA de aproximadamente 2,4 kb. Até o momento, 412 diferentes alterações foram identificadas no *locus* da PAH. A grande heterogeneidade molecular observada neste gene pode estar ligada à variabilidade do fenótipo nos pacientes com HPA por deficiência de PAH.

O presente estudo teve como objetivos principais determinar a frequência das mutações e estabelecer uma correlação entre os dados bioquímicos e clínicos com as alterações moleculares encontradas nos pacientes com HPA por deficiência de PAH no Sul do Brasil. A amostra foi composta por 30 pacientes não relacionados que se encontram em tratamento no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA, estando adequado ética e metodologicamente, de acordo com as Normas de Pesquisa em Saúde (resolução 01/88 do Conselho Nacional de Saúde).

O protocolo aplicado compreendeu a extração de DNA e posterior amplificação por PCR de 13 fragmentos do gene da PAH. Os produtos de PCR foram analisados pela técnica de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP). As amostras que apresentaram padrões de mobilidade eletroforética alterados foram submetidas à análise por digestão com endonucleases de restrição específicas e/ou seqüenciamento. Os pacientes foram classificados em subgrupos (PKU leve, PKU moderada e PKU clássica), de acordo com a tolerância à Phe quando em dieta controlada.

A técnica de SSCP permitiu a identificação de 25 pacientes (83,3%) com alterações nos fragmentos analisados do gene da PAH. Neste estudo, foram encontradas 24 alterações diferentes, sendo identificados 26 genótipos distintos associados à HPA por deficiência de PAH. A análise com endonucleases de restrição possibilitou a detecção de 8 mutações (I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt-11g>a, V388M, R408W e IVS12nt1g>a). O seqüenciamento direto permitiu a detecção de 16 alterações, sendo 10 mutações associadas à doença (L15/S16fsdelCT, IVS2nt5g>c, F55fsdelT, IVS2nt-13t>g, N133/Q134fsdelATCA, R158Q, R270K, P281L, IVS7nt1g>a e R408Q), 4 polimorfismos

(IVS2nt19t>c, V245V, Y414Y e IVS12nt-35c>t) e duas alterações novas no gene da PAH: 1378g>t e IVS12nt-15t>c. As técnicas empregadas neste estudo permitiram a identificação de pelo menos um alelo mutante em todos os pacientes analisados e o genótipo foi determinado em 23 dos 30 pacientes.

A frequência de mutações identificadas neste estudo foi de 87,3% (48/55) e as mais frequentes foram a I65T (18,2%), a R261X (9,1%), a R408W (9,1%), a IVS2nt5g>c (7,3%), a R261Q (7,3%) e a V388M (7,3%). As mutações raras apresentaram frequências variando entre 1,8% e 5,5%. A presença de polimorfismos foi observada em 46,6% dos pacientes com HPA por deficiência de PAH, sendo os polimorfismos IVS2nt19t>c, V245V e IVS12nt-35c>t os mais frequentes. O espectro de mutações encontrado em nossos pacientes é diferente do observado em pacientes de outros países da América Latina, confirmando a heterogeneidade molecular desta doença.

Não foi estabelecido uma correlação entre os valores de atividade residual prevista (ARP) para a fenilalanina hidroxilase com os parâmetros clínicos e bioquímicos, tanto em pacientes com diagnóstico precoce como tardio. Mas foi, no entanto, observada uma correlação entre os valores de ARP e os níveis de Tyr durante o tratamento em pacientes com diagnóstico precoce, indicando que os mesmos podem exercer um papel importante no controle da dieta e na determinação do fenótipo dos pacientes.

A análise de regressão linear simples mostrou uma forte relação entre a tolerância à Phe da dieta e os níveis de Phe pré e durante o tratamento, permitindo a classificação fenotípica dos pacientes com diagnóstico precoce. Esta análise mostrou também uma associação significativa entre a tolerância à Phe da dieta e os níveis de Phe durante o tratamento, permitindo também a determinação do fenótipo na maioria dos pacientes com diagnóstico tardio. Estes resultados ressaltam a importância do diagnóstico precoce e de um adequado controle dietético em pacientes com HPA por deficiência de PAH.

Os níveis de Phe e Tyr não foram capazes de determinar a gravidade de mutações em heterozigotos para HPA por deficiência de PAH, tanto na situação de jejum como após a sobrecarga de aspartame. Nas duas situações testadas, as relações Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram consideradas os melhores parâmetros para discriminar indivíduos heterozigotos e controles.

Este estudo se constitui numa contribuição original ao conhecimento das bases moleculares da HPA por deficiência de PAH no Sul do Brasil, trazendo informações relevantes para o melhor entendimento da relação genótipo-fenótipo neste distúrbio.

ABSTRACT

Hyperphenylalaninemia (HPA) due to phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency is a disorder inherited as an autosomal recessive trait. The *locus* of the PAH gene is located on chromosome 12, region q22-q24.1, and spans 90 kb of genomic DNA divided into 13 exons, which is transcribed into a mRNA of 2.4 kb. To date, 412 different alterations were identified in the PAH gene. The wide variation of phenotype observed among patients with PAH deficiency might be due to high molecular heterogeneity.

The aims of the present study were to determine the frequency of mutations and to establish a correlation between biochemical, clinical and molecular data from patients with HPA due to PAH deficiency from South Brazil. The sample was composed by 30 unrelated patients under treatment in the Medical Genetics Service of Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA). This study was approved by the Scientific Committee and Research and Ethical in Health Committee, being ethically and methodologically suitable, and according to Principles of Research in Health (resolution 01/88 of Health National Counsel).

The protocol applied consisted of PCR amplification of 13 fragments of PAH gene following DNA extraction. The PCR products were analysed by strand single conformational polymorphisms (SSCP) analysis. The fragments showing abnormal patterns of electrophoretic mobility were submitted to restriction endonucleases and/or direct sequencing analyses. The patients were classified in subgroups (mild PKU, moderate PKU and classical PKU), according to Phe tolerance when controlled diet.

The SSCP technique allowed the identification of 25 patients (83.3%) with alterations in fragments analysed of the PAH gene. In this study, 24 different alterations were detected, being identified 26 distinct genotypes associated to HPA due to PAH deficiency. Restriction endonuclease analysis permitted the detection of 8 mutations (I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt-11g>a, V388M, R408W and IVS12nt1g>a). Sequencing analysis allowed the detection of 16 alterations, being 10 disease associated mutations (L15/S16fsdelCT, IVS2nt5g>c, F55fsdelT, IVS2nt-13t>g, N133/Q134fsdelATCA, R158Q, R270K, P281L, IVS7nt1g>a, R408Q), 4 polymorphisms (IVS2nt19t>c, V245V, Y414Y and IVS12nt-35c>t) and 2 novel alterations in PAH gene: 1378g>t and IVS12nt-15t>c. The methods applied in this study allowed the identification of at least one mutant allele in all patients studied and genotype was established in 23 out of 30 patients.

The frequency of mutations identified in this study was 87.3% (48/55) and most frequent mutations were I65T (18.2%), R261X (9.1%), R408W (9.1%), IVS2nt5g>c (7.3%), R261Q (7.3%) and V388M (7.3%). Rare mutations showed frequencies ranging from 5.5% and 1.8%. Polymorphisms were seen in 46.6% of patients with HPA due to PAH deficiency, and most frequent were IVS2nt19t>c, V245V and IVS12nt-35c>t.

The spectrum of mutations observed in our patients is different from the observed in patients from other Latin American countries, confirming the molecular heterogeneity of this disease.

A correlation between values of predicted residual PAH activity (PRA) and clinical and biochemical parameters was not established, in patients with both early or late diagnostic. However, a correlation between the values of PRA and Tyr levels during treatment in patients with early diagnostic was observed, showing that Tyr levels can perform an important function in diet control and in patients phenotype determination.

The simple linear regression analysis showed a strong correlation between Phe tolerance and Phe levels before and during treatment, allowing a phenotypic classification of patients with early diagnostic. On the other hand, this analysis showed only a significant correlation between Phe tolerance and Phe levels during treatment, allowing phenotype determination at majority of the patients with late diagnostic. This data demonstrated the importance of an early diagnostic and suitable dietary control in patients with HPA due to PAH deficiency.

Plasma Phe and Tyr concentrations did not predict severity of mutations in obligate heterozygotes for HPA due to PAH deficiency, both in fasting state and after aspartame loading test. In these two situations, Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios were considered good parameters to discriminate controls from heterozygotes.

This study is an original contribution to the understanding of molecular bases of the HPA due to PAH deficiency in South Brazil, providing important informations for a better knowledge of genotype-phenotype correlation in this group of disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os caminhos da genética bioquímica humana ganharam um impulso considerável no início do século XX com a criação do conceito de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), proposto pelo médico inglês Archibald Garrod. Os EIM são um grupo de distúrbios hereditários envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo. A partir de estudos em pacientes com alcaptonúria, Garrod observou que os indivíduos com esta doença excretavam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina, maiores que as observadas em indivíduos normais. Verificou, também, que a alcaptonúria tinha uma distribuição familiar e que, freqüentemente, um ou mais irmãos eram também afetados, enquanto os pais e os demais parentes eram aparentemente normais. Baseado na observação de uma maior freqüência de casamentos consangüíneos entre os pais destes pacientes e nas descobertas de Mendel, Garrod sugeriu que esta doença fosse herdada de modo autossômico recessivo (Scriver *et al.*, 1995a).

As doenças relatadas por Garrod, e um número progressivo de EIM descritos subseqüentemente, se devem a mutações genéticas que afetam, quase sempre, uma enzima - chave para um passo metabólico específico. A maioria dos EIM são transmitidos nas famílias de modo autossômico recessivo, havendo um menor número de situações recessivas ligadas ao cromossomo X e raros casos de EIM herdados de modo dominante.

Apesar de individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que ocorrem 1 em cada 1000 recém-nascidos e vêm se tornando proporcionalmente mais comuns em indivíduos enfermos, na medida em que as doenças infecciosas e nutricionais vão sendo controladas.

Os EIM podem ser divididos em grupos conforme a área do metabolismo envolvida. A tabela 1.1 ilustra uma classificação resumida dos EIM (Giugliani, 1988).

Tabela 1.1: Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvido

Erros Inatos do Metabolismo	Exemplo
Aminoácidos	Fenilcetonúria
Ácidos Orgânicos	Acidúria Metilmalônica
Carboidratos	Galactosemia
Lipídios	Doença de Tay-Sachs
Glicosaminoglicanos	Síndrome de Hurler
Glicoproteínas	Fucosidose
Purinas e Pirimidinas	Doença de Lesch-Nyhan
Enzimas Eritrocitárias	Deficiência de Glicose-6-fosfato Desidrogenase
Metais	Doença de Wilson
Lipoproteínas	Hipercolesterolemia Familiar
Hormônios	Hiperplasia Adrenal Congênita

(Adaptado de Giugliani, 1988).

1.2 - AMINOÁCIDOS

Embora mais de 300 aminoácidos diferentes tenham sido identificados na natureza, somente 20 são comumente encontrados nas proteínas dos mamíferos, sendo os únicos aminoácidos codificados pelo DNA. Cada aminoácido possui um grupo carboxila, um grupo amino (exceto a prolina, que contém um grupo imino) e uma cadeia lateral distinta, ligados a um átomo de carbono. Os aminoácidos contêm nitrogênio além dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, também encontrados nos lipídios e glicídios. Este nitrogênio não pode ser armazenado e os aminoácidos em excesso às necessidades biossintéticas da célula são imediatamente degradados (Montgomery *et al.*, 1996).

A primeira fase do catabolismo envolve a remoção dos grupos α -amino por reações de transaminação e desaminação oxidativa, formando amônia e os α -cetoácidos correspondentes. Uma porção da amônia livre é excretada na urina, mas a maior parte é usada na síntese de uréia, que é, quantitativamente, a via mais importante para a eliminação de nitrogênio do corpo humano (Montgomery *et al.*, 1996).

Na segunda etapa do catabolismo dos aminoácidos, os esqueletos de carbono dos α -cetoácidos são convertidos em intermediários de rotas metabólicas produtoras de energia. Estes compostos podem ser metabolizados até gás carbônico (CO₂) e água, glicose, ácidos graxos ou corpos cetônicos por rotas específicas do metabolismo. Os aminoácidos são também precursores de muitos compostos nitrogenados (porfirinas,

neurotransmissores, hormônios, purinas e pirimidinas) que possuem importantes funções fisiológicas (Montgomery *et al.*, 1996).

As aminoacidopatias humanas geralmente são mais associadas à alterações no catabolismo dos aminoácidos que com a sua biossíntese. Quantidades suficientes de todos os aminoácidos estão presentes na dieta de crianças bem nutridas, desde que a deficiência de um aminoácido não-essencial, causada por um defeito em sua biossíntese, não ocorra. Contudo, uma falha no catabolismo dos aminoácidos da dieta pode levar ao acúmulo de compostos intermediários ou derivados dos aminoácidos, causando toxicidade ao organismo (Montgomery *et al.*, 1996).

1.3 - DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DA FENILALANINA

1.3.1 - Fenilalanina

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial, constituído de uma cadeia lateral apolar que não faz ligações ou doa prótons, nem participa em pontes de hidrogênio ou ligações iônicas. As cadeias laterais deste aminoácido podem ser consideradas lipídicas, uma propriedade que promove interações hidrofóbicas responsáveis pela estabilidade da estrutura protéica. Levando em consideração esta propriedade, a Phe tende a se localizar no interior da cadeia polipeptídica.

A hidroxilação da Phe leva à formação de tirosina (Tyr) e é a primeira reação no catabolismo da Phe. De acordo com a natureza de seus produtos metabólicos finais, a Phe é considerada um aminoácido glicocetogênico, pois seu metabolismo leva à formação de fumarato e acetoacetato (Montgomery *et al.*, 1996).

O conteúdo de Phe no sangue e em outros tecidos está em constante equilíbrio homeostático. Os níveis normais de Phe representam o estado estável (*steady state*) e um desvio deste valor representa um novo estado de equilíbrio, que pode ou não ter conseqüências para a saúde. Os níveis normais de Phe não são significativamente diferentes nas distintas faixas etárias. Os valores normais de Phe apresentam uma estreita variação de 30,0 a 180,0 $\mu\text{mol/L}$ em recém-nascidos e indivíduos adultos. As hiperfenilalaninemias (HPA) são caracterizadas por níveis de Phe mais elevados que a distribuição normal. O sexo parece interferir nas concentrações de Phe somente na

adolescência, onde o homem apresenta níveis mais elevados do que a mulher (Scriver *et al.*, 1995a).

1.3.2 - Sistema de Hidroxilação da Fenilalanina

Até a descoberta da conversão de Phe à Tyr nas amostras de fígado de indivíduos normais, pouco se conhecia sobre a enzima ou enzimas responsáveis por esta reação. Mas, no começo da década de 70, foram identificados muitos fatores bioquímicos que influenciavam a hidroxilação da Phe no fígado. Estes achados contribuíram para determinar que a fenilalanina hidroxilase (PAH, fenilalanina 4-monoxigenase, EC 1.14.16.1) é a enzima responsável por esse passo metabólico. Estudos posteriores revelaram que o sistema de hidroxilação hepático da Phe consiste de quatro componentes essenciais: a PAH, a dihidropteridina redutase (DHPR), o cofator 6(R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina (BH₄) e a pterina-4 α -carbinolamina desidratase (PCD).

A molécula de BH₄ participa de outras reações metabólicas como cofator natural, como por exemplo, nas reações catalisadas pela tirosina hidroxilase (TH, tirosina 3-monoxigenase, EC 1.14.16.2) e triptofano hidroxilase (TPH, triptofano 5-monoxigenase, EC 1.14.16.4), enzimas importantes na biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina. Desta forma, um defeito na biossíntese ou regeneração do cofator leva à hiperfenilalaninemia associada à deficiência de dopamina e serotonina.

A PAH é uma enzima de função mista: a oxidação de Phe se dá quando um átomo de oxigênio é incorporado à Tyr e um segundo átomo é reduzido à água. O cofator BH₄ atua como doador de elétrons na reação catalisada pela PAH. O BH₄ é oxidado à forma correspondente de dihydrobiopterina (BH₂) em cada ciclo da reação pela ação da enzima PCD. Desta forma, níveis apropriados do cofator são mantidos *in vivo* através da redução da dihydro a tetrahydrobiopterina pela ação da enzima dihidropteridina redutase (DHPR). A figura 1.1 mostra a rota metabólica da fenilalanina e a participação do cofator BH₄ nas hidroxilases dos aminoácidos aromáticos (Scriver *et al.*, 1995a; Blau e Blaskoviks, 1996).

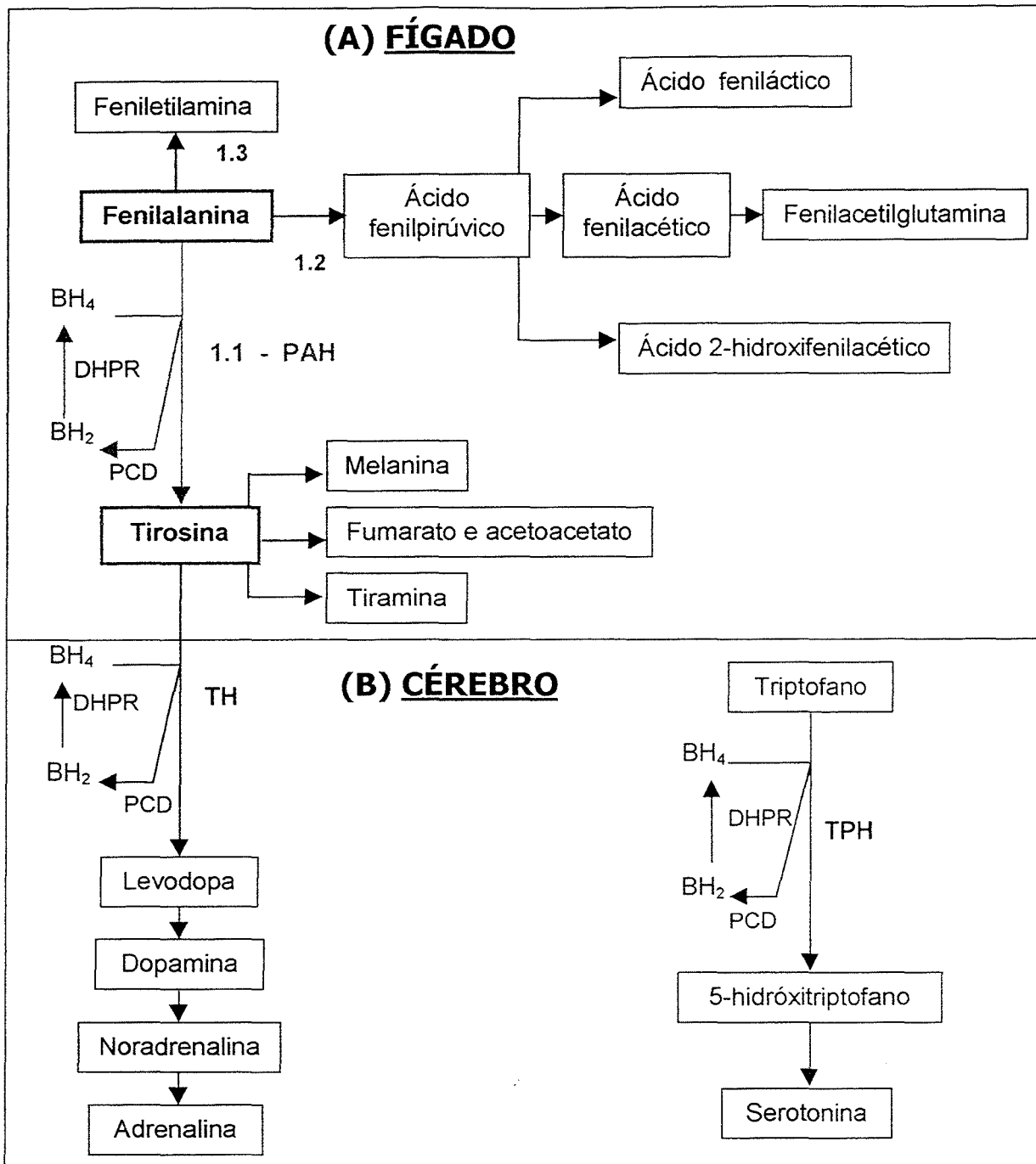


Figura 1.1: Rota metabólica da fenilalanina - (A) Fígado: 1.1: Reação de hidroxilação da fenilalanina (reação principal) catalisada pela PAH (fenilalanina-4-hidroxilase). A enzima pterina-4 α -carbinolamina desidratase (PCD) converte a forma tetrahydrobiopterina-4 α -carbinolamina em BH₂, o qual é reduzido a tetrahydrobiopterina (BH₄) pela ação da enzima dihydropteridina redutase (DHPR); 1.2 e 1.3: reações de transaminação e descarboxilação, respectivamente (reações bioquímicas menos utilizadas); **(B) Cérebro:** Participação do cofator BH₄ nas enzimas tirosina-3-hidroxilase e triptofano-5-hidroxilase (adaptado de Blau e Blaskoviks, 1996).

1.3.3 - Estrutura da fenilalanina hidroxilase humana

A PAH é uma enzima que contém átomos de ferro em sua estrutura e catalisa a hidroxilação de L-fenilalanina para L-tirosina na presença do cofator BH_4 e da molécula de oxigênio (Kappock e Caradonna, 1996). A PAH humana recombinante pode se apresentar nas formas de homotetrâmeros e homodímeros em uma solução com equilíbrio dependente do pH (Hufton *et al.*, 1995). A fosforilação reversível e a ativação do substrato são diretamente responsáveis pela regulação da atividade da PAH. A massa molecular de uma subunidade é de aproximadamente 50 kDa.

A PAH, de modo semelhante às enzimas TH e TPH, consiste de três domínios: o domínio regulatório amino terminal, de 12 a 19 kDa envolvido no controle da atividade enzimática (resíduos de 1 a 142); o domínio catalítico, de 38 kDa, mais conservado, envolvido na especificidade e hidroxilação do substrato e na ligação ao cofator (resíduos 143 a 410); e o domínio de tetramerização de 5 kDa, o qual é caracterizado pela presença de uma longa hélice que promove a oligomerização (agregação das cadeias polipeptídicas ou subunidades) (resíduos 411 a 452) (Erlandsen *et al.*, 1997; Fusetti *et al.*, 1998; Erlandsen e Stevens, 1999; Kobe *et al.*, 1999).

O átomo de ferro do sítio ativo está localizado em uma região coberta e acessível a solventes (entre as α -hélices 14 e as β -fitas 8) do domínio catalítico. O ferro catalítico está ligado a dois resíduos de histidina (His285 e His290), um resíduo de ácido glutâmico (Glu330) e três moléculas de água. Conectado a parte interior do sítio ativo se encontra um túnel (cujas paredes são formadas pelos resíduos 378 a 381), que pode ser a passagem por onde o substrato se liga ao sítio ativo. A maioria dos 34 aminoácidos que compõem a região do sítio ativo são resíduos hidrofóbicos, exceto 3 Glu com carga, 2 His supostamente carregadas e uma Tyr não carregada (Erlandsen e Stevens, 1999).

Os estudos sobre sistema de expressão da PAH humana e do rato demonstraram que estas enzimas compartilham propriedades em comum. As duas PAH são enzimas oligoméricas, compostas de subunidades protéicas idênticas e que podem existir principalmente na forma de tetrâmeros, trímeros e dímeros. A grande homologia encontrada na seqüência de aminoácidos (92,0%) é outro aspecto evidenciado pela similaridade entre as duas PAH. No entanto, existem algumas diferenças significativas entre as enzimas, particularmente relacionadas à estrutura e aos mecanismos de regulação (Waters *et al.*, 1998a).

1.3.4 - Hiperfenilalaninemias (HPA)

As HPA podem ser classificadas como: HPA por deficiência do cofator BH₄ (Blau e Blaskovics, 1996) e HPA por deficiência de PAH (Scriver *et al.*, 1995a).

Mutações no gene da PAH, quando em homozigose ou dupla heterozigose, resultam em deficiência de PAH que por sua vez causa hiperfenilalaninemia (HPA). A HPA esta relacionada a uma variedade de fenótipos clínicos, incluindo o retardo mental, se a doença não for tratada precocemente. A maioria das HPA é devida a mutações no gene da PAH, e somente 1,0% é devido a genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese ou regeneração do cofator BH₄ (Scriver *et al.*, 1995a).

1.3.4.1 - HPA por deficiência do cofator BH₄

As HPA por deficiência do cofator BH₄ ocorrem devido à deficiência das enzimas envolvidas na síntese (guanossina trifosfato ciclohidrolase I [GTPCH] e 6-piruvil-tetrahydropterina sintetase [PTPS]) ou na regeneração (dihidropteridina redutase [DHPR] e pterina-4 α -carbinolamina desidratase [PCD]) do cofator BH₄. Ao contrário da HPA por deficiência de PAH, os sintomas clínicos resultantes das alterações bioquímicas no metabolismo do cofator BH₄ não são evitados apenas com uma dieta restrita em Phe. O principal objetivo do tratamento destas formas de HPA é a normalização dos níveis de Phe, através da suplementação do cofator e da restauração da neurotransmissão monoaminérgica pela administração de precursores da dopamina (L-Dopa) e serotonina (5-hidroxitriptofano, 5HT) (Scriver *et al.*, 1995a). Até o momento, mais de 90 mutações foram descritas e associadas às alterações no metabolismo do cofator BH₄ (<http://www.unizh.ch/~blau/bh4.html>).

1.3.4.2 - HPA por deficiência de PAH

A fenilcetonúria (PKU) foi o primeiro EIM associado à deficiência mental. A grande quantidade de conhecimentos acumulados (clínicos, genéticos, bioquímicos, moleculares) desde 1934, tornou a PKU um modelo de estudo para as doenças genéticas humanas. Desde a sua descoberta, pelo bioquímico e médico norueguês Asbjørn Følling, a PKU é provavelmente o EIM que tem sido mais extensivamente estudado. Os acontecimentos a seguir indicam os principais meios para o conhecimento da PKU:

- A descoberta da PKU (Følling, 1934);
- Determinação do mecanismo de herança (Penrose, 1935);
- Identificação das características bioquímicas (Jervis, 1947; Jervis, 1953);
- Tratamento com dieta restrita em Phe (Bickel *et al.*, 1953);
- Detalhamento das características clínicas (Paine, 1957);
- Estudos de frequência da doença (Carter e Woolf, 1961; Cohen *et al.*, 1961);
- Implantação de programas de triagem neonatal (Guthrie e Susi, 1963);
- Estabelecimento de métodos simples para a quantificação dos aminoácidos Phe e Tyr (McCaman e Robins, 1962; Philips, 1967);
- Reconhecimento dos riscos teratogênicos da Phe: PKU materna (Kerr *et al.*, 1968; Huntley e Stevenson, 1969);
- Análise de ligação do gene da PAH (Berg e Saugstad, 1974; Kamaryt *et al.*, 1978; Knapp *et al.*, 1982);
- Diagnóstico pré-natal (Matalon *et al.*, 1977; Lidsky *et al.*, 1985a);
- Detecção de heterozigotos (Paul *et al.*, 1978);
- Estudos de correlação do genótipo com o fenótipo (Guttler, 1980);
- Caracterização e mapeamento do gene da PAH (Woo *et al.*, 1983; Lidsky *et al.*, 1984; Woo *et al.*, 1984; DiLella *et al.*, 1986);
- Primeiro protocolo experimental visando ao uso da terapia gênica no tratamento (Ledley *et al.*, 1985);
- Associações com marcadores genéticos (Guttler e Woo, 1986);
- Identificação das mutações por reação em cadeia da polimerase (DiLella *et al.*, 1988);
- Análise de expressão dos alelos mutantes da PAH (Okano *et al.*, 1991);
- Criação de um banco de dados contendo todas as alterações encontradas no gene da PAH (Hoang *et al.*, 1996);
- Criação de um animal geneticamente modificado que imita o fenótipo bioquímico e clínico (McDonald e Charlton, 1997);
- Determinação da estrutura da enzima e dos sítios funcionais (Erlandsen *et al.*, 1997; Fusetti *et al.*, 1998; Erlandsen e Stevens, 1999; Kobe *et al.*, 1999);
- Protocolo para o uso da fenilalanina amônia liase como uma nova ferramenta para o tratamento (Sarkissian *et al.*, 1999).

Este estudo representa mais uma contribuição para o universo de pesquisas em PKU. Considerando a participação de achados clínicos, bioquímicos e moleculares,

este grupo de HPA compreende a fenilcetonúria (PKU) clássica e formas variantes de deficiência de PAH (PKU moderada, PKU leve, HPA não-PKU). O estudo da HPA transitória e da PKU materna não faz parte dos objetivos deste trabalho e será abordado apenas de uma forma resumida a seguir.

A HPA transitória pode estar associada a um atraso na maturação da PAH ou a um distúrbio transitório no metabolismo da biopterina, associado à deficiência de PCD (Eisenmith e Woo, 1995).

A ocorrência de retardo mental na prole de mães com PKU é um exemplo de uma doença genética dependente do genótipo da mãe. A PKU materna é decorrente do efeito teratogênico da Phe. As mulheres fenilcetonúricas, que foram tratadas e não apresentam retardo mental e mesmo aquelas com HPA não-PKU, correm o risco de gerar crianças com retardo mental, microcefalia, atraso no crescimento intra-uterino, malformações congênitas cardíacas e de outros órgãos em menor escala. O controle dietético rigoroso dos níveis de Phe materna parece reduzir e evitar o dano, mas deve ser introduzido antes da concepção e continuar durante toda a gestação (Rouse *et al.*, 1997).

a) A Descoberta:

A PKU foi inicialmente denominada por Følling, em 1934, de "*imbecillitas phenylpyrouvica*" (oligofrenia fenilpirúvica), devido ao fato de ter sido encontrado um excesso de ácido fenilpirúvico na urina de pacientes com retardo mental. A presença de sintomas semelhantes em irmãos da mesma prole, levou Følling a postular que este distúrbio no metabolismo da Phe era herdado de um modo autossômico recessivo. No ano seguinte à sua descoberta, Penrose confirmou a hipótese de Følling, constatando que se tratava realmente de uma doença genética autossômica recessiva. O termo fenilcetonúria foi introduzido por Penrose e Quastel posteriormente (Eisenmith e Woo, 1995).

b) Terapia Dietética e Triagem Neonatal:

Uma década após a descoberta da PKU, Woolf e Vulliamy, considerando os inúmeros estudos relacionados às características genéticas, bioquímicas e clínicas, à frequência da PKU e ao sucesso no uso do manejo dietético para o tratamento da galactosemia, sugeriram que os níveis de Phe e de seus metabólitos podiam ser reduzidos pelo uso de uma dieta pobre em Phe (Woolf e Vulliamy, 1951). Dois anos mais tarde, Bickel, baseado nesta hipótese, verificou, após o estabelecimento da terapia

dietética, reduções significativas dos níveis de Phe no soro e de ácido fenilpirúvico na urina de fenilcetonúricos jovens (Bickel, 1996).

A partir destes achados, muitos trabalhos sugeriram que as graves manifestações clínicas e bioquímicas em fenilcetonúricos poderiam ser significativamente reduzidas, desde que os pacientes fossem diagnosticados ainda no período neonatal e tratados precocemente com a referida dieta. Esta observação provocou um grande interesse no desenvolvimento e implementação de programas de triagem neonatal para a PKU.

O primeiro programa, iniciado em 1957 na Califórnia (EUA) e, logo depois na Grã Bretanha, foi baseado no uso do teste do cloreto férrico para detectar fenilpiruvato na urina. No entanto, as elevadas concentrações plasmáticas de Phe precedem, em várias semanas, o aumento da excreção urinária de fenilpiruvato, contribuindo, desta forma, para a obtenção de resultados falso-negativos (Guthrie, 1996; Levy, 1999).

Em 1963, a descoberta por Guthrie de um método semiquantitativo para a determinação dos níveis séricos de Phe em recém nascidos, representou um avanço crítico para o tratamento da PKU e para a implantação dos programas de triagem neonatal. Cerca de 150 milhões de crianças participaram destes programas e aproximadamente 10000 foram detectadas como pacientes com PKU ou formas variantes e se encontram em tratamento (Guthrie, 1996; Levy, 1999).

c) Aspectos Clínicos e Bioquímicos:

Devido à natureza complexa do sistema de hidroxilação da Phe em humanos, alterações em diferentes componentes protéicos podem prejudicar esse processo, ocasionando, desta forma, uma elevação dos níveis teciduais desse aminoácido. Os pacientes com PKU são normais ao nascimento. Após a ingestão de leite e, em torno do sexto dia após o nascimento, a concentração plasmática de Phe excede 1200,0 $\mu\text{mol/L}$ e os metabólitos urinários são excretados, tornando a urina com um odor murino característico (provavelmente devido à presença de fenilcetonas) (Scriver *et al.*, 1995a).

Quando a criança não é diagnosticada e tratada precocemente, ela irá desenvolver retardo do desenvolvimento psicomotor, tremores, convulsões, hipopigmentação (devido à deficiência de melanina), hiperatividade, microcefalia, eczemas cutâneos, agressividade. A alteração da função mental é grave e os pacientes não tratados possuem quociente de inteligência (QI) inferior a 50 e problemas neurológicos que levam à necessidade de institucionalização. Estes pacientes podem

ainda apresentar eletroencefalograma (EEG) anormal, crescimento pós-natal alterado (principalmente com redução do tamanho do crânio) e redução na contagem dos espermatozóides e volume seminal nos homens afetados. O diagnóstico e o tratamento precoces evitam o aparecimento destas complicações (Eisensmith e Woo, 1995; Scriver *et al.*, 1995a).

Em indivíduos normais, a concentração plasmática de Phe varia de 30,0 a 180,0 $\mu\text{mol/L}$ (0,5 - 3,0 mg/dL). Os pacientes com PKU apresentam valores de Phe de 1000,0 a 1200,0 $\mu\text{mol/L}$ (16,0 a 20,0 mg/dL), com aumento de excreção urinária do aminoácido e de seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilactato, fenilacetato e seus conjugados fenilacetilglutamina e dihidroxifenilacetato, e feniletilamina, entre outros). Vários relatos demonstram que os valores plasmáticos de Phe não se correlacionam com as concentrações de seus metabólitos na urina e não há, até o momento, nenhuma correlação entre os elevados níveis urinários dos metabólitos da Phe e danos causados no cérebro de pacientes com PKU (Scriver *et al.*, 1995a).

A patogênese da PKU pode ser explicada a partir de três pontos de vista: (1) deficiência de tirosina; (2) efeito dos elevados níveis de Phe nos mecanismos de transporte e distribuição de metabólitos; (3) efeitos em rotas alternativas. Apesar do mecanismo de deficiência neurológica não estar totalmente estabelecido, provavelmente o acúmulo de Phe seja o principal agente neurotóxico responsável pela PKU.

A Phe pode inibir o transporte e, portanto, a disponibilidade de outros aminoácidos para o cérebro, durante um período crítico de seu desenvolvimento e maturação. No entanto, nenhum fato isolado consegue explicar completamente os danos cerebrais destes pacientes, levando a acreditar que trata-se de uma situação multifatorial. A importância de um evento sobre o outro provavelmente varia entre os pacientes (ou famílias), devendo o fenótipo PKU possuir muitos determinantes (Scriver *et al.*, 1995a)

Vários estudos têm usado imagens de ressonância magnética (MRI) para comprovar a existência de alterações no processo de mielinização do cérebro, as quais podem estar associadas com os níveis elevados de Phe encontrados em pacientes inadequadamente tratados ou que interromperam o tratamento (Bick *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1991). Como esperado, a maioria dos fenilcetonúricos tratados também apresenta MRI do cérebro anormal. Porém, desde que de início recente, as alterações podem ser revertidas com uma implantação adequada do tratamento. Estas alterações podem causar um *turnover* aumentado da mielina no estado hiperfenilalaninêmico. Em relação ao desenvolvimento cognitivo e à função cerebral, estas mudanças na função e

estrutura da mielina podem alterar mecanismos de conexão neuronal e diminuir a conexão sináptica permanente em pacientes com PKU (Scriver *et al.*, 1995a).

Leuzzi e colaboradores demonstraram que as alterações da substância branca observadas na MRI de pacientes com PKU provavelmente resultaram das exposições recentes aos elevados níveis de Phe. A atrofia cerebral encontrada em pacientes com diagnóstico tardio pode ser um resultado da exposição crônica aos elevados aumentos de Phe (Leuzzi *et al.*, 1995).

Em outro estudo, Hommes relatou alterações nos receptores de neurotransmissores em modelos animais para PKU. No entanto, não está claro se estes efeitos são totalmente responsáveis pelo dano mental (Hommes, 1994).

d) Diagnóstico Laboratorial e Diagnóstico Pré-natal:

O diagnóstico para a PKU é usualmente realizado por teste de triagem neonatal. Os valores normais das concentrações plasmáticas de Phe são menores que 150,0 $\mu\text{mol/L}$ em neonatos e menores que 120,0 $\mu\text{mol/L}$ em crianças e adultos. Valores acima de 1200,0 $\mu\text{mol/L}$ são encontrados em casos de PKU clássica, sendo mais elevados que os encontrados nas demais formas de HPA por deficiência de PAH (Scriver *et al.*, 1995a).

Não há dificuldades significativas para a implantação do teste de triagem neonatal para a detecção da PKU e a concentração de Phe de uma amostra de sangue pode ser analisada basicamente por três procedimentos: (1) teste de Guthrie, um método semi-quantitativo baseado em um ensaio microbiológico, de baixo custo e aplicado em grande escala, mas pode apresentar resultados falsos negativos devido à presença de drogas ou substâncias endógenas; (2) cromatografia, um teste semi-quantitativo usado em muitos laboratórios pelo baixo custo e pela possibilidade de permitir a detecção de outras aminoacidopatias; (3) fluorimetria, o método quantitativo mais preciso para determinar os níveis plasmáticos de Phe (Scriver *et al.*, 1995a).

Com o advento de novas técnicas automatizadas outros métodos foram implantados como por exemplo: *Quantase[®] Phe* (baseado na ação da enzima fenilalanina desidrogenase sobre a Phe, produzindo fenilpiruvato e amônia; usado em alguns laboratórios para triagem neonatal), análise espectrofotométrica (baseada na quantificação do ácido trans-ciânico obtido a partir da Phe pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL); não é adaptado para a triagem neonatal), cromatografia

líquida de alta performance (muito específica, mas necessita de aparelhagem sofisticada; usado somente para o monitoramento dos níveis de Phe nos pacientes sob dieta) (Taylor *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997).

Os estudos moleculares de identificação e caracterização do gene da PAH em pacientes com PKU, proporcionaram informações valiosas que podem ser usadas no diagnóstico pré-natal e na detecção de heterozigotos para a deficiência de PAH, além de sua importância e utilidade na determinação do prognóstico da doença. A seqüência do cDNA da PAH contém um grande número de polimorfismos. Estes alelos podem ser combinados para formar marcadores genéticos (denominados de haplótipos polimórficos) no locus da PAH. A segregação codominante destes haplótipos, associada ao alelo mutante, é bastante informativa para o diagnóstico pré-natal e a detecção de heterozigotos. Os amniócitos e vilosidades coriônicas são as amostras possíveis de utilização para a análise de DNA. Os métodos moleculares mais comumente usados na análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) e detecção de mutações são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Eisensmith e Woo, 1995; Scriver *et al.*, 1995a). A importância para o diagnóstico pré-natal e outras aplicações dos haplótipos polimórficos serão mais detalhadamente discutidas na seção 1.4.

O diagnóstico pré-natal para a PKU apresenta diferentes significados dependendo do contexto social e cultural da população. Do ponto de vista bioético, vários aspectos são considerados. Um deles se traduz no custo dos produtos da dieta, que pode representar um forte impacto na situação econômica das famílias. As diferentes freqüências da PKU entre grupos étnicos distintos também repercutem na realização do diagnóstico pré-natal. Nos Estados Unidos e em muitos países da Europa, o diagnóstico pré-natal e a interrupção da gravidez são raramente escolhidos pelas famílias com alto risco, mas na Turquia, onde a freqüência da PKU é mais elevada, ele pode ter um maior significado e uma melhor aceitação (Levy, 1998).

A detecção de heterozigotos por métodos moleculares é um ponto conflitante que merece também ser abordado. A implantação de uma variedade de métodos para a detecção de heterozigotos tem sido proposta como um meio de reduzir a incidência de PKU. Estes métodos de triagem devem ser confiáveis e capazes de detectar uma percentagem significativa de mutações no gene da PAH. À medida que mutações adicionais são identificadas, a eficiência desses métodos na triagem para heterozigotos deve aumentar (Eisensmith e Woo, 1995).

1.4 - ASPECTOS MOLECULARES DO GENE DA PAH

1.4.1 - Caracterização do Gene da PAH

a) Localização gênica:

Os estudos de ligação usando marcadores protéicos não conseguiram identificar o *locus* da PAH em humanos. Inicialmente, uma ligação moderada com o *locus* PGM1 da fosfoglucomutase e os *loci* AMY-1 e AMY-2 da amilase sugeriu que o *locus* da PAH estaria localizada no cromossomo 1 (Berk e Saugstad, 1974; Kamaryt *et al.*, 1978). Contudo, investigações posteriores baseadas em métodos para a identificação de heterozigotos em famílias PKU não comprovaram esta hipótese (Paul *et al.*, 1979a).

A localização cromossomal do gene da PAH foi determinada por *Southern blot* usando DNA genômico isolado de células híbridas, as quais continham diferentes combinações de cromossomos humanos e de roedores. Técnicas específicas, usando cDNA da PAH do clone phPAH247 como sonda de hibridização, determinaram que o *locus* da PAH se encontrava no cromossomo 12. Finalmente, através do mapeamento de deleções deste cromossomo e hibridização *in situ* de preparações em metáfases obtidas de células linfoblásticas de cariótipo normal, o gene da PAH foi localizado na região 12q22-q24.1 do cromossomo 12 (Lidsky *et al.*, 1984).

b) DNA Complementar (cDNA):

A purificação da PAH de fígado de rato e a produção de anticorpos monoclonais contribuíram consideravelmente para a clonagem do cDNA da PAH humana (Woo *et al.*, 1974). O cDNA foi obtido a partir do mRNA da PAH purificada de fígado de rato por imunoprecipitação de polissomas (Robson *et al.*, 1982). Em outro experimento, Woo e colaboradores (1983) descreveram o isolamento de um clone recombinante apresentando o cDNA da PAH humana (Woo *et al.*, 1983). Este clone foi caracterizado através de tradução do híbrido selecionado para produzir a proteína PAH. A comparação entre a seqüência de aminoácidos prevista do cDNA e a seqüência de aminoácidos parcial obtida da enzima confirmou estes achados (Robson *et al.*, 1984). O clone do cDNA do rato serviu, então, como uma sonda de hibridização específica para identificar e isolar vários clones de cDNA da PAH humana, a partir de bibliotecas de cDNA do fígado humano (Kwok *et al.*, 1985). Estes achados permitiram a determinação da estrutura primária da PAH (Lidsky *et al.*, 1985b), a caracterização do mRNA maduro da proteína

PAH (DiLella *et al.*, 1985), a delimitação da organização estrutural do gene da PAH (DiLella *et al.*, 1986) e o estabelecimento de um sistema de haplótipos por RFLP (Woo, 1988).

A extremidade 5' da seqüência do cDNA da PAH inclui uma região promotora que apresenta (Konecki *et al.*, 1992):

- Cinco sítios de início de transcrição (Cap), localizados a cerca de 154 pb do primeiro códon de iniciação (+1, +40, +58, +60 e +96);
- quatro domínios ricos em GC, localizados nas posições 14-23, 178-185, 237-244 e 312-318 da seqüência genômica;
- uma caixa CCAAT na posição 65-69;
- dois sítios de elementos parcialmente responsivos à glicocorticóides (GRE), localizados nas posições 37-42 e 75-80;
- duas caixas CACCC nas posições 140-144 e 214-218;
- dois sítios da proteína ativadora 2 (AP-2) e um elemento parcialmente responsivo ao AMP cíclico (CRE), localizados nas posições 86-92, 174-181 e 293-296, respectivamente;
- códon de início de transcrição ATG, na posição 223 do cDNA.

A região codificante apresenta 1356 nucleotídeos, o que corresponde a uma proteína homopolimérica madura (50 kDa) de 452 aminoácidos.

A extremidade 3' do gene da PAH compreende (Kwok *et al.*, 1985):

- Uma seqüência codificadora de 41 pb (localizada no exon 13);
- códon de terminação TAA, localizado na posição 1359;
- cerca de 848 pares de bases de seqüência não traduzida;
- sítio de poliadenilação TA (precedido de 13 bases pelo sinal de poliadenilação AATAAA);
- a seqüência CACTG (a 9 pb do sítio de poliadenilação) que pode desempenhar função no processamento do RNA e na poliadenilação.

c) Organização estrutural do gene:

O gene da PAH engloba 90 kb de DNA genômico divididos em 13 exons que são transcritos em um mRNA maduro de aproximadamente 2,4 kb. Os exons apresentam de 41 a 197 pb e os íntrons de 1 a 23,5 kb (Kwok *et al.*, 1985). Os dinucleotídeos gt e ag estão presentes em todas as junções íntron-exon. Os 17 nucleotídeos finais da

extremidade 3' de cada íntron (região rica em pirimidinas) contém somente um dinucleotídeo AG. Por outro lado, 8 dos 12 sítios de junção presentes no gene da PAH, apresentam um segundo dinucleotídeo gt na seqüência consensual. Três tipos de junções íntron-exon podem ser observadas no gene da PAH: a tipo 0 (entre os códons) ocorre 6 vezes e as tipos I e II (interrompendo os códons após o primeiro e o segundo dinucleotídeo, respectivamente) ocorrem 3 vezes cada uma. Estas observações estão de acordo com as junções íntron-exon de outros genes de células eucarióticas (DiLella *et al.*, 1986).

O *locus* da PAH é rico em marcadores polimórficos que podem ser usados para caracterizar cromossomos normais e mutantes. A estrutura do gene da PAH pode ser resumida na tabela 1.2 e na figura 1.2.

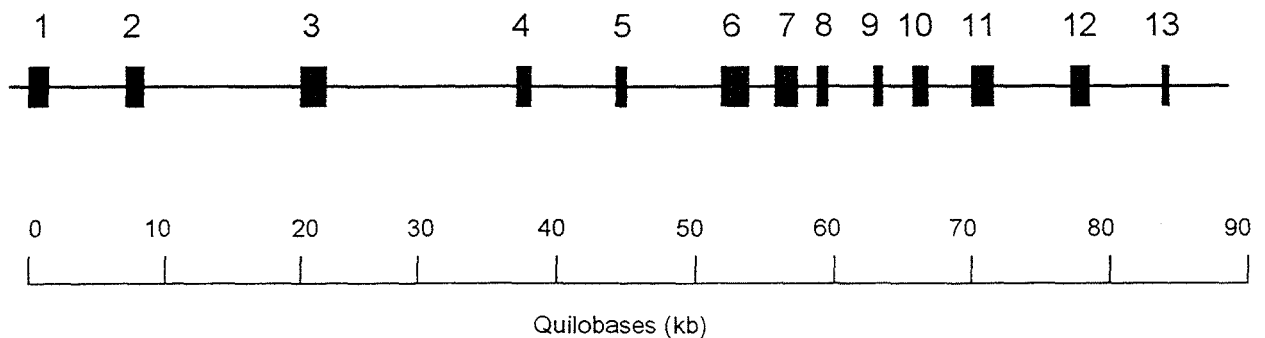
A comparação da estrutura primária das proteínas PAH de diferentes espécies (Morales *et al.*, 1990) e da PAH com outras hidroxilases de mamíferos (Grenet *et al.*, 1987) demonstraram uma alta homologia nas regiões codificadoras que estão localizadas entre os exons 4 e 11 da proteína PAH. O ápice desta homologia se concentra entre as regiões dos exons 7 e 9. Esta região central é uma seqüência importante para as funções que estas proteínas compartilham, como a ligação do oxigênio e do cofator e a conversão catalítica do substrato (Jennings *et al.*, 1991).

Tabela 1.2: Tamanho dos exons e introns do gene da PAH

Exon	Tamanho (pb)	Intron	Tamanho (kb)
1	118	1	4,5
2	108	2	16,5
3	184	3	23,5
4	89	4	13,5
5	68	5	12,0
6	197	6	2,5
7	136	7	1,0
8	70	8	3,5
9	57	9	1,5
10	96	10	1,2
11	134	11	3,2
12	116	12	1,2
13	41	-	-

(Adaptado de Kwok *et al.*, 1985 e DiLella *et al.*, 1986).

a) Gene da PAH



b) Proteína PAH

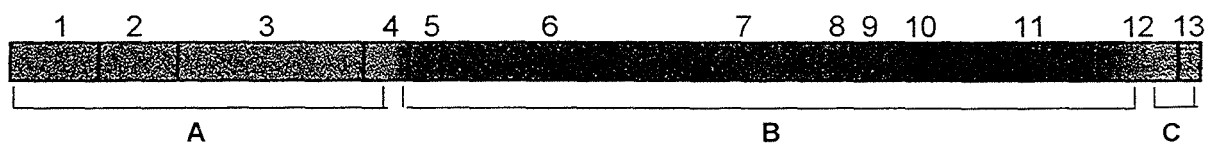


Figura 1.2: Gene e Proteína da PAH. a) Representação esquemática do gene da PAH indicando a distribuição dos exons e introns. Os exons são representados por caixas. b) Estrutura da proteína com seus domínios (A: domínio regulatório; B: domínio catalítico; C: domínio de tetramerização) (Adaptado de Kwok *et al.*, 1985 e Erlandsen e Stevens, 1999).

d) Regulação do gene da PAH:

O gene da PAH pode ser regulado por mecanismos de controle da transcrição e pós-tradução, os quais estão localizados na região promotora do gene da PAH. A região flanqueadora 5' contém 5 sítios Cap que são usados na expressão gênica. A presença destes sítios é uma característica dos genes constitutivos (Scriver, 1995b).

O gene da PAH não apresenta caixa TATA, mas contém pequenas seqüências correspondente a vários elementos de controle (*cis-acting elements*) que podem atuar na expressão do gene da PAH. Estes elementos incluem os domínios ricos em GC (uma outra característica dos genes constitutivos) e o segmento CCAAT que é um alvo dos fatores regulatórios para a eficiência da transcrição (Scriver, 1995b).

Os glicocorticóides podem afetar a atividade da PAH (Dahl e Mercer, 1986). O efeito dos glicocorticóides na hidroxilação e homeostasia da Phe pode ser mediado

através da interação cooperativa de proteínas ligadas aos sítios GRE e CACCC. A presença de sítios de ligação para as proteínas AP-2 e um CRE parcial ressalta a grande complexidade encontrada nos mecanismos de regulação do gene da PAH (Konecki *et al.*, 1992).

Estudos *in vivo*, baseados na fusão dos genes da PAH e da enzima bacteriana cloranfenicol acetil transferase (CAT) em camudongos transgênicos, demonstraram que a região flanqueadora 5' contém elementos promotores funcionais que podem conferir a expressão específica do gene da PAH para o tecido e estágio de desenvolvimento (Wang *et al.*, 1992).

e) Homologia entre hidroxilases dependentes do cofator BH₄:

A PAH faz parte de uma classe de enzimas dependentes do cofator BH₄: as hidroxilases dos L-aminoácidos aromáticos. Também estão incluídas nesta classe a TH e TPH. A PAH compartilha muitas propriedades bioquímicas e físicas com estas enzimas, sugerindo que as mesmas surgiram a partir de um ancestral comum e podem constituir uma família de proteínas associadas estruturalmente. As enzimas PAH, TH e TPH catalisam reações de hidroxilação para a formação de Tyr, serotonina e catecolamina, respectivamente, usando o mesmo átomo de ferro e diferindo apenas na sua especificidade ao substrato. As três hidroxilases são organizadas em 3 domínios muito semelhantes: domínio regulatório, domínio catalítico e domínio de tetramerização (Fusetti *et al.*, 1998). Versões truncadas (sem a parte da região amino terminal da proteína) da PAH e TH de murinos podem ainda executar a reação de hidroxilação, mas com uma aparente perda da especificidade do substrato. A PAH encontrada em *Chromobacterium violaceum* é menor que a PAH da *Drosophila* e de mamíferos (~36 kDa versus 52 kDa) e parece necessitar da região homóloga da extremidade amino terminal das proteínas destas outras espécies (Onishi *et al.*, 1991).

A seqüência de nucleotídeos bastante conservada entre os cDNA destas proteínas (PAH, TH e TPH) (Grennet *et al.*, 1987) e a grande homologia na seqüência dos aminoácidos das três hidroxilases (Morales *et al.*, 1990) são observadas tanto em espécies distintas como na mesma espécie. Vários anticorpos foram produzidos para reconhecer estas proteínas (Jennings e Cotton, 1990; Jennings *et al.*, 1991). As junções íntron-exon são também bastante conservadas nos três genes. No entanto, algumas diferenças podem ser observadas na estrutura das hidroxilases PAH, TH e TPH. O gene da PAH humana engloba 90 kb, enquanto o gene da TH engloba 80 kb e a TPH

apresenta um tamanho intermediário. Quatro espécies de mRNA da TH foram encontrados em humanos e em outras espécies de primatas, mas não foram identificados em um grande número de outros organismos. Desta forma, a ocorrência de múltiplos mRNA da TH é provavelmente específica de primatas. Por outro lado, muitos mRNA da PAH e da TPH foram observados em espécies não-primatas, os quais não são provavelmente produzidos pelos humanos e outros primatas (Eisensmith e Woo, 1995; Scriver *et al.*, 1995a).

f) Haplótipos no locus da PAH:

A seqüência do cDNA da PAH apresenta um grande número de polimorfismos reconhecidos e ainda podem ser encontrados muitos outros nos íntrons. Estes polimorfismos são marcadores genéticos, denominados de haplótipos, que apresentam pequenas variações normais na seqüência de nucleotídeos distribuídas em posições diferentes do gene. Alguns polimorfismos ocorrem em sítios de clivagem das enzimas de restrição, o que facilita a sua identificação. Entre estes, estão os sistemas bialélicos RFLP (polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição) que são denominados pela enzima de restrição correspondente (*Bgl*II, *Pvu*IIa e *Pvu*IIb na extremidade 5' e *Eco*RI, *Msp*Ia, *Msp*IIa, *Xmn*I, *Hind*III, *Eco*RV e *Sph*I na extremidade 3' do gene) (Woo *et al.*, 1983; Lidsky *et al.*, 1985c).

Os haplótipos por RFLP têm se expandido para incorporar vários outros polimorfismos multialélicos: o sistema *Hind*III de número variável de repetições em *tandem* (VNTR), que diferem quanto ao número de repetições e estão localizado na extremidade 3' do gene da PAH (Goltsov *et al.*, 1992); o sistema de pequenas repetições em *tandem* (STR), localizados no exon 3 do gene da PAH (Goltsov *et al.*, 1993a). O sistema de polimorfismo de um só nucleotídeo (SNP) é denominado de mutação silenciosa e não é considerado um alelo RFLP (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

As substituições de nucleotídeos responsáveis pelos RFLP não prejudicam qualquer função vital e não apresentam efeito no fenótipo. Entretanto, em alguns casos, os sítios de restrição polimórficos ocorrem na região codificadora do gene, e mutações nestes sítios podem modificar o modelo dos fragmentos polimórficos ou constantes. Este achado foi observado nas mutações L311P (Lichter-Konecki *et al.*, 1988), G272X, delL364 (Svensson *et al.*, 1990) e S273F (Melle *et al.*, 1991).

Uma relação entre desequilíbrio de ligação e distâncias de mapas físicos deste sítios polimórficos não identificou nenhuma região propensa à recombinação no gene da PAH humana. Considerando que os RFLP são fortemente ligados ao gene da PAH, eles podem ser usados para analisar a transmissão de cromossomos normais ou mutantes em famílias PKU. As frequências destes polimorfismos têm sido estabelecidas em cromossomos normais e mutantes em muitas populações. Nas populações europeias, as frequências podem ser muito significativas, onde 86,0% das famílias PKU são heterozigotas para um sítio RFLP ou mais. Contudo, as frequências entre orientais são menores, indicando que apenas 32,0% das famílias são heterozigotas para um sítio ou mais, sendo os RFLP menos informativos para o diagnóstico pré-natal ou para a detecção de heterozigotos em populações asiáticas (Scriver *et al.*, 1995a).

Os haplótipos surgem da combinação do padrão RFLP, STR e VNTR. A interação entre estes marcadores genéticos pode representar uma ferramenta importante para o diagnóstico pré-natal. Somente o sistema STR é 80,0 a 85,0% informativo em populações caucasóides. As combinações STR + VNTR são 90,0% informativas e STR + VNTR + *XmnI/MspI* ("mini-haplótipo") são 90,0 a 95,0% informativas em populações caucasóides (Eisensmith *et al.*, 1994).

Os haplótipos do gene da PAH são denominados por números arábicos e cerca de 87 já foram descritos (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki, 1998). A distribuição de haplótipos e associações entre mutações e haplótipos variam muito entre os grupos étnicos. Alguns exemplos podem ser observados a partir de estudos em várias populações: os haplótipos 1 e 2 são comumente associados à mutação R408W no noroeste e leste europeu, respectivamente; o haplótipo 3 com a mutação IVS12nt1g>a no norte da Europa; o haplótipo 6 com a mutação IVS10nt-11g>a na Turquia, sudeste europeu e na região do Mediterrâneo; o haplótipo 7 é comumente associado à mutação G272X na Noruega; o haplótipo 9 com a mutação I65T no noroeste europeu e na península ibérica.

Em populações específicas, podem ser observados a existência de haplótipos associados com mais de uma mutação e de mutações que estão associadas com mais de um haplótipo. Por exemplo, o haplótipo 1 está também associado à mutação R261Q na Alemanha, Suíça e Portugal. A mutação V388M está associada ao haplótipo 1 na Espanha e Portugal e ao haplótipo 4 em populações chilenas e japonesas. Além de ocorrer nos haplótipos 1 e 2, a mutação R408W está associada ao haplótipo 5 na população polonesa, em menor frequência ao haplótipo 34 na população portuguesa e

aos haplótipos 41 e 44 na população chinesa, indicando uma possível recorrência da mutação R408W nestas populações. Outra provável mutação recorrente é a E280K, a qual pode ser encontrada em associação com 4 diferentes haplótipos de populações europeias e nos haplótipos 1 e 2 em Quebec (Byck *et al.*, 1997). A tabela 1.3 mostra um resumo destas associações entre mutações e haplótipos em diferentes grupos étnicos.

A distribuição das mutações causadoras de PKU no gene da PAH não é uniforme, sendo que 5,0% de todos os códons abrigam 13,0% das mutações (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998). Byck e colaboradores, usando o programa MUTPRED (o qual prediz o perfil de mutabilidade), demonstraram que a maioria dos códons da PAH contendo um dinucleotídeo CpG (citosina-fosfato-guanina) apresentava uma mutação em particular ou várias mutações diferentes associadas a um ou mais haplótipos. Todas as mutações analisadas estavam associadas com a deficiência de PAH. Descreveram também que mutação recorrente, baseada na hipermutabilidade do codón CpG 280, era o provável mecanismo de origem para a mutação E280K (Byck *et al.*, 1997).

Apesar das diferenças na distribuição dos haplótipos por RFLP entre cromossomos normais e mutantes em diferentes populações, correlações significativas entre alguns haplótipos por RFLP e o fenótipo da PKU foram encontradas em populações específicas. Estes estudos demonstraram que os pacientes homocigotos ou heterocigotos para os alelos mutantes dos haplótipos 2 ou 3 exibiam a forma grave da PKU; enquanto que os pacientes com alelos mutantes dos haplótipos 1 ou 4 exibiam uma ampla faixa de fenótipos, freqüentemente menos grave (Güttler *et al.*, 1987; Svensson *et al.*, 1991).

Os fenótipos discordantes observados na mesma família, onde a PKU clássica e outras HPA por deficiência de PAH foram diagnosticadas em mais de um filho, indicam que estas alterações metabólicas são manifestações fenotípicas resultantes da presença de várias combinações de diferentes alelos da PAH (Güttler *et al.*, 1993a; Svensson *et al.*, 1993).

g) Mutações no gene da PAH:

Antes da determinação da estrutura completa do gene da PAH, se pensava que a PKU era causada por uma deleção completa do gene da PAH. Entretanto, a análise de DNA genômico por digestão com enzimas de restrição e posterior hibridização com a sonda hPAH247 (cDNA da PAH do rato), comprovou que a PKU não é causada por deleção total do gene da PAH (Woo *et al.*, 1983).

Tabela 1.3: Algumas associações entre mutações e haplótipos em diferentes grupos étnicos.

População	Mutação	Haplótipos	BgIII	PvuII(a)	PvuII(b)	EcoRI	MspI	XmnI	VNTR (HindIII)	EcoRV	STR	Referências
Alemã	R261Q	1	-	+	-	-	+	-	8	-		l
Portuguesa		1	-	+	-	-	+	-	8	-		r
Suíça		1	-	+	-	-	+	-	8	-		l
Inglesa	R408W	1	-	+	-	-	+	-	8	-	2.3 : 240	q
Irlandesa (norte)		1	-	+	-	-	+	-	8	-		m
Alemanha		2	-	+	-	-	+	-	3	+		j
Dinamarca		2	-	+	-	-	+	-	3	+		j
Estônia		2	-	+	-	-	+	-	3	+		n
Polonesa		5	+	-	+	+	+	-	7	+		d
Portuguesa		34	+	-	-	+	+	-		-		e
Chinesa		41	-	+	-	+	+	-	3	+		g
Chinesa	44	+	-	-	+	-	+	3	+	c		
Canadense	E280K	1	-	+	-	-	+	-	8	-	1.8 : 238 2.3 : 246	o
Canadense		2	-	+	-	-	+	-	3	+		o
Francesa		4	-	+	-	+	-	+	3	+		a
Francesa		16	-	+	-	+	-	-	3	+		o
Francesa		38	+	-	+	-	+	-	12	-		b
Espanhola	V388M	1	-	+	-	-	+	-	7	-	1.7 : 242	i, p
Portuguesa		1	-	+	-	-	+	-	7	-		r
Chilena		4	-	+	-	+	-	+	3	+		i
Japonesa		4	-	+	-	+	-	+	3	+		i
Alemã	IVS12nt1g>a	3	-	+	-	+	-	+	8	-		l
Dinamarquesa		3	-	+	-	+	-	+	8	-		l
Sueca		3	-	+	-	+	-	+	8	-		l
Espanhola	IVS10nt-11g>a	6	+	-	+	+	+	-	7	-	1.7 : 246	p
Italiana		6	+	-	+	+	+	-	7	-		f
Portuguesa		6	+	-	+	+	+	-	7	-		r
Turca		6	+	-	+	+	+	-	7	-		f
Norueguesa	G272X	7	+	-	-	+	-	+		-		h
Espanhola	I65T	9	+	+	-	+	+	-	8	+	9.8 : 246	p
Irlandesa		9	+	+	-	+	+	-	8	+	9.8 : 246	m
Portuguesa		9	+	+	-	+	+	-	8	+		r

a) Lyonnet *et al.*, 1988; b) Abadie *et al.*, 1989; c) Tsai *et al.*, 1990; d) Zygulska *et al.*, 1991; e) Caillaud *et al.*, 1992; f) Goltsov *et al.*, 1992; g) Lin *et al.*, 1992; h) Apold *et al.*, 1993; i) Desviat *et al.*, 1995; j) Eisensmith *et al.*, 1995; l) Eisensmith e Woo, 1995; m) Zschocke *et al.*, 1995; n) Lilleväli *et al.*, 1996; o) Byck *et al.*, 1997; p) Pérez *et al.*, 1997; q) Tyfield *et al.*, 1997; r) Rivera *et al.*, 1998.

A grande heterogeneidade genética observada nos genótipos associados à HPA por deficiência de PAH pode ser explicada a partir de 3 evidências: (1) fenótipos CRIM (*cross-reacting immunologic material* - quantidade de proteína detectável ou material imunologicamente relacionado à determinada proteína) positivos e negativos podem ser detectados no fígado de pacientes com PKU; (2) quantidades adequadas de mRNA da PAH podem ser detectadas no fígado de alguns pacientes, mas não em outros; (3) existe um amplo espectro de fenótipos clínicos observados em pacientes com deficiência de PAH. Baseado nestes achados, vários autores propuseram que a variação fenotípica presente nas deficiências de PAH reflete uma heterogeneidade implícita a nível molecular (Scriver *et al.*, 1995a).

Diversos trabalhos abordam também uma possível participação desta heterogeneidade em heterozigotos para HPA por deficiência de PAH (Svensson *et al.*, 1994; Treacy *et al.*, 1997; Guldberg *et al.*, 1998a; Spada *et al.*, 1998).

Um banco de dados envolvendo vários pesquisadores foi criado para registrar variações alélicas no *locus* do gene da PAH. Os autores registraram cerca de 412 alterações e as relacionaram com centenas de diferentes associações (haplótipo, região geográfica e população), junto com outras informações adicionais (Hoang *et al.*, 1996; Nowacki *et al.*, 1997; Nowacki *et al.*, 1998). Este banco de dados é constantemente atualizado (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>).

A tabela 1.4 mostra a distribuição das alterações na seqüência gênica da PAH (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>) e a tabela 1.5 ilustra algumas das mutações mais freqüentes no gene da PAH em populações específicas.

Tabela 1.4: Distribuição das alterações na seqüência gênica da PAH

Tipo de alteração	Número absoluto	Freqüência
Mutações de ponto de sentido trocado	255	61,9%
Deleções	56	13,6%
Mutações de sítios de junção	47	11,4%
Mutações silenciosas	27	6,6%
Mutações de ponto sem sentido	22	5,3%
Inserções	5	1,2%
Total	412	100,0%

(Adaptado de <http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/> e Nowacki *et al.*, 1998).

Tabela 1.5: Frequência de mutações no gene da PAH em diferentes populações

Mutação	População	Frequência relativa (%)	Referência
R408W	Estoniana	84,0	Lillevälli <i>et al.</i> , 1996
	Bielorussa	75,0	Goltsov <i>et al.</i> , 1993b
	Lituana	69,2	Eisensmith <i>et al.</i> , 1995
	Polonesa	62,3	Eisensmith <i>et al.</i> , 1995
	Russa	61,0	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Ucraniana	59,8	Eisensmith <i>et al.</i> , 1995
	Checa	54,9	Kozák <i>et al.</i> , 1997
	Húngara	48,6	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Búlgara	44,1	Kalaydjieva <i>et al.</i> , 1993
	Irlandesa	42,5	Eisensmith <i>et al.</i> , 1995
IVS10nt-11g>a	Turca	39,0	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Egípcia	30,8	Effat <i>et al.</i> , 1999
	Judaica	24,3	Kleiman <i>et al.</i> , 1994
	Italiana (Sudeste)	23,2	Guzzetta <i>et al.</i> , 1997
	Brasileira (São Paulo)	17,4	Acosta <i>et al.</i> , 2000
	Búlgara	14,7	Kalaydjieva <i>et al.</i> , 1993
	Chilena	13,0	Pérez <i>et al.</i> , 1999
	Portuguesa	10,8	Rivera <i>et al.</i> , 1998
	Espanhola	9,8	Desviat <i>et al.</i> , 1999
I65T	Irlandesa (Norte)	20,0	Zschocke <i>et al.</i> , 1995
	Australiana (Vitória)	18,1	Ramus <i>et al.</i> , 1995
	Escocesa (Oeste)	15,0	Tyfield <i>et al.</i> , 1997
	Inglesa	9,6	Tyfield <i>et al.</i> , 1997
	Espanhola	6,7	Desviat <i>et al.</i> , 1999
	Portuguesa	5,4	Rivera <i>et al.</i> , 1998
R261Q	Suíça	32,0	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Italiana (Sudeste)	22,2	Guzzetta <i>et al.</i> , 1997
	Canadense (Quebec)	18,9	Carter <i>et al.</i> , 1998
	Holandesa	12,2	Eisensmith e Woo, 1995
	Brasileira (São Paulo)	12,2	Acosta <i>et al.</i> , 2000
	Egípcia	11,5	Effat <i>et al.</i> , 1999
	Portuguesa	10,4	Rivera <i>et al.</i> , 1998
IVS12nt1g>a	Dinamarquesa	37,3	Guldberg <i>et al.</i> , 1993a
	Inglesa	22,8	Tyfield <i>et al.</i> , 1997
	Holandesa	21,4	Eisensmith e Woo, 1995
	Norueguesa	19,0	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Canadense (Quebec)	17,1	Carter <i>et al.</i> , 1998
	Sueca	15,7	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Australiana (Vitória)	15,7	Ramus <i>et al.</i> , 1995
	Alemã	14,4	Horts <i>et al.</i> , 1993
R158Q	Holandesa	13,3	Eisensmith e Woo, 1995
	Belga	8,3	François <i>et al.</i> , 1994
	Húngara	7,1	Eisensmith <i>et al.</i> , 1992
	Alemã	5,9	Horst <i>et al.</i> , 1993
	Italiana	5,6	Dianzani <i>et al.</i> , 1995a
V388M	Chilena	13,0	Pérez <i>et al.</i> , 1999
	Brasileira (São Paulo)	9,1	Acosta <i>et al.</i> , 2000
	Portuguesa	8,6	Rivera <i>et al.</i> , 1998
	Espanhola	6,2	Desviat <i>et al.</i> , 1999

Entre as populações da Ásia, duas mutações merecem destaque: a mutação R243Q, com uma frequência de 24,0% no norte da China (Gu *et al.*, 1992) e a mutação R413P, com uma frequência de 30,5% na população japonesa (Okano *et al.*, 1998). Duas grandes deleções (uma entre os exons 9 e 13 e outra entre os exons 1 e 5) observadas em pacientes indianos podem indicar uma alta frequência de deleções na Índia (Guldberg *et al.*, 1997a).

Aproximadamente, 18,0% de todas as alterações conhecidas se localizam no exon 7 e cerca de 76,0% ocorrem nas regiões codificadoras entre os exon 5 e 12 (<http://blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb>; Nowacki *et al.*, 1998). Apesar deste número elevado de mutações no exon 7, levando em consideração o tamanho relativo do exon e a composição de sua seqüência, o mesmo não representa uma região propensa para a ocorrência de mutações no gene da PAH (Dworniczak *et al.*, 1992). Ao contrário, o grande número de mutações indica a natureza crítica desta região, a qual é indispensável para a função da enzima. Esta análise complementa os estudos usando anticorpos monoclonais para demonstrar que o domínio de ligação do cofator está localizado na região codificada pelo exon 7 (Jennings *et al.*, 1991).

A maioria das mutações no gene da PAH ocorrem em aminoácidos conservados entre diferentes proteínas e espécies. Este fato representa uma consequência do elevado número de mutações em regiões de alta homologia entre a PAH e outras hidroxilases. Por exemplo, enquanto somente 38,0% (172/452) dos resíduos de aminoácidos da PAH humana são conservados na TPH de coelhos e na TH, mais da metade das mutações de sentido trocado ocorre nestes resíduos. A frequência desproporcional de mutações nestes resíduos conservados reforça a idéia que eles são importantes para a função da enzima (Eisensmith e Woo, 1995).

A introdução de métodos para a detecção no gene da PAH baseados na técnica de PCR (DiLella *et al.*, 1988), tais como a análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples - SSCP (Orita *et al.*, 1989; Labrune *et al.*, 1991), clivagem química (Dianzani *et al.*, 1991) e análise por eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE (Guldberg *et al.*, 1993a), proporcionaram um grande progresso para a detecção de mutações no gene da PAH.

A introdução de novas técnicas e equipamentos tem contribuído para o seqüenciamento de toda região codificadora e grande parte das regiões intrônicas do gene da PAH. Os métodos empregados contribuíram para a identificação de 94,0 a 99,6% de todas as mutações no gene da PAH (Guldberg *et al.*, 1993a; Eiken *et al.*, 1996a). Por

outro lado, não foi possível determinar o genótipo de um pequeno número de pacientes com PKU. Estas mutações podem se encontrar nas regiões não codificantes do gene: sítios promotores, Cap ou poliadenilação, sítios de junção crípticos. Presume-se, então, que estas mutações sejam raras nas populações, devido à dificuldade de detectá-las (Eisensmith e Woo, 1995).

1.5 - CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO:

As HPA por deficiência de PAH são acompanhadas de uma ampla heterogeneidade fenotípica, variando desde as formas extremamente graves (PKU clássica), que apresentam retardo mental profundo quando na ausência da terapia dietética adequada, até às formas moderadas, leves e HPA não-PKU, sendo esta última geralmente benigna, permitindo um desenvolvimento intelectual normal sem necessidade de dieta. Esta heterogeneidade fenotípica constitui o reflexo da heterogeneidade molecular observada nos pacientes com deficiência de PAH.

A definição da metodologia e dos parâmetros aplicados para distinguir os diferentes fenótipos observados é essencial para o estabelecimento do diagnóstico diferencial entre as HPA por deficiência de PAH. Atualmente, duas propostas podem ser utilizadas para definir as diferentes formas de PKU: (1) baseada na tolerância à Phe em mg/dia, subdividida em PKU e HPA não-PKU (Scriver *et al.*, 1995a); (2) 4 classes baseadas na tolerância à Phe em mg/kg/dia: PKU grave ou clássica, PKU moderada, PKU leve e HPA leve (Güttler, 1980; Güttler e Guldberg, 1996). A tolerância à Phe pode ser definida como a ingestão diária máxima deste aminoácido que é permitida para manter os níveis sanguíneos de Phe entre 180,0 a 360,0 $\mu\text{mol/L}$. A obtenção do genótipo e a determinação da tolerância são os fatores que podem estabelecer um consenso na correlação do genótipo com o fenótipo e, assim, facilitar a classificação adequada das formas de PKU (Ponzzone *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1998).

Estudos de expressão demonstraram que cada mutação no gene da PAH tem um efeito quantitativo particular na atividade enzimática (Okano *et al.*, 1991). As mutações decorrentes de rearranjos gênicos alteram a seqüência de aminoácidos; mutações nas junções íntron-exons causam remoção ou inserção de segmentos de aminoácidos; as mutações sem sentido resultam no término prematuro da síntese da proteína. Estas alterações comprometem drasticamente a atividade de PAH e são também denominadas

de mutações nulas. Os pacientes que apresentam uma mutação nula em um dos cromossomos são denominados heterozigotos compostos funcionais. Caso a segunda mutação apresente alguma atividade residual, ela determinará o fenótipo bioquímico e, portanto, o metabólico. A presença de duas mutações nulas determina o fenótipo de PKU clássica (Güttler e Guldberg, 1996).

Por outro lado, geralmente é impossível prever os efeitos das mutações de sentido trocado sobre a atividade da PAH. Estas mutações alteram somente um aminoácido na proteína e podem representar polimorfismos inócuos ou mutações patogênicas (Güttler e Guldberg, 1996).

As atividades das proteínas PAH mutantes determinadas *in vitro* são maiores que suas atividades correspondentes *in vivo*. Na ausência de estudos comparativos entre os dois sistemas, a análise de expressão não pode ser usada para avaliar a atividade de PAH hepática em pacientes com PKU. Desta forma, os fenótipos de um grande número de pacientes são previstos a partir de estudos *in vitro* da proteína PAH mutante e, ocasionalmente, a atividade prevista de PAH não se correlaciona, ou se correlaciona com os fenótipos bioquímicos ou clínicos de pacientes tratados e não tratados (Güttler *et al.*, 1993b; Ramus *et al.*, 1993; Verelst *et al.*, 1993; Ramus *et al.*, 1999).

Apesar das limitações, correlações significantes foram demonstradas entre os estudos de expressão *in vitro* e os índices bioquímicos usados para definir o fenótipo da HPA por deficiência de PAH (Eisensmith *et al.*, 1996; De Lucca *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999; Güttler *et al.*, 1999). Correlações foram também observadas entre a análise de expressão *in vitro* e o quociente de inteligência (QI) em pacientes entre 5 e 9 anos de idade, tratados precocemente (Trefz *et al.*, 1993; Lichter-Konecki, *et al.*, 1994; Burgad *et al.*, 1996).

As mutações graves são associadas à PKU clássica, quando presentes no estado homozigoto ou em heterozigotos compostos portadores de outra mutação grave. Mutações leves dão origem a proteínas com considerável atividade enzimática residual. Os pacientes que apresentam uma mutação leve e uma mutação grave exibem usualmente a forma leve de PKU. Pacientes apresentando duas mutações leves podem exibir PKU leve ou HPA não-PKU (Svensson *et al.*, 1993). Deste modo, a heterogeneidade fenotípica da HPA por deficiência de PAH pode ser explicada principalmente pela grande variabilidade encontrada no *locus* da PAH (Eisensmith e Woo, 1995; Guldberg *et al.*, 1998b).

Vários estudos têm documentado a ocorrência de diferentes fenótipos de PKU em uma mesma família devido à presença de 3 mutações no gene da PAH. Dependendo da combinação, cada mutação é responsável por um efeito fenotípico distinto, resultando em diferentes graus de HPA. Esta condição é denominada de alelismo (Ledley *et al.*, 1986; Guldberg *et al.*, 1994; Tyfield *et al.*, 1995).

As habilidades preditivas da determinação do genótipo, sugerem que a análise do mesmo pode ser uma ferramenta valiosa para a determinação do fenótipo em recém-nascidos ou para a análise de haplótipos em famílias com um indivíduo afetado. Tais testes permitiriam o refinamento do diagnóstico precoce, otimização de terapia e determinação do prognóstico da doença a longo prazo (Eisenmith e Woo, 1995).

1.6 - FREQUÊNCIA DE HPA POR DEFICIÊNCIA DE PAH

A incidência das HPA por deficiência de PAH é variável, sendo alta na Turquia, cerca de 1 indivíduo afetado em 2600 nascidos vivos (Özalp *et al.*, 1986), e baixa no Japão, onde ocorre 1 caso em 120000 nascimentos (Aoki e Wada, 1988). A frequência da PKU em populações caucasóides é de aproximadamente 1:10000, com uma frequência de heterozigotos entre 1:50 e 1:70 (Scriver *et al.*, 1995a). A frequência da deficiência de PAH no Rio Grande do Sul foi previamente estimada em 1:14288 (Jardim *et al.*, 1992).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a incidência relativamente alta da PKU em humanos: efeito fundador/deriva genética, vantagem adaptativa de heterozigotos, compensação reprodutiva, taxa mutacional elevada e o envolvimento de múltiplos *loci* que conferem fenótipos similares da doença. A hipótese do envolvimento de múltiplos *loci* não é aceita, uma vez que mais de 95,0% de todos os casos de PKU são o resultado da deficiência de PAH causada por mutações somente no *locus* da PAH. Apesar de evidências relatando que alguns genótipos de PKU são o resultado de mutações recorrentes, a elevada taxa de mutações no *locus* da PAH pode também não ser o mecanismo responsável pela alta frequência da PKU, pois muitos pacientes de uma população específica apresentam um número limitado de alelos mutantes (Eisenmith e Woo, 1995).

A frequência e a distribuição das mutações no gene da PAH têm sido determinadas em várias populações da Europa, Américas, Austrália e Ásia. Porém, qualquer tentativa de estabelecer as frequências das mutações em caucasóides é

limitada, devido às variações na distribuição de haplótipos mutantes e na associação mutação-haplótipo em diferentes subgrupos étnicos. Contudo, algumas frequências encontradas em populações caucasóides podem ser estimadas por uma mutação específica (John *et al.*, 1989; Eisensmith *et al.*, 1992; Lilleväli *et al.*, 1996).

1.6.1 - Evidência do efeito fundador/deriva genética:

O papel do efeito fundador e da deriva genética vem sendo estudado por vários grupos, os quais analisam várias mutações no gene da PAH em populações específicas (Saugstad, 1975; Zschocke *et al.*, 1997).

A maioria (ou todas) das mutações no gene da PAH podem ter ocorrido após a divergência das raças. Eisensmith e colaboradores (1992) estudaram as associações de haplótipos, frequências relativas e a distribuição de 5 mutações prevalentes no gene da PAH em populações européias: IVS12nt1g>a, R408W, R261Q, R158Q e IVS10nt-11g>a. Todas elas estavam associadas com somente 1 dos mais de 70 haplótipos no gene da PAH. Estes achados sugerem que cada uma destas mutações surgiu a partir de um único evento fundador que ocorreu há centenas ou milhares de anos atrás. A partir das diferenças observadas nas frequências relativas e distribuição destes 5 alelos mutantes na Europa, 5 supostos efeitos fundadores podem ser demonstrados em subgrupos étnicos específicos (Eisensmith *et al.*, 1992):

- A mutação IVS12nt1g>a parece ter ocorrido em um alelo normal do haplótipo 3.8 (tabela 1.3) em uma população fundadora dinamarquesa;
- A mutação R408W provavelmente surgiu a partir do haplótipo 2.3 (tabela 1.3) na população tcheca, embora a ausência de haplótipos e dados de frequência das regiões mais a leste da Rússia e outras repúblicas da antiga União Soviética tenha impossibilitado a localização precisa de uma suposta população fundadora. A ausência desta mutação no haplótipo 2.3 em populações chinesas e japonesas, sugeriu que o evento fundador foi único em populações caucasóides. Além disso, a forte associação entre esta mutação e o haplótipo 2.3, sugere que o efeito fundador ocorreu há alguns milhares de anos.
- A mutação IVS10nt-11g>a tem sido cogitada como de origem turca. No entanto, estudos referentes à sua distribuição na população italiana demonstraram que o alelo mutante estaria presente inicialmente em regiões que foram colonizadas por

populações italianas há cerca de 2000 anos, e não em regiões colonizadas por turcos ou outros povos do Oriente Médio.

- A mutação R261Q ligada ao haplótipo 1.8 (tabela 1.3) é relativamente freqüente na Suíça e na Turquia.
- Não foi observado efeito fundador associado à mutação R158Q.

Vários estudos têm indicado que somente 4 (R111X, R261X, V388M e R408W) das cerca de 20 mutações responsáveis por mais que 70,0% dos alelos mutantes em orientais também estão presentes em populações caucasóides. As alterações R261X e R408W ocorrem em diferentes haplótipos, sugerindo que estas mutações resultaram de mutações recorrentes e que a maioria delas (ou todas) pode ter ocorrido após a divergência das raças (Eisensmith *et al.*, 1992).

A incidência de PKU na Finlândia é muito baixa, provavelmente menor que 1:100.000. Em um estudo realizado em 4 pacientes, a mutação R408W foi encontrada em 4 alelos e relacionada ao haplótipo 2, enquanto as mutações IVS7nt1g>a, R261Q e IVS2nt1g>a estavam presentes em 3 alelos. Estes achados sugeriram um pronunciado efeito fundador negativo como a causa da baixa incidência da PKU na Finlândia. A mutação R408W ocorre no noroeste europeu com uma alta freqüência na Irlanda e no leste europeu com uma elevada freqüência na Lituânia. Nos dois países, a mutação é associada com o haplótipos 1 e 2, respectivamente, levando a sugerir que a mutação R408W teve duas origens independentes na Europa: uma Celta e uma Eslava. Desta maneira, os alelos mutantes da R408W encontrados nos pacientes finlandeses são de origem eslava (Eisensmith *et al.*, 1992; Guldborg *et al.*, 1995).

A Islândia foi colonizada pelos Vikings oriundos da Noruega e das Ilhas Britânicas entre os séculos IX e X. Embora seja conhecido que os Vikings acasalavam com suas escravas celtas, a contribuição relativa destes povos para a população islandesa é incerta. Muitos estudos de genética de populações usando marcadores clássicos indicaram uma pequena contribuição genética dos irlandeses (Zschocke *et al.*, 1997). Por outro lado, no mínimo 7 mutações no gene da PAH tiveram sua origem fora da Islândia. A distribuição quase exclusivamente escandinava destas mutações e a completa ausência de mutações comuns de origem irlandesa, provaram a evidência histórica e lingüística de uma herança escandinava predominante na população da Islândia (Guldborg *et al.*, 1997b).

1.6.2 - Vantagem adaptativa de heterozigotos para PKU:

A presença de muitas mutações no gene da PAH em diferentes populações implica em dizer que o efeito fundador e a deriva genética, isoladamente, não podem ser os fatores responsáveis pela incidência elevada de PKU. Alguma forma de vantagem adaptativa de heterozigotos pode representar uma possibilidade para explicar esta alta incidência. A influência exercida por um *locus* intimamente ligado à PAH pode representar uma forma de vantagem. A proximidade do *locus* do γ -interferon em relação à região 12q24 fornece bases especulativas para esta hipótese, mas não há evidência para este efeito. Uma segunda forma de vantagem adaptativa pode advir de efeitos compensatórios causados por elevações não significativas dos níveis de Phe em heterozigotos (Gold *et al.*, 1974). Um terceiro mecanismo pode envolver compensação reprodutiva, mediada por altas taxas de reprodução entre heterozigotos ou uma elevada taxa de sobrevivência entre suas proles. Há algumas evidências a favor (Saugstad, 1977) e contra (Paul *et al.*, 1979b) a compensação reprodutiva.

Outra hipótese é baseada no fato que o aumento sérico dos níveis de Phe presentes em mulheres heterozigotas pode proteger a sua prole contra uma elevada taxa de natimortos causada pela ocratoxina A, uma micotoxina abortiva encontrada em grãos e lentilhas contaminados (Woolf, 1986). Infelizmente, esta explicação não é suficiente para apoiar esta hipótese por duas razões. Primeiro, pode ser que esta vantagem tenha ocorrido no passado, porém não mais ativa. Segundo, visto que a PKU é menos freqüente que outras doenças genéticas para as quais este mecanismo tem sido proposto, os efeitos desta vantagem adaptativa podem ser também desprezíveis. Nos dois casos a vantagem seletiva pode ter existido em regiões onde ocorreram condições climáticas, culturais e dietéticas significativamente diferentes, uma vez que a PKU está presente em uma freqüência relativamente alta não somente em populações européias, mas em algumas populações do Oriente Médio e da Ásia (Daiger *et al.*, 1989).

A análise das possíveis contribuições do efeito fundador, deriva genética e vantagem dos heterozigotos para a origem e distribuição das mutações no gene da PAH em populações humanas, ainda representa um enigma para a genética de populações de PKU.

1.7 - ESTUDOS DE ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE DA PAH

O avanço das técnicas de biologia molecular representou um grande passo para um melhor conhecimento das bases moleculares das HPA causadas por deficiência de PAH. No entanto, algumas questões relacionadas ao real efeito das mutações sobre a estrutura e função da PAH ainda são desconhecidas. Os estudos de correlação entre a estrutura gênica e a função protéica como, por exemplo, os experimentos de análise de expressão heteróloga de proteínas PAH mutantes, o desenvolvimento de modelos animais para a PKU e os recentes estudos de cristalografia e análise computadorizada da estrutura tridimensional da PAH podem fornecer importantes informações.

1.7.1 - Análise de expressão das mutações

Estudos de expressão revelaram 3 grupos de mutações que codificam uma PAH que difere no comportamento cinético e/ou na estabilidade *in vivo*: (i) mutações que afetam a estabilidade e cinética da PAH; (ii) mutações que codificam uma enzima estruturalmente estável com propriedades cinéticas alteradas; e (iii) mutações que codificam uma enzima com comportamento cinético normal e reduzida estabilidade *in vitro* e *in vivo* (Erlandsen e Stevens, 1999).

Como a expressão da PAH humana é limitada ao fígado, a caracterização bioquímica das proteínas PAH mutantes necessitaria de amostras de tecido hepático obtidas de indivíduos homocigotos. Contudo, estas amostras são difíceis de se obter devido a razões éticas e genéticas. A maioria dos pacientes com deficiência de PAH são heterocigotos compostos e podem produzir 2 ou mais espécies de proteínas, dependendo da estabilidade das subunidades mutantes *in vivo*. Para superar estas limitações, análises de expressão *in vitro* são necessárias para demonstrar que a alteração genética altera a função da proteína (Eisensmith e Woo, 1995).

A maioria das informações sobre a enzima PAH normal deriva de estudos com enzima purificada do fígado de rato, uma vez que oportunidades para estudar a enzima humana nativa são raras (Scriver *et al.*, 1995a). O cDNA da PAH humana (Kwok *et al.*, 1985; Konecki *et al.*, 1992, GenBank U49897) e o cDNA da Pah de fígado de rato (Dahl e Mercer, 1986) apresentam 92,0% de homologia entre as seqüências de aminoácidos, sendo o estudo da Pah do rato muito útil na análise da PAH humana. Mutagênese sítio-

específica e a expressão de Pah recombinante de ratos complementam, portanto, os estudos da PAH humana (Waters *et al.*, 1998a).

A expressão heteróloga transitória por transfecção de DNA em células renais de macaco verde africano (células COS) é o sistema mais utilizado para o estudo funcional da proteína PAH mutante. A PAH endógena está ausente ou encontrada em níveis muito baixos nestas células (Weinstein *et al.*, 1993). As células renais embrionárias humanas e as células de adenocarcinoma de cólon podem ser hospedeiros alternativos (Waters *et al.*, 1998a).

A mutação R408W é responsável por atividade não detectável de PAH *in vitro* e níveis baixos de oxidação da Phe *in vivo*. As mutações A104D e R261Q codificam proteínas PAH que apresentam atividades reduzidas *in vitro* (26,0% e 30,0%, respectivamente) e realizam uma considerável oxidação da Phe *in vivo* em homocigotos para PKU. A mutação E6nt-96A->g apresenta efeito direto no processamento do RNA *in vivo* (Ellingsen *et al.*, 1997). A mutação G46S reduz drasticamente a atividade de PAH e a proteína imunorreativa, afetando os níveis de mRNA, porém não reduz a capacidade catalítica da PAH. A proteína resultante é considerada instável, o que implica em síntese deficiente, instabilidade intrínseca ou degradação aumentada (Eiken *et al.*, 1996b). A mutação A104D afeta a estabilidade da proteína PAH, mas com menor gravidade que a mutação G46S (Waters *et al.*, 1997).

A análise de expressão de mutações no gene da PAH identificou poucas proteínas mutantes estáveis (D143G, R158Q, P244L, A322G, V388M, R408Q), as quais apresentam níveis normais de PAH imunorreativa e atividade diminuída. Isto significa que estas mutações podem afetar resíduos importantes para as funções catalíticas ou regulatórias. A expressão *in vitro* da mutação D143G em 3 sistemas diferentes (células renais humanas, *E coli* e sistemas transcricional-traducionais), resultou em atividade residual relativamente alta (52,0, 33,0 e 102,0%, respectivamente) quando comparado aos valores da proteína normal (Knappskog *et al.*, 1996). Analisada em baixas concentrações de Phe e do cofator BH₄, a atividade residual foi compatível com hidroxilação reduzida da Phe, sugerindo que este resíduo (Asp143) executa importante papel no direcionamento do substrato ao sítio ativo (Erlandsen e Stevens, 1999).

Waters e colaboradores (1999) testaram a hipótese de que algumas mutações de sentido trocado podem acelerar o *turnover* proteolítico da enzima PAH. Para tanto, foi analisado o efeito de 6 mutações (F39L, K42I, L48S, I65T, A104D e R157N) sobre as taxas de *turnover* e os fatores envolvidos na degradação proteolítica da PAH selvagem e

mutante. Todas as mutações examinadas causaram acelerada degradação proteolítica da enzima PAH (Waters *et al.*, 1999).

Os sistemas de expressão não podem fornecer informações definitivas sobre os efeitos das mutações associadas à PKU e seu significado *in vivo*. A análise de expressão ainda não é capaz de identificar precisamente muitos resíduos de aminoácidos, que desempenham funções críticas na catálise ou regulação da atividade da PAH (Waters *et al.*, 1998a).

Análise de expressão *in vitro* foi realizada em cerca de 40 mutações de sentido trocado (DiLella *et al.*, 1987; Lichter-Konecki *et al.*, 1988; Dworniczak *et al.*, 1991; Eisensmith *et al.*, 1991; Okano *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Eisensmith e Woo, 1992; John *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 1992; Kleiman *et al.*, 1993; Weinstein *et al.*, 1993; Desviat *et al.*, 1995; Dianzani *et al.*, 1995b; Knappskog *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1995; Eiken *et al.*, 1996b; Waters *et al.*, 1997; Romano *et al.* 1998; Waters *et al.*, 1998a,b; Waters *et al.*, 1999), 2 mutações de sítios de junção íntron-exon (Marvit *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1991; Ellingsen *et al.*, 1997), 2 mutações sem sentido (Knappskog *et al.*, 1993; Knappskog *et al.*, 1996) e 2 deleções causando a perda de um único aminoácido (Caillaud *et al.*, 1991; Svensson *et al.*, 1993). Os resultados destes estudos indicaram que cerca de 30,0% destas mutações resultam na expressão de proteínas mutantes com significativa atividade residual, enquanto a maioria das mutações resultam na expressão de proteínas mutantes com pouca ou nenhuma atividade residual. A tabela 1.6 mostra a atividade residual para as mutações de sentido trocado associadas à HPA por deficiência de PAH. As mutações de sítios de junção, mutações sem sentido e deleções são responsáveis por codificar uma proteína sem atividade (Guldberg *et al.*, 1998b).

Tabela 1.6: Atividade Residual Prevista da PAH para as mutações de interesse para este estudo.

Mutações	Sistema de vetores: (análise de expressão <i>in vitro</i>)	Atividade de PAH ¹	Proteína imunoreativa de PAH ²	mRNA de PAH ³
I65T	p91023 (B)/COS	26	25	~100
R158Q	p91023 (B)/COS	10	~100	~100
R252W	pCDNA1/COS	0,5	~100	nr
R261Q	pCDNA1/COS	30	30	nr
P281L	pCDNA1/COS	Nd	Nd	~100
V388M	pRc/CMV/COS	43	~100	~100
R408W	p91023 (B)/COS	Nd	<1	~100
R408Q	pRc/CMV/COS	55	91	93
IVS12nt1g>a	p91023 (B)/COS	Nd	Nd	~100

^{1,2,3}: Valores expressos como percentagem da PAH normal; COS: linhagem de células de rim de macaco; nr: não realizado; nd: não detectável (Adaptado de Waters *et al.*, 1998a)

1.7.2 - Modelos animais para a PKU

A PKU alcançou um nível excepcional de caracterização através dos estudos bioquímicos, clínicos e genético-moleculares. No entanto, aspectos importantes sobre a fisiopatologia desta desordem merecem ser melhor abordados. Vários fatores são responsáveis por esta dificuldade, como: (1) a limitação do uso de seres humanos em experimentos controlados; (2) baixo número de participantes devido à raridade da doença; (3) população heterogênea em relação a constituição genética e fatores ambientais (dieta). Para superar estas limitações, modelos animais geneticamente modificados para apresentar PKU começaram a ser desenvolvidos em laboratório. Duas razões levaram a escolha do camundongo para estes estudos: a possibilidade de uma manipulação genética extensiva e alto grau de similaridade fisiológica em relação aos humanos (McDonald, 1994).

A escolha da PKU, como o primeiro fenótipo bioquímico selecionado para o estudo em modelos animais, foi devido à disponibilidade de testes de triagem relativamente simples com baixa taxa de falso positivo; e à grande quantidade de informação sobre a doença, levando à descoberta de reagentes moleculares e ensaios enzimáticos, através dos quais, os modelos animais foram caracterizados e produzidos (McDonald, 1994).

O gene da Pah do camundongo está localizado no cromossomo 10 (Ledbetter *et al.*, 1987). O aspecto mais importante para a genética do camundongo foi a descoberta do N-etil-N-nitrosouréia (ENU) como um agente mutagênico extremamente potente para a linhagem germinal destes animais. A técnica de mutagênese induzida por ENU, análise de pedigree e o teste de Guthrie para avaliar os níveis séricos de Phe produziram a primeira linhagem de camundongos com HPA herdável, denominada de HPA-1. No entanto, o fenótipo foi associado à deficiência de GTPCH I, sendo a mutação encontrada no cromossomo 14 do rato (McDonald e Bode, 1988).

McDonald e colaboradores (1990), usando a técnica de mutagênese induzida por ENU, identificaram uma nova linhagem de camundongos mutantes (HPA-5) exibindo HPA hereditária, bastante semelhante à forma leve de PKU encontrada em humanos. A mutação causadora desta condição foi mapeada no gene da Pah no cromossomo 10 (McDonald *et al.*, 1990). Através do método de não-complementação genética, foram identificadas duas novas linhagens de mutantes: HPA-5.1 e HPA-5.2 (Shedlovsky *et al.*, 1993).

As mutações encontradas nas linhagens HPA-5, HPA-5.1 e HPA-5.2 foram redefinidas como PAH^{ENU-1}, PAH^{ENU-2} e PAH^{ENU-3}, respectivamente. A mutação PAH^{ENU-1} é caracterizada por uma substituição do aminoácido valina por alanina no exon 3 da proteína, uma região onde mutações graves são raras em humanos. A mutação PAH^{ENU-2} é caracterizada por uma substituição de fenilalanina por serina no exon 7 da proteína, uma região onde mutações graves são comuns em humanos. As mutações PAH^{ENU-2} e PAH^{ENU-3} apresentam fenótipos que se enquadram na descrição de PKU clássica (McDonald, 1994; McDonald e Charlton, 1997).

A mutagênese sítio-específica vem sendo usada como uma ferramenta para analisar as relações entre a estrutura e a função da Pah de ratos. Os estudos de análise de expressão revelaram o modelo de ação de várias mutações no gene da Pah, identificando mecanismos que podem afetar a fosforilação da proteína (Kowlessur *et al.*, 1995), assim como as regiões de ligação do átomo de ferro e atividade catalítica desta enzima (Gibbs *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1994; Waters *et al.*, 1998a).

A boa correlação genótipo-fenótipo observada em murinos representa uma abordagem relevante para o conhecimento da relação entre a estrutura e a função da proteína e entre a ingestão de Phe da dieta e a patologia da doença (McDonald, 1994).

1.7.3 - Estudos de Cristalização e análise da estrutura tridimensional da PAH

O estudo da estrutura tridimensional da PAH poderá desempenhar um papel definitivo na identificação de resíduos de aminoácidos importantes para a enzima e no entendimento dos efeitos das mutações na função, estrutura e interações da PAH. Achados preliminares de cristalização de PAH purificada a partir de fígado de rato foram relatados há alguns anos (Celikel *et al.*, 1991). Contudo, muitos estudos sobre a estrutura da PAH humana e a Pah de ratos são limitados. As possíveis razões para esta limitação podem residir na heterogeneidade molecular, baseada em um equilíbrio entre as formas tetraméricas e monoméricas da PAH.

Alguns estudos iniciais de cristalização da PAH humana foram descritos. Uma forma truncada da enzima, correspondente ao centro catalítico e constituída exclusivamente de dímeros, foi produzida recentemente (Erlandsen *et al.*, 1997). Uma abordagem alternativa para a determinação da estrutura tridimensional da PAH se baseia na construção virtual de modelos protéicos tridimensionais através de dedução

computadorizada, usando regiões de homologia para as proteínas que apresentam a estrutura bem definida (Waters *et al.*, 1998a).

A enzima cristalizada apresenta-se como um tetrâmero, com cada monômero consistindo de um domínio catalítico e um de tetramerização. O domínio de tetramerização é caracterizado pela presença de uma ramificação permutando os domínios que interage com os outros monômeros, formando uma estrutura helicoidal antiparalela. A estrutura é o primeiro relato de uma PAH tetramérica e revela uma arquitetura completa semelhante à da TH funcional. Ao contrário da estrutura tetramérica da TH, a PAH apresenta uma assimetria bastante pronunciada no interior do monômero, onde os domínios catalíticos e de tetramerização podem adotar duas diferentes orientações. A análise de mutações causadoras de PKU demonstrou que algumas das mutações mais freqüentes estão localizadas na interface dos domínios catalíticos e de tetramerização. A estrutura cristalizada da PAH pode fornecer um importante modelo para a análise das bases moleculares da deficiência de PAH (Fusetti *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 2000).

1.8 - TRATAMENTO

A restrição dietética da Phe é o principal tratamento proposto para a PKU. É importante que a dieta seja introduzida precocemente (no primeiro ou, no máximo, no segundo mês de idade) e seguida por toda a vida (nos casos que necessitam da continuidade do tratamento). A base do tratamento é uma alimentação preparada com uma mistura de L-aminoácidos ou hidrolisados protéicos livres de Phe, com fornecimento de calorias, minerais e vitaminas, para evitar as deficiências nutricionais. Entretanto, uma quantidade mínima de Phe é essencial para o desenvolvimento e crescimento normais das crianças. Portanto a dieta prevê a ingestão de 250,0 a 500,0 mg de Phe por dia, dependendo da forma de PKU. Assim, mantém-se uma concentração plasmática, que não é prejudicial para o paciente, em torno de 120,0 a 360,0 $\mu\text{mol/L}$, nos primeiros anos de vida, podendo elevar-se até 480,0 $\mu\text{mol/L}$, após a idade de quatro anos. Após os 12 anos de idade a dieta pode ser menos rígida, mas os níveis plasmáticos de Phe devem se manter inferiores a 900,0 $\mu\text{mol/L}$.

As mulheres com PKU merecem uma especial atenção durante a gravidez, quando devem fazer uma dieta rigorosa e controlar as concentrações de Phe (Scriver *et al.*, 1995a).

A terapia dietética, apesar de evitar o retardo mental, não representa um tratamento definitivo para os fenilcetonúricos. Ainda não se sabe o período mais apropriado para o término da dieta. Alguns estudos verificaram reduções significativas no QI de crianças afetadas que interromperam o tratamento na primeira década de vida. Outros estudos sugerem que o término do tratamento, mesmo após os 10 anos de idade, pode ser responsável por pequenas alterações mentais e comportamentais (Eisensmith e Woo, 1995; Scriver *et al.*, 1995a).

Os problemas associados à terapia dietética estimularam a realização de outros estudos direcionados ao tratamento da PKU, como o transplante de fígado ortotópico realizado em uma criança com PKU de 10 anos, que apresentava concomitantemente doença hepática não relacionada em estágio final. O transplante corrigiu a alteração molecular, mas não pode ser considerado um bom substituto para a dieta por ser um procedimento invasivo e perigoso (Vajro *et al.*, 1993).

O uso da terapia gênica somática tem sido considerado um tratamento mais adequado (isolado ou associado) para pacientes com PKU. Esta tecnologia se baseia na introdução de um gene recombinante normal no fígado ou em outros tecidos de um indivíduo afetado, com o objetivo de substituir ou aumentar a função do gene deficiente. Esta abordagem necessita de três requisitos: (1) um clone do cDNA de PAH que tenha a propriedade de produzir a proteína PAH funcional; (2) um vetor que possa eficientemente transferir o cDNA para dentro dos hepatócitos ou outras células-alvo somáticas onde a proteína PAH funcione adequadamente; (3) um modelo animal para ser usado na determinação das eficácias de diferentes métodos de transferência gênica (Eisensmith e Woo, 1996).

Eisensmith e Woo (1996) revisaram os estudos de terapia gênica para PKU e verificaram a eficiência destas condições em camundongos mutantes PAH^{enu}. No entanto, os vetores usados não se mostraram suficientemente eficientes para a transferência gênica. Os vetores retrovirais se mostraram eficientes *in vitro*, mas, da mesma maneira que os complexos DNA/proteína, apresentaram baixa transdução *in vivo*. As infusões de recombinantes adenovirais contendo cDNA de PAH em camundongos PAH^{enu2} reduziu os níveis de Phe para concentrações normais, mas o efeito foi transitório e, devido a uma

resposta imune a estes vetores, não foi reproduzível (Eisensmith e Woo, 1996; Levy, 1999).

Os estudos sobre as propriedades da enzima bacteriana fenilalanina amônia liase (PAL) representam a mais recente tentativa para superar as limitações da terapia dietética em pacientes fenilcetonúricos. A PAL, uma enzima que age como uma substituta de PAH humana e não necessita de cofator, é responsável pela degradação da Phe em amônia e ácido trans-ciânico. A amônia não se acumula em quantidade suficiente para sugerir um quadro de hiperamoninemia e o ácido trans-ciânico é um metabólito inofensivo que é degradado em ácido benzóico, sendo este último convertido em ácido hipúrico e rapidamente excretado. Sarkissian e colaboradores (1999) relataram três aspectos que ressaltam a importância da PAL como um agente coadjuvante para o tratamento da PKU (Sarkissian *et al.* 1999):

- Criação de um modelo recombinante eficiente para produzir grandes quantidades de PAL;
- Efeito da PAL em camundongos mutantes PAH^{enu2} com HPA (criados por mutagênese induzida por N-etil-N-nitrosouréia);
- A PAL reduz drasticamente os níveis de Phe (30 a 50%) nestes camundongos, obedecendo os princípios farmacológicos (com um claro efeito de resposta à dose administrada) e fisiológicos (a PAL protegida da ação de proteases é significativamente efetiva para evitar HPA).

A terapia com PAL pode significar um aumento substancial da tolerância à dieta protéica, podendo proporcionar um novo futuro para o tratamento da PKU (Sarkissian *et al.*, 1999).

1.9 - JUSTIFICATIVA

O grande número de diferentes mutações relacionadas com a deficiência de PAH sugere uma doença heterogênea do ponto de vista molecular. A ampla variabilidade fenotípica observada nos pacientes está de acordo com esta heterogeneidade.

Aproveitando a experiência de vários anos com a PKU, tanto na assistência a pacientes quanto na pesquisa, a proposta de um protocolo de investigação para identificar as mutações presentes em pacientes com HPA por deficiência de PAH no sul do Brasil nos parece muito apropriada. A correlação destes achados com os dados clínicos e

bioquímicos dos pacientes estudados também poderia contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Os dados obtidos poderiam ajudar no manejo dos pacientes, permitindo a previsão, a partir do genótipo identificado, do comportamento fenotípico e das estratégias terapêuticas mais apropriadas. Além disso, a caracterização molecular das mutações no gene da PAH pode ser útil para a detecção de portadores e para o diagnóstico pré-natal.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Identificar as mutações comuns do gene da PAH associadas à PKU em pacientes do Sul do Brasil e estabelecer a incidência das mesmas na amostra estudada;
2. Padronizar protocolos laboratoriais para a identificação de heterozigotos através de técnicas moleculares;
3. Identificar e caracterizar mutações raras;
4. Avaliar o efeito da presença em heterozigose de um alelo mutante no metabolismo da Phe e Tyr, após a sobrecarga de aspartame;
5. Correlacionar as alterações moleculares aos dados bioquímicos medidos e à evolução clínica do pacientes (correlação genótipo-fenótipo).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

3.1.1 - PACIENTES COM HPA POR DEFICIÊNCIA DE PAH

A deficiência de PAH representa mais de 30,0% das aminoacidopatias detectadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), na qual já foram diagnosticados cerca de 80 indivíduos com esta doença metabólica. Aproximadamente 50 pacientes são acompanhados regularmente no ambulatório especializado mantido pelo serviço.

As famílias dos pacientes em tratamento foram convidadas a participar deste estudo através de contato pessoal, por carta (anexo 1) e/ou contato telefônico. Estas famílias foram informadas de forma clara e detalhada sobre os objetivos do estudo através de uma entrevista, onde foi preenchida a ficha com os dados do paciente (anexo 2). A colheita de sangue das famílias que concordaram em participar voluntariamente do referido estudo foi realizada após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 3).

Das 50 famílias contatadas, 30 participaram efetivamente do estudo. Em relação as 20 famílias restantes, 3 desistiram de participar e 4 não compareceram para a colheita de sangue, apesar de concordarem inicialmente em participar do estudo. Não foi possível estabelecer contato com as demais 13 famílias, devido à frequência irregular ao atendimento e à falta de horário disponível destas famílias para a entrevista, já que muitas residem no interior do Rio Grande do Sul ou no estado de Santa Catarina.

O critério fundamental para a inclusão dos casos na amostra foi o diagnóstico bioquímico confirmado de HPA, através da dosagem plasmática de Phe, com exclusão de alterações no metabolismo de BH_4 , detectadas através de testes apropriados.

A amostra estudada foi composta de 30 pacientes não relacionados entre si, sendo 33,0% do sexo feminino e 67,0% do sexo masculino.

A maioria dos pacientes (24 dos 30) tinha entre 1 e 10 anos (80,0%) na ocasião da colheita de sangue e apenas 6 pacientes tinham entre 13 e 18 anos (20,0%).

A tabela 3.1 mostra algumas características da amostra estudada, incluindo: origem étnica, período do diagnóstico, consangüinidade, história de outros casos na família e local de nascimento dos pacientes.

A origem étnica variou bastante entre os pacientes, sendo a denominação "brasileiro" o termo mais referido para definir o grupo étnico. Os pacientes caucasóides foram predominantes, representando 95,0%, enquanto que os pacientes negróides apresentaram uma freqüência de apenas 5,0%. No grupo de pacientes caucasóides, as ascendências portuguesa, alemã, italiana, espanhola e polonesa foram as mais mencionadas. Quanto ao período de diagnóstico, 12 pacientes foram diagnosticados tardiamente e os outros 18 precocemente (até 60 dias de vida). A taxa de casamentos consangüíneos neste estudo foi 23,3%. A presença de mais de um indivíduo afetado foi observada em 3 famílias diferentes. A maioria dos pacientes são provenientes do Rio Grande do Sul (73,3%) e os restantes (26,7%) do estado de Santa Catarina.

Os dados clínicos (tratamento, avaliação nutricional e evolução clínica) e bioquímicos (dosagem de Phe e Tyr e outras análises bioquímicas julgadas necessárias) foram obtidos a partir de um levantamento realizado nas fichas dos pacientes com deficiência de PAH que foram diagnosticados no SGM/HCPA.

3.1.2 - HETEROZIGOTOS OBRIGATÓRIOS PARA HPA POR DEFICIÊNCIA DE PAH

Uma sub-amostra constituída de 12 heterozigotos obrigatórios (7 do sexo masculino e 5 do sexo feminino), todos pais de pacientes com deficiência de PAH, foi analisada quanto aos níveis de Phe e Tyr antes e após uma sobrecarga de aspartame. Para a obtenção de valores de referência, uma amostra de 6 indivíduos sadios foi similarmente avaliada (controles). Os indivíduos heterozigotos e controles foram convidados a participar deste estudo através de contato pessoal, por carta (anexo 4) e/ou contato telefônico. Todos foram informados sobre o objetivo do estudo, concordaram em participar voluntariamente do mesmo e assinaram termo de consentimento (anexo 3).

3.1.3 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo procurou levar em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça. Para tanto, a avaliação ética do projeto do presente estudo se baseou em quatro pontos fundamentais: na qualificação da equipe de pesquisadores e do próprio projeto; na avaliação da relação risco-benefício; no consentimento livre e esclarecido e na avaliação prévia por um Comitê de Ética (HCPA).

Tabela 3.1: Características da amostra estudada

Pacientes	Origem étnica Avô/avó		Diagnóstico	Pais consangüíneos	Outros casos na família	Nascimento
	Paterna	Materna				
1	Brasileiro Brasileiro	Português Português	Tardio	Sim	-	SC
2	Português Brasileiro	Brasileiro Brasileiro	Tardio	-	-	RS
3	Brasileiro Brasileiro	Brasileiro Brasileiro	Precoce	-	-	SC
4	Português Português	Português Polonês	Tardio	-	-	RS
5	Austríaco Espanhol	Português Italiano	Precoce	Sim	-	SC
6	Italiano Italiano	Alemão Alemão	Tardio	-	-	SC
7	Português Português	Alemão Alemão	Precoce	Sim	-	SC
8	Português Português	Português Português	Tardio	-	Sim	SC
9	Italiano Italiano	Italiano Polonês	Precoce	-	-	RS
10	Português Português	Português Espanhol	Precoce	Sim	-	RS
11	Português Alemão	Italiano Italiano	Precoce	-	-	RS
12	Alemão Brasileiro	Português Brasileiro	Precoce	-	-	RS
13	Alemão Alemão	Alemão Alemão	Precoce	-	-	SC
14	Alemão Inglês	Brasileiro Brasileiro	Tardio	-	-	RS
15	Polonês Alemão	Alemão Alemão	Precoce	Sim	-	RS
16	Espanhol Espanhol	Austríaco Italiano	Tardio	-	-	RS
17	Italiano Italiano	Sírio Brasileiro	Precoce	-	-	RS
18	Alemão Alemão	Brasileiro Espanhol	Tardio	-	-	RS
19	Português Português	Português Português	Precoce	-	-	SC
20	Brasileiro Brasileiro	Brasileiro Brasileiro	Precoce	-	-	RS
21	Africano Africano	Alemão Alemão	Precoce	-	Sim	RS
22	Brasileiro Alemão	Alemão Alemão	Precoce	-	-	RS
23	Polonês Polonês	Alemão Alemão	Tardio	-	Sim	RS
24	Brasileiro Brasileiro	Brasileiro Brasileiro	Precoce	-	-	RS
25	Africano Africano	Africano Africano	Tardio	Sim	-	RS
26	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Precoce	Sim	-	RS
27	Brasileiro Brasileiro	Brasileiro Brasileiro	Tardio	-	-	RS
28	Português Alemão	Italiano Italiano	Precoce	-	-	RS
29	Português Português	Espanhol Espanhol	Tardio	-	-	RS
30	Português Português	Alemão Alemão	Precoce	-	-	RS

Considerando o caráter observacional desta pesquisa, os pacientes e familiares não foram expostos a nenhum risco maior, sendo o material biológico (sangue periférico) obtido por punção venosa, um procedimento pouco invasivo e realizado rotineiramente nestes pacientes para a avaliação dos níveis plasmáticos de Phe (parâmetro indicativo da eficácia do tratamento).

Apesar deste estudo não garantir o benefício direto do paciente, não sendo considerado prioridade o alcance de uma cura imediata e a mudança de curso da doença, alguns benefícios indiretos podem ser citados como: definir o genótipo do paciente (visando a fornecer informações à família quanto à possibilidade de prevenção de novos casos, através de diagnóstico molecular específico); estabelecer uma relação genótipo-fenótipo para a deficiência de PAH (informando sobre o prognóstico da doença para cada paciente); determinação das frequências das mutações no gene da PAH (possibilitando uma melhor compreensão das regiões mais importantes para o funcionamento normal da proteína) e caracterização de mutações novas no gene da PAH.

3.1.4 - COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

a) Pacientes e heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH: uma amostra de sangue total (5 a 10mL) foi obtida por punção venosa e colhida em frascos de vidro de 5mL (tipo *vacutainer*), contendo 54 μ L de EDTA. A amostra foi adequadamente identificada (nome do paciente e data de colheita) e armazenada a -20°C até o momento da extração de DNA, a qual foi realizada até um período máximo de uma semana após a colheita.

b) Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH: Os indivíduos estavam de jejum de pelo menos 12 horas antes da administração da sobrecarga oral de aspartame (100mg/kg de aspartame dissolvido em 300ml de suco de laranja). Amostras de 5mL de sangue foram colhidas com heparina antes e 30 minutos após a administração de aspartame e devidamente identificadas. O plasma foi separado até duas horas após a colheita e congelado a -20°C para posterior quantificação dos níveis plasmáticos de Phe e Tyr.

3.1.5 - REAGENTES QUÍMICOS

A tabela 3.2 mostra uma relação de reagentes químicos que foram utilizados na preparação de soluções utilizadas neste estudo, bem como a origem dos mesmos.

Tabela 3.2: Relação de reagentes químicos utilizados neste estudo

SUBSTÂNCIAS	PROCEDÊNCIA
Acetato de sódio	Sigma
Ácido bórico	Synth
Ácido acético glacial	Sigma / Pharmacia
Ácido clorídrico	Merck
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	Sigma
Ácido nítrico	Synth
Ácido succínico	Merck
Ácido tricloroacético	Pharmacia
Agarose	Sigma
Albumina de soro bovino	Sigma
Azul de bromofenol	Sigma
Brometo de etídio	Sigma
Carbonato de sódio anidro	Synth
Cloreto de potássio	Gibco-BRL
Cloreto de sódio	Gibco-BRL
Dimetil sulfoxido (DMSO)	Sigma
Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Gibco-BRL
Espermidina	Sigma
Etanol absoluto	Merck
L-fenilalanina	Merck
Ficol	Sigma
Formaldeído 37%	Merck / Pharmacia
Formamida	Sigma
Glicerol	Sigma / Pharmacia
Glutaraldeído	Pharmacia
Hidrocloreto de guanidina	Gibco-BRL
Hidróxido de sódio	Pharmacia
L-leucil-L-alanina	Sigma
MDE™ Gel Solution	FMC Bioproducts
Ninhidrina	Merck
Nitrato de prata	Sigma
Nitrito de sódio	Merck
α -nitroso- β -naftol	Sigma
Persulfato de amônio	Merck
Solução acrilamida:bisacrilamida 29:1 (40%)	Sigma
Sulfato de cobre	Vetec
N'N'N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED)	Sigma
Tartarato de sódio e potásio	Reagen
Tiosulfato de sódio	Pharmacia
Tirosina	Merck
Triton X-100	Sigma
Trizma-base	Sigma
Trizma-HCl	Sigma
Uréia	Sigma
Xileno cianol	Sigma

3.1.6 - NUCLEOTÍDEOS (dNTPs e ddNTPs)

Os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) utilizados para a amplificação dos fragmentos da seqüência gênica e para o seqüenciamento (manual e automático) foram adquiridos da Gibco-BRL ou Sigma na concentração de 100mM cada. A solução aquosa de [α^{35} S]dATP e os ddNTPs utilizados no seqüenciamento manual foram adquiridos da Amersham e Pharmacia, respectivamente.

2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato	(dATP)
2'-desoxicitidina 5'-trifosfato	(dCTP)
2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato	(dGTP)
2'-desoxitimidina 5'-trifosfato	(dTTP)
2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato marcada	([α^{35} S]dATP)
2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato	(ddATP)
2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato	(ddCTP)
2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato	(ddGTP)
2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato	(ddTTP)

Para o seqüenciamento automático os ddNTPs marcados com o composto fluoresceína foram adquiridos da Du Pont/NEN.

Fluoresceína-12-2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato	(F-ddATP)
Fluoresceína-12-2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato	(F-ddCTP)
Fluoresceína-12-2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato	(F-ddGTP)
Fluoresceína-12-2',3'-didesoxiuracila 5'-trifosfato	(F-ddUTP)

3.1.7 - MARCADORES DE PESO MOLECULAR

	Procedência
Marcador de DNA de 50pb (1 μ g/ μ L)	Gibco-BRL
Marcador de DNA de 100pb (1 μ g/ μ L)	Gibco-BRL
Marcador de DNA de 123pb (1 μ g/ μ L)	Gibco-BRL

O marcador de peso molecular de 50pb apresenta fragmentos na faixa de 50 a 800pb em múltiplos de 50pb e um fragmento adicional de 3002pb; o marcador de 100pb consiste de fragmentos na faixa de 100 a 1500pb em múltiplos de 100pb e uma banda

adicional de 2072pb e o marcador de 123pb apresenta fragmentos na faixa de 123 a 4182pb em múltiplos de 123pb.

3.1.8 - ENZIMAS

	Procedência
Proteinase K	Gibco-BRL
<i>Taq</i> DNA polimerase (1U/ μ L ou 5U/ μ L)	Promega, Cenbiot [®] , Biotools ou Gibco-BRL
Sequenase ^R versão 2.0 (13U/ μ L)	U.S. Biochemical Co.
Sequenase ^R versão 2.0 (8U/ μ L)	Amersham
Enzima de restrição <i>Ava</i> I	New England Bio Labs _{inc}
Enzima de restrição <i>Bsa</i> AI	New England Bio Labs _{inc}
Enzima de restrição <i>Dde</i> I	Gibco-BRL
Enzima de restrição <i>Hin</i> fi	New England Bio Labs _{inc}
Enzima de restrição <i>Rsa</i> I	Gibco-BRL
Enzima de restrição <i>Sty</i> I	Gibco-BRL
Enzima de restrição <i>Taq</i> I	Gibco-BRL
Enzima de restrição <i>Xmn</i> I	New England Bio Labs _{inc}

3.1.9 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (*PRIMERS*)

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados a partir da seqüência do cDNA do gene da PAH (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/sequence/>; *GenBank* U49897, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A tabela 3.3 demonstra a seqüência destes oligonucleotídeos iniciadores.

3.1.10 - EQUIPAMENTOS

A tabela 3.4 apresenta uma relação dos principais equipamentos utilizados no presente estudo.

Tabela 3.3: Seqüências dos *primers* utilizados neste estudo

Exon	Nome do <i>primer</i>	Seqüência do <i>primer</i> (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)
1	PKU 1A PKU 1B	GTTAAAACCTTCAGCCCCAC GGATCTCTTTCTCTGGAGGC	210
2	PKU 2A PKU 2B	GTCCATGGAGGTTTAACAGG GAACATGGAAGTTTGCTACG	237
3	PKU 3A PKU 3B	TTAGTTCCTGTGACTGTCTC CATGTGAGTTACTTATGTTGC	271
3'	PKU 3A PKU 3C*	TTAGTTCCTGTGACTGTCTC AACGAGAAGGTCTAGATT <u>CG</u>	92
4	PKU 4A PKU 4B	GTA CT CAGGACGTTGCCTTC CTCATCTACGGCCATGGAC	145
5	PKU 5A PKU 5B	GCACTGTCATGGCTTTAGAG CATGCTGGTATTTTCCATCC	266
6	PKU 6A PKU 6B	CTGCCTTGAGCACCTATTTTG CCAAC TTT CTCAGGGCATTG	270
7	PKU 7A PKU 7B	GAGTGGTGATGAGCTTTGAG ACCAGCCAGCAAATGAACC	274
8	PKU 8A PKU 8B	GAGTCTGGCTTGGCTTAAAC GAGAAATTCAGGTCACAGAC	183
9	PKU 9A PKU 9B	GCCAAGTACTAGGTTGGTTC GGCCATAGCCTATAGCACTC	179
10	PKU 10A PKU 10B	CCATCATAGAGTGTGCTCTC CAGGTTGCATATCAAACGG	250
11	PKU 11A PKU 11B	TGAGAGAAGGGGCACAAATG GTAGACATTGAGTCCACTCT	324
12	PKU 12A PKU 12B	CCACTGAGA ACT CTCTTAAG CTTCGATTACTGAGAAACCG	239
12'	PKU 12A PKU 12C*	CCACTGAGA ACT CTCTTAAG CGTAAGGTGTA AAT AC <u>GTA</u>	211
13	PKU 13A PKU 13B	GTCTTTCACTAGGACACTTG GGATCTCCATCAACAGATTC	170

* Os *primers* PKU 3C e PKU 12C apresentam em sua seqüência nucleotídeos que representam sítios de pareamento incorreto em relação à seqüência normal do gene (nucleotídeo em azul), os quais foram desenhados para a introdução de sítios de reconhecimento para as endonucleases usadas na detecção das mutações I65T e IVS12nt1g>a, respectivamente.

Tabela 3.4: Relação dos equipamentos utilizados neste estudo

Nome	Marca	Modelo
Agitador magnético com aquecimento	Thermolyne	Cimarec 2
Agitador de tubos	Thermolyne	Maxi MixII
Balança	Micronal	B600
Balança analítica	Shimadzu	AEG-80SM
Banho-maria com agitação	Techne	SB-16
Bloco de aquecimento	Thermolyne	DB 17615
Cuba de eletroforese horizontal (10 x 14cm)	Life Technologies	Horizon 11.14
Cuba de eletroforese vertical (17 x 32cm)	Life Technologies	Model SA 32
Cuba de eletroforese vertical (10 x 8cm)	Sigma	
Espectrofotômetro	Perkin Elmer	Lambda Bio
Espectrofluorômetro	Hitachi	F2000
Fonte	Gibco-BRL	250 e 4001
Máquina fotográfica	Polaroid	MP4
Microcentrífuga	Eppendorf	5415C
Quantificador de DNA/RNA	Pharmacia Biotech	80.2103.98
Secador de gel a vácuo	Bio RAD	583
Seqüenciador automático	Shimadzu	DSQ-2000L
Seqüenciador automático	PE Applied Biosystems	ABI Prism™ 377-XL
Sistema de videodocumentação e análise de géis	Econoimage Light Cabinet	Alpha Imager 2000
Termociclador	MJ Reseach	PTC-100 e PTC-150
Transiluminador	Fotodyne	

3.1.11 - SOLUÇÕES

As seguintes soluções foram preparadas no laboratório usando água deionizada e destilada estéril (Mili-Q):

Gel de agarose a 0,8% (p/v); 1,5% (p/v), 2,0% (p/v), 2,5% (p/v); e 3,0% (p/v):

dissolver 0,8g, 1,5g, 2,0g, 2,5g e 3,0g de agarose em 100mL de TBE 1X, respectivamente;

adicionar 3,0µL de solução brometo de etídio (10mg/mL)

Gel de MDE a 6% (p/v):

17,5 mL de MDE

14mL de TBE 5X

38,5mL de água

40µL de TEMED

350µL de APS 10% (p/v)

Gel de poliacrilamida a 6% (p/v):

18mL de solução de acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%)
24mL de TBE 5X
78mL de água
300 μ L de TEMED
900 μ L de APS 10% (p/v)

Gel de poliacrilamida a 8% (p/v):

28mL de solução de acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%)
105mL de TBE 1X
200 μ L de TEMED
1400 μ L de APS 10% (p/v)

Gel de poliacrilamida a 5%, Glicerol 5% (p/v):

15mL de solução de acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%)
24mL de TBE 5X
6mL de glicerol
75mL de água
300 μ L de TEMED
750 μ L de APS 15% (p/v)

SDS a 10% (p/v):

dissolver 10g de SDS em 100mL de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução cúprica:

dissolver 0,8g de carbonato de sódio anidro (A) em 150mL de água;
dissolver 0,05g de tartarato de sódio e potássio (B) em 150mL de água;
dissolver 0,03g de sulfato de cobre (C) em 150mL de água;
misturar os reagentes na ordem B + A + C;
completar o volume até 500mL com água;
estável em temperatura ambiente em frasco escuro

Solução de acetato de amônio 9,6M:

dissolver 739,2g de acetato de amônio em 1L de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução de acetato de sódio 3M pH 7,0:

dissolver 408,1g de acetato de sódio em 800mL de água;
ajustar o pH para 7,0 com NaOH 10N
conservar em temperatura ambiente

Solução de ácido acético a 10% (v/v)

diluir 50mL de ácido acético glacial em 450mL de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução de ácido etilenodiaminotetracético EDTA 0,5M pH 8,0:

dissolver 186,1g de EDTA em 800mL de água;
ajustar o pH para 8,0 com NaOH;
conservar em temperatura ambiente

Solução de ácido nítrico a 1% (v/v):

diluir 5mL de ácido nítrico em 495mL de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução de ácido nítrico 0,3N:

diluir 1ml de ácido nítrico em 10ml de água;
completar o volume até 50ml com água e armazenar a 4°C.

Solução de albumina de soro bovino (BSA) 10mg/mL:

dissolver 10mg de BSA em 1mL de água;
armazenar a -20°C.

Solução de brometo de etídio 10mg/mL:

dissolver 10mg de brometo de etídio em 1mL de água;
conservar em temperatura ambiente em frasco escuro

Solução de carbonato de sódio anidro 0,28M e formaldeído 0,019% (v/v):

dissolver 15g de carbonato de sódio anidro em 500mL de água;
adicionar 250µL de formaldeído 37%;
preparar esta solução na hora do uso.

Solução de dNTPs 2,0mM:

diluir 10µL de cada dNTP 100mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) em 460µL de água;
armazenar em alíquotas de 100µL a -20°C.

Solução de etanol a 10% (v/v):

diluir 50mL de etanol absoluto em 450mL de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução de etanol a 50% (v/v):

diluir 250mL de etanol absoluto em 250mL de água;
conservar em temperatura ambiente.

Solução de fenilalanina a 10% (p/v):

dissolver 10mg de L-fenilalanina em 100mL de TCA 0,3 N;
armazenar a 4°C.

Solução de L-leucil-L-alanina 5mM:

dissolver 50,5mg de L-leucil-L-alanina em 50mL de água;
armazenar a -20°C em alíquotas de 2mL

Solução de marcador de peso molecular de 50pb ou 100pb (200mg/µL):

25µL de marcador (1µg/µL)
25µL de corante (*loading buffer*)
75µL de água

Solução de marcador de peso molecular de 123pb (500mg/µL):

20µL de marcador (1µg/µL)
8µL de corante (*loading buffer*)
12µL de água

Solução de Ninhidrina 30mM:

dissolver 534mg de ninhidrina em 100mL de água;
armazenar a -20°C em alíquotas de 5mL

Solução de nitrato de prata 0,012M:

dissolver 1,015g de nitrato de prata em 500mL de água;
conservar em temperatura ambiente

Solução de nitrito de sódio a 1% (p/v):

dissolver 100mg de nitrito de sódio em 10mL de água;
armazenar a 4°C (estável por um mês).

Solução de α -nitroso- β -naftol alcoólico a 0,1% (p/v):

dissolver 50mg de α -nitroso- β -naftol em 50ml de etanol 95%;
armazenar a 4°C.

Solução de proteinase K 10mg/mL:

dissolver 200mg de proteinase K em 10mL de água;
armazenar a -20°C.

Solução de TCA 0,6N:

dissolver 24,5g de TCA em 250mL de água;
estável em temperatura ambiente em frasco escuro

Solução de TCA 0,3N:

diluir 100mL de TCA 0,6 N em igual volume de água;
estável em temperatura ambiente em frasco escuro

Solução de tirosina a 10% (p/v)

dissolver 10mg de tirosina em 100mL de TCA 0,3N;
armazenar a -20°C em alíquotas de 5mL

Tampão de corrida com formamida: SSCP

Formamida a 95%
EDTA 20mM
azul de bromofenol a 0,05%
xileno cianol a 0,05%

Tampão de corrida I (6X):

azul de bromofenol a 0,25% (p/v)
ficol a 15% (p/v)
dissolver em 5mL de água

Tampão de corrida II (6X):

30mg de xileno cianol a 0,25% (p/v)
750mg de ficol 400 a 15% (p/v)
dissolver em 3,75mL de água

Tampão de corrida III (6X): SSCP

azul de bromofenol a 0,25% (p/v)

xileno cianol a 0,25% (p/v)
ficol a 15% (p/v)
dissolver em 5mL de água

Tampão de lise nuclear 1X (*Nucleolysis* 1X):

100mM Tris-HCl (pH 8,3)
4M KCl
20mM EDTA (pH 8,2)

Tampão de PCR 10X (C): Biotools

75mM Tris-HCl (pH 9,0)
2mM MgCl₂
50mM KCl
20mM (NH₄)₂SO₄

Tampão de PCR 10X (A): Cenbiot

100mM Tris-HCl (pH 8,0)
1,5mM MgCl₂
50mM KCl

Tampão de PCR 10X (D): Gibco-BRL

200mM Tris-HCl (pH 8,4)
500mM KCl

Tampão de PCR 10X (B): Promega

10mM Tris-HCl (pH 9,0)
1,5mM MgCl₂
50mM KCl

Tampão succinato 0,3M pH 5,8:

dissolver 3,54g de ácido succínico em 90mL de água;
ajustar o pH para 5,8 com NaOH 18N;
completar o volume até 100ml com água e armazenar a 4°C.

TBE 1X:

100mM trizma base
90mM ácido bórico
1mM EDTA

TBE 5X:

54g de trizma base
27,5g de ácido bórico
20mL de EDTA 0,5M (pH 8,0)
completar o volume até 1L com água

TE 1X:

10mM Tris-HCl (pH 8,0)
1mM EDTA (pH 8,0)
ajustar o pH com NaOH

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - PROTOCOLO LABORATORIAL

a) Pacientes com HPA por deficiência de PAH:

As amostras de sangue de cada indivíduo afetado e de seus pais foram colhidas para a extração de DNA. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação de fragmentos específicos do gene da PAH, os quais foram utilizados na análise molecular.

A detecção da mutação V388M foi realizada inicialmente. Esta mutação foi descrita em um paciente de origem japonesa (Takahashi *et al.*, 1992) e apresenta uma frequência elevada na população portuguesa (Leandro *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 1998). Levando em consideração este aspecto, a investigação da mutação V388M foi a meta prioritária na análise molecular de pacientes com deficiência de PAH de nossa amostra. O exon 7 e regiões adjacentes foram amplificados com oligonucleotídeos iniciadores específicos. Os produtos de PCR foram submetidos à análise por digestão com a endonuclease de restrição *BsaA1*.

Após a detecção da mutação V388M, toda a região codificante do gene da PAH foi amplificada por PCR e submetidos à análise de SSCP. Os pacientes que apresentaram fragmentos com padrões de migração normais foram analisados somente por digestão com endonucleases de restrição. Enquanto que os pacientes que apresentaram fragmentos com padrões de migração alterados foram analisados por digestão com endonucleases de restrição e/ou seqüenciamento direto.

A análise por digestão com enzimas de restrição permitiu a detecção de mutações específicas, as quais apresentaram frequências consideráveis em populações estudadas previamente. O seqüenciamento direto proporcionou a identificação de mutações raras ou novas e/ou polimorfismos.

O protocolo utilizado nesta parte do estudo está representado esquematicamente na figura 3.1.

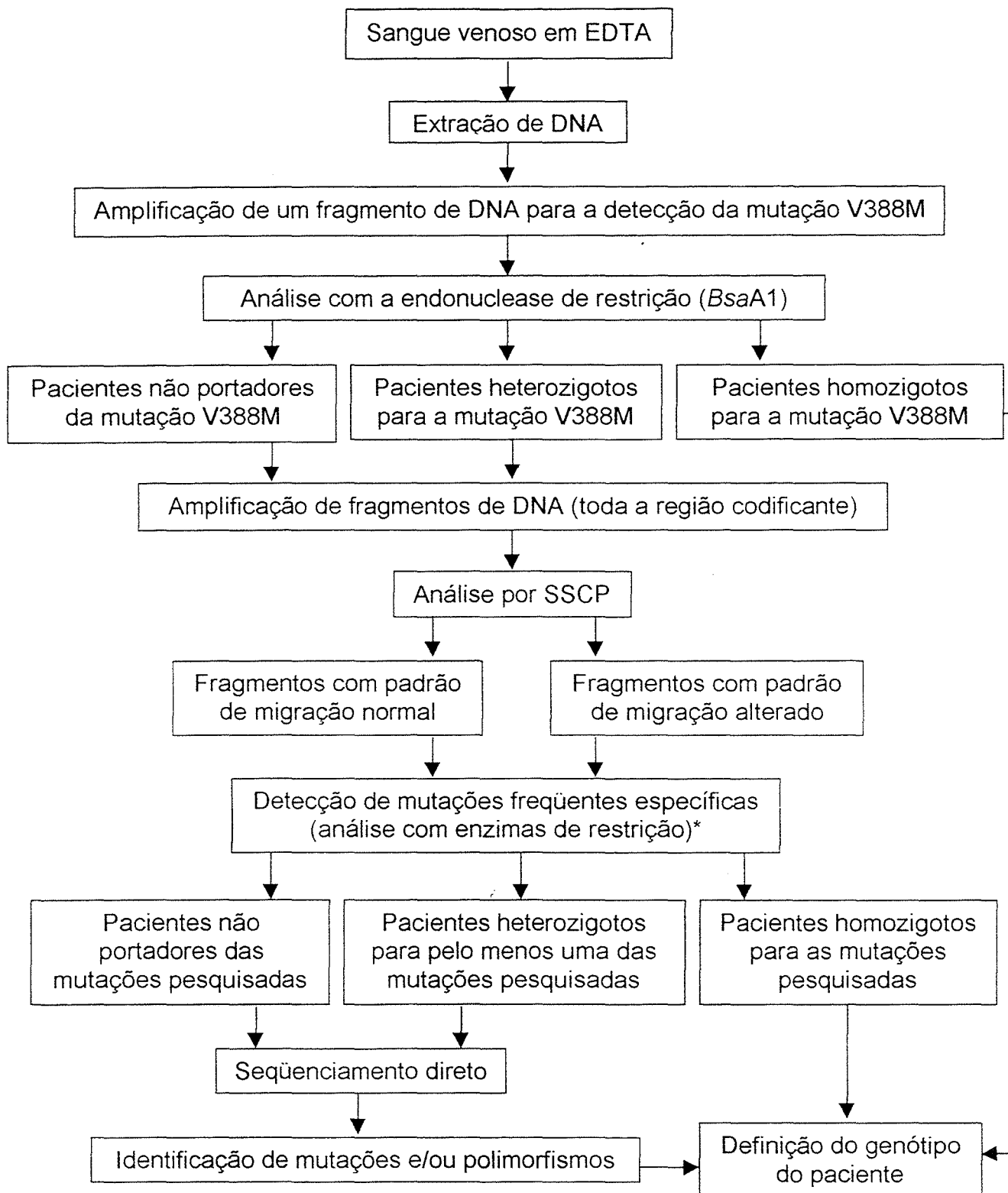


Figura 3.1: Protocolo laboratorial inicial empregado no estudo dos pacientes com deficiência de PAH. *: Mutações: I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt-11g>a, V388M, R408W e IVS12nt1g>a.

b) Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH:

Esta parte do estudo abrangeu análises bioquímicas e moleculares dos indivíduos estudados. Para as análises bioquímicas, duas amostras de sangue dos heterozigotos foram colhidas, conforme descrito no item 3.1.4: uma em jejum e outra 30 minutos após a sobrecarga de aspartame. As dosagens plasmáticas de Phe e Tyr foram determinadas para se verificar o efeito da sobrecarga.

Para as análises moleculares, as amostras de sangue de heterozigotos foram colhidas com EDTA para posterior extração de DNA. A partir daí, o protocolo seguido é semelhante ao descrito no item "a". O protocolo utilizado nesta parte do estudo está representado esquematicamente na figura 3.2.

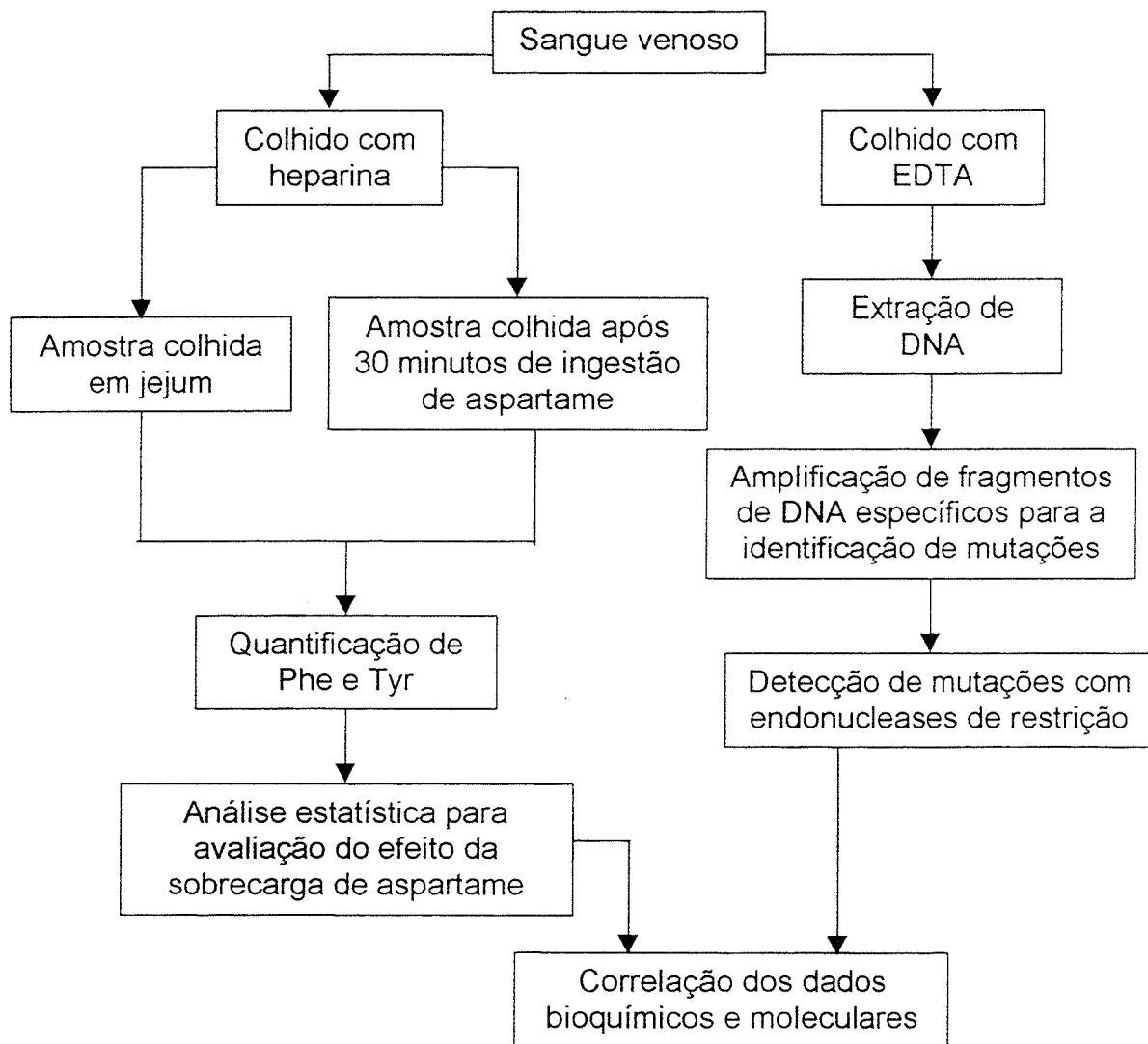


Figura 3.2: Protocolo laboratorial empregado na análise de heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH.

3.2.2 - DOSAGEM DE PHE NO PLASMA (McCaman e Robins, 1962)

A dosagem foi realizada em duplicata, conforme o protocolo abaixo:

1. Adicionar uma alíquota de 200 μ L de plasma a um volume igual de TCA 0,6N e centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm para completa desproteinização da amostra;
2. Retirar uma alíquota de 25 μ L de plasma desproteinizado e adicionar a 400 μ L de uma mistura reagente contendo tampão succinato 0,3M pH 5,8; ninhidrina 30mM e L-leucil-L-alanina 5mM;
3. Incubar os tubos, contendo a amostra e a mistura acima, em banho-maria a 60°C por 2 horas;
4. Resfriar os tubos em banho de água corrente por 5 minutos;
5. Adicionar 2,5mL de reagente cúprico e manter os tubos por 10 minutos em temperatura ambiente;
6. Fazer a leitura da fluorescência das amostras em espectrofluorômetro Hitachi (modelo F2000), usando os comprimentos de onda de 365nm (excitação) e 455nm (emissão);
7. Calcular as concentrações plasmáticas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de Phe.

3.2.3 - DOSAGEM DE TYR NO PLASMA (Philips, 1967)

A dosagem foi realizada em duplicata, conforme o protocolo abaixo:

1. Adicionar uma alíquota de 200 μ L de plasma a um volume igual de TCA 0,6N e centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm para completa desproteinização da amostra
2. Retirar uma alíquota de 20 μ L de plasma desproteinizado e adicionar a 500 μ L de uma mistura reagente composta de ácido nítrico 0,3N; nitrito de sódio 1% e α -nitroso- β -naftol em etanol 0,1%;
3. Incubar os tubos, contendo a amostra e a mistura acima, em banho de água fervente por 10 minutos.
4. Adicionar 3mL de água destilada em cada tubo;
5. Fazer a leitura da fluorescência das amostras em espectrofluorômetro Hitachi (modelo F2000), usando os comprimentos de onda de 436nm (excitação) e 535nm (emissão);
6. Calcular as concentrações plasmáticas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de Tyr.

3.2.4 - ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE (Miller, 1988)

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de uma amostra de sangue (5 ou 10mL) colhida em EDTA. Foi utilizado o método de precipitação com sais (*salting-out*), descrito a seguir.

1. Transferir o sangue para um tubo plástico cônico estéril de 50mL (tipo Falcon) logo após seu descongelamento;
2. Adicionar água destilada esterilizada gelada até completar 50mL;
3. Agitar as amostras em agitador de tubos;
4. Centrifugar a amostra por 20 minutos a 3000 rpm em TA;
5. Desprezar o sobrenadante;
6. Adicionar 25mL de triton X-100 0,1% (v/v) ao precipitado;
7. Homogeneizar o precipitado por alguns segundos até que o mesmo fique completamente ressuspenso;
8. Centrifugar por 20 minutos a 3000 rpm em TA;
9. Desprezar o sobrenadante;
10. Adicionar, ao precipitado, 3mL de tampão de lise nuclear (*Nucleolysis 1X*);
11. Homogeneizar a solução no agitador de tubos durante aproximadamente 20 segundos;
12. Adicionar 120 μ L da solução de proteinase K 10mg/mL e 200 μ L de solução de SDS 10% (p/v);
13. Homogeneizar rapidamente a solução no agitador de tubos;
14. Incubar a amostra a 37°C durante um período de 12 a 16 horas;
15. Adicionar 1mL de solução de acetato de amônio 9,6M;
16. Homogeneizar, no agitador de tubos, por 15 segundos;
17. Deixar a amostra em TA por 10 a 15 minutos;
18. Centrifugar a solução durante 20 minutos a 3000 rpm em TA;
19. Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro de 20mL estéril;
20. Adicionar ao sobrenadante 10mL de etanol absoluto gelado;
21. Misturar levemente por inversão para a precipitação do DNA;
22. Transferir o DNA para um tubo plástico cônico de 1,5mL (tipo Eppendorf);
23. Ressuspender o DNA em solução de TE (o volume da solução de TE depende da quantidade de DNA obtida);

24. Manter esta solução em TA durante alguns minutos e posteriormente armazenar a -20°C até o momento de uso.

3.2.5 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA

1. Diluir $10\mu\text{l}$ da solução de DNA em $490\mu\text{l}$ de água Mili-Q (diluição 1:50) em um tubo plástico cônico de $1,5\text{mL}$ (tipo Eppendorf);
2. Fazer a leitura da absorbância (Δ) das amostras a 260nm em um quantificador de DNA (Pharmacia Biotech);
3. Calcular a concentração de DNA considerando que uma unidade de absorbância equivale a $50\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA;
4. Diluir as amostras de DNA para uma concentração final de aproximadamente $100\text{ng}/\mu\text{l}$.

3.2.6 - PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO (Ausubel *et al.*, 1997).

Algumas amostras de DNA apresentaram dificuldades no processo de amplificação pela técnica de PCR. Para solucionar o problema estas amostras foram submetidas a um procedimento de precipitação, como o descrito abaixo:

1. Adicionar, à solução de DNA, $1/10$ do volume inicial de acetato de sódio 3M ($\text{pH } 7,0$);
2. Adicionar 2,5 vezes o volume inicial de etanol absoluto gelado;
3. Homogeneizar a solução por inversão e manter a -70°C por 30 minutos ou -20°C por 2 horas;
4. Centrifugar os tubos por 10 minutos a 14000 rpm em TA;
5. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com $200\mu\text{L}$ de solução de etanol 70% (v/v);
6. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm em TA;
7. Descartar o sobrenadante;
8. Deixar o precipitado secando em TA por aproximadamente 20 minutos;
9. Diluir o precipitado em um volume de solução de TE igual ao volume inicial.

3.2.7 - AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DO GENE DA PAH PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) (Newton e Graham, 1994)

Para a identificação e a caracterização molecular das mutações, regiões do gene da PAH que englobam os exons e suas regiões adjacentes foram amplificadas através da técnica de PCR. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sua localização encontram-se representadas na figura 3.3. Os *primers* foram diluídos com água Mili-Q até uma concentração de 1000 pmoles/ μ L (solução estoque). A solução de uso foi preparada para uma concentração de 10 pmoles/ μ L.

O protocolo de preparo das reações de amplificação por PCR se encontra resumido na tabela 3.5. Um tubo branco, com volume de água Mili-Q igual à quantidade de DNA encontrada nos tubos testes, foi preparado para cada reação de PCR. As condições de amplificação estão na tabela 3.6.

Tabela 3.5: Protocolo básico para as reações de amplificação por PCR.

Soluções	1X
DNTPs 2mM	2,5 μ L
Tampão de PCR 10X (com ou sem MgCl ₂)	2,5 μ L
<i>Primer</i> PKU A (10pmol/ μ L)	1,5 ou 2,0 μ L
<i>Primer</i> PKU B (10pmol/ μ L)	1,5 ou 2,0 μ L
25 ou 50mM MgCl ₂ (se não estiver incluído no tampão)	2,0 ou 1,5 μ L
<i>Taq</i> polimerase (1 ou 5U/ μ L)	1,0 ou 0,5; 0,25 μ L
DNA (100ng/ μ L)	1,0 ou 2,0 μ L
Água Mili-Q estéril	q.s.p. 25,0 μ L

Tabela 3.6: Condições usadas nas reações de amplificação.

Estágios	Número de ciclos	Temperatura	Tempo (minuto)
1° Passo: Desnaturação inicial	1	94°C	5
Desnaturação		94°C	1
2° Passo: Anelamento	30	55°C a 66°C	1
Extensão		72°C	1#
3° Passo: Extensão final	1	72° C	5

O tempo de extensão usado para a amplificação do exon 7 foi de 30 segundos.

Fragmento 1 (exon 1 e regiões adjacentes)

cga	ggt	taa	aac	ctt	cag	ccc	cac	gtg	ctg	ttt	gcA
AAC	CTG	CCT	GTA	CCT	GAG	GCC	CTA	AAA	AGC	CAG	AGA
CCT	CAC	TCC	CGG	GGA	GCC	AGC	ATG	TCC	ACT	GCG	GTC
CTG	GAA	AAC	CCA	GGC	TTG	GGC	AGG	AAA	CTC	TCT	GAC
TTT	GGA	CAG	gtg	agc	cac	ggc	agc	ctg	agc	tgc	tca
gtt	agg	gga	att	tgg	<u>gcc</u>	<u>tcc</u>	<u>aga</u>	<u>gaa</u>	<u>aga</u>	<u>gat</u>	<u>ccg</u>
aag	act	gct	ggt	gct	tcc	tgg	ttt	cat	aag	ctc	agt

Fragmento 2 (exon 2 e regiões adjacentes)

atg	caa	gat	tta	act	aga	aga	aag	agt	tca	tgc	ttg
ctt	tgt	cca	tgg	agg	ttt	aac	agg	aat	gaa	ttg	cta
aac	tgt	gga	aaa	tgt	ttt	aaa	caa	atg	cat	ctt	atc
ctg	tag	GAA	ACA	AGC	TAT	ATT	GAA	GAC	AAC	TGC	AAT
CAA	AAT	GGT	GCC	ATA	TCA	CTG	ATC	TTC	TCA	CTC	AAA
GAA	GAA	GTT	GGT	GCA	TTG	GCC	AAA	GTA	TTG	CGC	TTA
TTT	GAG	gtc	agt	gct	aca	atc	atg	ttt	gtc	ttg	gat
aat	gtc	gta	gca	aac	ttc	cat	gtt	ctt	ttc	tag	tta
gat	gca	atg	aaa	aga	aca	cag	gat	ctg	gaa	cag	g

Fragmento 3 (exon 3 e regiões adjacentes)

tgg	ttc	tgc	atc	ttt	ggc	ctg	<u>cgt</u>	<u>tag</u>	<u>ttc</u>	<u>ctg</u>	<u>tga</u>
<u>ctg</u>	<u>tct</u>	<u>cct</u>	<u>cac</u>	<u>cct</u>	<u>ccc</u>	<u>cat</u>	<u>tct</u>	<u>ctc</u>	<u>gtc</u>	<u>tag</u>	<u>GAG</u>
AAT	GAT	GTA	AAC	CTG	ACC	CAC	ATT	GAA	TCT	AGA	<u>CCT</u>
<u>TCT</u>	<u>CGT</u>	<u>TTA</u>	<u>AAG</u>	<u>AAA</u>	<u>GAT</u>	<u>GAG</u>	<u>TAT</u>	<u>GAA</u>	<u>TTT</u>	<u>TTC</u>	<u>ACC</u>
CAT	TTG	GAT	AAA	CGT	AGC	CTG	CCT	GCT	CTG	ACA	AAC
ATC	ATC	AAG	ATC	TTG	AGG	CAT	GAC	ATT	GGT	GCC	ACT
GTC	CAT	GAG	CTT	TCA	CGA	GAT	AAG	AAG	AAA	GAC	ACA
Ggt	aag	aat	tag	agg	aat	ttt	<u>gca</u>	<u>aca</u>	<u>taa</u>	<u>gta</u>	<u>act</u>
<u>cac</u>	<u>atg</u>	<u>tct</u>	<u>tat</u>	<u>a</u>							

Fragmento 4 (exon 4 e regiões adjacentes)

tgt	tct	gcc	aat	ctg	<u>taç</u>	<u>tca</u>	<u>gga</u>	<u>cgt</u>	<u>tgc</u>	<u>ctt</u>	<u>ctc</u>
tgt	gtt	tca	gTG	CCC	TGG	TTC	CCA	AGA	ACC	ATT	CAA
GAG	CTG	GAC	AGA	TTT	GCC	AAT	CAG	ATT	CTC	AGC	TAT
GGA	GCG	GAA	CTG	GAT	GCT	GAC	CAC	CCT	gtg	<u>agt</u>	<u>cca</u>
<u>tgg</u>	<u>ccc</u>	<u>gta</u>	<u>gat</u>	<u>gag</u>	<u>att</u>	<u>ttt</u>	<u>tga</u>	<u>ca</u>			

Figura 3.3: Seqüências do gene da PAH humana. Os íntrons estão representados em preto e em letras minúsculas e os exons estão representados em vermelho e em letras maiúsculas. As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se sublinhadas.

Fragmento 5 (exon 5 e regiões adjacentes)

```

aga   gct   aag   ttt   aac   ccg   aga   ctt   tag   ttt   tag   ggt
ata   ccc   aag   gga   agg   aga   gat   gca  ctg   tca   tgg   ctt
tag   agc  ccc   cat   tca   aag   cat   tca   taa   agg   tac   cag
acc   tct   tcc   tat   gaa   gcc   ttg   aaa   aat   cag   gtg   tct
ctt   ttc   tcc   tag   GGT   TTT   AAA   GAT   CCT   GTG   TAC   CGT
GCA   AGA   CGG   AAG   CAG   TTT   GCT   GAC   ATT   GCC   TAC   AAC
TAC   CGC   CAg   taa   gtc   tgc   ctt   gct   tgt   tga   ggg   gaa
gag   aga   aaa   aca   cac   ccc   tag   cct   gct   tct   ccc   ttg
ccc   tca   tcc   agt   tga   gga  tgg  aaa   ata   cca   gca  tga
aga   gta   atc   ttg   cac   gcc   ctc   gct   caa   gcc   ttc   gtc

```

Fragmento 6 (exon 6 e regiões adjacentes)

```

ctc   cct   ctg   cta   acc   taa   cct   gca   ttc   tgc   tgt   gcc
cct   gcc   ctg  cct   tga   gca   cct   att   ttg   tgc   ctg   tat
tct   agT   GGG   CAG   CCC   ATC   CCT   CGA   GTG   GAA   TAC   ATG
GAG   GAA   GAA   AAG   AAA   ACA   TGG   GGC   ACA   GTG   TTC   AAG
ACT   CTG   AAG   TCC   TTG   TAT   AAA   ACC   CAT   GCT   TGC   TAT
GAG   TAC   AAT   CAC   ATT   TTT   CCA   CTT   CTT   GAA   AAG   TAC
TGT   GGC   TTC   CAT   GAA   GAT   AAC   ATT   CCC   CAG   CTG   GAA
GAC   GTT   TCT   CAA   TTC   CTG   CAG   Agt   aag   tcc   aca   tca
ggg   tca  atg   ccc   tga   gaa   agt   tgg   ggg   agg   att   gag
gca   gag   gag   agg   gaa

```

Fragmento 7 (exon 7 e regiões adjacentes)

```

tat   gtg   act   act   cca   cta   cca   aag   gtc   tcc   tag   tgc
ctc   tga   ctg   agt   ggt   gat   gag   ctt   tga   gtt   ttc   ttt
ctt   ctt   ttc   atc   cca   gCT   TGC   ACT   GGT   TTC   CGC   CTC
CGA   CCT   GTG   GCT   GGC   CTG   CTT   TCC   TCT   GGG   GAT   TTC
TTG   GGT   GGC   CTG   GCC   TTC   CGA   GTC   TTC   CAC   TGC   ACA
CAG   TAC   ATC   AGA   CAT   GGA   TCC   AAG   CCC   ATG   TAT   ACC
CCC   GAA   CCg   tga   gta   ctg   tcc   tcc   agc   tac   cag   ttg
cca   ggc   aca   atg   agc   gcc   atc   ttt   tcc   tgc   tgc   aag
aat   gag   gtt   tgg   gtt   cag   ttg   ctg   gct   ggt   cca   cag
gct   agt   tgt   gta   gac   tgt   ttg   ctc   gta   gta   cta   aga

```

Figura 3.3 (continuação): Sequências do gene da PAH humana. Os íntrons estão representados em preto e em letras minúsculas e os exons estão representados em vermelho e em letras maiúsculas. As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se sublinhadas.

Fragmento 8 (exon 8 e regiões adjacentes)

c	att	ctt	tct	gcc	cat						
tcc	tca	tgt	aga	aag	act	<u>gag</u>	tct	ggc	ttg	<u>gct</u>	taa
<u>acc</u>	<u>tcc</u>	<u>tcc</u>	<u>cct</u>	<u>ccg</u>	<u>agc</u>	<u>tct</u>	<u>ctg</u>	<u>tgc</u>	<u>ttt</u>	<u>ctg</u>	<u>tct</u>
ttc	agT	GAC	ATC	TGC	CAT	GAG	CTG	TTG	GGA	CAT	GTG
CCC	TTG	TTT	TCA	GAT	CGC	AGC	TTT	GCC	CAG	TTT	TCC
CAG	gta	agg	aat	gga	ttt	ttt	agc	ctt	cta	gtt	ata
<u>ggt</u>	<u>ctg</u>	<u>tga</u>	<u>cct</u>	<u>gaa</u>	<u>ttt</u>	<u>ctc</u>	aaa	tga	gtt	gag	ccc
agg	gag	ggg	tcc	tca	tgc	cct	ctg	caa	gag	cg	aaa

Fragmento 9 (exon 9 e regiões adjacentes)

ata	aca	cac	tca	ggg	tct	atg	tgg	gct	gtt	ctg	aag
gca	tct	ggc	cac	cca	tca	cct	ttt	tat	<u>ggc</u>	caa	<u>gta</u>
<u>cta</u>	<u>ggt</u>	<u>tgg</u>	<u>ttc</u>	<u>tgt</u>	<u>ggt</u>	<u>tcc</u>	<u>aat</u>	<u>tac</u>	<u>agg</u>	<u>aac</u>	<u>aga</u>
aca	ggt	tct	att	ttc	ccc	caa	tta	cag	GAA	ATT	GCC
CTT	GCC	TCT	CTG	GGT	GCA	CCT	GAT	GAA	TAC	ATT	GAA
AAG	CTC	GCC	ACA	gta	agt	ccc	ttc	tct	ccc	tgg	gtg
gat	ggt	gga	gtg	cta	tag	gct	atg	<u>gcc</u>	ctc	agg	tct
ttg	aaa	ctc	tct	act	cct	gga	gca	ggt	atc	tgg	gaa

Fragmento 10 (exon 10 e regiões adjacentes)

atc	cca	gtc	aag	gtg	aca	cat	aaa	att	<u>aac</u>	<u>cat</u>	<u>cat</u>
<u>aga</u>	<u>gtg</u>	<u>tgc</u>	<u>tct</u>	<u>cag</u>	<u>att</u>	<u>gac</u>	<u>ttt</u>	<u>cca</u>	<u>ttc</u>	<u>cag</u>	<u>ATT</u>
TAC	TGG	TTT	ACT	GTG	GAG	TTT	GGG	CTC	TGC	AAA	CAT
GGA	GAC	TCC	ATA	AAG	GCA	TAT	GGT	GCT	GGG	CTC	CTG
TCA	TCC	TTT	GGT	GAA	TTA	CAG	gta	tga	cct	tca	cag
gaa	cca	agg	ata	gat	tta	aaa	gtg	gtg	ggt	aca	gaa
aac	cat	tat	tgt	gct	ttc	aat	att	gtt	gaa	acc	cta
ttt	gta	<u>tcc</u>	<u>gtt</u>	<u>ttg</u>	<u>ata</u>	<u>tgc</u>	<u>aac</u>	<u>ctg</u>	gga	act	cat
tct	cca	gtg	aat	t							

Figura 3.3 (continuação): Seqüências do gene da PAH humana. Os íntrons estão representados em preto e em letras minúsculas e os exons estão representados em vermelho e em letras maiúsculas. As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se sublinhadas.

Fragmento 11 (exon 11 e regiões adjacentes)

gga	ctg	tgg	tgt	aga	agg	aat	cgg	gtt	gag	<u>atg</u>	<u>aga</u>
<u>gaa</u>	<u>ggg</u>	<u>gca</u>	<u>caa</u>	<u>atg</u>	<u>gcc</u>	<u>tat</u>	<u>ggg</u>	<u>atg</u>	<u>cag</u>	<u>cag</u>	<u>gga</u>
ata	ctg	atc	ctg	att	taa	cag	tga	taa	taa	ctt	ttc
act	tgg	ggc	cta	cag	TAC	TGC	TTA	TCA	GAG	AAG	CCA
AAG	CTT	CTC	CCC	CTG	GAG	CTG	GAG	AAG	ACA	GCC	ATC
CAA	AAT	TAC	ACT	GTC	ACG	GAG	TTC	CAG	CCC	CTG	TAT
TAC	GTG	GCA	GAG	AGT	TTT	AAT	GAT	GCC	AAG	GAG	AAA
GTA	AGg	tga	ggt	ggt	gac	aaa	ggt	gag	cca	cta	gct
ctg	ggg	gcc	tcc	tga	ctg	gtg	cca	ctc	atc	tgt	ggg
tgg	ttc	cag	<u>gag</u>	<u>agt</u>	<u>gga</u>	<u>ctc</u>	<u>caa</u>	<u>tgt</u>	<u>cta</u>	<u>cag</u>	<u>tat</u>
ttg	tac	ata	gac	agt	ttc	tct	cca	tgt	tct	cac	ctc

Fragmento 12 (exon 12 e regiões adjacentes)

tcc	taa	aaa	aga	agt	aaa	atg	<u>cca</u>	<u>ctg</u>	<u>aga</u>	<u>act</u>	<u>ctc</u>
<u>tta</u>	<u>aga</u>	<u>cta</u>	<u>cct</u>	<u>ttc</u>	<u>tcc</u>	<u>aaa</u>	<u>tgg</u>	<u>tgc</u>	<u>ccc</u>	<u>ttc</u>	<u>act</u>
caa	gcc	tgt	ggt	ttt	ggt	ctt	agG	AAC	TTT	GCT	GCC
ACA	ATA	CCT	CGG	CCC	TTC	TCA	GTT	CGC	TAC	GAC	CCA
TAC	ACC	CAA	AGG	ATT	GAG	GTC	TTG	GAC	ATT	ACC	CAG
CAG	CTT	AAG	ATT	TTG	GCT	GAT	TCC	ATT	AAC	<u>Agt</u>	<u>aag</u>
taa	ttt	aca	cct	tac	gag	gcc	act	<u>cgg</u>	<u>ttt</u>	<u>ctc</u>	<u>agt</u>
<u>aat</u>	<u>cga</u>	<u>aga</u>	<u>ctg</u>	<u>tct</u>	<u>ttc</u>	<u>cct</u>	<u>acc</u>	<u>atc</u>	<u>gcc</u>	<u>ata</u>	<u>gg</u>

Fragmento 13 (exon 13 e regiões adjacentes)

gca	ccc	agc	tca	tcc	aag	aag	gcc	cac	tta	tcc	cct
<u>agt</u>	<u>ctt</u>	<u>tca</u>	<u>cta</u>	<u>gga</u>	<u>cac</u>	<u>ttg</u>	<u>aag</u>	<u>agt</u>	<u>ttt</u>	<u>tgc</u>	<u>tta</u>
tta	tac	aag	tgg	ccc	att	ttg	atg	gtg	ttt	ttc	ttt
gta	gGT	GAA	ATT	GGA	ATC	CTT	TGC	AGT	GCC	CTC	CAG
AAA	ATA	AAG	TAA	AGC	CAT	GGA	CAG	AAT	GTG	GTC	TGT
CAG	CTG	TGA	ATC	TGT	TGA	TGG	AGA	TCC	AAC	TAT	TTC
TTT	CAT	CAG	AAA	AAG	TCC	GAA	AAG	CAA	ACC	TTA	ATT

TAA: Códon de parada

Figura 3.3 (continuação): Sequências do gene da PAH humana. Os íntrons estão representados em preto e em letras minúsculas e os exons estão representados em vermelho e em letras maiúsculas. As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se sublinhadas.

3.2.8 - ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE (Ausubel *et al.* 1997)

1. Submeter os produtos de PCR à análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5% ou 2,0% ou 2,5% (p/v), de acordo com o tamanho do fragmento analisado;
2. Adicionar uma alíquota de 5,0 μ L do produto amplificado a 1,0 μ L de tampão de corrida (I ou II) e homogeneizar;
3. Aplicar cada produto de PCR em uma canaleta do gel;
4. Submeter à eletroforese horizontal em tampão TBE 1X a 100V durante 30, 40 ou 45 minutos, conforme o tamanho do fragmento a ser visualizado;
5. Transferir o gel de agarose para um transiluminador com luz ultravioleta e visualizar os fragmentos de DNA (isto ocorre devido ao brometo de etídio, presente no gel de agarose, intercalar-se na molécula de DNA e emitir fluorescência quando exposto à luz ultravioleta);
6. Comparar o tamanho do fragmento amplificado ao marcador de peso molecular (100 pb ou 123 pb) com o objetivo de confirmar a amplificação desejada.

3.2.9 - ANÁLISE DE POLIMORFISMOS CONFORMACIONAIS DE CADEIA SIMPLES (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Labrune *et al.*, 1991)

Todos os fragmentos do gene da PAH foram amplificados separadamente conforme o item 3.2.7. As amostras de DNA dos pacientes e de indivíduos controles foram então submetidas à análise por SSCP, a fim de identificar regiões do gene com alterações na seqüência gênica.

a) Fundamentação: O método baseia-se no fato que o DNA sofre desnaturação em alta temperatura (acima de 90°C), formando 2 fitas simples. Os produtos de desnaturação, quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, assumem uma conformação secundária dependente de sua seqüência primária de nucleotídeos. A presença de uma alteração na seqüência normal ocasiona um padrão de migração alterado e distinto, o qual pode ser visualizado ao final da análise.

O protocolo realizado está descrito abaixo:

1. Adicionar uma alíquota de 8 μ L do produto de DNA amplificado a 5 μ L de tampão de corrida III;

2. Desnaturar as amostras em termociclador a 99°C por 10 minutos;
3. Transferir as amostras, após a desnaturação, imediatamente para um banho de gelo e mantê-las durante 5 minutos;
4. Aplicar uma alíquota de 6µL dos produtos desnaturados em um gel de MDE a 6% (p/v).

A tabela 3.7 mostra as condições da análise de SSCP utilizadas neste estudo.

Tabela 3.7: Fragmentos do gene da PAH submetidos à análise por SSCP.

Fragmento	Tamanho (pb)	Potência (W)	Tempo de eletroforese (horas)	Temperatura (°C)
1	210	5	17	18
2	237	5	18	18
3	271	5 9	22 15	4 18
4	145	5	14	18
5	266	5	20	18
6	270	5	19	18
7	274	5	21	18
8	183	5	16	18
9	179	5	16	18
10	250	5	18	18
11	324	5	21	18
12	239	5	18	18
13	170	5	15	18

b) Coloração do gel com nitrato de prata: A revelação do gel foi realizada conforme o protocolo descrito abaixo. As soluções foram sempre preparadas na hora do procedimento e sob agitação com suave movimentos de rotação.

1. Colocar o gel em um recipiente com solução de etanol a 10% (v/v) e mantê-lo por 5 minutos (fixação das amostras);
2. Transferir o gel para solução de ácido nítrico a 1% (v/v) e mantê-lo por 3 minutos (oxidação do gel);
3. Lavar o gel 2 vezes com água destilada e deionizada durante poucos segundos;
4. Colocar o gel em solução de nitrato de prata 0,012M e mantê-lo por 20 minutos (coloração do gel);
5. Lavar o gel 2 vezes com água destilada e deionizada durante poucos segundos;

6. Cobrir o gel com solução de carbonato de sódio anidro 0,28M e formaldeído a 37% (v/v) e mantê-lo por 10 a 20 minutos, até o aparecimento completo dos fragmentos (revelação do gel);
7. Interromper a revelação transferindo o gel para uma solução de ácido acético a 10% (v/v) e mantê-lo por 2 minutos;
8. Lavar o gel um vez com água destilada e deionizada durante poucos segundos;
9. Colocar o gel em solução de etanol a 50% (v/v) durante 30 minutos.

Após o procedimento de coloração, o gel foi transferido para papel Whatman 3mm, coberto com um plástico protetor (Magipack) e colocado em um secador de gel a vácuo. A secagem foi realizada em temperatura de 65°C por 20 a 30 minutos.

A última etapa da análise por SSCP consistiu em arquivar a imagem do gel seco em um sistema de videodocumentação e análise de géis (*Econoimage Light Cabinet - Alpha Imager 2000*), para posterior interpretação do padrão de migração das amostras em estudo.

3.2.10 - ANÁLISE POR DIGESTÃO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Levando em consideração que na região sul do Brasil é observada a ocorrência de uma grande proporção de descendentes de imigrantes da Europa (principalmente da Península Ibérica, Itália, Alemanha e, em menor número, da Polônia), foram selecionadas para este estudo as mutações que apresentaram freqüências elevadas nestas populações, as quais estão localizadas nos fragmentos 3, 7, 11 e 12. Desta forma, as amostras que apresentaram alterações nestes fragmentos pela técnica de SSCP, foram posteriormente analisadas por digestão com enzimas de restrição para a detecção das seguintes mutações: I65T (exon 3); R252W, R261Q e R261X (exon 7); IVS10nt-11g>a e V388M (exon 11); IVS12nt1g>a e R408W (exon12).

Após a análise de SSCP, as amostras dos fragmentos 3, 7, 11 e 12 que apresentaram padrões de migração normais foram submetidos somente à análise com endonucleases de restrição.

O protocolo empregado na preparação das reações de digestão está representado na tabela 3.8. As reações foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas, com exceção das reações que utilizaram a enzima *Taq1*, as quais foram incubadas a 60°C pelo mesmo período de tempo.

A tabela 3.9 mostra os dados de interpretação utilizados na detecção das mutações.

Tabela 3.8: Protocolo de digestão com endonucleases de restrição.

Soluções	1X
Tampão da enzima de restrição (10X)	2,0 μ L
Enzima de restrição (5U/ μ L ou 10U/ μ L)	1,0 a 2,0 μ L
Produto de PCR	10,0 a 14,0 μ L
Água Mili-Q estéril	q.s.p. 25,0 μ L

Tabela 3.9: Dados de interpretação para a detecção das mutações I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt- 11g->a, V388M, IVS12nt1g->a e R408W.

Fragmentos	Mutação	Enzima	Produto de PCR (pb)	Fragmentos esperados	
				Alelo normal (pb)	Alelo mutante (pb)
3'	I65T	<i>Taq1</i>	92	72 + 20	92
7	R252W	<i>Ava1</i>	274	182 + 92	274
	R261Q	<i>Hinf1</i>	274	154 + 120	274
	R261X	<i>Dde1</i>	274	274	156 + 118
11	IVS10nt-11g>a	<i>Dde1</i>	324	324	244 + 80
	V388M	<i>BsaA1</i>	324	188 + 136	324
12	R408W	<i>Sty1</i>	239	239	145 + 94
12'	IVS12nt1g>a	<i>Rsa1</i>	211	192 + 19	211

3.2.11 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO

Após a digestão com as enzimas de restrição, alíquotas de 5 a 10 μ L do produto das reações foram adicionadas a 1 μ L do tampão de corrida (I ou II). Os produtos foram aplicados em gel de agarose a 2,0%, 2,5% e 3,0% conforme o tamanho dos fragmentos e submetidos a uma separação eletroforética em cuba horizontal (10 x 14cm) durante um período de 40 a 120 minutos, de acordo com o tamanho dos fragmentos esperados. Os fragmentos digeridos foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta. Os fragmentos produzidos pela digestão foram comparados ao marcadores de peso molecular de 100 pb e 123 pb.

3.2.12 - SEQÜENCIAMENTO DIRETO

As amostras que apresentaram mobilidade eletroforética alterada no SSCP e mutação não identificada por análise com enzima de restrição foram submetidas à análise de seqüenciamento (manual ou automatizado).

As amostras foram amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito no item 3.2.7. Os produtos de PCR foram então purificados utilizando o kit *Concert™ Rapid PCR Purification System* (Gibco-BRL Products), seguindo as instruções do fornecedor.

Os produtos purificados foram então submetidos à análise de seqüenciamento, utilizando o kit *Sequenase^R* versão 2.0 (U.S. Biochemical Co.), no seqüenciamento manual ou o método de terminação fluorescente em um seqüenciador automático (*ABI Prism™ 377-XL*, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O seqüenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado na Inglaterra pela Dra. Maria Luiza Pereira e nos Estados Unidos da América (Department of Human Genetics, Mount Sinai Medical Center) pelos Drs. Claudio V. Peredo e Robert Desnick.

3.2.13 - CORRELAÇÃO GENÓTIPO - FENÓTIPO

a) Pacientes com HPA por deficiência de PAH:

O fenótipo dos pacientes foi classificado de acordo com a tolerância à dieta restrita em Phe (Güttler e Guldborg, 1996), de acordo com os dados abaixo:

- PKU clássica: tolerância entre 250 a 350 mg de Phe/dia (abaixo de 20 mg/kg por dia);
- PKU moderada: tolerância entre 350 a 400 mg de Phe/dia (20 a 25 mg/kg por dia);
- PKU leve: tolerância entre 400 a 600 mg de Phe/dia (25 a 50 mg/kg por dia);
- HPA não-PKU: níveis de Phe entre 400 e 600 µmol/L em dieta normal.

As concentrações da atividade de PAH obtidas por estudos de expressão *in vitro* do cDNA da PAH normal e mutante foram usados para prever o nível de atividade de PAH em pacientes com genótipos conhecidos. O valor da atividade residual prevista de PAH (ARP) foi calculado considerando a média dos níveis da atividade de PAH associados a cada enzima mutante e foi expresso como a porcentagem do nível normal da atividade de PAH (Okano *et al.*, 1991).

A ARP foi comparada com os índices bioquímicos associados ao diagnóstico (níveis de Phe e Tyr pré-tratamento, tolerância à Phe da dieta e teste de sobrecarga) e ao tratamento (valores de Phe e Tyr durante os primeiros 5 anos de vida) dos pacientes com HPA por deficiência de PAH. Os valores de Tyr foram considerados apenas para os pacientes com diagnóstico precoce.

A ARP foi comparada também com o quadro clínico (presença ou não de retardo mental, convulsões, eletroencefalograma alterado, valores do quociente de inteligência [QI]) apresentado pelos pacientes com diagnóstico tardio. O QI foi determinado pela escala de inteligência de Wechsler para crianças (WISC).

Os índices associados ao diagnóstico e ao tratamento de todos os pacientes com HPA por deficiência de PAH foram comparados entre si. Estes índices foram também comparados com o quadro clínico apresentado pelos pacientes com diagnóstico tardio.

b) Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH:

Após a determinação das concentrações plasmáticas dos aminoácidos Phe e Tyr, os valores das relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr foram calculadas para os indivíduos controles e heterozigotos, em jejum e 30 minutos após a sobrecarga de aspartame.

Os resultados de cada parâmetro (Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr), foram comparados nas seguintes situações:

- jejum x sobrecarga de aspartame (controles x controles e heterozigotos x heterozigotos);
- jejum x jejum (controles x heterozigotos);
- sobrecarga de aspartame x sobrecarga de aspartame (controles x heterozigotos).

Para avaliar o efeito de um único alelo mutante no metabolismo da Phe e Tyr em heterozigotos para PKU, os dados bioquímicos e moleculares foram comparados.

3.2.14 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) e PEPI (*Computer Programs for Epidemiologist, Version 3.0*) foram usados para a análise estatística dos resultados apresentados neste estudo.

a) Pacientes com HPA por deficiência de PAH:

Os testes estatísticos usados para a análise dos resultados foram os seguintes:

- Teste de comparação de proporções e intervalo de confiança exato de Fischer: aplicados na comparação entre as frequências das mutações encontradas neste estudo e as frequências observadas em outros estudos;
- Coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (r): teste usado para determinar o nível de correlação entre as variáveis quantitativas (índices bioquímicos associados ao diagnóstico e tratamento, valores de QI e ARP);
- Análise de regressão linear múltipla: teste usado para avaliar a relação causa - efeito entre as variáveis quantitativas que apresentaram correlações significativas no coeficiente de Pearson;
- Teste exato de Fischer: usado para analisar a associação entre as variáveis do fenótipo representado por parâmetros do quadro clínico (convulsões, eletroencefalograma e retardo mental);
- Teste U de Mann-Whitney: aplicado para a análise de associação entre as variáveis do fenótipo ligado aos parâmetros do quadro clínico (convulsões, eletroencefalograma e retardo mental) e as variáveis quantitativas (parâmetros bioquímicos associados ao diagnóstico e tratamento e os valores de ARP);
- Teste de Kruskal-Wallis: usado para verificar o grau de discriminação entre os fenótipos PKU clássica, PKU moderada e PKU leve, considerando os níveis de Phe pré e durante o tratamento, tolerância à dieta e os valores da ARP. O teste de Dunn foi aplicado para testar o grau de significância entre estas variáveis;
- Teste de MacNemar: usado para correlacionar o genótipo observado nos nossos pacientes com o genótipo do Banco de Dados do Consórcio de Análise Mutacional do Gene da PAH (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

As frequências das mutações encontradas foram calculadas pela divisão do número de alelos portadores das mesmas pelo número total de alelos pesquisados. Para a determinação dos valores percentuais, este coeficiente foi multiplicado por 100.

b) Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH:

Para analisar os parâmetros Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr em heterozigotos e indivíduos controles (situação de jejum e após a sobrecarga de aspartame), foi utilizado o teste "t" de Student para amostras pareadas e independentes ou então sua variável t', quando as variâncias diferiram significativamente (Snedecor e Cochran, 1973).

4. RESULTADOS

4.1 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO FREQUENTE (V388M)

A mutação V388M é causada por uma transição de guanina para adenina na posição 1162 do gene da PAH, levando à substituição do aminoácido valina por metionina na posição 388 da proteína. A presença desta mutação causa a perda do sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição *BsaA1*.

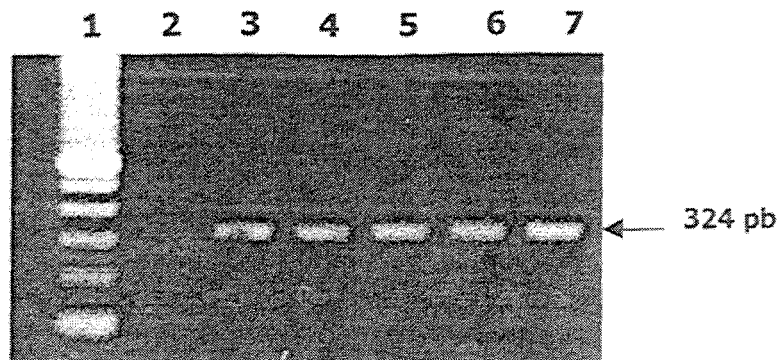
O fragmento 11 que engloba o exon 11 e regiões adjacentes foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PKU 11A e PKU 11B (tabela 3.3). Os produtos amplificados correspondentes a 324 pb foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v) para a confirmação da presença do fragmento esperado (figura 4.1a).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *BsaA1* e analisados em gel de agarose 2,0% (p/v). Esta enzima cliva o fragmento de 324 pb em dois fragmentos menores de 188 pb e 136 pb na presença do alelo normal. Na presença da mutação, o fragmento original permanece intacto.

Desta forma, um indivíduo homocigoto para a sequência normal apresenta os 2 fragmentos menores, um indivíduo heterocigoto apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR intacto e os 2 fragmentos menores) e um indivíduo homocigoto para a sequência mutante apresenta apenas o fragmento de 324 pb.

Foram encontrados 3 pacientes portadores da mutação V388M na amostra estudada, sendo 1 homocigoto e 2 heterocigotos para a alteração em questão (figura 4.1b). A presença da mutação V388M nestes pacientes foi também confirmada por seqüenciamento direto.

A)



B)

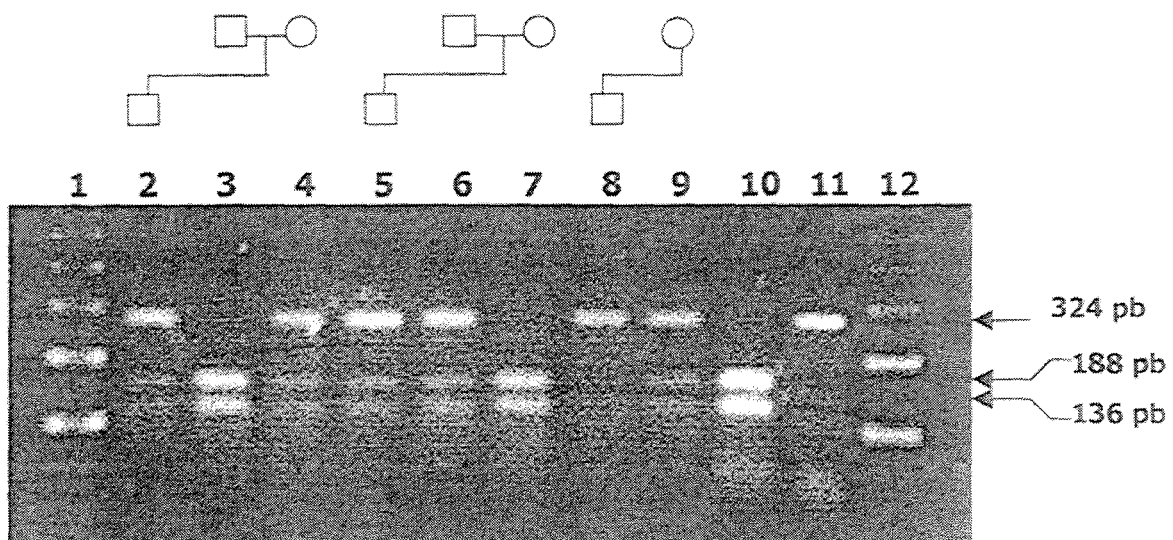


Figura 4.1: Detecção da mutação V388M. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *BsaA1* e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaletas 1 e 12: marcador de peso molecular de 123 pb; canaletas 2 e 5: pacientes com deficiência de PAH heterozigotos para esta mutação; canaletas 3 e 7: indivíduos heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH não portadores da mutação V388M; canaletas 4, 6 e 9: indivíduos heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH com a mutação V388M; canaleta 8: paciente com deficiência de PAH homozigoto para a mutação testada; canaleta 10: controle negativo; canaleta 11: produto de PCR não submetido à digestão.

4.2 - ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE DNA PELA TÉCNICA DE SSCP

4.2.1 - FRAGMENTO 1:

O fragmento 1, o qual engloba o exon 1 e suas regiões adjacentes 5' e 3,' foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PKU 1A e PKU 1B (tabela 3.3). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v) para verificar a amplificação do fragmento de 210 pb (figura 4.2a).

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Foi observado um paciente com deficiência de PAH com um padrão de migração diferente (canaleta 10) do observado em indivíduos controles (canaletas 1 e 2), indicando uma alteração na seqüência gênica deste paciente (figura 4.2b). A presença da mutação foi posteriormente confirmada através do seqüenciamento deste fragmento de DNA.

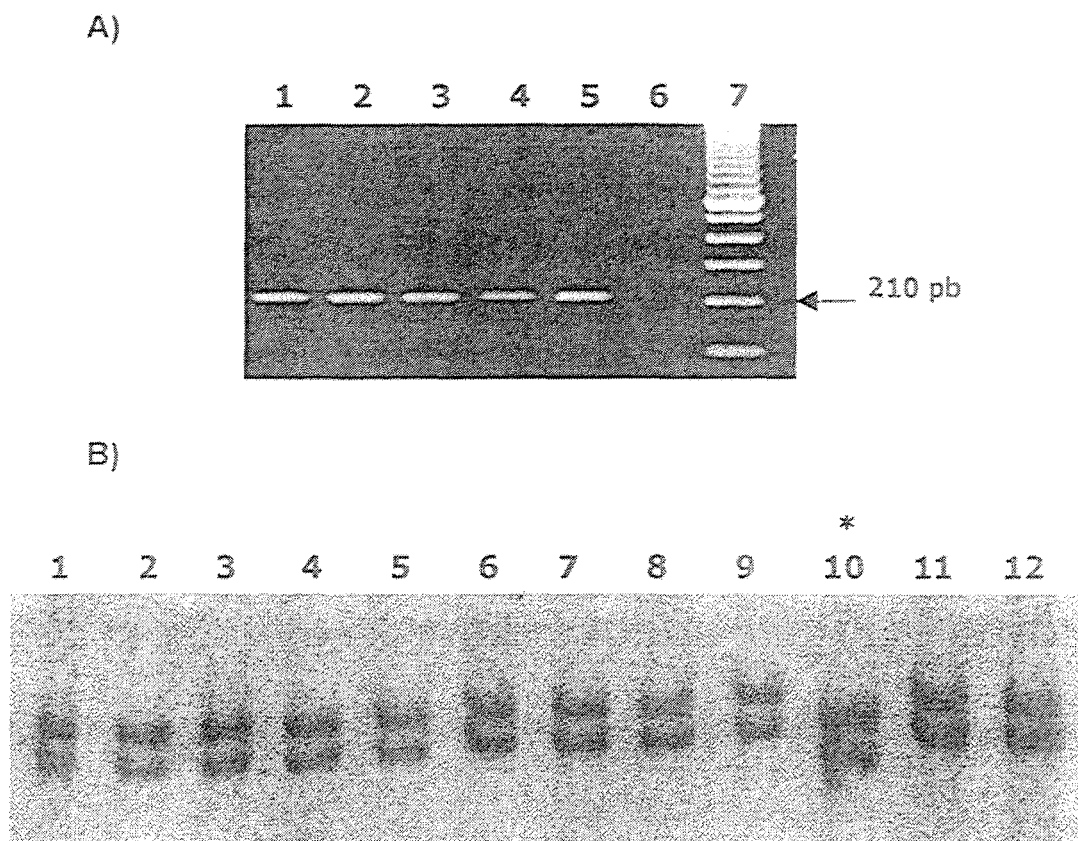


Figura 4.2: Análise por SSCP do fragmento 1. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaletas 1 a 5: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 6: controle negativo; canaleta 7: marcador de peso molecular de 100 pb. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3 a 9, 11 e 12: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaleta 10: paciente com deficiência de PAH que apresentou um padrão de migração alterado para este fragmento.

4.2.2 - FRAGMENTO 2:

Para a amplificação do fragmento 2, o qual abrange o exon 2 e suas regiões adjacentes 5' e 3', foram utilizados como iniciadores os oligonucleotídeos PKU 2A e PKU 2B (tabela 3.3). O produto amplificado apresenta 237 pb de DNA genômico (figura 4.3a).

Após a amplificação por PCR, os produtos obtidos de todos os pacientes foram submetidos à análise por SSCP. Neste fragmento, foram identificadas alterações na seqüência gênica de 10 pacientes, os quais apresentaram padrões de migração alterados e distintos entre si em comparação ao padrão observado na mesma seqüência dos indivíduos controles (figura 4.3b). Estas alterações foram posteriormente confirmadas através do seqüenciamento deste fragmento de DNA.

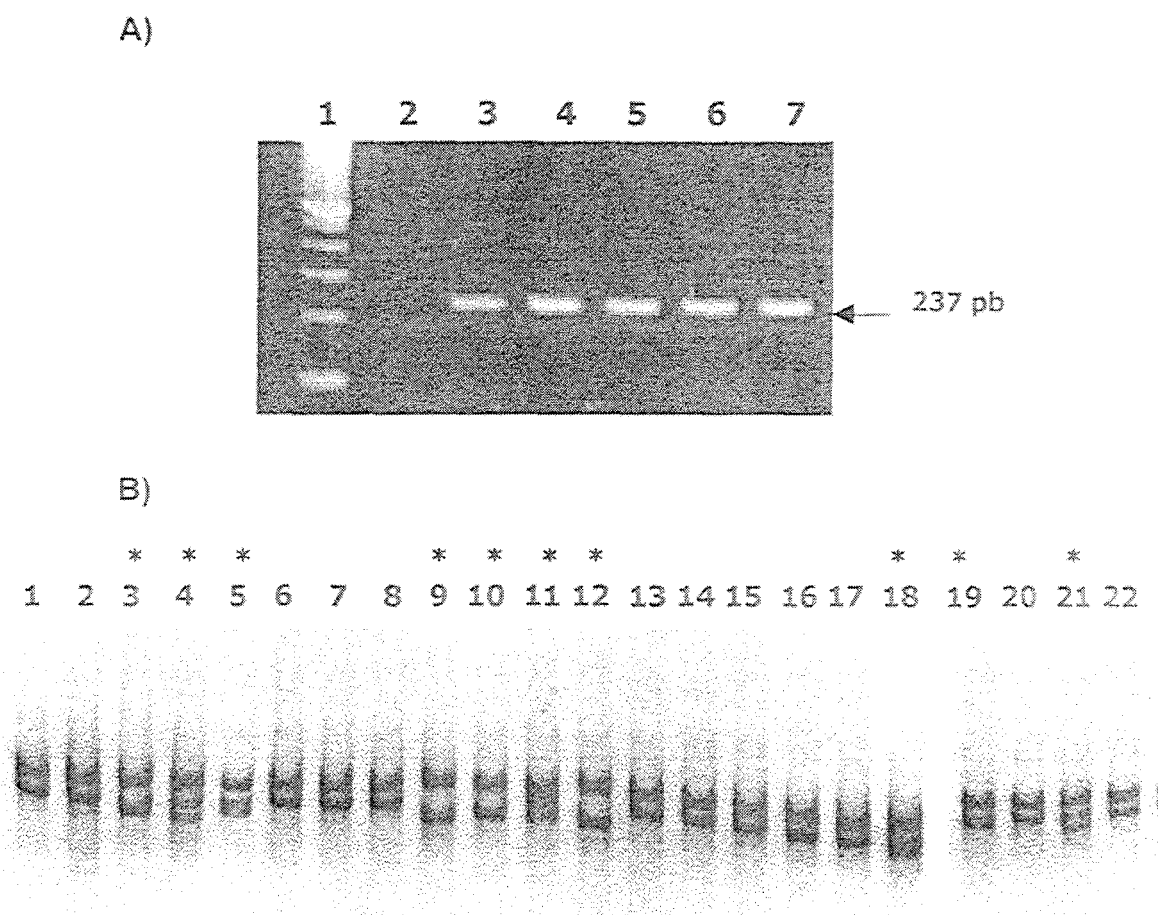


Figura 4.3: Análise por SSCP do fragmento 2. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3 a 5, 9 a 12, 18, 19 e 21: pacientes com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados; canaletas 6 a 8, 13 a 17, 20 e 22: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal.

4.2.3 - FRAGMENTO 3:

O fragmento 3, o qual engloba o exon 3 e suas regiões adjacentes 5' e 3', foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PKU 3A e PKU 3B (tabela 3.3). A análise eletroforética em gel de agarose 1,5% (p/v) dos produtos de PCR permitiu a visualização de um fragmento correspondente a 271 pb de DNA genômico (figura 4.4a).

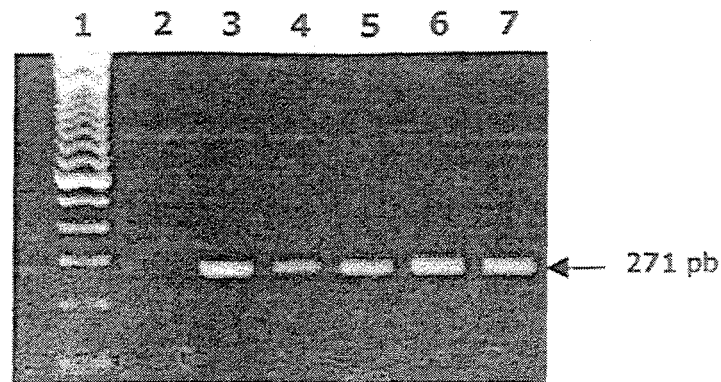
Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP, a qual foi realizada em 2 temperaturas diferentes (18°C e 4°C). Nas duas temperaturas testadas foi observado um paciente com padrão de migração alterado (canaleta 1 da figura 4.4b e canaleta 5 da figura 4.4c correspondem à mesma amostra) quando comparado ao padrão normal observado em indivíduos controles. Esta alteração foi posteriormente confirmada por seqüenciamento deste fragmento de DNA.

4.2.4 - FRAGMENTO 4:

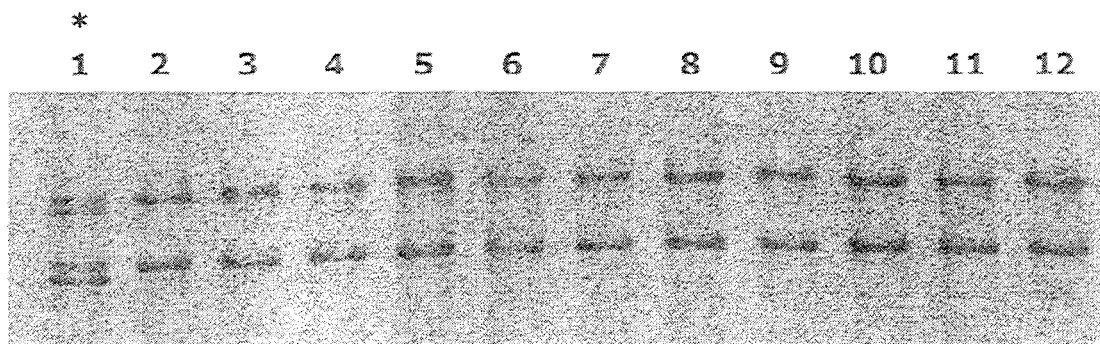
Os oligonucleotídeos iniciadores PKU 4A e PKU 4B (tabela 3.3) foram utilizados para a amplificação do fragmento 4 (exon 4 e suas regiões adjacentes 5' e 3'). A análise dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v) confirmou a amplificação do fragmento esperado de 145 pb (figura 4.5a). Neste caso, através do PCR foi possível a identificação de um paciente com produto de tamanho alterado (canaleta 3 da figura 4.5a), o qual pode ser melhor observado na figura 4.5b (canaleta 2).

A análise por SSCP dos produtos de PCR de todos os pacientes analisados, permitiu a identificação de um paciente com padrão de migração alterado (canaleta 13, figura 4.5c) em relação ao padrão observado em indivíduos controles, indicando uma alteração na seqüência gênica deste paciente. Esta amostra é a mesma observada nas figuras 4.5a e 4.5b e a presença de uma mutação foi posteriormente confirmada através do seqüenciamento deste fragmento de DNA.

A)



B)



C)

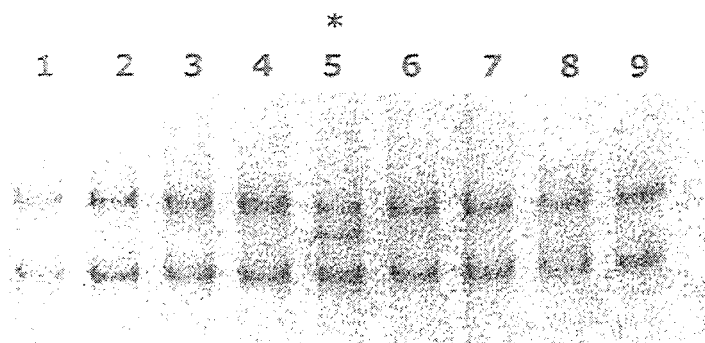


Figura 4.4: Análise por SSCP do fragmento 3. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) a 18°C e corado com nitrato de prata. Canaleta 1: paciente com deficiência de PAH que apresentou padrão de migração alterado; canaletas 2 a 9: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 10 a 12: controles negativos. C) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) a 4°C e corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 4, 6 e 7: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal para este fragmento; canaleta 5: paciente com deficiência de PAH que apresentou padrão de migração alterado; canaletas 8 e 9: controles negativos.

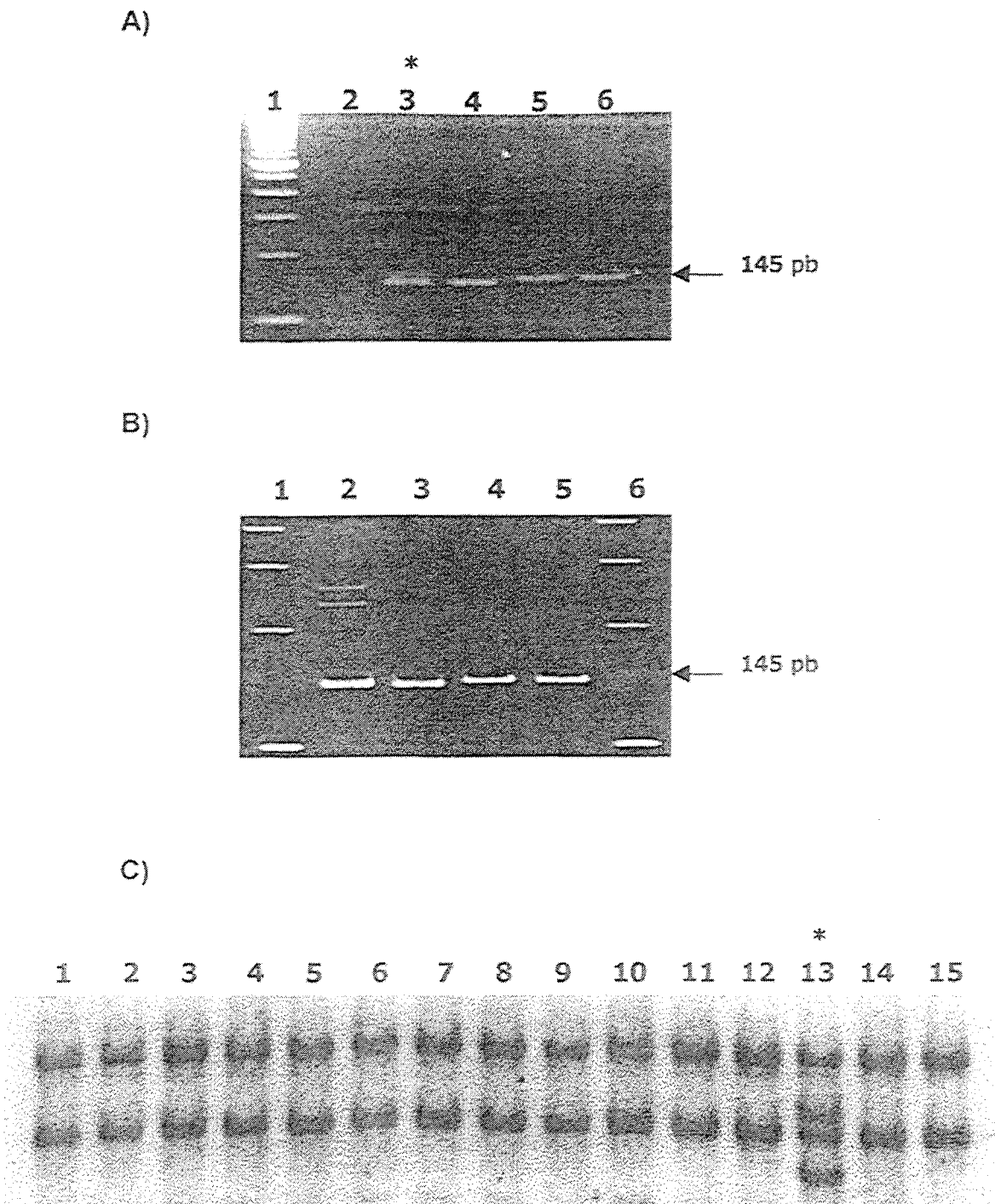


Figura 4.5: Análise por SSCP do fragmento 4. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaleta 3: produto de PCR de tamanho alterado para um paciente com deficiência de PAH; canaleta 4: heterozigoto obrigatório para a deficiência de PAH (mãe do paciente representado na canaleta 3); canaletas 5 e 6: produtos de PCR de tamanho esperado para os pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de poliácridamida 8,0% (v/v) e corado com brometo de etídio. Canaletas 1 e 6: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: paciente com deficiência de PAH; canaleta 3: heterozigoto obrigatório para a deficiência de PAH (mãe do paciente representado na canaleta 2); canaletas 4 e 5: indivíduos normais. C) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliácridamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3 a 12, 14 e 15: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaleta 13: paciente com deficiência de PAH que apresentou um padrão de migração alterado.

4.2.5 - FRAGMENTO 5:

Para a amplificação do fragmento 5 (o exon 5 e suas regiões adjacentes 5' e 3') foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 5A e PKU 5B (tabela 3.3), os quais produzem um fragmento de 266 pb após a reação de PCR. Os resultados da reação de amplificação podem ser observados na figura 4.6a.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Neste fragmento, foi identificado um paciente com um padrão de migração alterado (canaleta 7, figura 4.6b) em relação ao padrão observado em indivíduos controles, indicando uma alteração na seqüência gênica deste paciente. A presença de uma mutação foi posteriormente confirmada por seqüenciamento deste fragmento de DNA.

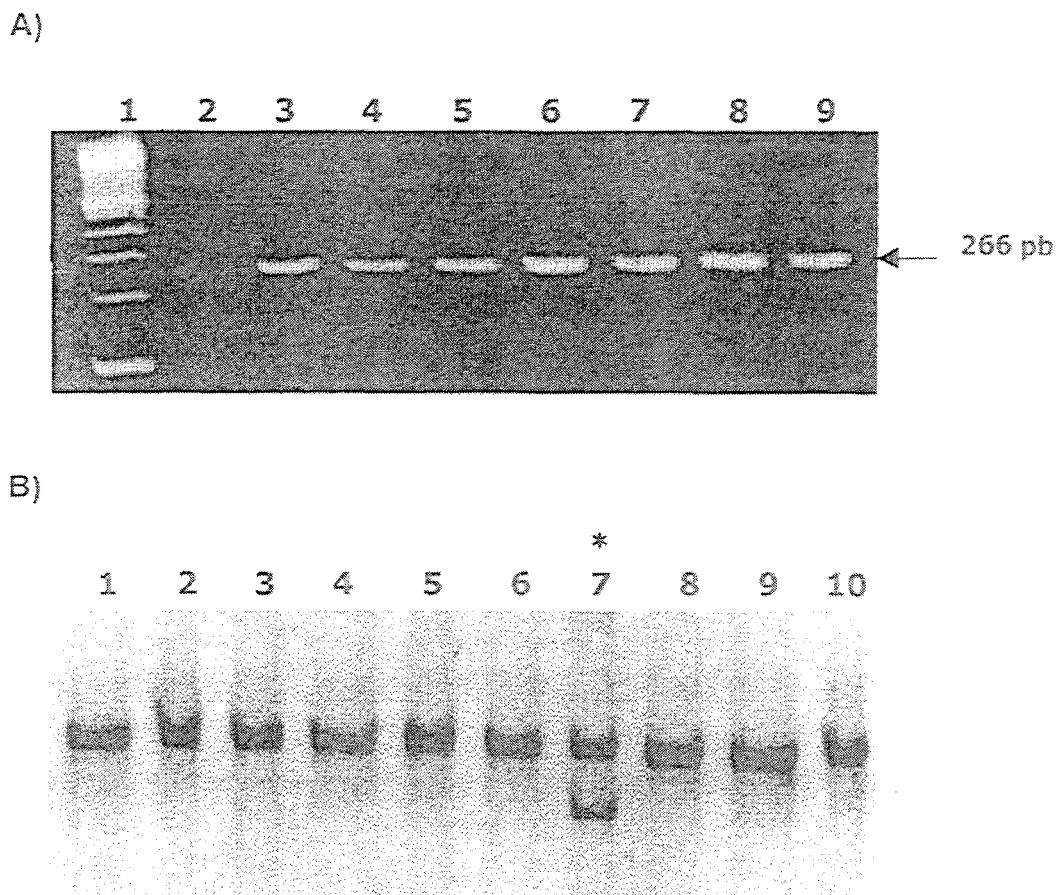


Figura 4.6: Análise por SSCP do fragmento 5. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 9: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliácridamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 6 e 8: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaleta 7: paciente com deficiência de PAH que apresentou padrão de migração alterado; canaletas 9 e 10: controles negativos.

4.2.6 - FRAGMENTO 6:

Para a amplificação do fragmento 6 (exon 6 e suas regiões adjacentes 5' e 3') foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 6A e PKU 6B (tabela 3.3), os quais produzem um fragmento de 270 pb após a reação de PCR. Os resultados da reação de amplificação podem ser observados na figura 4.7a.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Não foram encontradas alterações neste fragmento (figura 4.7b).

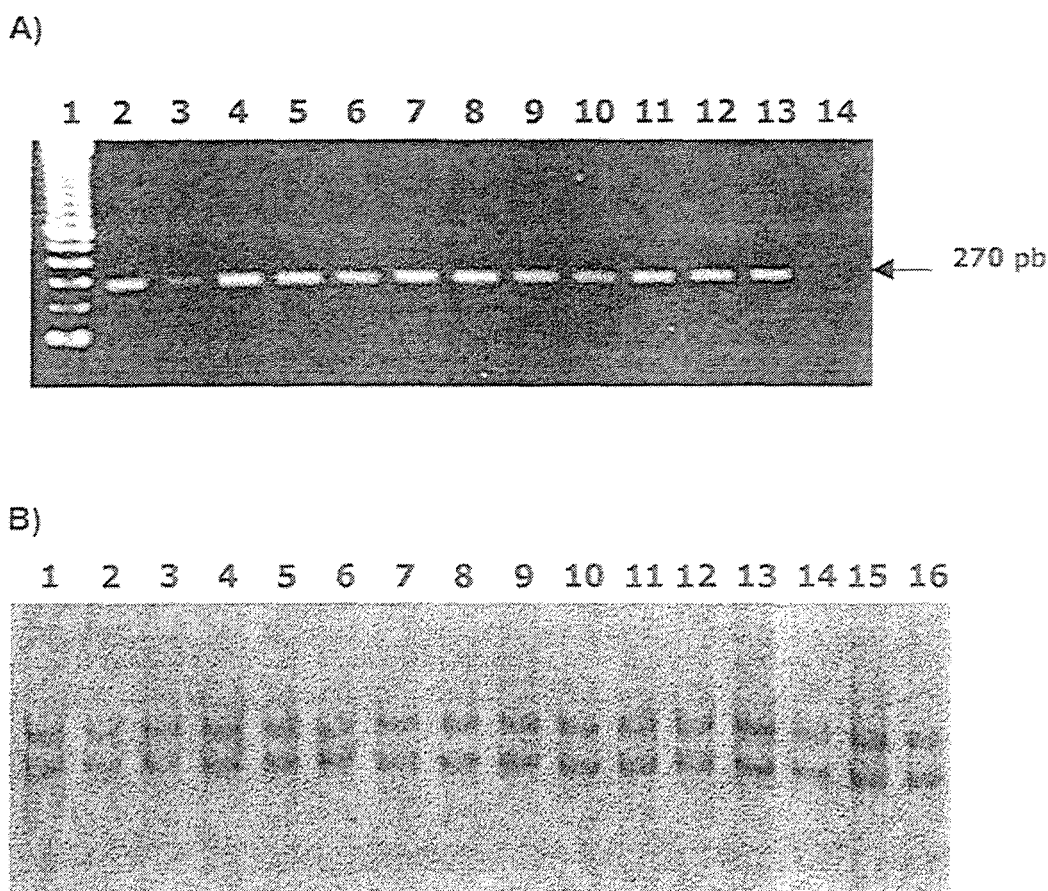


Figura 4.7: Análise por SSCP do fragmento 6. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 3 a 13: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 14: controle negativo. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 14: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 15 e 16: controles negativos.

4.2.7 - FRAGMENTO 7:

Para a amplificação do fragmento 7, o qual engloba o exon 7 e suas regiões adjacentes 5' e 3', foram utilizados como iniciadores os oligonucleotídeos PKU 7A e PKU 7B (tabela 3.3). O produto amplificado por estes *primers* apresenta 274 pb de DNA genômico (figura 4.8a).

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Esta técnica proporcionou a identificação de alterações na seqüência gênica de 15 pacientes, os quais apresentaram padrões de migração alterados e, alguns deles, distintos entre si, quando comparados ao padrão observado na mesma seqüência gênica de indivíduos controles (figura 4.8b). Estas alterações foram posteriormente confirmadas através da análise por digestão com enzimas de restrição e/ou seqüenciamento deste fragmento de DNA.

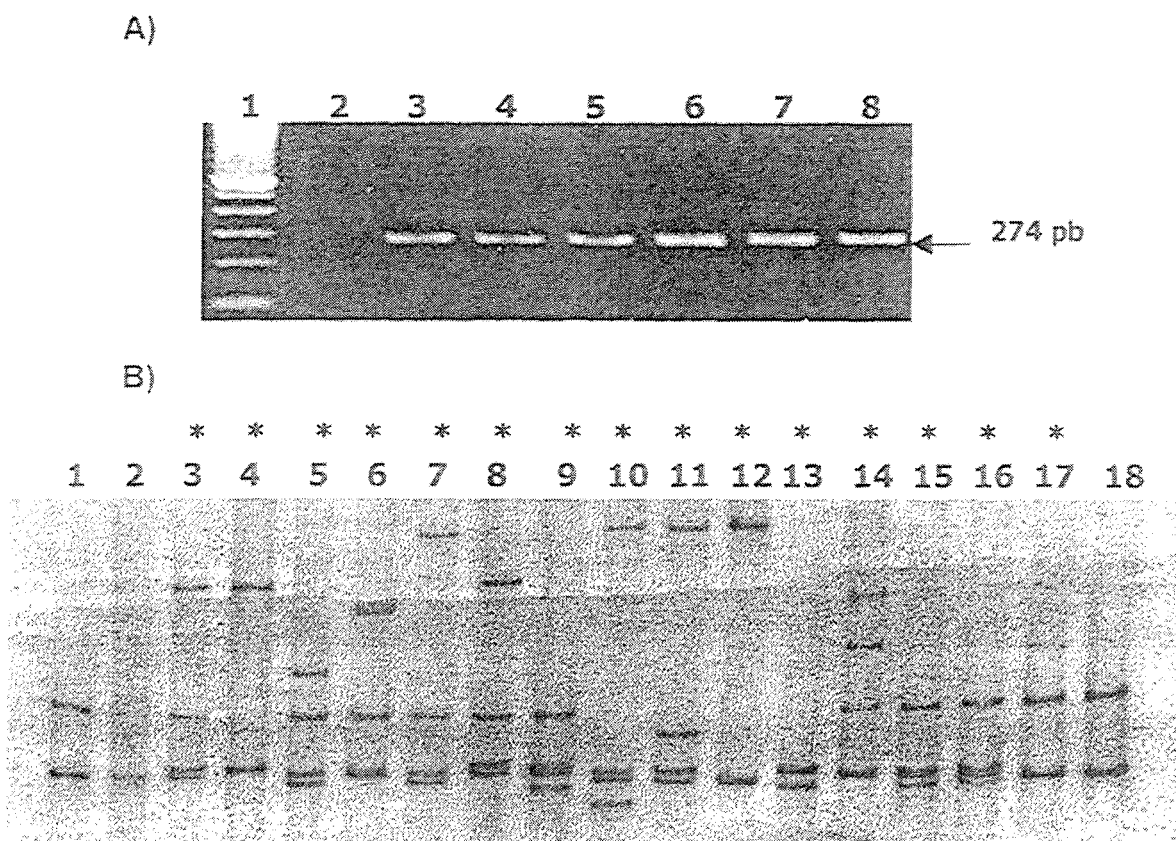


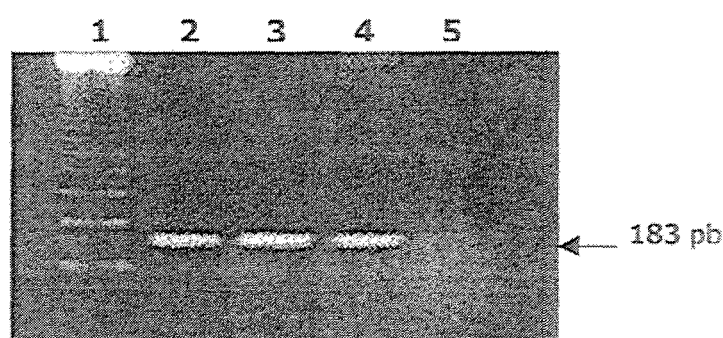
Figura 4.8: Análise por SSCP do fragmento 7. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 8: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1, 2 e 18: controles negativos; canaletas 3 a 17: pacientes com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados.

4.2.8 - FRAGMENTO 8:

Para a amplificação do fragmento 8 (exon 8 e suas regiões adjacentes 5' e 3') foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 8A e PKU 8B (tabela 3.3), os quais produzem um fragmento de 183 pb após a reação de PCR. Os resultados da reação de amplificação podem ser observados na figura 4.9a.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Não foram encontradas alterações neste fragmento (figura 4.9b).

A)



B)

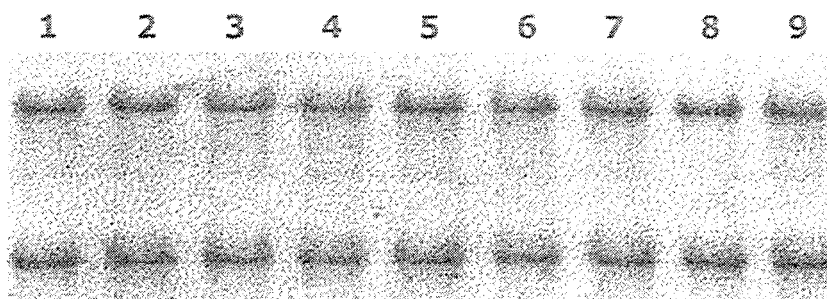


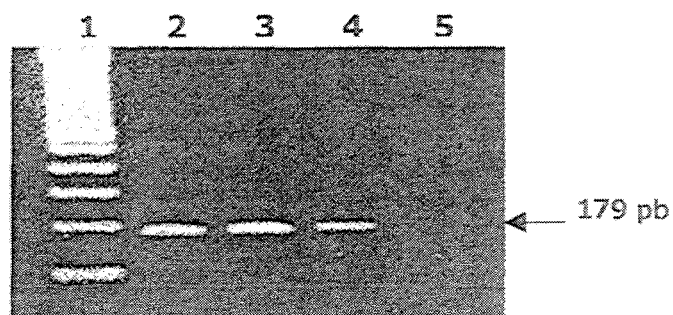
Figura 4.9: Análise por SSCP do fragmento 8. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 123 pb; canaletas 2 a 4: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 5: controle negativo. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3 a 9: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal.

4.2.9 - FRAGMENTO 9:

Para a amplificação do fragmento 9 (exon 9 e suas regiões adjacentes 5' e 3') foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 9A e PKU 9B (tabela 3.3), os quais produzem um fragmento de 179 pb após a reação de PCR. Os resultados da reação de amplificação podem ser observados na figura 4.10a.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Não foram encontradas alterações neste fragmento (figura 4.10b).

A)



B)

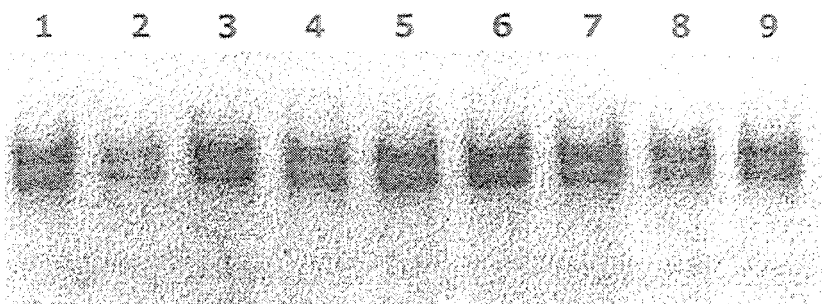


Figura 4.10: Análise por SSCP do fragmento 9. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 2 a 4: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 5: controle negativo. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 7: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 8 e 9: controles negativos.

4.2.10 - FRAGMENTO 10:

Para a amplificação do fragmento 10 (exon 10 e suas regiões adjacentes 5' e 3') foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 10A e PKU 10B (tabela 3.3), os quais produzem um fragmento de 250 pb após a reação de PCR. Os resultados da reação de amplificação podem ser observados na figura 4.11a.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Não foram encontradas alterações neste fragmento (figura 4.11b).

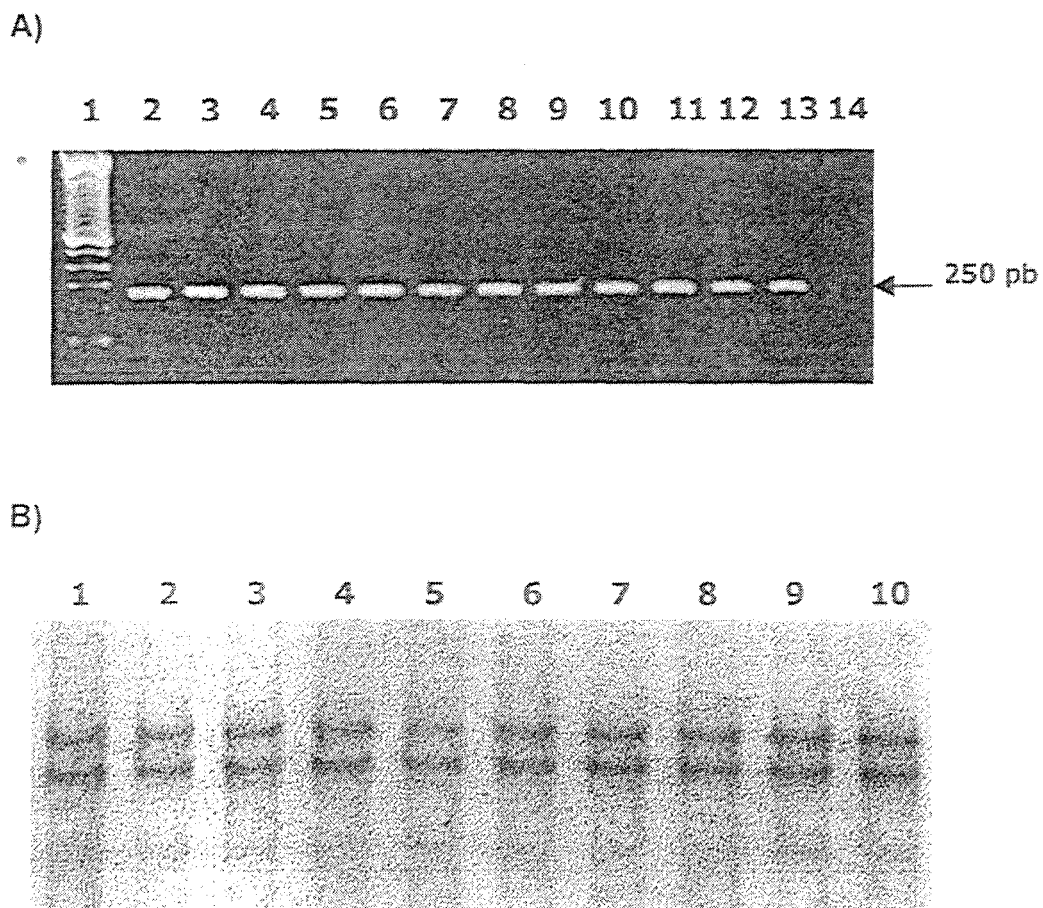


Figura 4.11: Análise por SSCP do fragmento 10. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 2 a 13: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 14: controle negativo. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 8: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 9 e 10: controles negativos.

4.2.11 - FRAGMENTO 11:

O fragmento 11 (exon 11 e suas regiões adjacentes) foi amplificado utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos PKU 11A e PKU 11B (tabela 3.3). A análise dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v) comprovou a presença de um fragmento de 324 pb (figura 4.1a).

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP, permitindo a identificação de alterações na seqüência gênica de 3 pacientes, os quais apresentaram padrões de migração alterados (figura 4.12). Estas alterações foram posteriormente confirmadas por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento deste fragmento de DNA.

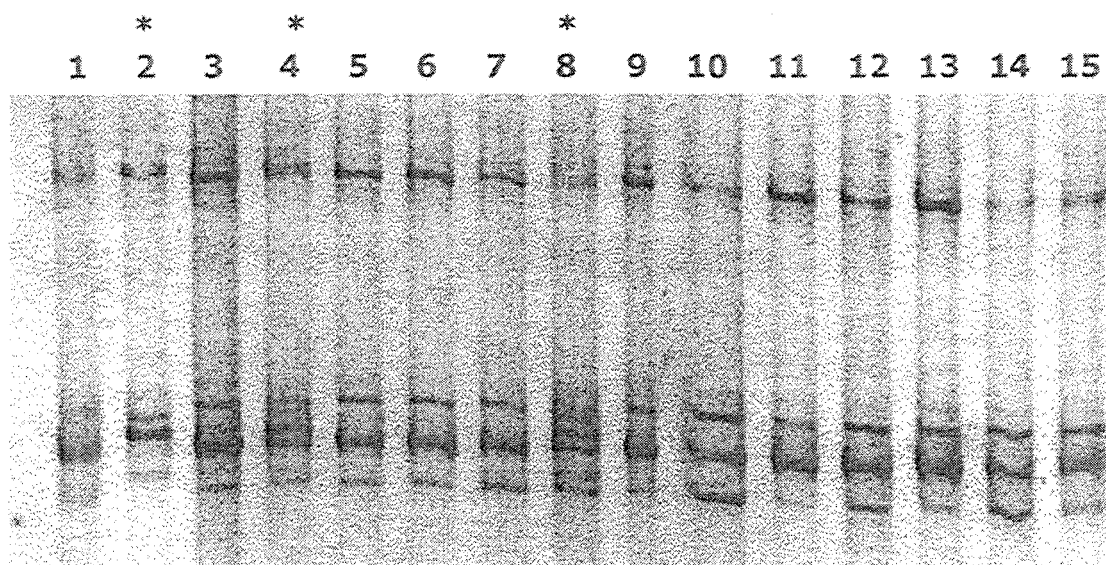


Figura 4.12: Análise por SSCP do fragmento 11. Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1, 3, 5 a 7, 9 a 13: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 2, 4 e 8: pacientes com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados; canaletas 14 e 15: controles negativos.

4.2.12 - FRAGMENTO 12:

Para a amplificação do fragmento 12, o qual compreende o exon 12 e suas regiões adjacentes 5' e 3', foram utilizados como iniciadores os *primers* PKU 12A e PKU 12B (tabela 3.3). O produto amplificado apresenta 239 pb de DNA genômico que pode ser observado na figura 4.13a.

A análise por SSCP permitiu a identificação de alterações na seqüência gênica de 7 pacientes, os quais apresentaram padrões de migração alterados em relação ao padrão observado na mesma seqüência gênica de indivíduos controles (figura 4.13b e 4.13c). A presença de mutações foi posteriormente confirmada por digestão com enzimas de restrição ou seqüenciamento deste fragmento de DNA.

4.2.13 - FRAGMENTO 13:

Para a amplificação do fragmento 13, o qual abrange o exon 13 e suas regiões adjacentes 5'e 3', foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PKU 13A e PKU 13B (tabela 3.3). O produto amplificado apresenta 170 pb de DNA genômico (figura 4.14a).

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Através desta técnica foi possível identificar alterações na seqüência gênica de 5 pacientes, os quais apresentaram padrões de migração diferentes e distintos entre si em comparação ao padrão observado na mesma seqüência gênica de indivíduos controles (figuras 4.14b). A presença destas alterações foi posteriormente confirmada através do seqüenciamento deste fragmento de DNA.

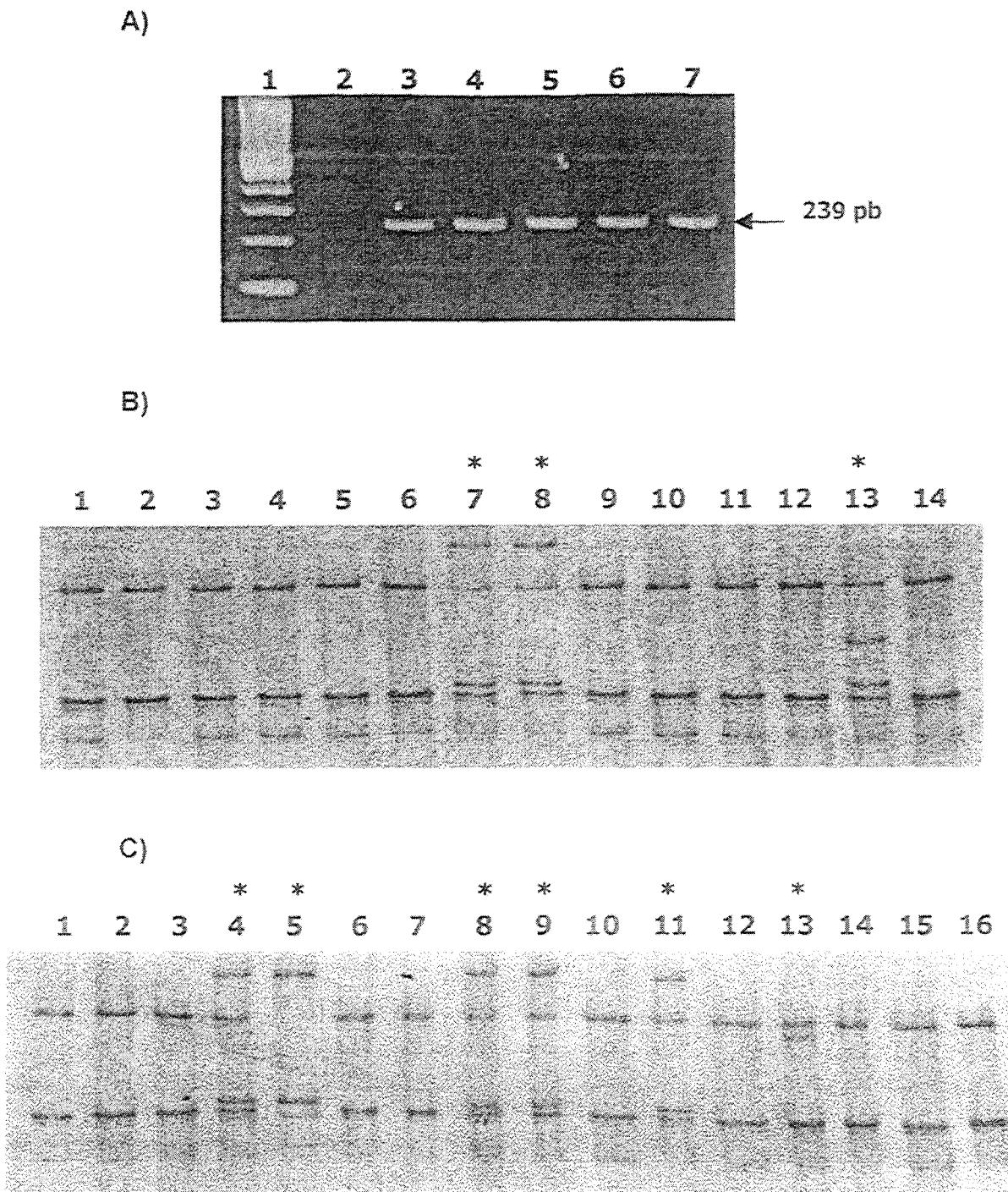


Figura 4.13: Análise por SSCP do fragmento 12. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3 a 6, 9 a 12 e 14: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 7, 8 e 13: paciente com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados. C) Canaletas 1 e 2: controles negativos; canaletas 3, 6, 7, 10, 12, 14 a 16: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal; canaletas 4, 5, 11 e 13: paciente com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados; canaletas 8 e 9: pacientes com deficiência de PAH com padrões de migração alterados e correspondentes aos pacientes nas canaletas 7 e 8 da figura 4.13b.

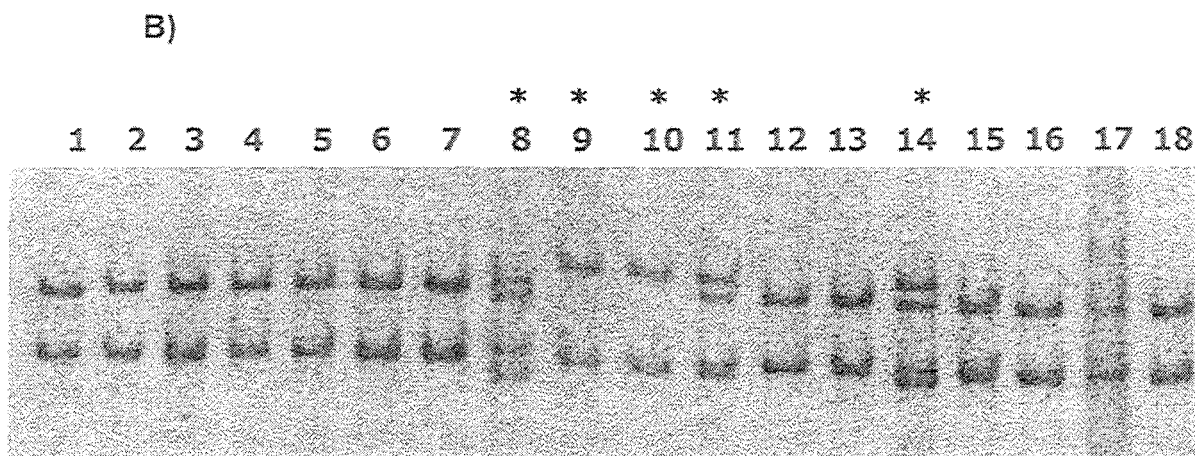
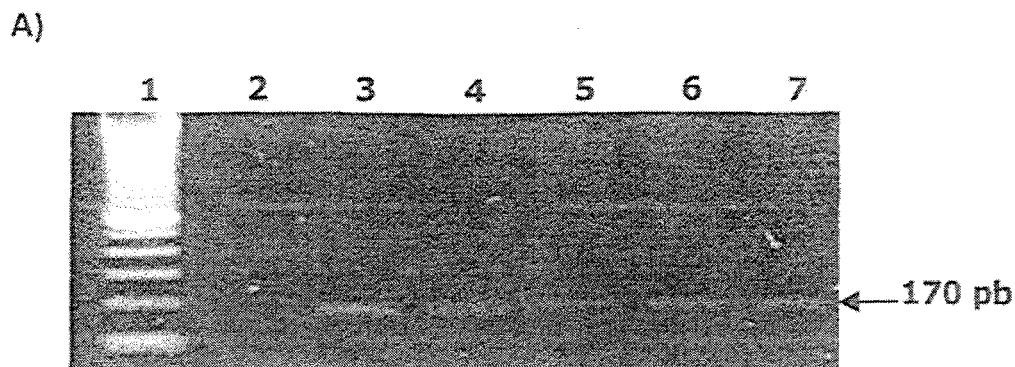


Figura 4.14: Análise por SSCP do fragmento 13. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida (contendo MDE) corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 7, 12, 13, 15 e 16: pacientes com deficiência de PAH com padrão de migração normal neste fragmento; canaletas 8 a 11 e 14: paciente com deficiência de PAH que apresentaram padrões de migração alterados; canaletas 17 e 18: controles negativos.

4.2.14 - RESUMO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PELA TÉCNICA DE SSCP

Os resultados obtidos pela análise de SSCP estão resumidos na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Distribuição das alterações no gene da PAH identificadas por SSCP.

Fragmento	Número de Pacientes	Número de padrões de migração alterados observados
1	1	1
2	10	3
3	1	1
4	1	1
5	1	1
6	-	-
7	15	11
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	3	2
12	7	4
13	5	3

4.3 - DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ESPECÍFICAS

Para esta etapa do estudo, foram selecionadas mutações que apresentam frequências elevadas em populações da Europa, principalmente da Península Ibérica, Itália, Alemanha e, em um menor número, da Polônia. Estas alterações localizam-se nos exons 3, 7, 11 e 12.

Após a análise de SSCP, os fragmentos amplificados contendo os exons 3, 7, 11 e 12, que apresentaram padrões de migração alterados, foram submetidos à análise por digestão com enzimas de restrição específicas.

4.3.1 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO I65T:

A mutação I65T é causada por uma transição de timina para citosina na posição 194 do gene da PAH, levando à substituição do aminoácido isoleucina por treonina no resíduo 65 da proteína. A presença desta mutação causa a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *Taq1*.

Para a detecção da mutação I65T, um fragmento contendo as regiões adjacentes à alteração foi amplificado utilizando os *primers* PKU 3A e PKU 3C (tabela 3.3), os quais amplificam uma região do exon 3 correspondente a um fragmento de 92 pb. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 2,5% (p/v) para a confirmação da presença do fragmento esperado (figura 4.15a).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Taq1* e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Esta enzima cliva o fragmento de 92 pb em dois fragmentos menores de 72 pb e 20 pb na seqüência normal do gene da PAH. Na presença da mutação, como ocorre a perda do sítio de reconhecimento, o fragmento não é clivado.

Um indivíduo homozigoto para a seqüência normal apresenta 2 fragmentos menores, um indivíduo heterozigoto apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR intacto e os 2 fragmentos menores) e um indivíduo homozigoto para a seqüência mutante apresenta apenas o fragmento de 92 pb.

Nas amostras estudadas, foram encontrados 9 pacientes com a mutação I65T, sendo 2 homozigotos e 7 heterozigotos para a mesma. A figura 4.15b mostra os resultados obtidos em 2 pacientes com deficiência de PAH e seus familiares.

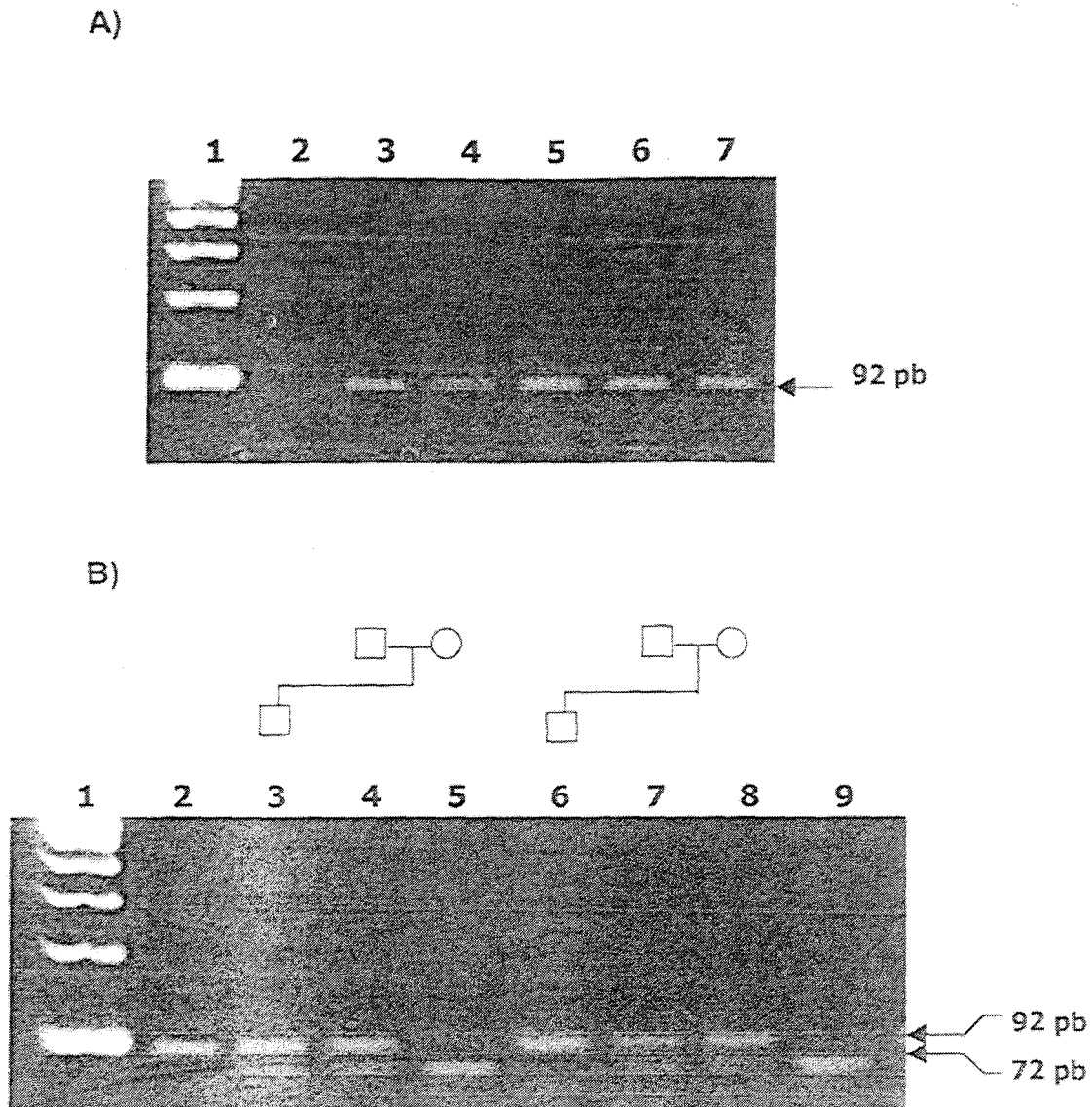


Figura 4.15: Detecção da mutação I65T. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,5% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: controle negativo; canaletas 3 a 7: pacientes com deficiência de PAH. B) Eletroforese dos produtos de digestão em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaleta 3: paciente com deficiência de PAH heterozigoto para a mutação I65T; canaletas 4, 7 e 8: indivíduos heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH com a mutação I65T; canaleta 5: indivíduo heterozigoto obrigatório não portador da mutação I65T; canaleta 6: paciente com deficiência de PAH homozigoto para esta mutação; canaleta 9: controle negativo.

4.3.2 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO R252W:

A mutação R252W, causada pela transição de citosina por timina na posição 754 do gene da PAH, origina a substituição de arginina por triptofano na posição 252 da proteína. Esta mutação causa a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *Ava1*.

Um fragmento de 274 pb, contendo as regiões adjacentes à alteração, foi amplificado utilizando os *primers* PKU 7A e PKU 7B (tabela 3.3 e figura 4.8a). Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Ava1* e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Na seqüência normal, esta enzima cliva o fragmento de 274 pb em dois fragmentos de 182 pb e 92 pb. Na presença da mutação, o fragmento não é clivado.

Um indivíduo homozigoto para a seqüência normal apresenta apenas os 2 fragmentos menores, um indivíduo heterozigoto apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR intacto e os 2 fragmentos menores) e um indivíduo homozigoto para a seqüência mutante apresenta apenas o fragmento de 274 pb.

A análise com a enzima de restrição *Ava1* permitiu a detecção de 1 paciente heterozigoto para a mutação R252W (figura 4.16).

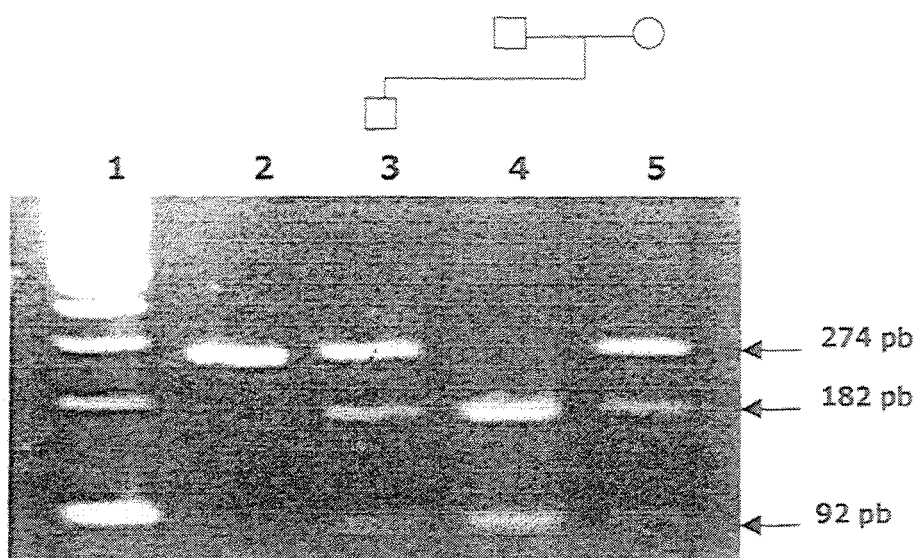


Figura 4.16: Detecção da mutação R252W. Após a amplificação do fragmento 7, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Ava1* e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaleta 3: paciente com deficiência de PAH heterozigoto para a seqüência mutante; canaleta 4: indivíduo heterozigoto obrigatório para a deficiência de PAH não portador da mutação R252W; canaleta 5: indivíduo heterozigoto obrigatório para a deficiência de PAH com a mutação R252W.

4.3.3 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO R261X:

A mutação R261X é causada pela transição de uma citosina por uma timina na posição 781 do gene da PAH, levando à formação de um códon de terminação no aminoácido 261 da proteína. A presença desta mutação cria um sítio de reconhecimento para a enzima *Dde1*.

Neste caso, o mesmo fragmento 7 (274 pb) foi amplificado e os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Dde1* e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Na seqüência normal do gene, o fragmento de 274 pb não é clivado pela enzima. Na presença da mutação, este fragmento é clivado em dois fragmentos de 156 pb e 118 pb.

Um indivíduo é homocigoto para a seqüência normal quando apresenta apenas o fragmento de 274 pb; um indivíduo é heterocigoto quando apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR e os 2 fragmentos menores); e um indivíduo é homocigoto para a seqüência mutante quando apresenta apenas os dois fragmentos menores. Esta análise permitiu a detecção de 4 pacientes com a mutação R261X, sendo 3 heterocigotos e 1 homocigoto (figura 4.17).

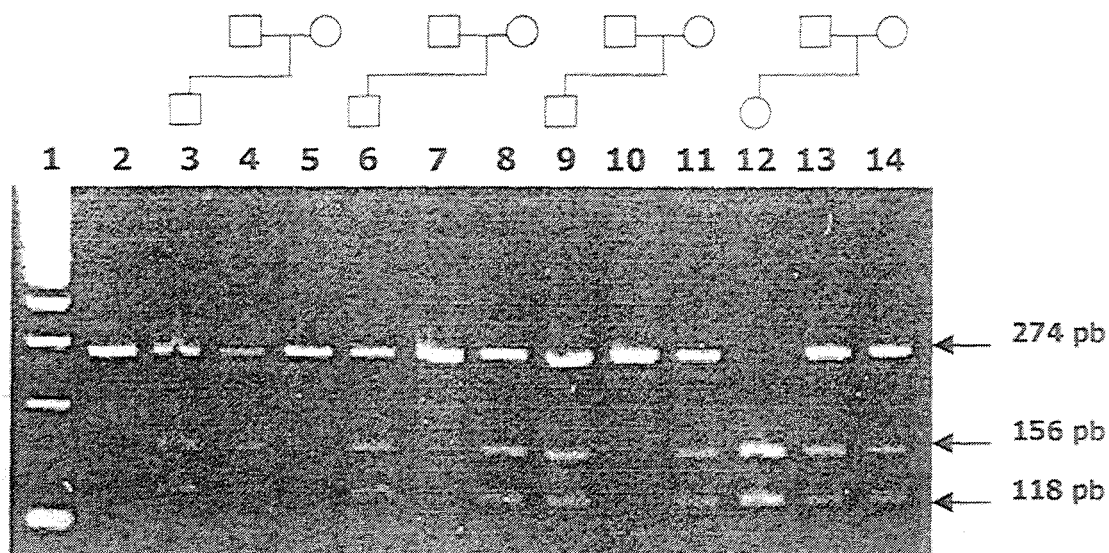


Figura 4.17: Detecção da mutação R261X. Após a amplificação do fragmento 7, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Dde1* e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaletas 3, 6 e 9: pacientes com deficiência de PAH heterocigotos para a mutação; canaletas: 4, 8, 11, 13 e 14: indivíduos heterocigotos obrigatórios portadores da mutação R261X; canaletas 5, 7 e 10: indivíduos heterocigotos obrigatórios não portadores desta mutação; canaleta 12: paciente com deficiência de PAH homocigoto para a seqüência mutante.

4.3.4 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO R261Q:

A mutação R261Q, causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 782 do gene da PAH, leva à substituição de arginina por glutamina na posição 261 da proteína. Esta mutação causa a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *Hinf*I.

Para a detecção desta mutação, o fragmento 7 foi amplificado e os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Hinf*I e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Na presença da seqüência normal, a enzima cliva o fragmento de 274 pb em fragmentos de 154 pb e 120 pb. Na presença da mutação, o fragmento de 274 pb não é clivado.

Um indivíduo homocigoto para a seqüência normal apresenta os 2 fragmentos menores, um indivíduo heterocigoto apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR e os 2 fragmentos) e um indivíduo homocigoto para a seqüência mutante apresenta apenas o fragmento de 274 pb.

Esta análise permitiu a detecção de 3 pacientes portadores da mutação R261Q, sendo 2 heterocigotos e 1 homocigoto para a alteração (figura 4.18).

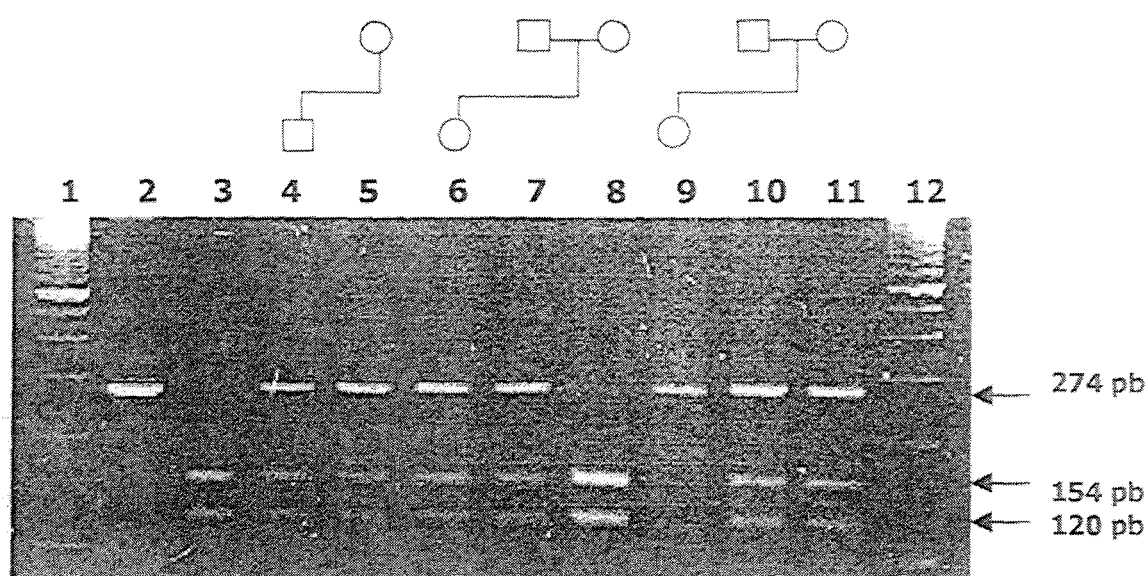


Figura 4.18: Detecção da mutação R261Q. Após a amplificação do fragmento 7, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Hinf*I e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaletas 1 e 12: marcadores de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 e 6: pacientes com deficiência de PAH heterocigotos para a mutação; canaletas 5, 7, 10 e 11: indivíduos heterocigotos obrigatórios portadores da mutação R261Q; canaleta 8: indivíduo heterocigoto obrigatório não portador da mutação R261Q; canaleta 9: paciente com deficiência de PAH homocigoto para a seqüência mutante.

4.3.5 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO IVS10nt-11g>a:

A mutação IVS10nt-11g>a é causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 1066 do gene da PAH. A presença desta mutação cria um sítio de reconhecimento para a enzima *Dde1*.

Um fragmento contendo as regiões adjacentes à alteração foi amplificado utilizando os *primers* PKU 11A e PKU 11B (tabela 3.3), correspondente a 324 pb. Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Dde1* e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Na presença da seqüência normal, o fragmento de 324 pb não é clivado pela enzima. Na presença da mutação, a enzima cliva o fragmento de 324 pb em 2 fragmentos de 244 pb e 80 pb.

Um indivíduo homozigoto para a seqüência normal apresenta o fragmento de 324 pb, um indivíduo heterozigoto apresenta os 3 fragmentos (o produto de PCR e os 2 fragmentos menores) e um indivíduo homozigoto para a seqüência mutante apresenta os 2 fragmentos menores.

A análise por digestão com a enzima *Dde1* permitiu a detecção de 1 paciente heterozigoto para a mutação IVS10nt-11g>a (figura 4.19).

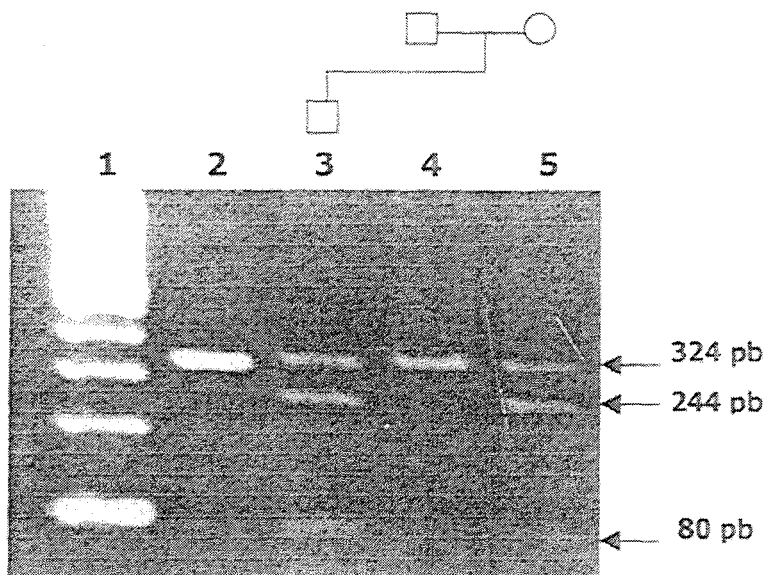


Figura 4.19: Detecção da mutação IVS10nt-11g>a. Após a amplificação do fragmento 11, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Dde1* e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaletas 3: paciente com deficiência de PAH heterozigoto para a mutação; canaleta 4: indivíduo heterozigoto obrigatório não portador da mutação; canaleta 5: indivíduo heterozigoto obrigatório portador da mutação IVS10nt-11g>a.

4.3.6 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO R408W:

A mutação R408W, causada pela transição de citosina por timina na posição 1222 do gene da PAH, origina a substituição de arginina por triptofano na posição 408 da proteína. A presença desta mutação cria um sítio de reconhecimento para a enzima *Sty1*.

O fragmento 12 (239 pb), o qual contém as regiões adjacentes à alteração, foi amplificado utilizando os *primers* PKU 12A e PKU 12B (tabela 3.3). Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Sty1* e analisados em gel de agarose 2,0% (p/v). Na presença da mutação, o fragmento de 239 pb é clivado em dois fragmentos de 145 pb e 94 pb. Na presença do alelo normal, o fragmento de 239 pb não é clivado.

Desta forma, um indivíduo é homocigoto para a seqüência normal quando apresenta apenas o fragmento de 239 pb; um indivíduo é heterocigoto quando apresenta os 3 fragmentos e um indivíduo é homocigoto para a seqüência mutante quando apresenta apenas os 2 fragmentos menores.

A análise com a enzima restrição *Sty1* permitiu a detecção de 5 pacientes portadores da mutação R408W, sendo 4 heterocigotos e 1 homocigoto para a mesma (figura 4.20).

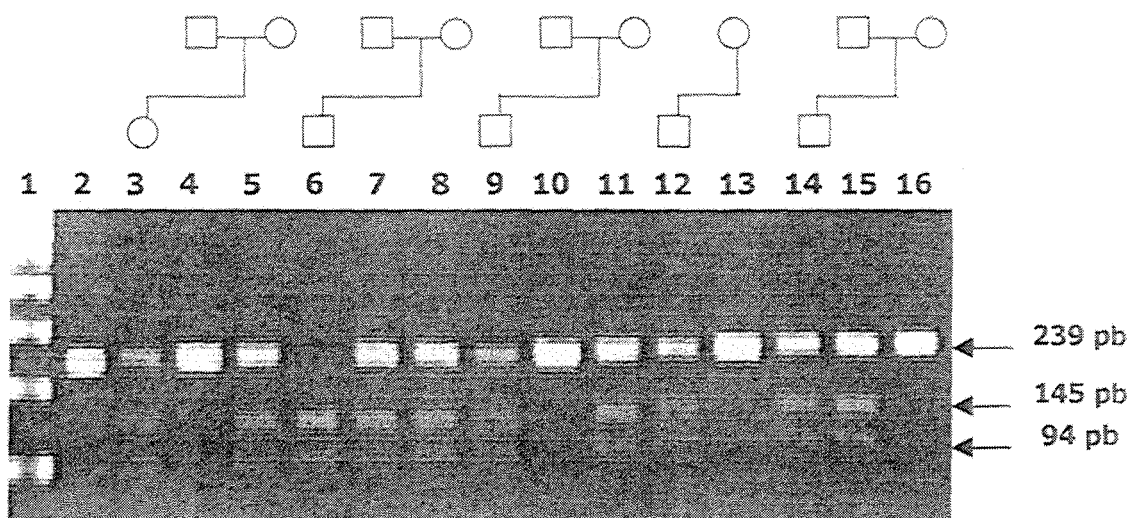


Figura 4.20: Detecção da mutação R408W. Após a amplificação do fragmento 12, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima *Sty1* e analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaletas 3, 9, 12 e 14: pacientes com deficiência de PAH heterocigotos para a seqüência mutante; canaletas 4, 10, 13 e 16: indivíduos heterocigotos obrigatórios não portadores da mutação; canaletas 5, 7, 8, 11 e 15: indivíduos heterocigotos obrigatórios portadores da mutação R408W; canaleta 6: paciente com deficiência de PAH homocigoto para a seqüência mutante.

4.3.7 - DETECÇÃO DA MUTAÇÃO IVS12nt1g>a:

A mutação IVS12nt1g>a é causada por uma transição de guanina para adenina na posição 1315 do gene da PAH. A presença desta mutação causa a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *Rsa1*.

Para a detecção da mutação IVS12nt1g>a, um fragmento de 211 pb contendo as regiões adjacentes à alteração foi amplificado utilizando os *primers* PKU 12A e PKU 12C (tabela 3.3). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 2,0% (p/v) para a confirmação da presença do fragmento esperado (figura 4.21a).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *Rsa1* e analisados em gel de agarose 3,0% (p/v). Na presença do alelo normal, esta enzima cliva o fragmento de 211 pb em dois fragmentos de 192 pb e 19 pb. Na presença da mutação, o fragmento de 211 pb não é clivado.

Desta forma, um indivíduo homozigoto para a seqüência normal apresenta 2 fragmentos menores, um indivíduo heterozigoto apresenta 3 fragmentos (o produto de PCR e os 2 fragmentos menores) e um indivíduo homozigoto para a seqüência mutante apresenta apenas o fragmento de 211 pb.

Foram encontrados 3 pacientes heterozigotos para a mutação IVS12nt1g>a na amostra estudada (figura 4.21b).

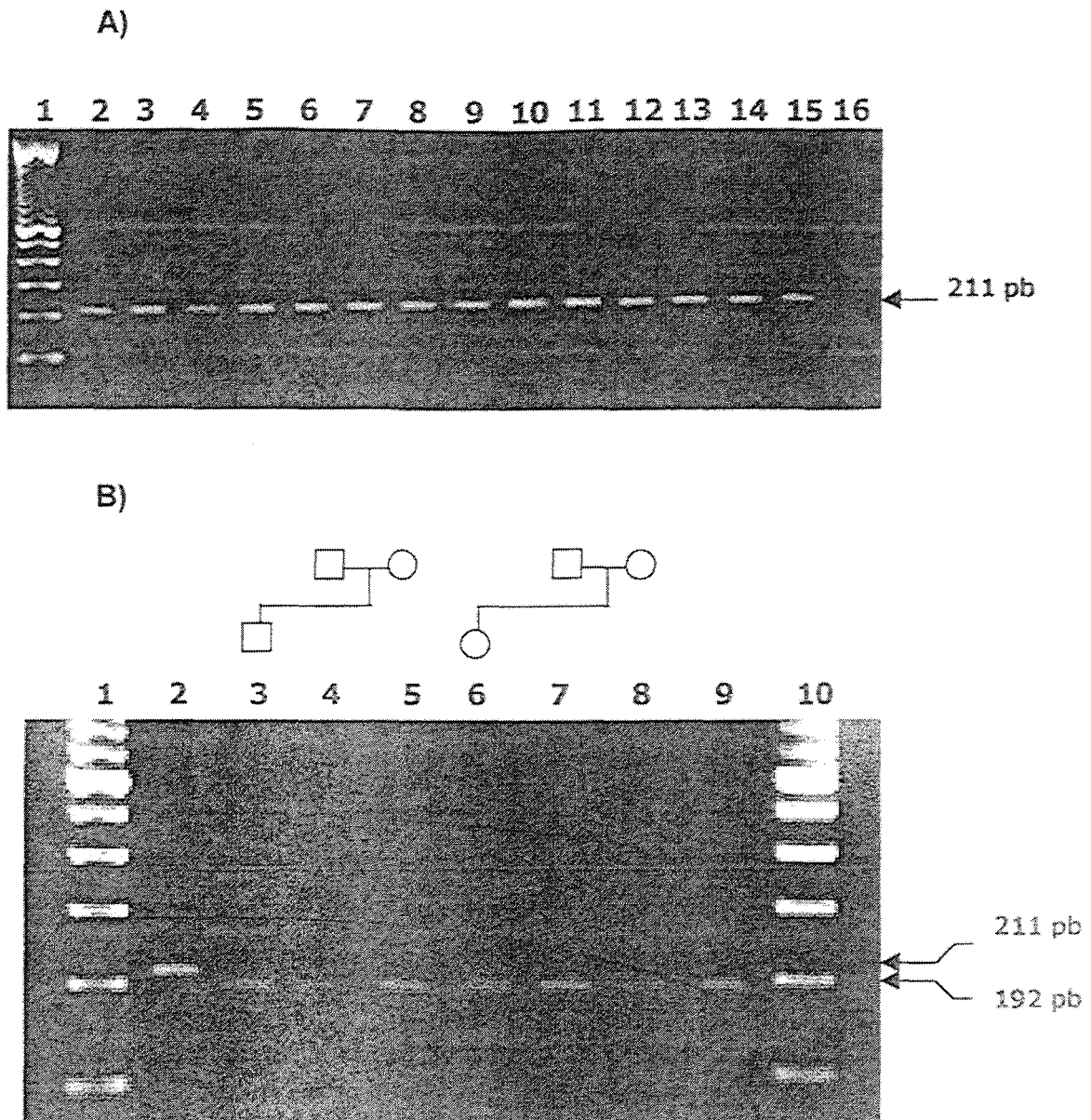


Figura 4.21: Detecção da mutação IVS12nt1g>a. A) Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 2 a 15: pacientes com deficiência de PAH; canaleta 16: controle negativo. B) Após a amplificação do fragmento 12, os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Rsa*I e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaletas 1 e 10: marcadores de peso molecular de 100 pb; canaleta 2: produto de PCR não submetido à digestão; canaletas 3 e 6: pacientes com deficiência de PAH heterozigotos para a seqüência mutante; canaletas 4 e 8: indivíduos heterozigotos obrigatórios portadores da mutação IVS12nt1g>a; canaletas 5, 7 e 9: indivíduos heterozigotos obrigatórios não portadores da mutação IVS12nt1g>a.

4.4 - SEQÜENCIAMENTO DIRETO DE FRAGMENTOS DO GENE DA PAH

As amostras que apresentaram padrões alterados no SSCP foram submetidas ao seqüenciamento direto de DNA (manual ou automático). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *Concert™ Rapid PCR Purification System* (Gibco-BRL Products).

4.4.1 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 1:

Na análise por SSCP do fragmento 1, foi observado uma amostra com padrão de migração alterado, conforme mostra a figura 4.2b. O fragmento com migração alterada foi seqüenciado a partir do *primer* PKU 1B (sentido reverso) e a mutação L15/S16fsdelCT foi identificada. Esta mutação é causada pela deleção de 2 nucleotídeos (citosina e timina) nas posições 47 e 48 do exon 1 do gene da PAH, respectivamente. O pacientes em questão é homozigoto para esta mutação (figura 4.22).

L15/S16fsdelCT

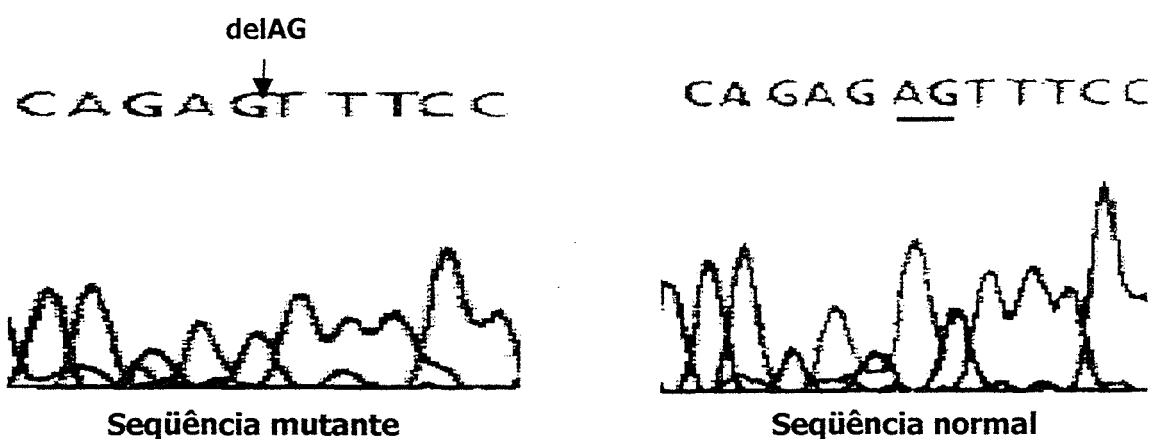
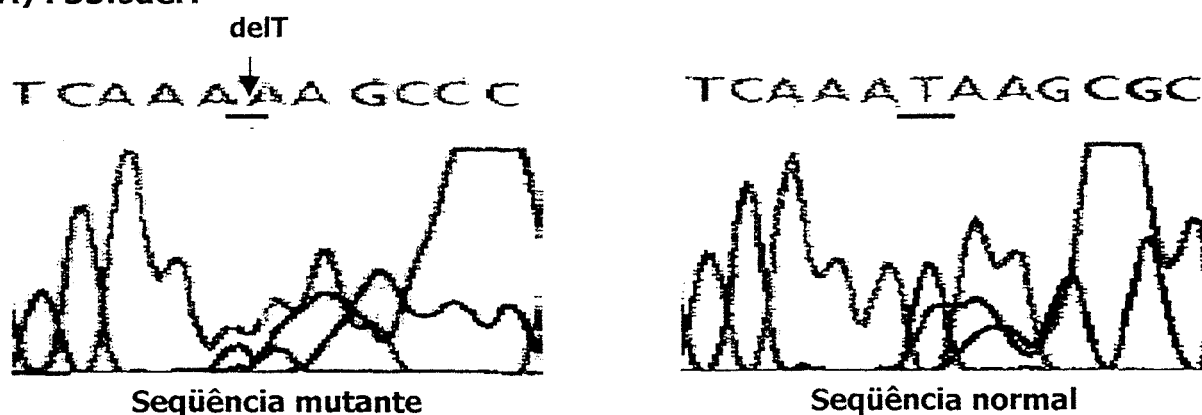


Figura 4.22: Seqüenciamento do fragmento 1 do gene da PAH: Identificação da mutação L15/S16fsdelCT no paciente 26.

4.4.2 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO FRAGMENTO 2:

Na análise por SSCP do fragmento 2, foram observadas 10 amostras com padrões de migração alterados (figura 4.3b). O fragmento 2 foi seqüenciado a partir do *primer* 2A e as mutações F55fsdelT e IVS2nt5g>c foram identificadas. A mutação F55fsdelT é causada pela deleção de um nucleotídeo (timina) na posição 165 do exon 2 do gene da PAH, levando a um códon de terminação prematuro no resíduo 60 da proteína. Foi encontrado um paciente com deficiência de PAH heterozigoto para a mutação F55fsdelT (figura 4.23a). A mutação IVS2nt5g>c é causada por transversão de uma guanina por uma citosina na posição 168+5g/c do íntron 2 do gene da PAH. Foram encontrados 4 pacientes com esta alteração, sendo 2 heterozigotos e 1 homozigoto para a seqüência mutante (figura 4.23b).

A) F55fsdelT



B) IVS2nt5g>c

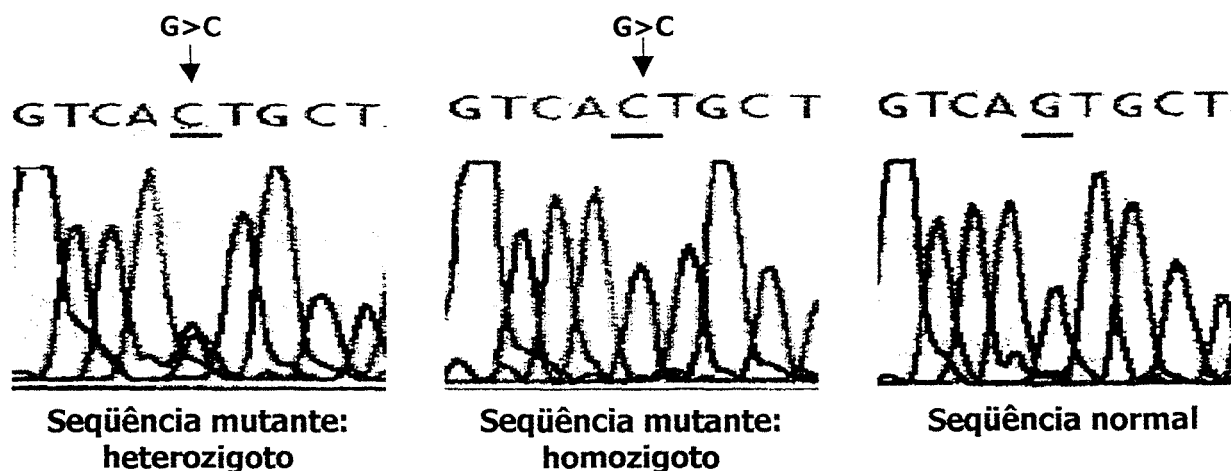


Figura 4.23: Seqüenciamento do fragmento 2 do gene da PAH: A) Identificação da mutação F55fsdelT no paciente 9; B) Identificação da mutação IVS2nt5g>c nos pacientes 2, 19 (heterozigotos), 7 e 10 (homozigotos).

4.4.3 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 3:

Na análise por SSCP do fragmento 3, foi observada uma amostra com padrão de migração alterado (figura 4.4b e 4.4c). O fragmento foi seqüenciado a partir do *primer* PKU 3B (sentido reverso) e a mutação IVS2nt-13t>g foi identificada. Esta alteração é causada por transversão de uma timina por uma guanina na posição 169-13t/g do íntron 2 do gene da PAH. Um paciente heterozigoto para esta mutação foi detectado (figura 4.24).

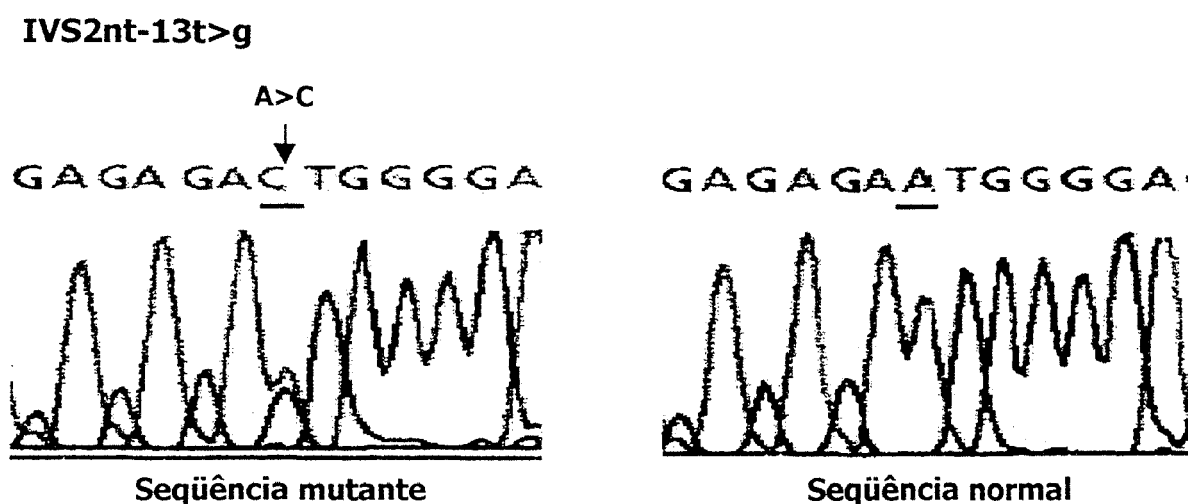


Figura 4.24: Seqüenciamento do fragmento 3 do gene da PAH: Identificação da mutação IVS2nt-13t>g no paciente 6.

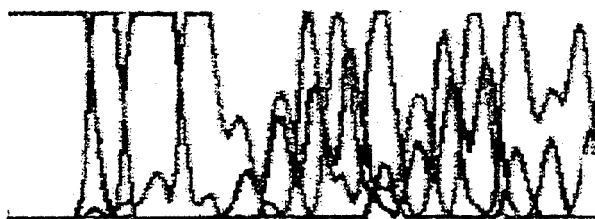
4.4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 4:

Na análise por SSCP do fragmento 4, foi observada uma amostra com padrão de migração alterado (figura 4.5b). O fragmento foi seqüenciado a partir do *primer* PKU 4A e a mutação N133/Q134fsdel4pb foi identificada. Esta mutação é causada por deleção de 4 pares de bases (ATCA) entre as posições 398 e 401 do exon 4. Foi observado um paciente heterozigoto para esta mutação (figura 4.25).

N133/Q134fsdelATCA

del ATCA

T TGCCAGIATTCTCA GCT



Seqüência mutante

TTGCCAA TCA GATTCTCA

Seqüência normal

Figura 4.25: Seqüenciamento do fragmento 4 do gene da PAH: Identificação da mutação N133/Q134fsdelATCA no paciente 16.

4.4.5 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 5:

Na análise por SSCP do fragmento 5, foi observada uma amostra com padrão de migração alterado (figura 4.6b). O fragmento foi seqüenciado a partir do *primer* PKU 5A e a mutação R158Q foi identificada. Esta alteração é causada por transição de uma guanina por uma adenina na posição 472 do exon 5, levando à substituição de arginina por glutamina no resíduo 158 da proteína. Foi observado um paciente heterozigoto para esta mutação (figura 4.26).

R158Q

G>A

A A G A C A G A A G C

Seqüência mutante

A A G A C G G A A G C

Seqüência normal

Figura 4.26: Seqüenciamento do fragmento 5 do gene da PAH: Identificação da mutação R158Q no paciente 14.

4.4.6 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO FRAGMENTO 7:

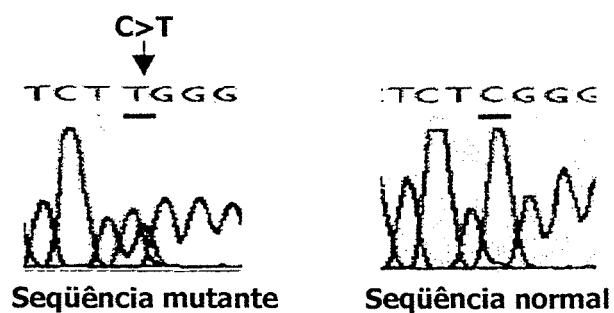
A análise por SSCP do fragmento 7 permitiu a identificação de 15 amostras com padrões de migração alterados (figura 4.8b), as quais foram submetidas ao seqüenciamento e os seguintes resultados foram encontrados:

- Um paciente heterozigoto para a mutação R252W. Esta alteração é causada por transição de citosina por timina na posição 754 do exon 7, a qual leva à substituição do aminoácido arginina por triptofano na posição 252 da proteína (figura 4.27a);
- Um paciente heterozigoto para a mutação R270K. Para a detecção desta mutação foi usado o *primer* 7B (sentido reverso). Esta mutação é causada por transição de guanina por adenina na posição 809 do exon 7, levando à substituição do aminoácido arginina por lisina na posição 270 da proteína (figura 4.27b);
- Dois pacientes heterozigotos para a mutação P281L. Esta mutação é causada por transição de citosina por timina na posição 842 do exon 7, levando à substituição de prolina por leucina no resíduo 281 da proteína (figura 4.27c);
- Um paciente heterozigoto para a mutação IVS7nt1g>a, causada por transição de guanina por adenina na posição 842+1g/a do íntron 7 (figura 4.27d).

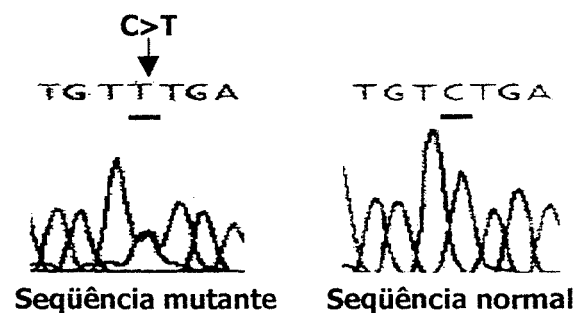
4.4.7 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 11:

Na análise por SSCP do fragmento 11, foram observadas 3 amostras com padrões de migração alterados (4.12a). Os fragmentos foram submetidos ao seqüenciamento a partir do *primer* PKU 11A. A presença da mutação V388M foi confirmada em 3 pacientes, sendo um homozigoto e dois heterozigotos para a seqüência mutante. Esta mutação é causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 1162 do exon 11, levando à substituição de valina por metionina no resíduo 388 da proteína (figura 4.28).

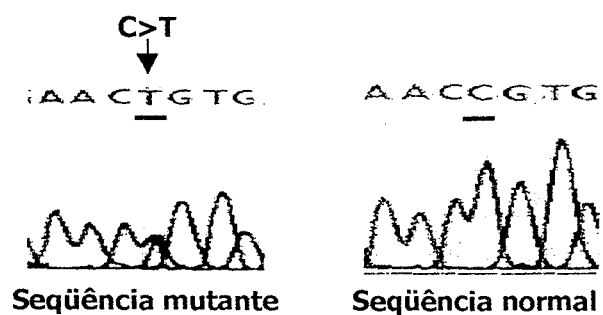
A) R252W



B) R270K



C) P281L



D) IVS7nt1g>a

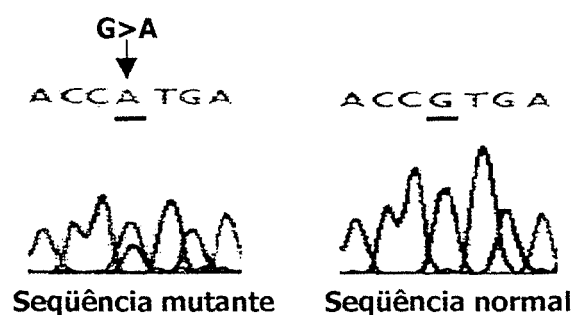


Figura 4.27: Seqüenciamento do fragmento 7 do gene da PAH: A) Identificação da mutação R252W no paciente 12; B) Identificação da mutação R270K no paciente 14; C) Identificação da mutação P281L nos pacientes 4 e 21.1; D) Identificação da mutação IVS7nt1g>a no paciente 22.

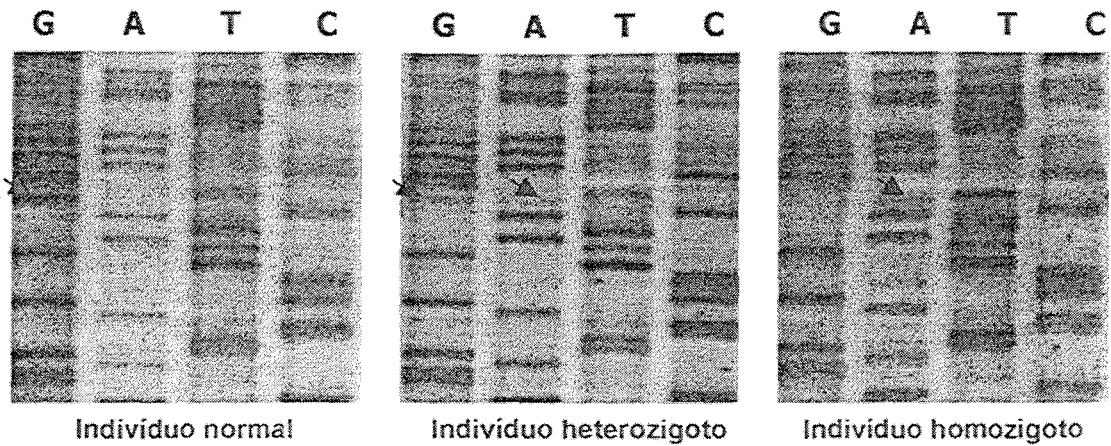


Figura 4.28: Seqüenciamento direto do fragmento 11: Identificação da mutação V388M. A seta indica o local da alteração (G>A). O indivíduo heterozigoto apresenta a guanina (G) e a adenina (A) na mesma posição. O indivíduo homozigoto apresenta apenas a adenina. Na seqüência normal, a guanina ocupa esta posição. A detecção desta mutação foi previamente realizada por digestão com enzimas de restrição específica (figura 4.1b).

4.4.8 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO FRAGMENTO 12:

Na análise por SSCP do fragmento 12, foram observadas 7 amostras com padrões de migração alterados (4.12a). Os fragmentos foram submetidos ao seqüenciamento a partir do *primer* PKU 12A e a mutação R408Q foi identificada. Esta mutação é causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 1223 do exon 12, levando à substituição de arginina por glutamina no resíduo 408 da proteína. Foi observado um paciente heterozigoto para a mutação em questão (figura 4.29).

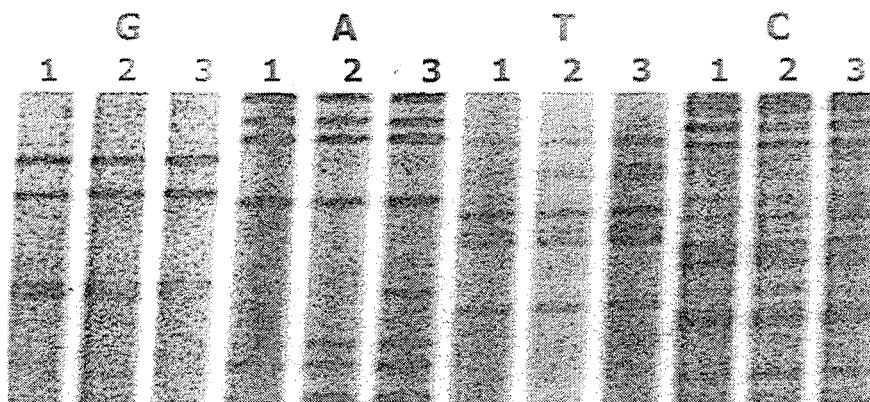


Figura 4.29: Identificação da mutação R408Q: Seqüenciamento direto do fragmento 12. A seta indica o local da mutação (G>A). Canaleta 1: indivíduo homozigoto para a seqüência normal; canaleta 2: paciente com deficiência de PAH não portador desta mutação; canaleta 3: paciente com deficiência de PAH heterozigoto para a mutação R408Q.

4.4.9 - IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NOVAS:

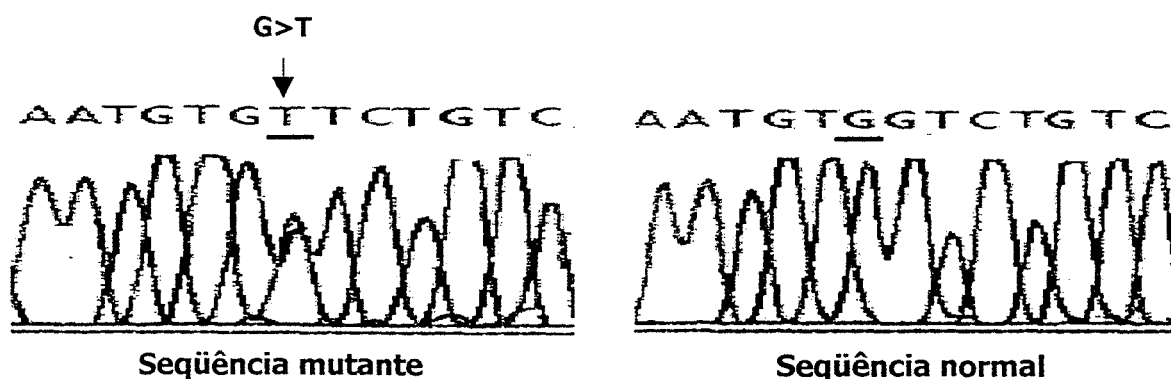
A análise por SSCP do fragmento 13, permitiu a identificação de amostras com padrões de migração alterados (figura 4.8b). Os fragmentos foram seqüenciados a partir do *primer* PKU 13A e duas alterações novas no gene da PAH foram identificadas. A alteração 1378g>t é causada por transversão de uma guanina por uma timina na posição 1378 da região 3', logo após o final do exon 13. Foi observado um paciente heterozigoto para esta alteração (figura 4.30a). A alteração IVS12nt-15t>c é causada por uma transição de timina por citosina na posição 1316-15t/c do íntron 12. Foram encontrados 3 pacientes heterozigotos para a mesma (figura 4.30b).

4.4.10 - IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA PAH:

O seqüenciamento direto permitiu a identificação dos seguintes polimorfismos IVS2nt19t>c (fragmento 2), V245V (fragmento 7), Y414Y (fragmento 12) e IVS12nt-35c>t (fragmento 13).

- O polimorfismo IVS2nt19t>c é causado por uma transição de timina por citosina na posição 168+19t/c do íntron 2. Foram encontrados 9 pacientes com esta alteração, sendo 5 heterozigotos e 4 homozigotos para a mesma (figura 4.31a);
- O polimorfismo V245V é causado por transição de uma guanina por uma adenina na posição 735 do exon 7, que não altera o aminoácido localizado na posição 245 da proteína. Foram encontrados 5 pacientes com esta alteração, sendo 4 heterozigotos e 1 homozigoto para a mesma (figura 4.31b);
- A alteração Y414Y é causada por transição de citosina por timina na posição 1242 do exon 12, que não altera o aminoácido localizado na posição 414 da proteína. Apenas 1 paciente heterozigoto para esta alteração foi encontrado (figura 4.31c);
- O polimorfismo IVS12nt-35c>t é causado por uma transição de citosina por timina na posição 1316-35c/t do íntron 12. Foram encontrados 4 pacientes com esta alteração, sendo 2 heterozigotos e 2 homozigotos para a mesma (figura 4.31d).

A) 1378g>t



B) IVS12nt-15t>c

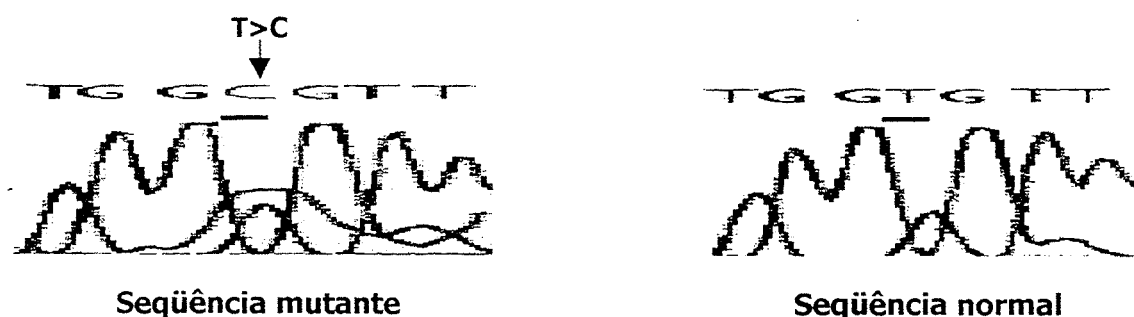


Figura 4.30: Seqüenciamento do fragmento 13 do gene da PAH: A) Identificação da alteração 1378g>t no paciente 11; B) Identificação da alteração IVS12nt-15t>c nos pacientes 10, 11 e 19.

A) IVS2nt19t>c

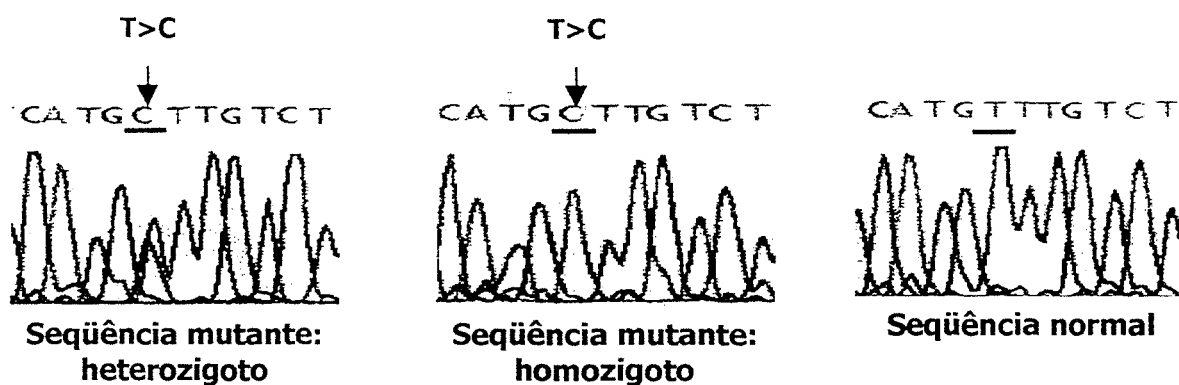


Figura 4.31: Seqüenciamento do gene da PAH: Identificação de polimorfismos. A) Polimorfismo IVS2nt19t>c encontrado nos pacientes 1, 7, 8, 10 (homozigotos), 2, 3, 16, 17 e 19 (heterozigotos).

4.5 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS ENCONTRADOS

As tabelas 4.2 e 4.3 mostram as mutações e os polimorfismos encontrados no DNA dos pacientes estudados, respectivamente. As regiões em que as alterações ocorrem, assim como a posição do nucleotídeo e conseqüentemente, quando for o caso, a posição do aminoácido alterado, são demonstrados.

A frequência relativa das mutações e dos polimorfismos encontrada nos pacientes dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, assim como, os métodos usados para a detecção destas alterações, são demonstrados nas tabelas 4.4 e 4.5, respectivamente.

A distribuição do genótipo dos pacientes é mostrada na tabela 4.6.

Tabela 4.2: Mutações encontradas no gene da PAH nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH analisados neste estudo.

Região do gene	Mutação		Nucleotídeo		Aminoácido	
	Nomenclatura sistemática*	Nomenclatura trivial*	Alteração	Posição	Alteração	Posição
Exon 1	c.47-48delCT	L15/S16fsdelCT	TCT→TGA	47-48delCT	Ser→Ter	16
Exon 2	c.165delT	F55fsdelT	TTT→TTG	165delT	Phe→Leu	55
Intron 2	c.168+5g>c	IVS2nt5g>c	AGT→ACT	168 + 5	-	-
Íntron 2	c.169-13t>g	IVS2nt-13t>g	CAT→CAG	169 - 13	-	-
Exon 3	c.194T>C	I65T	ATT→ACT	194	Ile→Thr	65
Exon 4	c.398-401 delATCA	N133/Q134fsdel ATCA	AATCAG→AGATTC	398-401 delATCA	Asn - Gln→Arg - Phe	133 - 134
Exon 5	c.473G>A	R158Q	CGG→CAG	473	Arg→Gln	158
Exon 7	c.754C>T	R252W	CGG→TGG	754	Arg→Trp	252
Exon 7	c.781C>T	R261X	CGA→TGA	781	Arg→Ter	261
Exon 7	c.782G>A	R261Q	CGA→CAA	782	Arg→Gln	261
Exon 7	c.809G>A	R270K	AGA→AAA	809	Arg→Lys	270
Exon 7	c.842C>T	P281L	CCG→CTG	842	Pro→Leu	281
Íntron 7	c.842+1g>a	IVS7nt1g>a	CCG→CCA	842 + 1	-	-
Íntron 10	c.1066-11g>a	IVS10nt-11g>a	TGG→TAG	1066 - 11	-	-
Exon 11	c.1162G>A	V388M	GTG→ATG	1162	Val→Met	388
Exon 12	c.1222C>T	R408W	CGG→TGG	1222	Arg→Trp	408
Exon 12	c.1223G>A	R408Q	CGG→CAG	1223	Arg→Gln	408
Íntron 12	c.1315+1g>a	IVS12nt1g>a	AGT→AAT	1315 + 1	-	-
UTR	c.1378g>t	1378g>t	GTC→TTC	1378	-	-

*: nomenclatura sistemática e trivial das mutações, de acordo com o Banco de Dados do Consórcio de Análise de Mutações no Gene da PAH (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998); fs: mudança de leitura (*frameshift*); del: deleção; Ter: códon de terminação da transcrição; UTR: região não traduzida do gene; IVS: seqüência interventora (*intervient sequence*); c: numeração de acordo com o cDNA.

Tabela 4.3: Polimorfismos encontrados no gene da PAH nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH analisados neste estudo.

Região do gene	Polimorfismo		Nucleotídeo		Aminoácido	
	Nomenclatura sistemática*	Nomenclatura trivial*	Alteração	Posição	Alteração	Posição
Intron 2	c.168+19t/c	IVS2nt19t>c	TTT→CTT	168 + 19	-	-
Exon 7	c.735G/A	V245V	GTG→GTA	735	Val→Val	245
Exon 12	c.1241C/T	Y414Y	TAC→TAT	1241	Tyr→Tyr	414
Intron 12	c.1316-15t/c	IVS12nt-15t>c	GTG→GCG	1316 - 15	-	-
Intron 12	c.1316-35c/t	IVS12nt-35c>t	TAC→TAT	1316 - 35	-	-

*: nomenclatura sistemática e trivial dos polimorfismos, de acordo com o Banco de Dados do Consórcio de Análise de Mutações no Gene da PAH (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998); **IVS**: seqüência interventora (*intervient sequence*); **c**: numeração de acordo com o cDNA.

Tabela 4.4: Frequência das mutações encontradas no gene da PAH nos 30 pacientes (55 alelos sem os casos consangüíneos) com HPA por deficiência de PAH dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Mutação	Métodos de detecção	Frequência (%) (número de alelos)		Frequência total (%)
		RS	SC	
L15/S16fsdelCT	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
IVS2nt5g>c	SSCP / Seqüenciamento	4,9 (2)	14,3 (2)	7,3
F55fsdelT	SSCP / Seqüenciamento	2,4(1)	-	1,8
IVS2nt-13t>g	SSCP / Seqüenciamento	-	7,1 (1)	1,8
I65T	SSCP / Digestão	17,1 (7)	21,4 (3)	18,2
N133/Q134fsdelATCA	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
R158Q	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
R252W	SSCP / Digestão*	2,4 (1)	-	1,8
R261Q	SSCP / Digestão	9,8 (4)	-	7,3
R261X	SSCP / Digestão	2,4 (1)	28,6 (4)	9,1
R270K	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
P281L	SSCP / Seqüenciamento	4,9 (2)	-	3,6
IVS7nt1g>a	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
IVS10nt-11g>a	SSCP / Digestão	-	7,1 (1)	1,8
V388M	SSCP / Digestão*	7,3 (3)	7,1 (1)	7,3
R408W	SSCP / Digestão	9,8 (4)	7,1 (1)	9,1
R408Q	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
IVS12nt1g>a	SSCP / Digestão	7,3 (3)	-	5,5
1378g>t	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
Total de alelos identificados		85,4 (35)	92,9 (13)	87,3

SSCP: polimorfismo conformacional de fita simples; *: As mutações R252W e V388M foram confirmadas por seqüenciamento

Tabela 4.5: Freqüência dos polimorfismos encontrados no gene da PAH nos 30 pacientes com deficiência de PAH do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Polimorfismo	Métodos de detecção	Freqüência (%) (número de alelos)		Freqüência total (%)
		RS	SC	
IVS2nt19t>c	SSCP / Seqüenciamento	9,8 (4)	50,0 (7)	20,0
V245V	SSCP / Seqüenciamento	14,6 (6)	-	10,9
Y414Y	SSCP / Seqüenciamento	2,4 (1)	-	1,8
IVS12nt-15t>c	SSCP / Seqüenciamento	4,9 (2)	7,1 (1)	5,5
IVS12nt-35c>t	SSCP / Seqüenciamento	4,9 (2)	14,3 (2)	7,3

Tabela 4.6: Genótipos encontrados nos 30 pacientes com deficiência de PAH.

Paciente	Genótipo		Polimorfismos encontrados
1*	R261X	IVS10nt-11g>a	IVS2nt19t>c (homozigoto)
2	I65T	IVS2nt5g>c	IVS2nt19t>c e IVS12nt-35c>t
3*	R261X	?	IVS2nt19t>c
4	R408W	P281L	-
5* (C)	R408W	R408W	-
6*	V388M	IVS2nt-13t>g	-
7* (C)	IVS2nt5g>c	IVS2nt5g>c	IVS2nt19t>c (homozigoto) e IVS12nt-35c>t (homozigoto)
8*	R261X	R261X	IVS2nt19t>c (homozigoto)
9	R408W	F55fsdelT	-
10 (C)	IVS2nt5g>c	IVS2nt5g>c	IVS2nt19t>c (homozigoto), IVS12nt-35c>t (homozigoto) e IVS12nt-15t>c
11	R408Q	1378g>t	V245V (homozigoto) e IVS12nt-15t>c
12	R252W	?	V245V
13*	I65T	I65T	-
14	R158Q	R270K	V245V
15	I65T	IVS12nt1g>a	-
16	N133/Q134fsdelATCA	?	Y414Y e IVS2nt19t>c
17	I65T	R261X	IVS2nt19t>c
18	R408W	R261Q	-
19*	I65T	IVS2nt5g>c	IVS2nt19t>c, IVS12nt-35c>t e IVS12nt-15t>c
20	I65T	?	V245V
21	I65T	P281L	-
22	IVS7nt1g>a	V388M	V245V
23	R408W	?	-
24	R261Q	R261Q	-
25 (C)	I65T	I65T	-
26 (C)	L15/S16fsdelCT	L15/S16fsdelCT	-
27	V388M	V388M	-
28	R261Q	IVS12nt1g>a	-
29	I65T	?	-
30	IVS12nt1g>a	?	-

* Pacientes com HPA por deficiência de PAH de Santa Catarina; (C): pacientes homozigotos filhos de pais consangüíneos.

4.6 - CORRELAÇÃO DA ANÁLISE MOLECULAR COM OS ASPECTOS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES COM HPA POR DEFICIÊNCIA DE PAH.

O genótipo e os parâmetros bioquímicos e clínicos observados nos pacientes são demonstrados nas tabelas 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11.

4.6.1 - PACIENTES COM DIAGNÓSTICO PRECOCE

A tabela 4.7 compara os parâmetros bioquímicos com os valores da ARP dos pacientes diagnosticados precocemente. A quantidade de Phe tolerada na dieta apresentou forte correlação com os níveis de Phe durante o tratamento ($r:-0,68= p<0,002$) e pré-tratamento ($r:-0,64= p<0,004$), e uma fraca correlação com os níveis de Tyr durante o tratamento ($r:0,46= p<0,05$). Uma forte correlação também foi observada entre os níveis de Phe e Tyr pré-tratamento ($r:0,61= p<0,007$). Apenas uma fraca correlação entre os valores da ARP e os níveis de Tyr durante o tratamento ($r:0,54= p<0,05$) foi observada. Os valores de ARP apresentaram uma tendência à correlação com os níveis de Tyr pré-tratamento, a qual não foi significativa ($r:0,49= p=0,09$). De acordo com a análise de regressão linear múltipla, os níveis de Phe no diagnóstico e durante o tratamento foram considerados os fatores mais associados à tolerância à Phe da dieta ($p<0,0003$) (figura 4.32a e b).

4.6.2 - PACIENTES COM DIAGNÓSTICO TARDIO

Não foi observado nenhuma correlação entre os parâmetros bioquímicos e clínicos com os valores da ARP dos pacientes diagnosticados tardiamente. O coeficiente de Pearson mostrou que os níveis de Phe durante o tratamento apresentaram correlação com a quantidade de Phe tolerada na dieta ($r:-0,55= p<0,05$) (figura 4.32c). De acordo com o teste exato de Fischer, não houve diferenças entre os parâmetros clínicos (retardo mental, convulsões e EEG alterado). O teste U de Mann-Whitney demonstrou que não houve associação entre o QI e as outras variáveis do quadro clínico e nem entre este último e os parâmetros bioquímicos ligados ao diagnóstico e tratamento da doença ($p>0,05$). Estes resultados são mostrados na tabela 4.8.

4.6.3 - CLASIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS PACIENTES QUANTO À QUANTIDADE DE PHE TOLERADA NA DIETA CONTROLADA

De acordo com a tolerância à Phe da dieta, os pacientes foram agrupados em 3 categorias: PKU clássica, PKU moderada e PKU leve, segundo os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Dunn. Não foi possível classificar 2 pacientes (2 e 25), devido à dificuldade de obter dados confiáveis referentes à terapia dietética. Dentre os pacientes com diagnóstico precoce, foi observado que os níveis de Phe pré-tratamento e durante o tratamento foram maiores nos pacientes com PKU clássica que nos pacientes com a forma leve ($p < 0,03$). Os pacientes com PKU leve ou moderada exibiram uma tolerância à Phe da dieta controlada maior que a observada nos pacientes com PKU clássica ($p < 0,03$). Não houve diferença entre os pacientes com PKU leve e PKU moderada quanto aos parâmetros testados (tabela 4.9).

Dentre os pacientes com diagnóstico tardio, foi observado que os valores da ARP e a quantidade de Phe tolerada na dieta foram maiores nos pacientes com PKU moderada que nos pacientes com PKU clássica ($p < 0,03$).

Os pacientes com PKU clássica e diagnóstico precoce apresentaram níveis de Phe pré-tratamento maiores que os observados nos pacientes com diagnóstico tardio e exibindo o mesmo fenótipo ($p < 0,02$). Os pacientes com PKU clássica e diagnóstico tardio apresentaram os níveis de Phe durante o tratamento maiores que os encontrados nos pacientes com diagnóstico precoce exibindo o mesmo fenótipo ($p < 0,05$). A quantidade de Phe tolerada na dieta foi maior nos pacientes com PKU moderada e diagnóstico precoce que nos pacientes com diagnóstico tardio e o mesmo fenótipo ($p < 0,04$) (tabela 4.9).

4.6.4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GENÓTIPO SOBRE O METABOLISMO DA PHE

Considerando os pacientes como um único grupo, o teste de Pearson demonstrou que não houve correlação entre os valores da ARP e de Phe após o teste de sobrecarga de Phe. Porém, os valores de Phe após a sobrecarga apresentaram uma forte correlação com os níveis de Phe observados durante o tratamento ($r:0,75 = p < 0,001$) e a pré-sobrecarga ($r:0,74 = p < 0,001$) e uma menor correlação com a quantidade de Phe tolerada na dieta ($r:-0,57 = p < 0,02$). Os níveis de Phe na pré-sobrecarga apresentaram uma forte correlação com os níveis de Phe durante o tratamento ($r:0,82 = p < 0,0001$) e a

tolerância à Phe na dieta ($r:-0,69= p<0,003$), e menor correlação com os níveis de Phe pré-tratamento ($r:0,54= p<0,02$). A análise de regressão linear múltipla confirmou a forte correlação existente entre os níveis de Phe durante o tratamento e os observados após a sobrecarga ($p<0,0005$) (tabela 4.10 e figura 32d).

Os pacientes que receberam a sobrecarga de Phe foram agrupados conforme a quantidade de Phe tolerada na dieta controlada. Desta forma, os pacientes com PKU moderada exibiram valores de ARP maiores que os observados nos pacientes com PKU clássica ($p<0,02$). Os níveis de Phe pré-tratamento em pacientes com PKU clássica foram maiores que os observados em paciente com PKU leve ($p<0,05$). As concentrações de Phe durante o tratamento e na pré-sobrecarga foram maiores em pacientes com PKU clássica que nos pacientes com a forma leve ou moderada da doença ($p<0,05$). Os pacientes com PKU clássica exibiram níveis de Phe após a sobrecarga maiores que os dos pacientes com PKU leve ($p<0,05$). Por outro lado, os pacientes com PKU leve ou PKU moderada demonstraram uma tolerância à Phe da dieta maior que a observada nos pacientes com PKU clássica ($p<0,05$). Não houve diferença entre os pacientes com PKU leve ou moderada em nenhum dos parâmetros avaliados (tabela 4.11).

4.7 - EFEITO DE UMA SOBRECARGA DE ASPARTAME SOBRE O GENÓTIPO DE HETEROZIGOTOS PARA HPA POR DEFICIÊNCIA DE PAH.

O efeito de um único alelo mutante no metabolismo da Phe e da Tyr foi avaliado sob condições de jejum e após uma sobrecarga de aspartame. Os indivíduos foram divididos em 3 grupos: heterozigotos com mutações graves, heterozigotos com mutações moderadas e controles normais. Os grupos foram comparados quanto aos valores dos parâmetros Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr em situação de jejum e 30 minutos após a sobrecarga de aspartame (tabela 4.12).

Após a sobrecarga de aspartame, foi observado um aumento significativo dos níveis de Phe e das relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr nos heterozigotos com mutações graves ($p<0,05$). No entanto, somente um aumento significativo da relação Phe/Tyr foi observado nos heterozigotos com mutações moderadas ($p<0,05$). Quando os grupos de heterozigotos foram comparados entre si na situação de jejum, apenas os níveis de Phe se encontraram mais elevados para os heterozigotos com mutações moderadas ($p<0,05$).

Após a sobrecarga de aspartame, os grupos de heterozigotos não apresentaram diferenças significativas quanto aos resultados dos parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Os grupos de heterozigotos apresentaram, tanto na situação de jejum como após a sobrecarga de aspartame, valores dos parâmetros Phe, Phe/Tyr e Phe²/Tyr maiores que os observados em controles normais ($p < 0,05$), não ocorrendo nenhuma sobreposição. Por outro lado, após a sobrecarga de aspartame, os níveis de Tyr se mostraram mais elevados ($p < 0,05$) nos controles normais quando comparados com os observados nos heterozigotos.

Tabela 4.7: Correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de ARP dos pacientes com diagnóstico precoce de HPA por deficiência de PAH.

Pacientes	Genótipo	ARP (%)	Diagnóstico		Tratamento		Tolerância à Phe da dieta*	Classificação fenotípica
			Phe	Tyr	Phe*	Tyr*		
3	R261X / ?	0/?	1174	44,1	791,8 ± 132,0	62,9 ± 12,7	368 ± 37	Moderado
5	R408W / R408W	0	950	55,2	462,6 ± 245,3	51,3 ± 7,1	385 ± 39	Moderado
7	IVS2nt5g>c / IVS2nt5g>c	0	1199	71,7	603,5 ± 88,4	70,6 ± 12,4	344 ± 31	Clássico
9	R408W / F55fsdelT	0	1792	22,0	564,0 ± 232,0	81,1 ± 14,3	347 ± 44	Clássico
10	IVS2nt5g>c / IVS2nt5g>c	0	1586	126,9	532,0 ± 156,2	64,0 ± 21,5	345 ± 37	Clássico
11	R408Q / 1378g>t	55/?	515	99,3	213,4 ± 98,0	88,3 ± 28,7	467 ± 24	Leve
12	R252W / ?	0/?	848	60,7	408,6 ± 230,6	71,7 ± 16,0	388 ± 37	Moderado
13	I65T / I65T	26	726	66,2	472,5 ± 255,5	67,3 ± 14,9	376 ± 4	Moderado
15	I65T / IVS12nt1g>a	13	2948	176,6	451,0 ± 144,7	64,0 ± 13,8	340 ± 26	Clássico
17	I65T / R261X	13	2101	193,1	584,1 ± 164,0	72,3 ± 11,6	329 ± 46	Clássico
19	I65T / IVS2nt5g>c	13	1374	121,4	348,4 ± 219,7	96,0 ± 18,8	397 ± 24	Moderado
20	I65T / ?	26/?	303	110,4	249,4 ± 59,9	85,5 ± 14,3	600 ± 84	Leve
21	I65T / P281L	13	2688	209,7	635,6 ± 315,0	87,2 ± 25,4	311 ± 21	Clássico
22	IVS7nt1g>a / V388M	21	1647	77,3	889,0 ± 95,0	73,4 ± 17,1	345 ± 31	Clássico
24	R261Q / R261Q	30	1610	226,3	597,5 ± 121,7	103,8 ± 27,0	392 ± 48	Moderado
26	L15/S16fsdelCT / L15/S16fs delCT	0	1689	77,3	637,4 ± 200,4	58,5 ± 16,0	348 ± 38	Clássico
28	R261Q / IVS12nt1g>a	15	2542	182,1	300,2 ± 83,5	97,1 ± 18,2	395 ± 55	Moderado
30	IVS12nt1g>a / ?	0/?	2179	160,0	756,0 ± 99,3	50,2 ± 18,2	200 ± 47	Clássico

ARP: atividade residual prevista da PAH, conforme estudos de expressão *in vitro* (tabela 1.6); níveis de Phe e Tyr no diagnóstico e durante o tratamento expressos em $\mu\text{mol/L}$; quantidade de Phe na dieta expressa em mg/Phe/dia; * média \pm desvio padrão.

Tabela 4.8: Correlação dos parâmetros clínicos e bioquímicos com os valores de ARP dos pacientes com diagnóstico tardio de HPA por deficiência de PAH.

Pacientes	Genótipo	ARP (%)	Phe no diagnóstico	Phe durante o tratamento*	Tolerância à Phe da dieta*	Aspectos clínicos				Classificação fenotípica
						Convulsões	EEG	QI	RM	
1	R261X / IVS10nt-11g>a	0	1471	922,0 ± 142,2	340 ± 28	Sim	Alterado	Nr	Sim	Clássico
2	I65T / IVS2nt5g>c	13	1247	1238,5 ± 485,5	?	Não	Normal	47	Sim	?
4	R408W / P281L	0	2784	620,5 ± 244,7	339 ± 15	Sim	Alterado	Nr	Sim	Clássico
6	V388M / IVS2nt-13t>g	21	823	622,3 ± 146,5	360 ± 42	Sim	Normal	Nr	Não	Moderado
8	R261X / R261X	0	1078	469,7 ± 222,1	340 ± 37	Sim	Nr	Nr	Sim	Clássico
14	R158Q / R270K	10/?	1362	1015,7 ± 149,5	230	Sim	Alterado	Nr	Sim	Clássico
16	N133/Q134fsdelATCA / ?	0/?	1586	952,8 ± 186,4	152 ± 22	Não	Alterado	49	Sim	Clássico
18	R408W / R261Q	15	1471	886,8 ± 243,3	266 ± 55	Sim	Nr	Nr	Sim	Clássico
23	R408W / ?	0/?	956	773,3 ± 229,0	350	Sim	Alterado	Nr	Sim	Clássico
25	I65T / I65T	26	1265	613,8 ± 174,9	?	Sim	Alterado	Nr	Sim	?
27	V388M / V388M	43	1536	464,4 ± 238,0	363 ± 23	Sim	Alterado	Nr	Sim	Moderado
29	I65T/?	26/?	1217	880,8 ± 190,7	220	Não	Nr	80	Não	Clássico

ARP: atividade residual prevista da PAH, conforme estudos de expressão *in vitro* (tabela 1.6); níveis de Phe no diagnóstico e durante o tratamento expressos em $\mu\text{mol/L}$; quantidade de Phe na dieta expressa em mg/Phe/dia; * média \pm desvio padrão; EEG: eletroencefalograma; QI: coeficiente de inteligência; RM: retardo mental; Nr: não realizado.

Tabela 4.9: Classificação fenotípica dos pacientes diagnosticados precoce e tardiamente com HPA por deficiência de PAH

Classificação Fenotípica	Diagnóstico precoce						Diagnóstico tardio					
	N	Mutações	ARP (%) [*]	Phe 1 [*]	Phe 2 [*]	Phe 3 [*]	N	Mutações	ARP (%)	Phe 1 [*]	Phe 2 [*]	Phe 3 [*]
PKU Clássica	9	L15/S16fsdelCT; IVS2nt5g>c; F55fsdelT; I65T; R261X; P281L; IV7nt1g>a; V388M; R408W; IVS12nt1g>a	0 - 21 7,5 ± 8,4	1199-2948 1981 ± 558	451 - 889 628 ± 128	200 - 347 323 ± 48	8	I65T; N133/Q134fsdel4pb; R158Q; R261Q; R261X; R270K; P281L; IVS10nt-11g>a R408W	0 - 15 3,7 ± 7,5	956 - 2784 1491 ± 564	470 - 1016 815 ± 185	152 - 350 280 ± 74
PKU moderada	7	IVS2nt5g>c; I65T; R252W; R261Q; R261X; R408W; IVS12nt1g>a	0 - 30 17 ± 12	726 - 2542 1318 ± 621	300 - 792 483 ± 166	368 - 397 386 ± 11	2	IVS2nt-13t>g; V388M	21 - 43 32 ± 16	823 - 1536 1180 ± 504	464 - 622 543 ± 112	360 - 363 362 ± 2
PKU Leve	2	I65T; R408Q; 1378g>t	?	303 - 515 409 ± 150	213 - 249 231 ± 25	467 - 600 534 ± 94	-	-	-	-	-	-
Pacientes não classificados	-	-	-	-	-	-	2	I65T; IVS2nt5g>c	13 - 26 19,5±9	1247 - 1265 1256 ± 13	614 - 1238 926 ± 442	?

n: tamanho da amostra; **ARP**: atividade residual prevista da PAH, conforme estudos de expressão *in vitro* (tabela 1.6); **Phe 1 e Phe 2**: níveis de Phe no diagnóstico e durante o tratamento ($\mu\text{mol/L}$); **Phe 3**: quantidade de Phe na dieta controlada (mg de Phe por dia); *: média \pm desvio padrão.

Tabela 4.10: Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe após uma sobrecarga de Phe em 17 pacientes com HPA por deficiência de PAH.

Paciente	Genótipo	ARP (%)	Phe no diagnóstico	Phe durante o tratamento*	Tolerância à Phe da dieta*	Níveis de Phe	
						Pré-sobrecarga	Após a sobrecarga
1	R261X / IVS10nt-11g>a	0	1471	922,0 ± 142,2	340 ± 28	823,2	1622,3
2	I65T / IVS2nt5g>C	13	1247	1238,5 ± 485,5	?	726,4	1380,1
7	IVS2nt5g>c / IVS2nt5g>c	0	1199	603,5 ± 88,4	344 ± 31	599,3	774,8
8	R261X / R261X	0	1078	469,7 ± 222,1	340 ± 37	780,9	1924,9
10	IVS2nt5g>c / IVS2nt5g>c	0	1586	532,0 ± 156,2	345 ± 37	562,9	780,9
11	R408Q / 1378g>t	55/?	515	213,4 ± 98,0	467 ± 24	108,9	417,7
12	R252W / ?	0/?	848	408,6 ± 230,6	388 ± 37	284,5	1234,9
13	I65T / I65T	26	726	472,5 ± 255,5	376 ± 4	435,8	1168,3
14	R158Q / R270K	10/?	1362	1015,7 ± 149,5	230	992,7	1622,3
17	I65T / R261X	13	2101	584,1 ± 164,0	329 ± 46	690,1	811,1
18	R408W / R261Q	15	1471	886,8 ± 243,3	266 ± 55	1004,8	1888,6
19	I65T / IVS2nt5g>c	13	1374	348,4 ± 219,7	397 ± 24	157,4	805,1
20	I65T / ?	26/?	303	249,4 ± 59,9	600 ± 84	302,7	587,2
21	I65T / P281L	13	2688	635,6 ± 315,0	311 ± 21	756,6	847,4
22	IVS7nt1g>a / V388M	21	1647	889,0 ± 95,0	345 ± 31	1218,5	1834,1
24	R261Q / R261Q	30	1610	597,5 ± 121,7	392 ± 48	629,5	678,0
27	V388M / V388M	43	1536	464,4 ± 238,0	363 ± 23	490,3	684,0

ARP: atividade residual prevista da PAH, conforme estudos de expressão *in vitro* (tabela 1.6); níveis de Phe e Tyr no diagnóstico, durante o tratamento, antes e após a sobrecarga expressos em $\mu\text{mol/L}$; quantidade de Phe na dieta expressa em mg/Phe/dia; * média \pm desvio padrão.

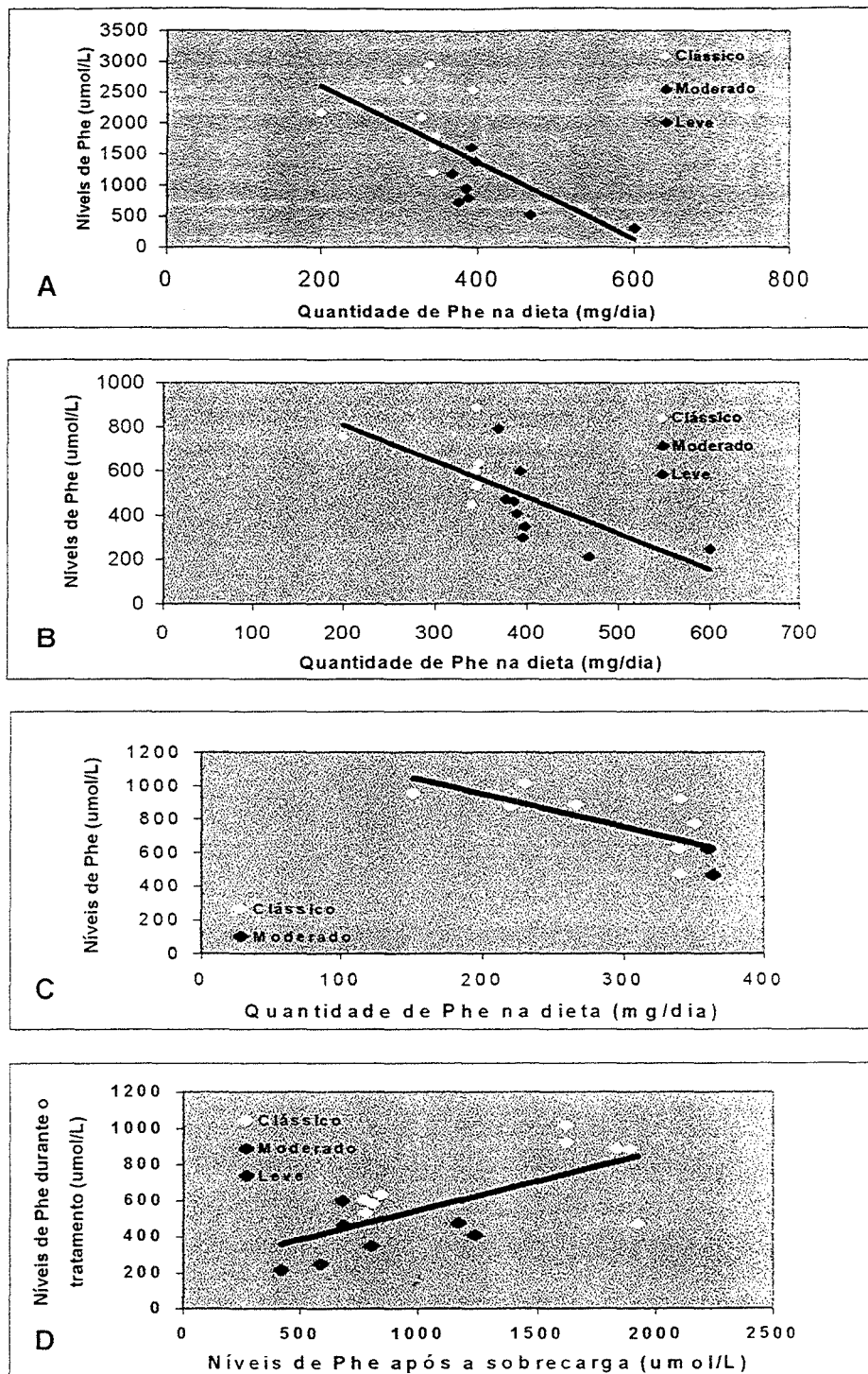


Figura 4.32: Comparação entre os parâmetros bioquímicos de diagnóstico e tratamento: A) Correlação entre os níveis de Phe pré-tratamento e a quantidade de Phe tolerada na dieta em pacientes com diagnóstico precoce; B) Correlação entre os níveis de Phe durante o tratamento e a quantidade de Phe tolerada na dieta em pacientes com diagnóstico precoce; C) Correlação entre os níveis de Phe durante o tratamento e a quantidade de Phe tolerada na dieta em pacientes com diagnóstico tardio; D) Correlação entre os níveis de Phe na sobrecarga e durante o tratamento em 17 pacientes.

Tabela 4.11: Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe após uma sobrecarga de Phe: Classificação fenotípica dos 17 pacientes com HPA por deficiência de PAH.

Fenótipo	N	Mutações	ARP (%)	Phe no diagnóstico*	Phe durante o tratamento*	Tolerância à Phe da dieta*	Níveis de Phe*	
							Pré-sobrecarga	Após a sobrecarga
PKU Clássica	9	IVS2nt5g>c; I65T; R158Q; R261Q; R261X; R270K; P281L; IVS7nt1g>a; IVS10nt-11g>a; V388M; R408W	0 - 21 7,8 ± 8,6	1078 - 2688 1623 ± 494	470 - 1016 726 ± 200	230 - 345 317 ± 41	563 - 1218 825 ± 212	775 - 1925 1345 ± 524
PKU moderada	5	IVS2nt5g>c; I65T; R252W; R261Q; V388M	13 - 43 28,0 ± 12,0	726 - 1610 1219 ± 406	348 - 597 458 ± 92	363 - 397 383 ± 14	157 - 629 400 ± 183	678 - 1235 914 ± 268
PKU Leve	2	I65T; R408Q; 1378g>t	?	303 - 515 409 ± 150	213 - 249 231 ± 25	467 - 600 534 ± 94	109 - 303 200 ± 137	418 - 587 502 ± 120
Paciente não classificado	1	I65T; IVS2nt5g>c	13	1247	1238	?	726	1380

n: tamanho da amostra; **ARP**: atividade residual prevista da PAH, conforme estudos de expressão *in vitro* (tabela 1.6); níveis de Phe no diagnóstico, durante o tratamento, antes e após a sobrecarga expressos em $\mu\text{mol/L}$; quantidade de Phe na dieta expressa em mg/Phe/dia; * média e desvio padrão.

Tabela 4.12: Efeito do teste de sobrecarga oral de aspartame (100 mg/kg) em heterozigotos para HPA por deficiência de PAH portadores de mutação graves ou moderadas e em controles normais.

Grupos	Alelo mutante	Antes da sobrecarga				Após a sobrecarga			
		Phe*	Tyr*	Phe/Tyr	Phe ² /Tyr	Phe*	Tyr*	Phe/Tyr	Phe ² /Tyr
Mutação grave (n= 4)	P281L	77	67	1,15	88	94	59	1,59	149
	R408W	93	60	1,55	145	107	62	1,73	185
	IVS12nt1g>a	108	73	1,48	160	124	70	1,77	220
	IVS12nt1g>a	70	57	1,23	86	109	73	1,50	164
	Intervalo	70 - 108	57 - 73	1,15 - 1,55	86 - 160	94 - 124	59 - 73	1,50 - 1,77	149 - 220
Média ± DP	87 ± 17 ^a	64 ± 7	1,35 ± 0,19 ^a	120 ± 38 ^a	109 ± 9 ^{a,b}	66 ± 7	1,65±0,13 ^{a,b}	180 ± 31 ^{a,b}	
Mutação moderada (n= 8)	V388M	105	57	1,84	194	91	50	1,82	165
	R261Q	113	69	1,63	185	126	64	1,97	249
	R261Q	116	64	1,82	210	149	77	1,93	288
	I65T	94	77	1,22	115	113	68	1,66	187
	I65T	113	94	1,20	135	106	71	1,50	159
	I65T	113	102	1,10	125	103	94	1,09	112
	I65T	111	46	2,40	267	130	51	2,57	335
	I65T	95	58	1,64	156	85	52	1,63	139
Intervalo	94-116	46 - 102	1,10 - 2,40	115 - 267	85-149	50 - 94	1,09 - 2,57	112 - 335	
Média ± DP	108 ± 9 ^{a,c}	71 ± 19	1,61 ± 0,43 ^a	173 ± 51 ^a	113 ± 21 ^a	66 ± 15	1,77±0,43 ^{a,b}	204 ± 78 ^a	
Controles (n= 6)									
	Intervalo	53-66	60 - 87	0,70 - 1,01	38 - 63	64 - 84	64 - 93	0,76 - 1,01	54 - 79
Média ± DP	59 ± 5	73 ± 11	0,83 ± 0,13	49 ± 10	75 ± 7 ^b	82 ± 11 ^a	0,93 ± 0,1	69 ± 11 ^b	

DP: desvio padrão; *: os valores de Phe e Tyr são expressos em µmol/L; ^a: diferenças significativas entre heterozigotos e controles normais (p<0,05); ^b: efeito significativo da sobrecarga de aspartame em cada grupo (p<0,05); ^c: diferenças significativas entre grupos de heterozigotos (p<0,05).

5. DISCUSSÃO

5.1 - DETECÇÃO DE MUTAÇÕES COMUNS

Os portugueses chegaram ao Brasil no século XVI e a partir do século XIX, a imigração de povos europeus para o Brasil se intensificou. A região sul recebeu imigrantes provenientes principalmente da Península Ibérica (Portugal e Espanha), da Itália e do norte e leste europeus (Alemanha e Polônia). Estes grupos europeus, juntamente com os índios que já habitavam o Brasil e os africanos, que chegaram como escravos na segunda metade do século XVI, formam a população desta região. Considerando estes fatos histórico-demográficos, a presença de mutações comuns no gene da PAH nas populações européias citadas acima foi investigada no sul do Brasil.

O emprego combinado das técnicas de SSCP e de análise por digestão com enzimas de restrição específicas permitiu a investigação dessas mutações comuns na nossa amostra, entre elas a I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10nt-11g>a, V388M, R408W e a IVS12nt1g>a. As mutações R408W e IVS12nt1g>a são comumente observadas em pacientes da Alemanha (Horst *et al.*, 1993) e Polônia (Jaruzelska *et al.*, 1993), enquanto que as mutações I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10nt-11g>a e V388M apresentam freqüências elevadas na Itália (Dianzani *et al.*, 1995a) e Península Ibérica (Rivera *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999).

Por outro lado, o grupo de mutações comuns encontrado em nosso estudo é muito diferente do observado em pacientes chineses (Okano *et al.*, 1992), coreanos (Okano *et al.*, 1994) e japoneses (Okano *et al.*, 1998), conforme esperado.

Com exceção da mutação R261X, a qual é mencionada em poucos estudos e apresenta freqüências muito baixas, as outras estão entre as 20 mutações mais freqüentes, conforme o Banco de Dados do Consórcio de Análise de Mutações no Gene da PAH (PAHdb) (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

Vários estudos revelaram a ocorrência de poucas mutações freqüentes e um grande número de mutações raras na maioria das populações (Güttler e Guldborg, 1996). Por exemplo, as mutações IVS10nt-11g>a, L48S, R158Q, R261Q, P281L e R261X são responsáveis por 42,0% dos casos de deficiência de PAH em pacientes italianos, sendo as demais muito raras (Dianzani *et al.*, 1995a). O mesmo ocorre em pacientes portugueses, onde 44,0% dos genótipos apresentam as mutações IVS10nt-11g>a, R261Q, V388M, I65T, P281L e R252W (Rivera *et al.*, 1998), e nos pacientes espanhóis, onde as mutações IVS10nt-11g>a, A403V, I65T, V388M, R261Q e R243Q são

responsáveis por 38,0% dos genótipos causadores de HPA por deficiência de PAH (Desviat *et al.*, 1999).

De fato, nosso estudo mostrou que um pequeno número de mutações freqüentes é detectada na grande maioria dos alelos e um grande grupo de mutações raras ocorre nos demais casos. As tabelas 4.4 e 4.5 (vide resultados) mostram a freqüência alélica relativa das alterações encontradas no presente estudo. As mutações mais freqüentes foram I65T (18,2%), R408W (9,1%), R261X (9,1%), IVS2nt5g>c (7,3%), R261Q (7,3%) e V388M (7,3%), as quais representam 58,3% do total de alelos mutantes, enquanto as 13 mutações restantes apresentaram freqüências entre 1,8% e 5,5%.

5.2 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES RARAS E POLIMORFISMOS

Através do seqüenciamento direto foram identificadas as seguintes alterações: L15/S16fsdelCT, IVS2nt5g>c, F55fsdelT, IVS2nt-13t>g, N133/Q134fsdelATCA, R158Q, R270K, P281L, IVS7nt1g>a e R408Q, todas previamente descritas por outros estudos. Além disso, os seguintes polimorfismos também foram encontrados: IVS2nt19t>c, V245V, Y414Y e IVS12nt-35c>t.

Os resultados do seqüenciamento direto de DNA mostraram que dentre as mutações causadoras de HPA por deficiência de PAH, as alterações que ocorreram mais de uma vez foram IVS2nt5g>c (4/55) e P281L (2/55). As mutações R158Q, P281L, IVS7nt1g>a e R408Q têm sido bastante relatadas, exceto a mutação F55fsdelT, a qual é descrita em 21 estudos. Por outro lado, as mutações L15/S16fsdelCT, IVS2nt5g>c, IVS2nt-13t>g, N133/Q134fsdelATCA e R270K têm sido pouco documentadas. (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

A mutação IVS2nt5g>c foi descrita em pacientes da Bulgária (Kalaydjieva *et al.*, 1993), Romênia (Popescu *et al.*, 1994), Alemanha, Bélgica, Turquia (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998), Egito (Effat *et al.*, 1999) e Brasil (Acosta *et al.*, 2000). A mutação L15/S16fsdelCT foi inicialmente descrita em um paciente alemão (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>) e posteriormente foi observada em dois pacientes: um australiano (Ramus *et al.*, 1995; Ramus *et al.*, 1999) e um checo (Kózak *et al.*, 1997). A mutação IVS2nt-13t>g foi descrita em um paciente italiano (Bosco *et al.*, 1998). A deleção N133/Q134fsdelATCA foi observada em um caso nos Estados Unidos (Guldberg *et al.*, 1996; Güttler *et al.*, 1999). Por sua vez, a mutação R270K tem

sido observada em pacientes portugueses (Leandro *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 1998), tártaros (Kuzmin *et al.*, 1995), americanos (Guldberg *et al.*, 1996) e brasileiros (Acosta *et al.*, 2000).

Os polimorfismos IVS2nt19t>c e V245V têm sido bastante relatados. No entanto, os polimorfismos Y414Y e IVS12nt-35c>t têm sido pouco documentados. (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998). O polimorfismo Y414Y foi inicialmente descrito na Dinamarca (Guldberg e Güttler, 1993), sendo posteriormente observado entre ingleses, belgas (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998), americanos (Guldberg *et al.*, 1996) e canadenses (Carter *et al.*, 1998). O polimorfismo IVS12nt-35c>t foi observado em pacientes belgas (François *et al.*, 1994), tártaros (Kuzmin *et al.*, 1995), noruegueses (Eiken *et al.*, 1996), espanhóis (Pérez *et al.*, 1997) e egípcios (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

5.3 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOVAS

Neste estudo, foram identificadas duas alterações novas no gene da PAH: 1378g>t e IVS12nt-15t>c.

Mutações nas regiões não codificadoras do gene da PAH (promotoras, sítios de poliadenilação e distantes dos sítios de junção exon-íntron) podem também causar deficiência de PAH (Kozák *et al.*, 1997). A alteração 1378g>t, identificada neste estudo, é causada por transversão de uma guanina por uma timina, localizada na extremidade 3' do gene a 19 nucleotídeos após o códon de terminação (TAA) do exon 13. Alguns motivos sugerem que esta alteração pode ser uma nova mutação associada à HPA por deficiência de PAH:

- (1) Na técnica de SSCP, o fragmento com este alelo mutante apresentou um padrão de migração alterado, distinto e único em relação às outras amostras analisadas do mesmo fragmento;
- (2) a presença deste alelo foi encontrada somente em um paciente com PKU leve, o qual já tinha sido identificada a mutação R408Q no outro cromossomo.

Para descobrir se a alteração 1378g>t está associada à HPA por deficiência de PAH, é preciso determinar a frequência desta alteração em 100 cromossomos normais. Desta forma, foi realizado um estudo populacional em 50 indivíduos controles, nos quais

não foi encontrado esta alteração. Este achado indica que a alteração 1378g>t pode estar associada à HPA por deficiência de PAH.

A alteração nova IVS12nt-15t>c foi considerada um polimorfismo, pois foi encontrada em 3 pacientes que apresentavam 2 mutações descritas previamente e associadas à HPA por deficiência de PAH.

5.4 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE DA PAH

As técnicas de biologia molecular foram empregadas para determinar o genótipo de 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH, perfazendo um total de 60 alelos analisados. Entretanto, no cálculo de frequência alélica, foram considerados apenas 55 alelos, pois 5 pacientes homocigotos são filhos de pais consanguíneos.

A ampla variedade de genótipos é o reflexo da heterogeneidade molecular no *locus* da PAH. Na maioria dos estudos foram observados 20 ou mais mutações diferentes associadas à HPA por deficiência de PAH, sendo a distribuição e frequência das mesmas diferentes entre as populações (Jaruzelska *et al.*, 1993; Dianzani *et al.*, 1995a; Tyfield *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999; Effat *et al.*, 1999).

Esta heterogeneidade esteve presente em nosso estudo, onde 24 alterações (18 mutações associadas à HPA por deficiência de PAH, 4 polimorfismos e 2 alterações novas: IVS12nt-15t>c e 1378g>t), conferindo 26 genótipos diferentes associados à doença, foram observadas nos 30 pacientes com deficiência de PAH analisados. Foi possível a identificação de pelo menos uma mutação patogênica em todos os pacientes analisados (tabela 4.6 - vide resultados).

As alterações no gene da PAH ficaram distribuídas da seguinte maneira: 9 mutações de sentido trocado (I65T, R158Q, R252W, R261Q, R270K, P281L, V388M, R408W e R408Q), 5 mutações de sítios de junção (IVS2nt5g>c, IVS2nt-13t>g, IVS7nt1g>a, IVS10nt-11g>a e IVS12nt1g>a), 3 deleções (L16/S16fsdelCT, F55fsdelT e N133/Q134fddelATCA), 1 mutação sem sentido (R261X), 4 polimorfismos (IVS2nt19t>c, V245V, Y414Y e IVS12nt-35c>t). A tabela 5.1 mostra que esta distribuição está de acordo com a observada no PAHdb e em outros estudos (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998; Scriver *et al.*, 2000). As alterações novas IVS12nt-15t>c e 1378g>t não estão incluídas neste grupo.

Tabela 5.1: Freqüência dos tipos de alterações no gene da PAH: (última consulta: maio de 2000).

Tipo de Alteração	Mutações identificadas no presente estudo (%)	Banco de dados (%)
Mutações de ponto de sentido trocado	9 (40,9)	255 (61,9)
Deleções	3 (13,6)	56 (13,6)
Mutações de sítios de junção	5 (22,7)	47 (11,4)
Mutações silenciosas / polimorfismos	4 (18,2)	27 (6,6)
Mutações de ponto sem sentido	1 (4,5)	22 (5,3)
Inserções	0	5 (1,2)
Total	22 (100,0)	412 (100,0)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de mutações encontradas em nosso estudo e os tipos do PAHdb ($p > 0,05$).

A quantidade de indivíduos homocigotos em uma determinada população, indica o grau de variação genética no *locus* do gene da PAH que a mesma apresenta: quanto maior for o número de homocigotos, mais homogênea será a população em relação às mutações no gene da PAH (Avigad *et al.*, 1990; Guldberg *et al.*, 1996). A freqüência de genótipos homocigóticos observada no presente estudo foi de 30,0% (9/30), envolvendo 7 mutações diferentes e semelhante às taxas (em torno de 25,0% a 30,0%) encontradas em populações heterogêneas e miscigenadas da Europa (Guldberg *et al.*, 1993; Dianzani *et al.*, 1995a; Desviat *et al.*, 1997; Kayaalp *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1998).

A tabela 5.2 compara a freqüência das mutações encontradas em nossa amostra de pacientes e as freqüências observadas em outros países da América do Sul (Chile), América do Norte, Europa, Ásia e Oceânia. A freqüência encontrada para a mutação I65T foi semelhante às observadas nos pacientes ingleses/escoceses, irlandeses e australianos ($p > 0,05$) e superior às encontradas nos demais estudos ($p < 0,005$). A mutação R408W apresentou uma freqüência maior que as observadas nos pacientes italianos ($p < 0,01$) e portugueses (0,003) e inferior às freqüências observadas nos pacientes alemães ($p < 0,018$), poloneses ($p < 0,0001$), ingleses/escoceses ($p < 0,05$), irlandeses ($p < 0,007$), romenos ($p < 0,001$) e estonianos ($p < 0,0001$). A mutação R261X apresentou uma freqüência semelhante à verificada em pacientes italianos ($p > 0,05$) e superior à encontrada nos estudos realizados em Portugal ($p < 0,001$) e Bélgica ($p < 0,005$).

A freqüência da mutação R261Q foi superior às observadas nos pacientes poloneses ($p < 0,03$), ingleses/escoceses ($p < 0,003$) e irlandeses ($p < 0,02$), porém inferior à

descrita para pacientes suíços ($p < 0,003$). A mutação V388M apresentou uma frequência similar às observadas nos pacientes chilenos, espanhóis e portugueses ($p > 0,05$) e foi significativamente maior que as frequências observadas nos pacientes americanos ($p < 0,004$) e japoneses ($p < 0,05$). A frequência da a mutação IVS12nt1g>a foi de 5,5%, semelhante à observada na maioria dos estudos prévios, sendo apenas inferior à frequência observada em um estudo realizado com pacientes canadenses ($p < 0,05$). As frequências das mutações IVS2nt5g>c (7,3%) e P281L (3,6%) não são estatisticamente diferentes das frequências observadas nos outros estudos ($p > 0,05$) (tabela 5.2).

Em um estudo anterior, realizado em 17 pacientes de Porto Alegre, foi investigado a presença das três mutações mais frequentes na Península Ibérica (I65T, IVS10nt-11g>a e V388M) e duas mutações prevalentes nas regiões leste e norte européias (R408W e IVS12nt1g>a) (Pérez *et al.*, 1996). A mutação IVS10nt-11g>a não foi detectada neste estudo e as frequências relativas encontradas para as mutações I65T (20,0%), V388M (6,0%), R408W (6,0%) e IVS12nt1g>a (6,0%) foram semelhantes às observadas em nosso estudo ($p > 0,05$).

As frequências das mutações observadas em nosso estudo foram comparadas com as frequências obtidas em um estudo realizado no estado de São Paulo (Pérez *et al.*, 1996; Acosta *et al.*, 2000). As mutações mais frequentes em São Paulo foram IVS10nt-11g>a (17,4%), R261Q (12,2%), V388M (9,1%), R252W (6,5%) e R270K (4,8%). As mutações R261Q, V388M, R252W e R270K apresentaram frequências semelhantes em nosso estudo. As frequências das mutações I65T (3,5%) e R408W (3,5%) nos pacientes de São Paulo foram menores que as observadas no nosso estudo ($p < 0,007$ e $p < 0,04$, respectivamente). Por outro lado, a mutação IVS10nt-11g>a foi mais prevalente entre os pacientes de São Paulo ($p < 0,005$).

De Lucca e colaboradores (1999), a partir da análise das 5 mutações mais frequentes na Europa em 448 alelos mutantes de pacientes do Brasil (estado de São Paulo), Chile, Argentina e Venezuela, demonstraram a presença nestes alelos das mutações mais comuns na Península Ibérica (IVS10nt-11g>a, I65T e V388M) e na Europa Oriental e Setentrional (R408W e IVS12nt1g>a) (De Lucca *et al.*, 1999). Apesar da diferença no delineamento do estudo, este achado é semelhante aos nossos resultados, onde as mutações I65T, R408W, V388M e IVS12nt1g>a estão entre as mais frequentes encontradas em nosso estudo. No entanto, a mutação IVS10nt-11g>a foi encontrada em uma baixa frequência (1,8%) no presente estudo.

Tabela 5.2: Frequência alélica relativa de mutações encontradas no gene da PAH em diferentes populações

População	Mutações								Referências
	I65T	R408W	R261X	IV2nt5g>c	R261Q	V388M	IVS12nt1g>a	P281L	
Brasileira	18,2 (10/55)	9,1 (5/55)	9,1 (5/55)	7,3 (4/55)	7,3 (4/55)	7,3 (4/55)	5,5 (3/55)	3,6 (2/55)	Presente estudo
Chilena						13,0 (19/146)			g
Americana	4,1 (12/294)	18,7 (55/222)			2,4 (7/294)	0,7 (2/294)	7,8 (23/294)	2,7 (8/294)	k
Canadense	4,4 (6/135)	11,1 (15/135)			5,9 (8/135)		17,8 (24/135)	2,2 (3/135)	o
Espanhola	6,7 (26/390)				4,1 (16/390)	6,2 (24/390)		2,3 (3/129)	r, m
Portuguesa	5,4 (12/222)	0,9 (2/222)	0,4 (1/222)		10,4 (23/222)	8,6 (19/222)		4,5 (10/222)	q
Italiana		1,1 (2/177)	4,5 (8/177)		5,1 (9/177)		2,8 (5/177)	5,1 (9/177)	h
Francesa		5,9 (22/372)			6,2 (23/372)		5,6 (21/372)		a
Suíça		6,0 (3/50)			32,0 (16/50)		4,0 (2/50)		a
Belga	2,8 (7/246)	6,9 (17/246)	1,2 (3/246)		6,9 (17/246)		15,0 (37/246)	6,9 (17/246)	d
Alemã		24,5 (80/326)			6,1 (20/326)		14,4 (47/326)		b
Polonesa		63,4 (90/142)			0,7 (1/142)		4,9 (7/142)		c
Romena		45,5 (10/22)		4,5 (1/22)	9,1 (2/22)		9,1 (2/22)	4,5 (1/22)	f
Estoniana		84,0 (57/68)			1,5 (1/68)		2,9 (2/68)		l
Inglesa / escocesa	12,0 (59/490)	21 (103/490)			1,0 (5/490)		13,7 (67/490)	1,0 (5/490)	n
Irlandesa (Norte)	20,2 (49/242)	27,6 (67/242)			1,2 (3/242)		3,3 (8/242)		j
Judia (askhenazi)		2,8 (4/144)			6,3 (9/144)				e
Egípcia				15,4 (4/26)	11,5 (3/26)				s
Australiana	18,1 (15/83)	19,3 (16/83)			4,8 (4/83)		15,7 (13/83)	1,2 (1/83)	i
Japonesa						1,2 (1/82)			p

a: Eisensmith *et al.*, 1992; b: Horst *et al.*, 1993; c: Jaruzelska *et al.*, 1993; d: François *et al.*, 1994; e: Kleiman *et al.*, 1994; f: Popescu *et al.*, 1994; g: Desviat *et al.*, 1995; h: Dianzani *et al.*, 1995a; i: Ramus *et al.*, 1995; j: Zschocke *et al.*, 1995; k: Guldberg *et al.*, 1996; l: Lillevälli *et al.*, 1996; m: Pérez *et al.*, 1997; n: Tyfield *et al.*, 1997; o: Carter *et al.*, 1998; p: Okano *et al.*, 1998; q: Rivera *et al.*, 1998; r: Desviat *et al.*, 1999; s: Effat *et al.*, 1999.

Considerando o pequeno tamanho de nossa amostra, não foi possível comparar o espectro de mutações verificado entre os pacientes do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (tabelas 4.4, 4.5 e 4.6). As diferenças entre as frequências das mutações encontradas nos pacientes destes estados podem ser ocasionais. No entanto, alguns achados merecem destaque:

1. O polimorfismo V245V foi encontrado apenas nos pacientes gaúchos;
2. as mutações I65T, R261Q, R408W, V388M e IVS12nt1g>a representam 51,3% dos alelos mutantes encontrados nos pacientes do Rio Grande do Sul, enquanto que as mutações R261X, I65T, IVS2nt5g>c representam 64,3% dos alelos mutantes observados nos pacientes de Santa Catarina;
3. a aparente frequência elevada da mutação R261X (28,6%) e do polimorfismo IVS2nt19t>c (50,0%) observada nos pacientes catarinenses;
4. a presença de quase todas as alterações nos pacientes gaúchos, exceto as mutações IVS2nt-13t>g e IVS10nt-11g>a as quais foram observadas somente em pacientes catarinenses.

A presença de polimorfismos foi observada em 46,6% dos pacientes com deficiência de PAH. Os polimorfismos IVS2nt19t>c, V245V e IVS12nt-35c>t foram os mais frequentemente detectados. O polimorfismo IVS2nt19t>c apresentou uma frequência de 20,0%, sendo a mais elevada. Esta frequência é similar à observada em pacientes italianos (22,2%) (Dianzani *et al.*, 1995a), checos (20,0%) e franceses (14,0%) (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998) e superior à descrita na Bélgica (1,7%) (François *et al.*, 1994), Noruega (0,8%) (Eiken *et al.*, 1996a), Inglaterra (0,5%) (Tyfield *et al.*, 1997).

A frequência do polimorfismo V245V foi de 10,9%, similar à observada nos pacientes búlgaros (10,0%), franceses (15,0%) (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998), egípcios (18,7%) (Hashen *et al.*, 1996), espanhóis (12,4%) (Pérez *et al.*, 1997) e portugueses (9,4%) (Rivera *et al.*, 1998), superior à verificada em paciente noruegueses (0,8%) (Eiken *et al.*, 1996a), poloneses (1,7%) e turcos (1,8%) (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998) e inferior à apresentada por pacientes italianos (26,6%) (Dianzani *et al.*, 1995a).

A análise de SSCP do fragmento 7 (92 controles) mostrou que o polimorfismo V245V foi encontrado em uma frequência alélica de 23,4% (43 alelos em 184 analisados), sendo 3 indivíduos homocigotos e 37 heterocigotos para o polimorfismo em questão. Esta frequência foi superior ($p < 0,05$) à encontrada em pacientes com deficiência de PAH

apresentando o polimorfismo V245V. Apesar do pequeno número de amostras analisadas, a elevada frequência observada deste alelo pode representar um indício que este polimorfismo é amplamente distribuído, pelo menos na população do Rio Grande do Sul. Não há na literatura nenhum relato sobre este tipo de comparação.

O polimorfismo IVS12nt-35c>t apresentou uma frequência de 7,3%, maior que a descrita em pacientes belgas (1,7%) (François *et al.*, 1994), noruegueses (0,8%) (Eiken *et al.*, 1996a) e espanhóis (0,7%) (Pérez *et al.*, 1997). O polimorfismo Y414Y foi observado em apenas um alelo, apresentando uma frequência baixa (1,8%). A ocorrência deste alelo é considerada rara, havendo poucos estudos que descrevem a sua presença (Guldborg e Güttler, 1993; Guldborg *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1998). O novo polimorfismo IVS12nt-15t>c, detectado em nosso estudo, apresentou uma frequência de 5,5%.

5.5 - DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE DA PAH

Neste estudo, não foram encontradas alterações nos fragmentos 6, 8, 9 e 10 do gene da PAH. No entanto, em relação ao total de alelos mutantes no gene da PAH (412), várias alterações foram descritas nas regiões que abrangem o fragmentos 6 (14,5%) e o fragmento 10 (10,0%) (Carter *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999). Como já foi mencionado, cerca de 18,0% das alterações conhecidas no gene da PAH estão localizadas no exon 7 e em torno de 76,0% se localizam entre as regiões dos exons 5 e 12.

Os resultados do presente estudo revelaram que 29,2% das alterações (7/24) se encontram no fragmento 7, o qual compreende o exon 7 e suas regiões adjacentes 5' e 3'. Esta alta frequência é semelhante à descrita em vários estudos (Dianzani *et al.*, 1995a; Carter *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 1998). Nossos achados indicam que 62,5% (15/24) das alterações identificadas se localizam entre os exons 5 e 12 e o restante se encontram nos exons 1, 2, 3, 4 e 13 (37,5%), valores um pouco menores que os descritos pelo PAHdb (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

O conteúdo de CpG (citosina-fosfato-guanina) no gene da PAH não é elevado e apenas em torno de 6,0% das mutações ocorrem nestas seqüências (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998). As mutações de ponto encontradas neste estudo foram causadas por 18 transições (9 G>A, 6 C>T e 3 T>C) e 3 transversões (G>C, T>G e G>T).

As mutações R158Q, R261Q, IVS7nt1g>a e R408Q resultaram de transições G>A, enquanto que as mutações R252W, R261X, P281L e R408W resultaram de transições C>T. Estas alterações ocorrem em regiões muito conservadas do gene da PAH e apresentam uma grande distribuição em várias populações (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998). Neste estudo, por exemplo, as mutações R408W, R261X e R261Q estão entre as 6 mutações mais freqüentes. Desta forma, a ocorrência de mutações nos códons contendo dinucleotídeos CpG (158, 252, 261, 281 e 408) confirmam que os mesmos são regiões propensas à ocorrência de mutações no gene da PAH (*hot spots*), conforme observado em estudos anteriores (Byck *et al.*, 1997; <http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Nowacki *et al.*, 1998).

A maioria das alterações no gene da PAH, afeta o domínio catalítico, situado entre as regiões codificadoras dos exons 5 (resíduo 143) e 12 (resíduo 410); uma segunda parte afeta o domínio regulatório, o qual se encontra entre os exons 1 (resíduo 1) e 4 (resíduo 142); e uma menor fração ocorre no domínio de tetramerização, que se estende do resíduo 411 no exon 12 ao 452 no exon 13 (Erlandsen e Stevens, 1999). Distribuição semelhante foi observada em nosso estudo, onde 41,6% das alterações (R158Q, V245V, R252W, R261X, R261Q, R270K, P281L, V388M, R408W e R408Q) ocorre no domínio catalítico, 16,7% no domínio regulatório (L15/S16fsdelCT, F55fsdelT, I65T e N133/Q134fsdelATCA) e 4,2% no domínio de tetramerização (Y414Y). As outras alterações (37,5%) estão localizadas em regiões não codificadoras do gene da PAH.

5.6 - SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS MOLECULARES

A percentagem de alterações encontradas, através da análise por SSCP, varia de 70,0% a 90,0%, de acordo com o gene em estudo e com as condições em que a técnica é realizada (Orita *et al.*, 1989; Mirchaud *et al.*, 1992) e parece haver uma maior eficiência no processamento de fragmentos de DNA entre 150 e 300 pb de comprimento (Grompe, 1993; Sheffield *et al.*, 1993).

A análise por SSCP permitiu a identificação de pelo menos uma alteração na seqüência do gene da PAH em 83,3% dos pacientes analisados (25/30). Todas as alterações observadas nos fragmentos através da técnica de SSCP foram confirmadas pelo seqüenciamento direto e/ou digestão com enzimas de restrição como mutações

causadoras de deficiência de PAH ou polimorfismos. A sensibilidade da técnica de SSCP em nosso estudo foi de 62,0% (34 alelos mutantes em 55 analisados).

Nenhum resultado falso-positivo foi observado neste estudo, embora falsos-negativos não possam ser descartados. Os fragmentos 3, 11 e 12 de controles positivos para as mutações I65T, IVS10nt-11g>a e IVS12nt1g>a não apresentaram padrões de migração alterados quando analisados pela técnica de SSCP (nas condições utilizadas neste estudo). Estas alterações representam 14 alelos mutantes. Desta forma, a taxa de falsos-negativos no nosso estudo ficou em pelo menos 25,4%. Um estudo recente sobre métodos de triagem molecular aponta que a análise de SSCP pode apresentar taxas de resultados falsos-negativos entre 5,0% e 40,0% (Ravine, 1999).

A análise do fragmento 3 de pacientes, previamente identificados por análise de digestão para a mutação I65T, foi realizada em duas condições de temperaturas diferentes (4° e 18°C), porém não foi encontrado nenhum padrão de mobilidade característico para esta mutação. Por outro lado, foi observado que um paciente apresentou dois padrões de migração diferentes para a mesma alteração, conforme as temperaturas utilizadas na análise de SSCP. Um pequeno aumento na mobilidade deste fragmento foi observado quando a eletroforese foi realizada a 4°C (canaleta 5 da figura 4.4c).

A conformação do DNA de fita simples pode ser alterada por fatores ambientais tais como temperatura do gel durante a eletroforese, concentração do tampão de eletroforese e a presença de agentes desnaturantes. A alta temperatura pode destruir algumas conformações pouco estáveis e a mudança de mobilidade pode aumentar quando a eletroforese for realizada em temperaturas baixas (Orita *et al.*, 1989).

Labrune e colaboradores (1991) não detectaram, apesar de várias condições experimentais serem testadas (concentração do tampão, temperatura e duração da corrida), um polimorfismo conformacional para a mutação IVS12nt1g>a. Concluíram, então, que o efeito de uma alteração no padrão de migração do fragmento de DNA pode ser imprevisível, e, que algumas mudanças de nucleotídeos podem não alterar significativamente a mobilidade eletroforética dos fragmentos amplificados (Labrune *et al.*, 1991).

A análise de SSCP permitiu a detecção tanto de substituições de um nucleotídeo como deleções. Em muitos casos, foi visível a observação de padrões de migração distintos para a mesma mutação em pacientes homozigotos e heterozigotos. Um exemplo desta relação é representado pela mutação R408W, a qual apresenta dois

padrões de migração distintos: um para pacientes heterozigotos e outro para homozigotos (canaletas 4 e 5 da figura 4.13c, respectivamente).

Vários estudos utilizaram a técnica de SSCP como método de triagem molecular para mutações comuns, raras e novas, apresentando graus diferentes de sensibilidade. A sensibilidade da técnica de SSCP em nosso estudo foi semelhante à observada em um estudo realizado em pacientes italianos (64,0%) (Dianzani *et al.*, 1995a) e menor que a verificada em um outro estudo com pacientes italianos (75,0%) (Guzzeta *et al.*, 1997), e estudos com pacientes das Ilhas Britânicas (89,0%) (Tyfield *et al.*, 1997) e da Estônia (93,0%) (Lillevälli *et al.*, 1996).

Existem outras técnicas usadas para a detecção rápida de mutações no gene da PAH, tais como clivagem bioquímica e DGGE. Estas técnicas requerem, como no procedimento de SSCP, conhecimento da seqüência normal e amplificação eficiente da seqüência mutante. Contudo, a análise de SSCP tem muitas vantagens sobre estas técnicas, não sendo necessários tratamento químico e equipamentos específicos. Além disso, este procedimento requer completo ajuste de condições eletroforéticas para cada exon (Labrune *et al.*, 1991).

A sensibilidade da técnica de SSCP atingida em nosso estudo (62,0%) foi comparada com a verificada em alguns estudos usando a técnica de DGGE, sendo menor que as sensibilidades de 76,0%, 87,5%, 89,0%, 92,0%, 95,0%, 95,7% e 99,6% verificada em pacientes egípcios (Effat *et al.*, 1999), venezuelanos (De Lucca *et al.*, 1998), espanhóis (Desviat *et al.*, 1999), japoneses (Okano *et al.*, 1998), americanos (Guldberg *et al.*, 1996), canadenses (Carter *et al.*, 1998) e irlandeses (Zschocke *et al.*, 1995), respectivamente.

A sensibilidade do método diminui com o tamanho do produto de PCR, baixando até 50,0% quando fragmentos de 400 pb são analisados. Algumas das limitações quanto ao tamanho do fragmento, podem ser superadas pela amplificação e análise simultâneas de vários fragmentos (PCR multiplex) ou por digestão com enzimas de restrição (Grompe, 1993). Estas análises não foram realizadas no presente estudo.

A combinação da técnica de SSCP com a análise por digestão com enzimas de restrição e o seqüenciamento direto dos fragmentos de DNA permitiu a eficiência do diagnóstico molecular em 87,3% dos alelos analisados (48/55), valor semelhante ao observado nos estudos realizados em pacientes da Escócia, País de Gales, Inglaterra (89,0%) (Tyfield *et al.*, 1997), Espanha (89,0%) (Desviat *et al.*, 1999), São Paulo (91,0%)

(Acosta *et al.*, 2000) e Japão (92,0%) (Okano *et al.*, 1998), superior ao valor encontrado em pacientes da Itália (64,0%) (Dianzani *et al.*, 1995a), e inferior à percentagem encontrada em pacientes do Canadá (95,7%) (Carter *et al.*, 1998), Austrália (98,0%) (Ramus *et al.*, 1995), Irlanda (99,6%) (Zschocke *et al.*, 1995) e Noruega (99,6%) (Eiken *et al.*, 1996a).

Em 7 pacientes (3, 12, 16, 20, 23, 29 e 30) não foi possível identificar a mutação presente no outro alelo. Isto pode ser devido a uma possível limitação da técnica de SSCP, pois algumas mudanças de nucleotídeos podem não alterar significativamente o padrão de migração dos fragmentos amplificados. O seqüenciamento de toda a região codificante do gene da PAH destes pacientes poderia resolver este problema, mas esta etapa não foi realizada no presente estudo.

5.7 - CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

5.7.1 - Pacientes com HPA por deficiência de PAH

a) Correlação genótipo-fenótipo: Presente estudo x dados da literatura

A correlação genótipo-fenótipo tem sido usada para avaliar a gravidade das mutações em pacientes homocigotos com o mesmo genótipo e mesmo fenótipo. No entanto, a maioria dos pacientes com deficiência de PAH são heterocigotos compostos, sendo difícil estabelecer a gravidade de cada mutação e sua contribuição para a expressão do fenótipo (Waters *et al.*, 1998a).

O fenótipo da HPA por deficiência de PAH é muito heterogêneo, sendo difícil de correlacionar com a atividade residual estimada para as proteínas mutantes. Desta forma, o uso clínico da análise do genótipo deve ser limitado (Romano *et al.*, 1998).

Dentre os genótipos definidos neste estudo, apenas 13 dos 26 foram descritos previamente. A correlação destes genótipos com os fenótipos dos pacientes foi comparada com a observada em outros estudos (<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Dianzani *et al.*, 1995a; Desviat *et al.*, 1997; Guzetta *et al.*, 1997; Kayaalp *et al.*, 1997; Guldberg *et al.*, 1998b; Nowacki *et al.*, 1998; Effat *et al.*, 1999). A tabela 5.3 mostra uma concordância de 92,3% entre os nossos resultados e os da literatura ($p > 0,05$). No entanto, as mutações I65T e V388M quando em homocigose podem resultar nas três categorias de deficiência de PAH (PKU leve, PKU moderada ou PKU clássica). Por outro

lado, a presença das mutações IVS2nt5g>c ou R261Q estão associadas à PKU moderada ou PKU clássica.

Os genótipos R261X/R261X, L15/S16delCT/L15/S16delCT (homozigotos nulos: uma mutação responsável por atividade não detectável de PAH), R408W/P281L, R408W/F55fsdelT (heterozigotos compostos nulos: duas mutações responsáveis por atividade não detectável de PAH), I65T/IVS12nt1g>a e I65T/P281L (heterozigotos compostos funcionais: uma mutação de sentido trocado que confere atividade residual de PAH e uma mutação associada à atividade enzimática não detectável) estão sempre associados à PKU clássica (tabela 5.3).

Tabela 5.3: Correlação genótipo-fenótipo: presente estudo e dados da literatura

Paciente	Genótipo	Fenótipo	
		Presente estudo	Outros estudos *
4	R408W / P281L	Clássico	Clássico
5	R408W / R408W	Moderado	Clássico
7	IVS2nt5g>c/IVS2nt5g>c	Clássico	Clássico**
8	R261X / R261X	Clássico	Clássico
9	R408W / F55fsdelT	Clássico	Clássico
13	I65T / I65T	Moderado	Moderado***
15	I65T / IVS12nt1g>a	Clássico	Clássico
18	R408W / R261Q	Clássico	Clássico**
21	I65T / P281L	Clássico	Clássico
24	R261Q / R261Q	Moderado	Moderado**
26	L15/S16delCT / L15/S16delCT	Clássico	Clássico
27	V388M / V388M	Moderado	Moderado***
28	R261Q / IVS12nt1g>a	Moderado	Moderado**

*: Fenótipos mais comumente encontrados para os respectivos genótipos; **: Estes genótipos podem causar PKU moderada ou clássica; ***: Estes genótipos podem causar PKU leve, moderada ou clássica (adaptado de <http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>; Dianzani *et al.*, 1995a; Desviat *et al.*, 1997; Guzetta *et al.*, 1997; Kayaalp *et al.*, 1997; Guldberg *et al.*, 1998b; Nowacki *et al.*, 1998; Effat *et al.*, 1999).

b) Distribuição das mutações por fenótipos

Neste estudo, 17 pacientes (9 com diagnóstico precoce e 8 com diagnóstico tardio) apresentaram 15 mutações associadas à PKU clássica, sendo que as mutações L15/S16fsdelCT, F55fsdelT, N133/Q134fsdelATCA, R158Q, R270K, P281L, IVS7nt1g>a e IVS10nt-11g>a foram encontradas somente nestes pacientes. A maioria dos pacientes com PKU clássica apresentaram genótipos nulos (3 heterozigotos compostos e 4 homozigotos). A variação entre 13,0% e 21,0% da ARP foi observada nos pacientes 15,

17, 18, 21 e 22 (heterozigotos compostos funcionais). Com exceção do paciente 29, os pacientes 16, 23 e 30 apresentaram apenas uma mutação nula identificada em um dos alelos. Quanto ao paciente 14, a ARP conferida pela mutação R158Q foi de 10%, porém, devido à ausência de estudos de expressão da mutação R270K, ainda não se sabe o efeito desta alteração no gene da PAH. No entanto, a análise de expressão *in vitro* da mutação R270K mostrou atividade de PAH não detectável em ratos (Dickson *et al.*, 1994).

De acordo com a tolerância à Phe da dieta, 9 pacientes (2 com diagnóstico tardio e 7 com diagnóstico precoce) apresentaram 9 mutações associadas com a forma moderada da PKU. As mutações IVS2nt-13t>g e R252W foram identificadas somente em pacientes com PKU moderada. Com exceção do paciente 5 que apresentou o genótipo nulo R408W/R408W, a ARP variou de 13,0% a 21,0% nos pacientes heterozigotos compostos funcionais (6, 19 e 28) e de 26,0% a 43,0% nos pacientes homozigotos para mutações de sentido trocado (13, 24 e 27). Nos pacientes 3 e 12 foi identificado apenas uma mutação nula.

A mutação R408W é uma mutação nula, portanto em pacientes homozigotos pode determinar PKU clássica. No entanto, quando a mutação R408W está associada à presença dos haplótipos 1 ou 4, pode resultar em um fenótipo menos grave (Güttler *et al.*, 1987). No presente estudo, a análise destes haplótipos no gene da PAH não foi realizada para testar esta hipótese.

No grupo dos pacientes com PKU leve, 3 mutações foram identificadas: I65T, R408Q e 1378g>t. Além do fato que as mutações I65T e R408Q apresentam ARP de 26,0% e 55,0%, respectivamente, os menores níveis de Phe observados no pré-tratamento e durante o tratamento e uma maior tolerância à Phe da dieta contribuíram para a inclusão dos pacientes 11 e 20 nesta categoria. Estes pacientes apresentaram as menores elevações dos níveis de Phe, quando submetidos à dieta normal por mais de um mês, indicando que apresentam uma maior tolerância à Phe que os pacientes com PKU clássica, especialmente.

Foram observados 9 pacientes com genótipos de heterozigoto composto funcional. A maioria destes pacientes (15, 17, 18, 21 e 22) exibe o fenótipo clássico da doença, apresentando níveis de Phe pré-tratamento muito elevados, difícil controle dos níveis de Phe durante o tratamento e uma menor tolerância à Phe da dieta. Os pacientes 6 (diagnóstico tardio), 19 e 28 (diagnóstico precoce) apresentaram a forma moderada de deficiência de PAH. Não foi possível determinar a tolerância à Phe da dieta do paciente 2, o qual apresentou níveis de Phe pré-tratamento semelhante aos observados nos

pacientes com PKU moderada, mas com níveis de Phe durante o tratamento semelhantes aos dos pacientes com PKU clássica.

As mutações IVS2nt5g>c, R261Q, R261X, V388M, R408W e IVS12nt1g>a foram encontradas nos pacientes com PKU clássica e PKU moderada. A mutação I65T foi encontrada em todas as categorias, fato descrito freqüentemente (Desviat *et al.*, 1997; Kayaalp *et al.*, 1997; Guldborg *et al.*, 1998b; Nowacki *et al.*, 1998).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar as bases genéticas responsáveis pela existência de fenótipos diferentes na HPA por deficiência de PAH, como: a complementação interalélica negativa (Kaufman *et al.*, 1975); o alelismo (Ledley *et al.*, 1986), a ação combinada de muitos genes (DiSilvestre *et al.*, 1991); e a presença de um gene modificador independente (Ramus *et al.*, 1993);

Os pacientes 24 e 28 (um homozigoto e outro heterozigoto composto funcional para a mutação R261Q, respectivamente) apresentaram valores de Phe pré-tratamento maiores que o esperado a partir do seu genótipo. Estes achados foram observados em outros estudos, nos quais a análise de expressão revelou que a mutação R261Q apresenta atividade residual da PAH em torno de 30% e imunorreatividade em torno de 50%, podendo ser um bom candidato para a complementação alélica negativa entre alelos mutantes da PAH (Lichter-Konecki *et al.*, 1994; Burgad *et al.*, 1996).

c) Genótipo x sintomas clínicos

As principais manifestações clínicas observadas nos pacientes com diagnóstico precoce ou tardio de deficiência de PAH são mostradas na tabela 5.4.

A maioria das manifestações clínicas encontradas em nossos pacientes é freqüentemente descrita em outros estudos (MacDonald *et al.*, 1994; Scriver *et al.*, 1995a; Blau e Blaskovics, 1996). Não houve nenhuma correlação entre os valores de ARP e estas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes. No entanto, as complicações neurológicas, como o atraso no desenvolvimento neuro-psicomotor, foi muito mais evidente nos pacientes diagnosticados tardiamente que nos com diagnóstico precoce. Esta constatação comprova a importância do diagnóstico precoce para a deficiência de PAH. Um exemplo é o caso do paciente 2 (I65T/IVS2nt5g>c) que foi diagnosticado tardiamente e, portanto, apresentou retardo mental. Enquanto que o paciente 19 com diagnóstico precoce e o mesmo genótipo, não apresentou retardo mental.

Tabela 5.4: Principais sintomas clínicos nos 30 pacientes com HPA por deficiência de PAH.

Categorias fenotípicas	n	Sintomas clínicos (%)			
		Diagnóstico precoce		Diagnóstico tardio	
PKU clássica	17	Hiperatividade	(22,2%)	Convulsões	(75,0%)
		RMO	(22,2%)	RDNPM	(62,5%)
		Hipereflexia difusa	(11,1%)	Lesões cutâneas	(37,5%)
		Aprendizado deficiente	(11,1%)	Retardo mental	(25,0%)
		Tremores	(11,1%)	Microcefalia	(25,0%)
		Lesões cutâneas	(11,1%)	Aprendizado deficiente	(25,0%)
		Vômitos	(11,1%)	Hipotonia	(12,5%)
		Gastroenterite	(11,1%)	Hipereflexia difusa	(12,5%)
				Agressividade	(12,5%)
				Hiperatividade	(12,5%)
				Tremores	(12,5%)
				RMO	(12,5%)
				Marcha atáxica	(12,5%)
		Gastroenterite	(12,5%)		
PKU moderada	9	Lesões cutâneas	(57,1%)	Convulsões	(100,0%)
		Hipereflexia difusa	(28,6%)	Gastroenterite	(50,0%)
		Vômitos	(28,6%)	RDNPM	(50,0%)
		Irritabilidade	(14,3%)	Hiperatividade	(50,0%)
				Hipereflexia difusa	(50,0%)
				Lesões cutâneas	(50,0%)
PKU leve	2	Irritabilidade	(50,0%)	-	
		Hiperatividade	(50,0%)	-	
Pacientes não classificados	2	-		Retardo mental	(100,0%)
		-		Aprendizado deficiente	(100,0%)
		-		Hipotonia	(50,0%)
		-		Lesões cutâneas	(50,0%)
		-		RDNPM grave	(50,0%)
		-		Comportamento autista	(50,0%)
		-		Agressividade	(50,0%)
-		Tremores	(50,0%)		

n: Tamanho da amostra; RMO: retardo da maturação óssea; RDNPM: retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor.

d) Genótipo x parâmetros clínicos e bioquímicos

Para avaliar a correlação existente entre as variáveis consideradas neste estudo, a atividade residual prevista para a proteína PAH mutante (ARP) foi comparada com os parâmetros ligados ao diagnóstico (níveis de Phe pré-tratamento; tolerância à dieta restrita em Phe, determinada entre 2 e 5 anos de idade; teste de sobrecarga), ao tratamento (níveis de Phe durante os primeiros 5 anos de idade) e ao quadro clínico (somente nos pacientes com diagnóstico tardio, considerando os escores do coeficiente de inteligência, presença ou não de convulsões e retardo mental e presença ou não de alterações no eletroencefalograma).

Os níveis de Tyr pré e durante o tratamento foram considerados somente para os pacientes com diagnóstico precoce. A tolerância à dieta restrita em Phe foi o principal parâmetro utilizado para a classificação fenotípica dos pacientes (PKU leve, PKU moderada e PKU clássica).

Os estudos de análise de expressão *in vitro* demonstraram que cada mutação no gene da PAH tem um efeito quantitativo na atividade da PAH (Okano *et al.*, 1991). Vários autores descreveram o efeito das mutações sobre a atividade da PAH, demonstrando que a combinação destas está associada com a tolerância à Phe e os níveis de Phe no pré-tratamento (Eisensmith *et al.*, 1996; Güttler e Guldberg, 1996; Desviat *et al.*, 1997; Okano *et al.*, 1998).

A associação entre os valores de ARP e a tolerância à Phe não foi encontrada em outros relatos, onde a qualidade da terapia dietética foi independente do genótipo dos pacientes (Lichter-Konecki *et al.*, 1994; Burgard *et al.*, 1996). Ramus e colaboradores descreveram que os níveis plasmáticos de Phe não se correlacionaram com os valores de ARP em pacientes com HPA por deficiência de PAH não tratados (Ramus *et al.*, 1999). Nossos resultados também mostraram que a ARP não se correlacionou com a tolerância à Phe e nem com os níveis de Phe pré-tratamento nos 30 pacientes analisados.

d.1) Correlação genótipo-fenótipo: pacientes com diagnóstico precoce

Os níveis de Phe pré e durante o tratamento foram os fatores mais associados à quantidade de Phe tolerada na dieta dos pacientes com HPA por deficiência de PAH, diagnosticados precocemente. Desta forma, os pacientes que apresentaram menor tolerância à dieta e os maiores valores de Phe no pré e durante o tratamento foram classificados como apresentando PKU clássica; os pacientes com maior tolerância à Phe e os menores níveis de Phe no pré e durante o tratamento apresentaram PKU leve; os pacientes com os valores intermediários exibiram a forma moderada da doença.

Os níveis de Tyr apresentaram correlações significativas com os valores da ARP e os parâmetros bioquímicos dos pacientes com diagnóstico precoce. Por exemplo, uma forte correlação positiva foi verificada entre os níveis de Phe e Tyr pré-tratamento. Esta associação pode ser melhor observada nos pacientes 5, 7, 10 (homozigotos nulos), 24 (homozigoto), 15, 17, 19, 21 e 28 (heterozigotos compostos funcionais). Outro fato relevante foi a pequena relação encontrada entre os valores de Phe da dieta e os níveis de Tyr durante o tratamento.

Houve uma pequena correlação positiva entre os valores de ARP e os níveis de Tyr observados durante o tratamento, indicando que a variação nos níveis de Tyr podem depender da atividade residual da PAH. Os valores de ARP mostraram uma tendência a se correlacionar com os níveis de Tyr no momento do diagnóstico. Os níveis de Tyr durante o tratamento também apresentaram uma tendência à correlação com os níveis de Tyr pré-tratamento e de Phe durante o tratamento. Apesar da relevante sobreposição entre os parâmetros analisados e do pequeno número de amostras, os pacientes com PKU leve apresentaram níveis de Tyr durante o tratamento maiores que os pacientes com PKU grave ($p < 0,05$).

Levando em consideração as correlações encontradas, os níveis de Tyr podem representar um possível marcador da expressão do genótipo e exercer uma importante função no controle dietético e na determinação do fenótipo dos pacientes.

É muito difícil manter os níveis de Phe dentro das medidas aceitáveis para os pacientes que apresentam PKU clássica (Verkerk *et al.*, 1994; Scriver *et al.*, 1995a). Este achado foi também confirmado em nosso estudo quando os pacientes com diagnóstico precoce foram comparados, onde os pacientes com PKU clássica apresentaram níveis de Phe pré e durante o tratamento maiores que os observados nos pacientes com PKU leve (tabela 4.9).

Apesar de não haver uma correlação entre os valores de ARP com os parâmetros bioquímicos ligados ao tratamento (níveis de Phe durante o tratamento) e ao diagnóstico (níveis de Phe pré-tratamento e quantidade de Phe tolerada na dieta), algumas diferenças significativas foram encontradas quando os pacientes com diagnóstico precoce foram agrupados nas 3 categorias fenotípicas. Os pacientes com PKU leve ou PKU moderada apresentaram uma tolerância maior à Phe da dieta que os pacientes com PKU clássica, como era esperado.

d.2) Correlação genótipo-fenótipo: pacientes com diagnóstico tardio

O desenvolvimento e o desempenho cognitivos são o resultado da interação de muitos genes. Nem sempre os parâmetros bioquímicos e o genótipo se correlacionam com o fenótipo clínico, como foi provado em estudos analisando o desenvolvimento cognitivo em pacientes com diagnóstico tardio (Güttler *et al.*, 1993b; Ramus *et al.*, 1993; Ramus *et al.*, 1999). Os fatores ambientais (diferenças na ingestão de Phe durante os primeiros anos de vida) e os fatores genéticos parecem determinar como os níveis

elevados de Phe prejudicam o desenvolvimento e a função cognitivos dos pacientes não tratados e com diagnóstico tardio (Güttler e Guldberg, 1996).

Apesar de não ocorrer diferenças significativas entre as variáveis dos parâmetros clínicos e bioquímicos, houve uma tendência dos pacientes com retardo mental e EEG alterado apresentarem níveis de Phe pré-tratamento maiores que os observados nos pacientes sem retardo mental e EEG normal ($p > 0,06$). Os pacientes que nunca apresentaram convulsões exibiram níveis de Phe durante o tratamento maiores que os que exibiram crises convulsivas em alguma época da vida, mas este achado não foi considerado estatisticamente significativo ($p > 0,07$).

Este estudo não demonstrou correlações entre os valores de ARP com os parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes diagnosticados tardiamente. Quando os parâmetros ligados ao diagnóstico e ao tratamento foram comparados, foi observado que a quantidade de Phe tolerada na dieta pode depender das concentrações de Phe durante o tratamento. Os níveis de Tyr não foram mencionados porque não constavam na maioria das fichas clínicas dos pacientes com diagnóstico tardio. Em relação aos parâmetros clínicos, não houve diferenças significativas entre as variáveis analisadas, talvez, devido ao pequeno número da amostra. Mas dois aspectos merecem ser destacados:

1. A maioria dos pacientes com retardo mental apresentaram convulsões e EEG alterado;
2. os baixos escores do QI apresentados pelos pacientes diagnosticados tardiamente foram associados à presença de retardo mental.

Algumas diferenças significativas foram encontradas quando os pacientes com diagnóstico tardio foram agrupados nas 3 categorias fenotípicas. A análise destes pacientes mostrou que os valores da ARP e a tolerância à Phe da dieta foram maiores nos pacientes com PKU moderada que nos pacientes com a forma clássica da doença.

d.3) Pacientes com diagnóstico precoce x pacientes com diagnóstico tardio

A precocidade do diagnóstico pode também desempenhar um papel relevante na manutenção terapêutica dos níveis de Phe em pacientes com PKU clássica. Os pacientes diagnosticados precocemente e com PKU clássica apresentaram níveis de Phe pré-tratamento e tolerância à Phe da dieta maiores que os observados nos pacientes com diagnóstico tardio, exibindo o mesmo fenótipo. No entanto, durante o tratamento, os pacientes com diagnóstico tardio e com PKU clássica apresentaram níveis de Phe

maiores que os observados nos pacientes com diagnóstico precoce e apresentando o mesmo fenótipo (tabela 4.9).

d.4) Efeito do genótipo sobre o metabolismo da Phe

O teste de sobrecarga de Phe em heterozigotos compostos funcionais é uma das formas de analisar os efeitos das mutações de sentido trocado sobre a atividade da PAH. Este teste pode determinar a quantidade de Phe tolerada para manter os níveis de Phe dentro das proporções terapêuticas. O teste de sobrecarga de Phe pode também representar uma tentativa de determinar o diagnóstico diferencial entre as formas de HPA por deficiência de PAH (Guldberg *et al.*, 1993b; Güttler e Guldberg, 1994).

O teste de sobrecarga foi aplicado em 17 pacientes (6 com diagnóstico tardio e 11 com diagnóstico precoce) e teve a duração média de 3 dias, período no qual os pacientes receberam o triplo da quantidade de Phe administrada durante a dieta controlada.

Não houve correlação entre os valores de ARP e os níveis de Phe após a sobrecarga de Phe. Os parâmetros ligados ao diagnóstico apresentaram uma correlação negativa com os níveis de Phe após a sobrecarga, onde os pacientes com menor tolerância à dieta apresentavam valores elevados de Phe após o teste de sobrecarga. Por outro lado, os parâmetros ligados ao tratamento apresentaram uma forte correlação positiva com os níveis de Phe após a sobrecarga (tabela 10).

Quando os pacientes foram agrupados de acordo com o fenótipo, diferenças significativas foram observadas. Como já abordado, os pacientes com PKU moderada exibiram valores de ARP maiores que os observados nos pacientes com PKU clássica, os quais por sua vez, apresentaram níveis de Phe pré-tratamento e após a sobrecarga maiores que os encontrados nos pacientes com PKU leve. Os pacientes com PKU leve ou PKU moderada apresentaram níveis de Phe durante o tratamento e na pré-sobrecarga menores que os verificados nos pacientes com a forma clássica da doença. Porém, os mesmos apresentam uma maior tolerância à Phe da dieta que os pacientes com PKU clássica (tabela 4.11).

Os pacientes com PKU clássica exibindo genótipos nulos (1, 7, 8 e 10) apresentaram aumento dos níveis de Phe após a sobrecarga, principalmente nos pacientes 1 e 8. O mesmo foi observado nos pacientes heterozigotos funcionais (2, 17, 18, 19, 21 e 22), com destaque para os pacientes 2, 18 e 22. Os pacientes homozigotos para as mutações I65T (13), R261Q (24) e V388M (27) apresentaram um aumento dos

níveis de Phe esperado para pacientes com PKU moderada. Possivelmente, este achado pode estar associado aos significativos valores da ARP conferidos por estas mutações (particularmente R261Q e V388M) (tabela 4.11).

O paciente 14 (R158Q/R270K) apresentou um aumento expressivo dos níveis de Phe após a sobrecarga (1622,3 $\mu\text{mol/L}$), valor esperado para o fenótipo de PKU clássica. No entanto, como mencionado anteriormente, ainda não foi possível determinar o efeito da mutação R270K no gene da PAH. Desta maneira, torna-se difícil determinar se este paciente é um heterozigoto composto funcional ou um heterozigoto composto com duas mutações de sentido trocado conferindo atividade residual de PAH.

e) Inconsistências na correlação genótipo-fenótipo

O fenótipo observado nos pacientes dinamarqueses tem sido sempre igual ao fenótipo esperado, deduzido a partir do genótipo. Desta maneira, as exceções seriam pacientes apresentando fenótipo pobremente predito a partir do genótipo (Güttler e Guldberg, 1996). Guldberg e colaboradores (1998) sugeriram que as diferenças nos métodos usados para a detecção de mutações e/ou para a classificação dos fenótipos podem explicar um grande número de inconsistências na relação genótipo-fenótipo (Guldberg *et al.*, 1998b). Estas particularidades podem também ser consideradas no presente estudo. Por exemplo, algumas diferenças foram observadas em três irmandades (paciente 8, paciente 21 e paciente 23) e em outros pacientes que apresentaram a forma clássica de deficiência de PAH, especialmente.

O paciente 8 (R261X/R261X) foi diagnosticado com 2 anos e 6 meses e freqüente escola especial. No entanto, sua irmã foi diagnosticada mais tardiamente (11 anos e 9 meses) e, apesar disto, está cursando a 6ª série da escola normal com 13 anos de idade.

O paciente 21 (I65T/P281L) foi diagnosticado precocemente, apresentou níveis de Phe durante os primeiros anos de tratamento inadequados para a sua idade, apesar de freqüentar escola normal. Sua irmã teve diagnóstico tardio (1 ano), apresenta retardo mental, freqüente escola especial, mas apresentou níveis de Phe nos primeiros anos de tratamento adequados para a sua idade.

O paciente 23 (mutação R408W em apenas um dos cromossomas) foi diagnosticado mais tardiamente (5 anos e 6 meses), apresentou convulsões e falou aos 4 anos. Sua irmã teve diagnóstico tardio (2 anos), mas nunca apresentou convulsões e falou com 1 ano e 3 meses.

O paciente 6 (V388M/IVS2nt-13t>g) foi diagnosticado tardiamente (5 meses) e apresenta PKU moderada. Em sua primeira consulta, foi observado irritabilidade e lesões cutâneas. Apresentou convulsão, mas o EEG foi normal. Freqüente escola normal e continua agitado. Por outro lado, o paciente 14 (R158Q/R270K) com diagnóstico tardio semelhante ao do paciente 6 apresentou PKU clássica e, em sua primeira consulta, foi observada a presença de RDNPM e microcefalia. Apresentou convulsão e EEG alterado.

O paciente 27 (V388M/V388M) apresenta PKU moderada e teve diagnóstico tardio com 1 ano de idade. A atividade residual prevista para a proteína PAH mutante é expressiva (43,0%) e seria esperado que o paciente apresentasse uma forma mais leve da doença. Porém, na primeira consulta foi observado um grave atraso do DNPM, relato de convulsões e o EEG apresentou atrofia cerebral.

Apesar de apresentar PKU clássica, o paciente 29 (I65T/?) não apresenta retardo mental, sendo o único caso onde o valor de QI esta dentro dos valores da normalidade. Este paciente foi diagnosticado com 5 anos de idade e apresenta apenas a mutação I65T em um dos seus cromossomas. Na primeira consulta, apresentou agressividade. Freqüente escola normal com bom desempenho e apresenta um controle metabólico satisfatório.

A elevada freqüência de mutações graves, as quais contribuem para a formação de genótipos nulos, pode explicar a prevalência relativamente alta da forma clássica da deficiência de PAH em nossos pacientes. Resultados semelhantes foram documentados em outros estudos (Eisensmith *et al.*, 1996; Guldberg *et al.*, 1996).

5.7.2 - Pacientes com HPA por deficiência de PAH apresentando mutação I65T

A mutação I65T apresentou uma freqüência de 18,2%, sendo a mais freqüente neste estudo. Esta alteração foi identificada em todas as classes (1 paciente com PKU leve, 2 com PKU moderada e 4 com PKU clássica), conforme descrito por outros estudos (Desviat *et al.*, 1997; Guldberg *et al.*, 1998b). Devido à falta de dados relacionados à dieta e ao diagnóstico tardio realizado acima dos 10 anos de idade, não foi possível determinar o fenótipo nos pacientes 2 (I65T/IVS2nt5g>c) e 25 (I65T/I65T).

Foram identificados 3 pacientes com diagnóstico tardio apresentando a mutação I65T, sendo 1 homocigoto, 1 heterocigoto composto funcional (I65T/IVS2nt5g>c) e 1 onde foi identificado apenas uma mutação (I65T/?). Seis pacientes com diagnóstico

precoce apresentaram esta alteração, sendo 1 homozigoto, 4 heterozigotos compostos funcionais (I65T/IVS2nt5g>c, I65T/R261X, I65T/P281L e I65T/IVS12nt1g>a) e 1 onde foi identificado apenas uma mutação (I65T/?).

Os pacientes apresentaram valores de ARP que variaram entre 13,0% e 26,0%. Os níveis de Phe pré-tratamento apresentaram uma tendência à correlação com os valores de ARP, a qual não foi estatisticamente significativa ($r:-63= p=0,09$). Por outro lado, houve uma forte associação negativa entre os níveis de Phe durante o tratamento e a quantidade de Phe tolerada na dieta ($r:-82= p<0,01$), indicando que os pacientes com PKU clássica apresentam uma menor tolerância à Phe da dieta.

Os pacientes heterozigotos compostos funcionais com PKU clássica (15, 17 e 21) e diagnosticados precocemente apresentaram níveis muito elevados de Phe pré-tratamento (variando entre 2101 e 2948 $\mu\text{mol/L}$), indicando uma forte contribuição das mutações nulas R261X, P281L e IVS12nt1g>a sobre este parâmetro, como tem sido documentado (Kayaalp *et al.*, 1997; Guldberg *et al.*, 1998b).

Estes resultados podem ser observados nas tabelas 4.7 e 4.8.

5.7.3 - Heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH

Vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar os possíveis efeitos do adoçante aspartame e seus componentes no metabolismo dos aminoácidos Phe e Tyr em heterozigotos para HPA por deficiência de PAH (Stegink *et al.*, 1987; Blau *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997). A relação entre os testes de sobrecarga de Phe e mutações no gene da PAH tem sido pouco explorada (Svensson *et al.*, 1994; Guldberg *et al.*, 1998a; Spada *et al.*, 1998). Este é o primeiro estudo em heterozigotos que procurou avaliar o efeito de um único alelo mutante no metabolismo da Phe e da Tyr, sob condições de jejum e após uma sobrecarga de aspartame.

Na situação de jejum, foi observado que os níveis plasmáticos de Phe encontrados nos heterozigotos com mutações moderadas foram maiores que os observados nos heterozigotos com mutações graves, embora uma importante sobreposição tenha ocorrido. Estes achados estão de acordo com os obtidos em um estudo anterior, no qual foi relatado que após uma sobrecarga protéica, as concentrações de Phe e Tyr não são capazes de prever a gravidade de mutações no gene da PAH em heterozigotos (Svensson *et al.*, 1994).

As relações Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram consideradas os parâmetros mais adequados para discriminar controles de heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH, tanto na situação de jejum como após a sobrecarga de aspartame. Os resultados apresentados relatam os níveis de Phe e Tyr em heterozigotos portadores de mutações específicas encontradas neste estudo, os quais não podem ser generalizados para outras mutações. Contudo, estes achados sugerem que estudos adicionais, abrangendo um maior número de indivíduos heterozigotos, são necessários para definir o potencial diagnóstico dos testes de sobrecarga, os quais poderiam detectar e distinguir portadores de mutações moderadas e graves.

Os resultados aqui mencionados foram recentemente aceitos para publicação (anexo 6).

5.8 - ASPECTOS ÉTNICOS

A grande miscigenação étnica é responsável pela acentuada heterogeneidade da população brasileira, onde um pouco mais da metade são caucasianos de origem européia e o restante são mestiços de origem negra, ameríndia e asiática. A maioria da população caucasiana no Brasil é constituída por descendentes de portugueses, italianos, espanhóis e alemães. Esta distribuição é mais evidente na região sul, onde a miscigenação étnica é menor.

A maioria dos pacientes é de origem caucasóide (95,0%), sendo a denominação "brasileiro" o termo mais usado para definir a origem étnica, vindo a seguir os descendentes de portugueses, alemães, italianos, espanhóis e poloneses. O restante foi constituído de negróides (5,0%). A tabela 5.5 mostra a ascendência dos pacientes e as mutações identificadas.

A distribuição de haplótipos mutantes e associações entre mutações e haplótipos variam muito entre a maioria dos grupos étnicos (Eisensmith *et al.*, 1995). Neste estudo não foi realizada a análise de haplótipos para verificar estas associações, porém a maioria das mutações encontradas tem sido associada a um ou mais haplótipos observados em populações diferentes (Pérez *et al.*, 1996; Kozák *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1998; Effat *et al.*, 1999; Ramus *et al.*, 1999).

Tabela 5.5: Mutações e origem étnica dos pacientes com HPA por deficiência de PAH.

Pacientes	Origem étnica			
	Mutação	Paterna	Mutação	Materna
1	R261X	Brasileira	IVS10nt-11g>a	Portuguesa
2	I65T	Portuguesa / brasileira	IVS2nt5g>c	Brasileira
3	?	Brasileira	R261X	Brasileira
4	P281L	Portuguesa	R408W	Portuguesa / polonesa
5	R408W	Austríaca / espanhola	R408W	Portuguesa / italiana
6	IVS2nt-13t>g	Italiana	V388M	Alemã
7	IVS2nt5g>c	Portuguesa	IVS2nt5g>c	Alemã
8	R261X	Portuguesa	R261X	Portuguesa
9	F55fsdelT	Italiana	R408W	Italiana / polonesa
10	IVS2nt5g>c	Portuguesa	IVS2nt5g>c	Portuguesa / espanhola
11	R408Q	Alemã / portuguesa	1378g>t	Italiana
12	?	Alemã / brasileira	R252W	Portuguesa / brasileira
13	I65T	Alemã	I65T	Alemã
14	R158Q	Alemã / inglesa	R270K	Brasileira
15	IVS12nt1g>a	Alemã / polonesa	I65T	Alemã
16	?	Espanhola	N133/Q134fsdelATCA	Austríaca / italiana
17	I65T	Italiana	R261X	Síria / brasileira
18	R408W	Alemã	R261Q	Espanhola / brasileira
19	IVS2nt5g>c	Portuguesa	I65T	Portuguesa
20	?	Brasileira	I65T	Brasileira
21	P281L	Africana	I65T	Alemã
22	V388M	Alemã / brasileira	IVS7nt1g>a	Alemã
23	R408W	Polonesa	?	Alemã
24	R261Q	Brasileira	R261Q	Brasileira
25	I65T	Africana	I65T	Africana
26	L15/S16fsdelCT	Italiana	L15/S16fsdelCT	Italiana
27	V388M	Brasileira	V388M	Brasileira
28	R261Q	Alemã / portuguesa	IVS12nt1g>a	Italiana
29	I65T	Portuguesa	?	Espanhola
30	?	Portuguesa	IVS12nt1g>a	Alemã

Pérez e colaboradores encontraram associações entre as mutações I65T, V388M, R408W, IVS12nt1g>a e os haplótipos 9.8, 1.7, 2.3 e 3.8, respectivamente, em um grupo de pacientes de nossa amostra. A mutação I65T foi a alteração mais freqüente, semelhante à freqüência encontrada em nosso estudo. A consangüinidade parece não ser a razão para esta alta freqüência, pois apenas um paciente homozigoto para a mutação I65T é filho de pais consangüíneos. Outros fatores como a deriva genética podem explicar a alta freqüência da mutação I65T em nossos pacientes (Pérez *et al.*, 1996).

A mutação I65T é muito comum na Espanha, Irlanda do Norte e Inglaterra, mas é pouco freqüente em outros países da Europa. Surpreendentemente, uma grande parcela dos pacientes de nossa amostra com esta mutação têm ancestrais alemães (13, 15

e 21), o que representa um contraste com as baixas frequências da mutação I65T observadas nos pacientes da Alemanha (Horst, *et al.*, 1993; Treacy *et al.*, 1993).

Nossos resultados apontam para alguns aspectos importantes:

1. A relevante concordância entre as mutações que ocorreram na etnia portuguesa e no grupo determinado de "brasileiro";
2. o espectro de mutações encontrado para os pacientes de origem polonesa e portuguesa é semelhante ao descrito na Polônia (Jaruzelska *et al.*, 1993) e em Portugal (Rivera *et al.*, 1998), respectivamente;
3. a mutação IVS2nt-13t>g foi encontrada em um paciente de origem paterna italiana, a qual foi inicialmente descrita em um paciente da Itália (Bosco *et al.*, 1998);
4. a mutação N133/Q134fsdelATCA foi observada em um paciente de origem materna austríaca/italiana, a qual foi descrita em um paciente de origem alemã/francesa/holandesa (Guldborg *et al.*, 1996);
5. a mutação IVS2nt5g>c esteve associada na maioria dos casos aos pacientes de origem portuguesa.

Duas associações entre mutações e polimorfismos foram observadas neste estudo. Os genótipos constituídos pela mutação IVS2nt5g>c sempre foram associados à presença dos polimorfismos IVS2nt19t>c e IVS12nt-35c>t, resultados também obtidos em tártaros (Kuzmin *et al.*, 1995). Hashem e colaboradores descreveram uma associação entre a mutação IVS2nt5g>c e apenas o polimorfismo IVS2nt19t>c em pacientes egípcios (Hashem *et al.*, 1996). Os genótipos constituídos pela mutação R261X também apresentaram uma associação com o polimorfismo IVS2nt19t>c e não existe relato deste evento na literatura.

5.9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fenótipos extremos (PKU clássica x HPA não-PKU) podem ser determinados quando a análise de mutações for capaz de distinguir entre casos que necessitam de tratamento e casos que podem iniciar o tratamento com dieta livre. A análise do genótipo não pode ser usada para fazer a discriminação entre fenótipos intermediários, isto é, clássico x moderado, moderado x leve, leve x HPA não-PKU (Romano *et al.*, 1998). Em outras palavras, a melhor correlação genótipo-fenótipo é obtida a partir de mutações responsáveis por uma atividade nula (nesta situação a dieta é

restrita) e por mutações associadas à elevada ARP da PAH (onde a dieta pode ser livre) (Ponzone *et al.*, 1998).

A extrema heterogeneidade das mutações no gene da PAH representa um obstáculo para a introdução de programas de detecção de heterozigotos a nível populacional, restringindo assim o aconselhamento genético a famílias com uma criança afetada. De fato, para apresentar uma maior eficiência, considerando os termos da relação custo/benefício, um programa de triagem para heterozigotos seria somente realizado em populações onde no mínimo 95,0% das mutações estejam caracterizadas e nas quais o número de alelos mutantes não seja excessivamente grande (Dianzani *et al.*, 1995a).

Os testes que utilizam amostras de DNA contribuem para o diagnóstico diferencial das HPA por deficiência de PAH e identificação de pacientes assintomáticos e heterozigotos obrigatórios. Todavia, se por um lado esta doença pode ser detectada através de um teste simples e de baixo custo em recém-nascidos (teste de Guthrie ou similar), por outro a causa genética da deficiência de PAH é bastante heterogênea, sendo representada por muitas diferentes mutações no gene da PAH. Esta heterogeneidade de mutações dificulta a implantação de um método que satisfaça o principal critério para a análise do diagnóstico por DNA: a habilidade para detectar rapidamente mutações associadas à deficiência de PAH.

Os métodos usados na detecção de mutações têm levado a um intenso debate sobre qual é a melhor abordagem para o diagnóstico (Ravine *et al.*, 1999). Não existe resposta precisa para esta pergunta, e as metodologias empregadas podem variar de população para população. Por exemplo, o diagnóstico de deficiência de PAH em judeus iemenitas, grupo no qual todos os pacientes são homozigotos para a deleção do exon 3, necessitaria apenas de um método específico para a detecção desta mutação. No caso de populações muito heterogêneas é necessário um método que detecte o maior número de mutações distintas. Desta forma, a extensão da heterogeneidade alélica deve ser o fator determinante na escolha do método de detecção de mutações para o diagnóstico molecular da HPA por deficiência de PAH.

Podem também existir outras causas de heterogeneidade associadas à deficiência de PAH. Muitos mecanismos podem estar envolvidos em processos através dos quais o fenótipo é obtido: requisição do cofator BH₄; regulação da síntese (genes modificadores); diferenças na excreção urinária e na atividade de transaminase da Phe; taxa de hidroxilação; diferenças na distribuição dos aminoácidos entre os compartimentos

extracelular e intracelular; e a possível requisição de um mecanismo responsável pelo transporte de substratos para dentro da célula e de produtos para fora da célula. Em muitas desordens herdadas do metabolismo que apresentam heterogeneidade metabólica, 2 ou mais destas causas podem estar envolvidas (Güttler e Guldberg, 1996).

A ocorrência de alguns fatores durante o tratamento dos pacientes representou um obstáculo para determinar a classificação do fenótipo dos mesmos, baseada na tolerância à dieta. A dieta irregular (pais que não compreendem a terapia dietética; crianças que fogem da dieta na escola), a dificuldade em obter o suplemento dietético, a ocorrência de infecções virais e bacterianas acompanhadas ou não de febre aumentando o catabolismo da Phe, contribuíram para o aumento dos níveis de Phe em algumas ocasiões. Estas variações foram cuidadosamente analisadas e excluídas do presente estudo para garantir a integridade dos resultados.

Os valores de ARP não se correlacionaram com a maioria dos parâmetros bioquímicos dos pacientes com diagnóstico precoce ou tardio. Apesar desta inconsistência, o coeficiente de Pearson exibiu valores próximos da zona de significância quando a ARP foi comparada com a quantidade de Phe tolerada na dieta dos pacientes com diagnóstico precoce; com os níveis de Phe durante o tratamento de pacientes com diagnóstico tardio; e com os níveis de Phe após a sobrecarga protéica.

Kaufman (1999) descreveu um modelo quantitativo do metabolismo da Phe em humanos. O modelo foi baseado nas propriedades cinéticas da PAH humana recombinante e nas estimativas das taxas *in vivo* de transaminação da Phe e degradação da proteína. Os valores calculados para a concentração do *steady-state* da Phe, taxa de eliminação de Phe (após uma sobrecarga do aminoácido) e tolerância à Phe da dieta estavam de acordo com os dados obtidos a partir de indivíduos normais, pacientes com deficiência de PAH e heterozigotos obrigatórios. Estes valores podem ajudar na decisão sobre a restrição de ingestão de Phe necessária para atingir um resultado clínico satisfatório nos pacientes com HPA por deficiência de PAH (Kaufman *et al.*, 1999).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 - CONCLUSÕES

Os resultados da análise molecular permitiram a identificação de alterações no gene da PAH e a determinação da frequência das mesmas em 30 pacientes com PKU. O presente estudo também tentou correlacionar o genótipo com os dados bioquímicos e clínicos (fenótipo) dos pacientes. As conclusões deste trabalho são as seguintes:

6.1.1 - Em relação à análise molecular:

- Neste estudo, foram identificadas 24 alterações (18 mutações associadas à HPA por deficiência de PAH, 4 polimorfismos e 2 alterações novas), as quais conferiram 26 genótipos diferentes associados à HPA por deficiência de PAH. A maioria destas alterações se localiza no fragmento 7 (7/24), o qual compreende o exon 7 e suas regiões adjacentes 5' e 3';
- A frequência de indivíduos heterozigotos compostos foi de 70,0% (21/30), enquanto que a frequência de genótipos homoalélicos foi de 30,0% (9/30);
- O emprego combinado das técnicas de SSCP e da análise com enzimas de restrição específicas permitiu a detecção de mutações comumente encontradas em estudos realizados com pacientes da Itália, Península Ibérica (I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10nt-11g>a e V388M), Alemanha (IVS12nt1g>a) e Polônia (R408W);
- Através das técnicas de SSCP e de seqüenciamento dos fragmentos de DNA foi possível identificar 16 alterações, sendo 10 mutações (L15/S16fsdelCT, IVS2nt5g>c, F55fsdelT, IVS2nt-13t>g, N133/Q134fsdelATCA, R158Q, R270K, P281L, IVS7nt1g>a e R408W) e 4 polimorfismos (IVS2nt19t>c, V245V, Y414Y e IVS12nt-35c>t) previamente descritos, e 2 alterações novas (1378g>t e IVS12nt-15t>c);
- As mutações associadas à HPA por deficiência de PAH mais frequentes neste estudo foram I65T (18,2%), R408W (9,1%), R261X (9,1%), IVS2nt5g>c (7,3%), R261Q (7,3%) e V388M (7,3%), representando 58,3% do total de alelos mutantes. As mutações raras encontradas apresentaram frequências variando entre 1,8% e 5,5%;
- A frequência da mutação I65T neste estudo é semelhante à observada nos pacientes ingleses, escoceses, irlandeses e australianos;
- Os polimorfismos foram identificados em 46,6% dos pacientes com deficiência de PAH, sendo as alterações IVS2nt19t>c e V245V as mais frequentes. O polimorfismo V245V foi somente encontrado nos pacientes gaúchos em uma frequência de 10,9%

(6/55) e em uma amostra de indivíduos normais apresentou uma frequência alélica de 23,4% (43/184);

- A análise por SSCP permitiu a identificação de pelo menos um padrão de mobilidade eletroforética alterado no gene da PAH em 83,3% dos pacientes analisados (25/30). No entanto, apresentou uma sensibilidade de 62,0% e uma taxa de resultados falso-negativos em torno de 38,0%;
- A combinação das técnicas de SSCP, análise por digestão com endonucleases de restrição específicas e o seqüenciamento dos fragmentos de DNA contribuiu para uma eficiência de 87,3% no diagnóstico molecular das alterações no gene da PAH;
- A alteração 1378g>t não foi encontrada em 100 cromossomos normais, indicando que pode se tratar de uma mutação associada à HPA por deficiência de PAH;
- A alteração IVS12nt-15t>c pode ser considerada um polimorfismo, pois a mesma foi encontrada em 3 pacientes que apresentavam 2 mutações associadas à HPA por deficiência de PAH;

6.1.2 - Em relação à correlação genótipo x fenótipo:

- A maioria dos pacientes com a forma clássica da doença (15/17) apresenta pelo menos uma mutação nula em seu genótipo e uma ARP variável entre 0 e 21,0%. Na maioria dos pacientes com PKU moderada (6/9), a ARP variou de 13,0 a 43,0%;
- Valores relevantes de ARP para as mutações I65T (26,0%) e R408Q (55,0%), os menores níveis de Phe pré e durante o tratamento e uma maior tolerância à Phe na dieta foram observados nos pacientes com a forma leve da doença;
- A ARP não apresentou correlação com os parâmetros bioquímicos ligados ao diagnóstico e ao tratamento nos 30 pacientes analisados (com diagnóstico precoce ou tardio). Os valores de ARP não apresentaram correlação com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com diagnóstico tardio;
- Em relação aos pacientes com diagnóstico precoce, os níveis de Phe pré e durante o tratamento apresentaram uma forte associação com a tolerância à dieta, onde os pacientes com PKU clássica exibiram os níveis mais elevados e apresentaram uma menor tolerância à Phe da dieta;
- Entre os pacientes com diagnóstico precoce: os com PKU clássica apresentaram níveis de Phe pré e durante o tratamento maiores que os encontrados nos pacientes

com a forma leve da doença; os com PKU leve ou moderada apresentaram uma tolerância maior à Phe da dieta que os pacientes com PKU clássica;

- Em relação aos pacientes com diagnóstico tardio, os níveis de Phe durante o tratamento apresentaram correlação com a tolerância à dieta. Desta forma, os pacientes com PKU clássica apresentaram os maiores valores de Phe durante o tratamento, pois toleram menos a dieta restrita em Phe;
- Entre os pacientes com diagnóstico tardio, os com PKU moderada apresentaram os valores de ARP e a tolerância à Phe da dieta maiores que os pacientes com PKU clássica;
- As complicações neurológicas foram mais evidentes nos pacientes com diagnóstico tardio, salientando, desta maneira, a importância do estabelecimento do diagnóstico precoce da HPA por deficiência de PAH;
- Os pacientes com diagnóstico precoce e PKU clássica apresentaram os níveis de Phe pré-tratamento e tolerância à dieta maiores que os observados nos pacientes com diagnóstico tardio, apresentando o mesmo fenótipo. Porém, durante o tratamento, estes últimos apresentaram os maiores níveis de Phe;
- Os valores de ARP não se correlacionaram com os níveis de Phe após o teste de sobrecarga de Phe; mas houve uma correlação significativa entre os parâmetros ligados ao diagnóstico e ao tratamento com os valores de Phe após a sobrecarga;
- Os pacientes com PKU clássica apresentaram níveis de Phe após a sobrecarga maiores que os observados nos pacientes com PKU leve;
- Uma sobreposição significativa foi observada entre os parâmetros bioquímicos analisados nos pacientes com PKU moderada e pacientes com PKU clássica;
- Uma alta frequência de mutações graves associadas à HPA por deficiência de PAH foi observada neste estudo. Este achado pode estar relacionado com o grande número de pacientes com a forma clássica da doença;
- A mutação I65T foi encontrada tanto em pacientes com PKU clássica como PKU moderada e PKU leve;
- Na situação de jejum, os níveis de Phe foram significativamente maiores nos heterozigotos com mutações moderadas que nos heterozigotos com mutações graves. No entanto, devido a relevante sobreposição entre estes dois grupos, os níveis de Phe não podem prever a gravidade de mutações no *locus* da PAH;

- As relações Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram os parâmetros mais adequados para discriminar controles de heterozigotos obrigatórios para HPA por deficiência de PAH, tanto na situação de jejum como após a sobrecarga de aspartame;

6.1.3 - Em relação aos aspectos étnicos:

- Uma concordância significativa entre as mutações que ocorreram na etnia portuguesa e no grupo determinado de "brasileiro" foi observada. A mutação IVS2nt5g>c foi associada na maioria dos casos aos pacientes de origem portuguesa;
- A presença dos polimorfismos IVS2nt19t>c e IVS12nt-35c>t foi sempre associada à ocorrência da mutação IVS2nt5g>c nos pacientes analisados. A mutação R261X foi associada à presença do polimorfismo IVS2nt19t>c.

6.1.4 - Protocolo laboratorial sugerido para a detecção de mutações em pacientes com Fenilcetonúria:

A partir dos resultados obtidos e conclusões elaboradas, foi proposto um protocolo laboratorial para a detecção das mutações, o qual se encontra abaixo descrito.

As amostras de sangue de cada indivíduo afetado e de seus pais serão colhidas para a extração de DNA. O DNA extraído será utilizado para a amplificação de fragmentos específicos do gene da PAH. Os produtos de PCR serão submetidos à análise por digestão com enzimas de restrição para a identificação das mutações mais frequentes encontradas neste estudo (I65T, R261X, R408W, R261Q, V388M e IVS2nt5g>c).

Para facilitar a detecção da mutação IVS2nt5g>c, novos *primers* para a amplificação do fragmento 2 do gene da PAH deverão ser desenhados, de forma a introduzir um sítio de reconhecimento para uma endonuclease específica a ser utilizada na detecção da mutação em questão.

Os fragmentos de toda região codificante dos pacientes não portadores das mutações pesquisadas e dos pacientes heterozigotos para pelo menos uma das mutações pesquisadas serão amplificados e submetidos à análise de SSCP. Aqueles fragmentos que apresentarem padrões de mobilidade eletroforética alterados serão submetidos ao seqüenciamento direto para a identificação de mutações raras ou novas e/ou polimorfismos. Os fragmentos com padrão de migração normal deverão ser considerados como não portadores de alteração, não apresentando, portanto, indicação para a análise de seqüenciamento direto, exceto no caso de uma suspeita específica.

O protocolo sugerido está representado esquematicamente na figura 6.1.

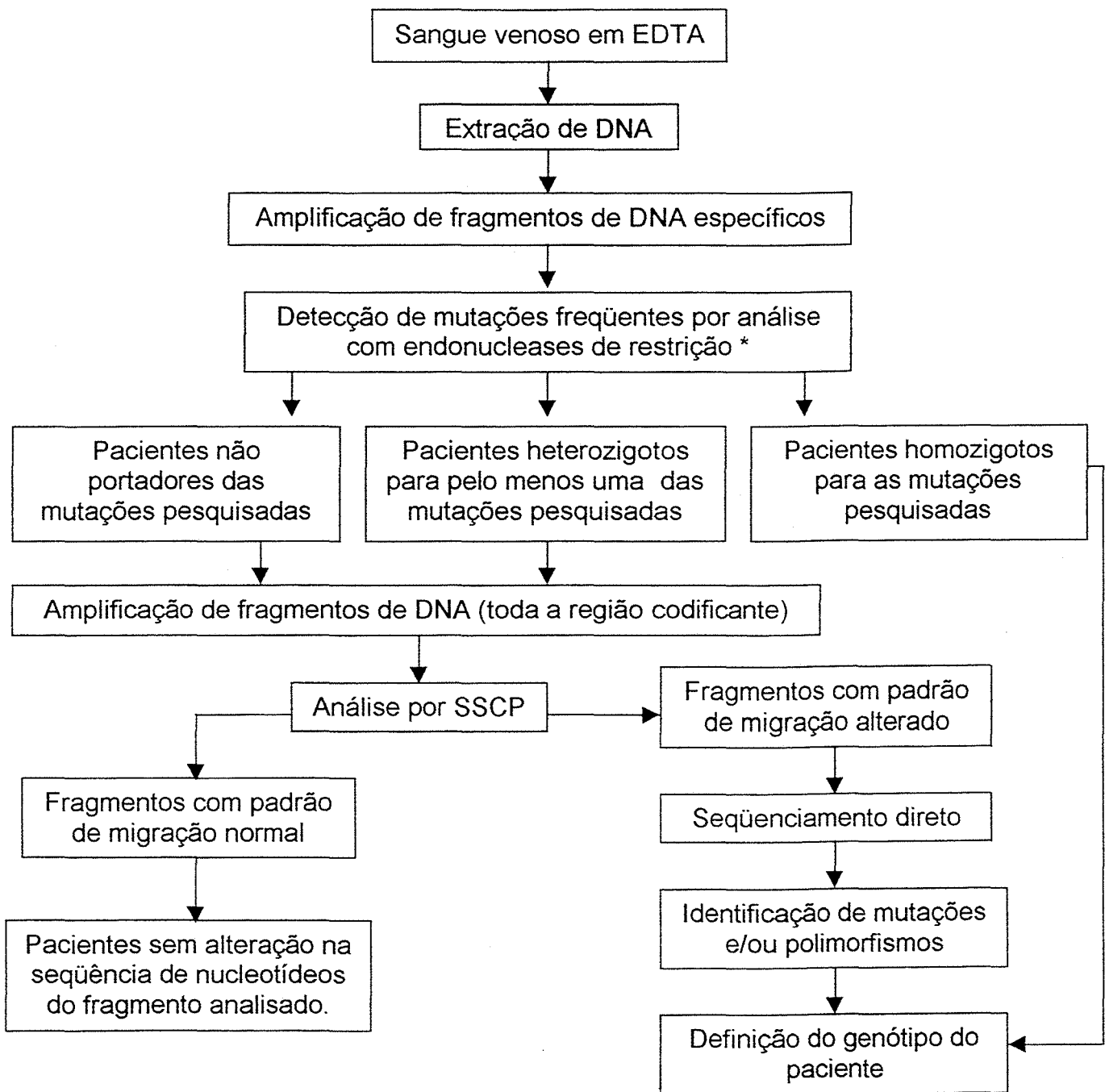


Figura 6.1: Protocolo laboratorial sugerido para a detecção das mutações em pacientes com fenilcetonúria. *: Mutações I65T, R261Q, R261X, V388M, R408W e IVS2nt5g>c.

6.2 - PERSPECTIVAS

A continuidade deste estudo poderia colaborar para uma análise mais completa do gene da PAH com o objetivo de detectar as mutações naqueles pacientes com genótipos não completamente definidos e em novos pacientes diagnosticados.

A análise da correlação do genótipo com o fenótipo deve ser continuada, principalmente nos pacientes com diagnóstico precoce, pelo menos durante os 5 primeiros anos de vida. Os resultados desta correlação podem ser úteis no diagnóstico diferencial e no tratamento da HPA por deficiência de PAH.

A determinação da frequência alélica dos polimorfismos na população poderá demonstrar se estes polimorfismos estão mais intimamente associados aos alelos mutantes ou alelos normais do gene da PAH, com especial destaque para o polimorfismo IVS12nt-15t>c.

Os estudos de haplótipos poderão contribuir para a determinação da origem racial destas mutações, estabelecendo os mecanismos responsáveis (deriva genética, mutação recorrente e efeito fundador) pela origem destas mutações em nosso meio. Os haplótipos poderão também ser úteis no diagnóstico pré-natal de famílias em risco.

A análise de expressão das mutações e o conhecimento da estrutura tridimensional das proteínas produzidas devem ser considerados em estudos futuros sobre a genética molecular da HPA por deficiência de PAH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, V.; LYONNET, S.; MAURIN, N.; BERTHELON, M.; CAILLAUD, C.; GIRAUD, F.; MATTEI, J.F.; REY, J.; REY, F.; MUNNICH, A. (1989) CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria. *Genomics*. 5: 936-939.
- ACOSTA, A.X.; SILVA Jr, W.A.; CARVALHO, T.M.; LAGRECA, M.C.; FRANGIPANI, B.J.; ZAGO, M.A. (2000) Caracterização Molecular do Gene da Fenilalanina Hidroxilase em Pacientes com Fenilcetonúria. (Resumo): P060, XII Congresso Brasileiro de Genética Clínica e III Simpósio Luso-brasileiro de Genética Clínica, Teresópolis, RJ - Brasil.
- AOKI, K. e WADA, Y. (1988) Outcome of the parents detected by newborn screening in Japan. *Acta Paediatr.* 30: 429-434.
- APOLD, EIKEN, H.G.; SVENSSON, E.; KUNERT, E.; KOZÁK, L.; CECHAK, P.; GÜTTLER, F.; GILTAY, J.; LICHTER-KONECKI, U.; MELLE, D.; JARUZELSKA, J.M. (1993) The phenylketonuria G272X haplotype 7 mutation in European populations. *Hum. Genet.* 92: 107-109.
- AVIGAD, S.; COHEN, B.E.; BAUER, R.; SCHWARTZ, G.; FRYDMAN, M.; WOO, S.L.C.; SHILOH, Y. (1990) A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature*. 344: 168-170.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; DEIDMANN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (1997) *In: Current protocol in molecular biology*. Cambridge, John Willey & Sons.
- BERG, K. e SAUGSTAD, L.F. (1974) A linkage study of phenylketonuria. *Clin. Genet.* 6: 147-152.
- BICKEL, H.; GERRARD, J.; HICKMANS, E.M. (1953) Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 2: 812-813.
- BICKEL, H. (1996) The first treatment of phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 155 (suppl. 1): 2-3.
- BICK, U.; FAHRENDORF, G.; LUDOLPH, A.C.; VASSALLO, P.; WEGLAGE, J.; ULLRICH, K. (1991) Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: Evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur. J. Pediatr.* 150: 185-189.

- BYCK, S.; TYFIELD, L.; CARTER, K.; SCRIVER, C.R. (1997) Prediction of multiple hypermutable codons in the human *PAH* gene: Codon 280 contains recurrent mutations in Quebec and other populations. *Hum. Mut.* 9: 316-321.
- BLAU, N.; CURTIUS, H.Ch.; ENDRES, W. (1994) Effect of high-protein meal plus aspartame ingestion on plasma phenylalanine concentrations in obligate heterozygotes for phenylketonuria. *Metabolism.* 43: 413-416.
- BLAU, N. e BLASKOVICS, M.E. (1996) Hyperphenylalaninaemia. In: BLAU, N.; DURAN, M.; BLASKOVICS, M.E., eds. Pp. 65-78. London: Chapman & Hall.
- BOSCO, P.; CALÍ, F.; MELI, C.; MOLLICA, F.; ZAMMARCHI, E.; CERONE, R.; VANNI, R.; PALILLO, L.; GRECO, D.; ROMANO, V. (1998) Eight new mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian patients with hyperphenylalaninaemia. *Hum. Mutat.* 11: 240-243.
- BURGAD, P.; RUPP, A.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K.; SCHMIDT, H.; LICHTER-KONECKI, U. (1996) Phenylalanine hydroxylase genotype, predicted residual enzyme activity and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 155 (suppl. 1): S11-S15.
- CAILLAUD, C.; LYONNET, S.; REY, F.; MELLE, D.; FREBOURG, T.; BERTHELON, M.; VILARINHO, L.; Vaz OSÓRIO, R.; REY, J.; MUNNICH, A. (1991) A 3-base pair in-frame deletion of the phenylalanine hydroxylase results in a kinetic variant of phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* 266: 9351-9354.
- CAILLAUD, C.; VILARINHO, R.; VILARINHO, A.; REY, F.; BERTHELON, M.; SANTOS, R.; LYONNET, S.; BRIARD, M.L.; OSÓRIO, R.V.; REY, J.; MUNNICH, A. (1992) Linkage disequilibrium between phenylketonuria and RFLP haplotype 1 at the phenylalanine hydroxylase *locus* in Portugal. *Hum. Genet.* 89: 69-72.
- CARTER, C.O. e WOOLF, L.I. (1961) The birthplaces of parents and grandparents of a series of patients with phenylketonuria in Southeast England. *Ann. Hum. Genet.* 25: 57-64.
- CARTER, K.C.; BYCK, S.; WATERS, P.J.; RICHARDS, B.; NOWACKI, P.M.; LAFRAMBOISE, R.; LAMBERT, M.; TREACY, E.; SCRIVER, C.R. (1998) Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*) and its use document population genetic variation: The Quebec experience. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 61-70.
- CELIKEL, R.; DAVIS, M.D.; DAÍ, X.; KAUFMAN, S.; XUONG, N.H. (1991) Crystallisation and preliminary X-ray analysis of phenylalanine hydroxylase from rat liver. *J. Mol. Biol.* 218: 495-498.

- COHEN, B.E.; BODONYI, E.; SZEINBERG, A. (1961) Phenylketonuria in Jews. *Lancet*. 1: 344-345.
- DAHL, H.H. e MERCER, J.F.B. (1986) Isolation and sequence of a cDNA clone which contains the complete coding region of rat phenylalanine hydroxylase. Structural homology with tyrosine hydroxylase, glucocorticoid regulation, and use of alternate polyadenylation sites. *J. Biol. Chem.* 261: 4148-4153.
- DAIGER, S.P.; REED, L.; HUANG, S.Z.; ZENG, Y.T.; WANG, T.; LO, W.H.Y.; OKANO, Y.; HASE, Y.; FUKUDA, Y.; OURA, T.; TADA, K.; WOO, S.L.C. (1989) Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) *locus* in Asian families with phenylketonuria (PKU). *Am. J. Hum. Genet.* 45: 319-324.
- De LUCCA, M.; PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. (1998) Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. *Hum. Mutat.* 11: 354-359.
- De LUCCA, M.; PÉREZ, B.; DESVIAT, L.; UGARTE, M. (1999) Bases moleculares de la fenilcetonuria en latinoamerica. (Resumo): P-74, II Congresso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, Santiago - Chile.
- DESVIAT, L. R.; PÉREZ, B.; De LUCCA, M.; CORNEJO, V.; SCHMIDT, B.; UGARTE, M. (1995) Evidence in Latin America of recurrence of V388M, a phenylketonuria mutation with high *in vitro* residual activity. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 337-342.
- DESVIAT, L.R.; PÉREZ, B.; GARCÍA, M.J.; MARTÍNEZ-PARDO, M.; BALDELLOU, A.; ARENA, J.; SANJURJO, P.; CAMPISTOL, J.; COUCE, M.L.; FERNÁNDEZ, A.; CARDESA, J.; UGARTE, M. (1997) Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur. J. Hum. Genet.* 5: 196-202.
- DESVIAT, L.R.; PÉREZ, B.; GÁMEZ, A.; SÁNCHEZ, A.; GARCÍA, M.J.; MARTÍNEZ-PARDO, M.; MARCHANTE, G.; BÓVEDA, D.; BALDELLOU, A.; ARENA, J.; SANJURJO, P.; FERNÁNDEZ, A.; CABELLO, M.L.; UGARTE, M. (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 386-392.
- DIANZANI, I.; FORREST, S.M.; CAMASCHELLA, C.; SAGLIO, G.; PONZONE, A.; COTTON, R.G.H. (1991) 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.* 48: 631-635.

- DIANZANI, I.; GIANNATTASIO, S.; SANCTIS, L.; ALLIAUDI, C.; LATTANZIO, P.; VICI, C.D.; BURLINA, A.; BURRONI, M.; SEBASTIO, G.; CARNEVALE, F.; GUZZETTA, V.; MARRA, E.; CAMASCHELLA, C.; PONZONE, A. (1995a) Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. *Eur. J. Hum. Genet.* 3: 294-302.
- DIANZANI, I.; KNAPPSKOG, P.M.; SANCTIS, L.; GIANNATTASIO, S.; RIVA, E.; PONZONE, A.; APOLD, J.; CAMASCHELLA, C. (1995b) Novel missense mutation in the phenylalanine hydroxylase gene leading to complete loss of enzymatic activity. *Hum. Mutat.* 6: 247-249.
- DICKSON, P.W.; JENNINGS, I.G.; COTTON, R.G.H. (1994) Delineation of the catalytic core of phenylalanine hydroxylase and identification of glutamate 286 as a critical residue for pterin function. *J. Biol. Chem.* 269: 20369-20375.
- DILELLA, A.G.; LEDLEY, F.D.; REY, F.; MUNNICH, A.; WOO, S.L.C. (1985) Detection of phenylalanine hydroxylase messenger RNA in liver biopsy samples from patients with phenylketonuria. *Lancet* 1: 160-161.
- DILELLA, A.G.; KWOK, S.C.M.; LEDLEY, F.D.; MARVIT, J.; WOO, S.L.C. (1986) Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 25: 743-749.
- DILELLA, A.G.; MARVIT, J.; BRAYTON, K.; WOO, S.L.C. (1987) An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature.* 327: 333-336.
- DILELLA, A.G.; HUANG, W.M.; WOO, S.L.C. (1988) Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Lancet* 1: 497-499.
- DiSILVESTRE, D.; KOCH, R.; GROFFEN, J. (1991) Different clinical manifestations in three siblings with identical phenylalanine hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1014-1016.
- DWORNICZAK, B.; GRUDDA, K.; STÜMPER, J.; BARTHOLOMÉ, K.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; HORST, J. (1991) Phenylalanine hydroxylase gene: Novel missense mutation in exon 7 causing severe phenylketonuria. *Genomics.* 9: 193-199.
- DWORNICZAK, B.; KALAYDJIEVA, L.; PANKOKE, S.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; ALLEN, G.; HORST, J. (1992) Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot? *Hum. Mutat.* 1: 138-146.
- EFFAT, L.; KUZMIN, A.; KASEM, N.; MEGUID, N.A.; KOTB, S.; EISENSMITH, R.C.; TEMTAMY, S.A.; RUSHDI, S.; WOO, S.; EI-AWARDY, M. (1999) Haplotypes and

- mutations of the PAH *locus* in Egyptian families with PKU. *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 259-262.
- EIKEN, H.G.; KNAPPSKOG, P.M.; BOMAN, H.; THUNE, K.S.; KAADA, G.; MOTZFELDT, K.; APOLD, J. (1996a) Relative frequency, heterogeneity and geographic clustering of PKU mutations in Norway. *Eur. J. Hum. Genet.* 4: 205-213.
- EIKEN, H.G.; KNAPPSKOG, P.M.; APOLD, J.; FLATMARK, T. (1996b) PKU mutation G46S is associated with increased aggregation and degradation of the phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum. Mutat.* 7: 228-238.
- EISENSMITH, R.C.; WANG, T.; DASOVICH, M.; OKANO, Y.; WOO, S.L.C. (1991) Molecular basis of phenylketonuria (PKU). *Am. J. Hum. Genet.* 49 (suppl.): A455.
- EISENSMITH, R.C. e WOO, S.L.C. (1992) Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninaemias: Mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Mutat.* 1: 13-23.
- EISENSMITH, R.C.; OKANO, Y.; DASOVICH, M.; WANG, T.; GÜTTLER, F.; LOU, H.; GULDBERG, P.; LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; SVENSSON, E.; HAGENFELDT, L.; REY, F.; MUNNICH, A.; LYONNET, S.; COCKBURN, F.; CONNOR, J.M.; PEMBREY, M.E.; SMITH, I.; GITZELMANN, R.; STEINMANN, B.; APOLD, J.; EIKEN, H.G.; GIOVANNINI, M.; RIVA, E.; LONGHI, R.; ROMANO, C.; CERONE, R.; NAUGHTEN, E.R.; MULLINS, C.; CAHALANE, S.; ÖZALP, I.; FEKETE, G.; SCHULER, D.; BERENCSI, G.Y.; NÁSZ, I.; BRDICKA, R.; KAMARYT, J.; PIJACKOVA, A.; CABALSKA, B.; BOSZKOWA, K.; SCHWARTZ, E.; KALININ, V.N.; JIN, L.; CHAKRABORTY, R.; WOO, S.L.C. (1992) Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1355-1365.
- EISENSMITH, R.C.; GOLTISOV, A.A.; WOO, S.L.C. (1994) A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. *Prenatal Diag.* 14: 1113-1118.
- EISENSMITH, R.C. e WOO, S.L.C. (1995) Molecular genetics of phenylketonuria: from molecular anthropology to gene therapy. *Advances in Genetics.* 32: 199- 271.
- EISENSMITH, R.C.; GOLTISOV, A.A.; O'NEILL, C.; TYFIELD, L.A.; SCHWARTZ, E.I.; KUZMIN, A.I.; BARANOVSKAYA, S.S; TSUKERMAN, G.L.; TREACY, E.; SCRIVER, C.R.; GÜTTLER, F.; GULDBERG, P.; EIKEN, H.G.; APOLD, J.; SVENSSON, E.; NAUGHTEN, E.; CAHALANE, S.F.; CROKE, D.T.; COCKBURN, F.; WOO, S.L.C. (1995) Recurrence of the R408W mutations in phenylalanine hydroxylase *locus* in Europeans. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 278-286.

- EISENSMITH, R.C.; MARTINEZ, D.R.; KUZMIN, A.I.; GOLTSOV, A.A.; BROWN, A.; SINGH, R.; ELSAS, L.J.; WOO, S.L.C. (1996) Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous Southeastern US population. *Pediatrics*. 97: 512-516.
- EISENSMITH, R.C. e WOO, S.L.C. (1996) Gene therapy for phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 155 (suppl. 1): S16-S19.
- ELLINGSEN, S.; KNAPPSKOG, P.M.; EIKEN, H.G. (1997) Phenylketonuria splice mutation (EXON6nt-96A>g) masquerading as missense mutation (Y204C). *Hum. Mutat.* 9: 88-90.
- ERLANDSEN, H.; FUSETTI, F.; MARTINEZ, A.; HOUGH, E.; FLATMARK, T.; STEVENS, R.C. (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Struct. Biol.* 4: 995-1000.
- ERLANDSEN, H. e STEVENS, R.C. (1999) The Structural Basis of Phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 68: 103-125.
- FØLLING, A. (1934) Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 227: 169-176.
- FRANÇOIS, B.; VANDEVYVER, C.; VERELST, P.; PHILLIPPAER, L.; RAUS, J. (1994) Heterogeneity of phenylketonuria in Belgium at the genotype-phenotype level. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 369-370.
- FUSETTI, F.; ERLANDSEN, H.; FLATMARK, T.; STEVENS, R.C. (1998) Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for Phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* 273: 16962-16967.
- GIBBS, B.S.; WOJCHOWSKI, D.; BENKOVIC, S.J. (1993) Expression of rat liver phenylalanine hydroxylase in insect cells and site-directed mutagenesis of putative non-heme iron-binding sites. *J. Biol. Chem.* 268: 8046-8052.
- GIUGLIANI, R. (1988) Erros Inatos do Metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatr. Moderna*. 23: 29-39.
- GOLD, R.J.M.; MAAG, U.R.; NEAL, J.L.; SCRIVER, C.R. (1974) The use of biochemical data in screening for mutant alleles and in genetic counseling. *Ann. Hum. Genet.* 37: 315-326.

- GOLTSOV, A A ; EISENSMITH, R.C.; KONECKI, D.S.; LICHTER-KONECKI, U.; WOO, S.L.C. (1992) Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 627- 636.
- GOLTSOV, A A ; EISENSMITH, R.C.; NAUGHTON, E.R.; JIN, L.; CHAKRABORTY, R.; WOO, S.L.C. (1993a) A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. *Hum. Molec. Genet.* 2: 577- 581.
- GOLTSOV, A A ; EISENSMITH, R.C.; SCHWARTZ, E.I.; WOO, S.L.C. (1993b) Distribution of the phenylalanine hydroxylase mutation R408W in the Commonwealth of Independent States. *Am. J. Hum. Genet.* 53 (suppl.): 809.
- GRENETT, H.E.; LEDLEY, F.D.; REED, L.L.; WOO, S.L.C. (1987) Full-length cDNA rabbit tryptophan hydroxylase: Functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 4: 5530-5534.
- GROMPE, M. (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet.* 5: 111-117.
- GU, X.F.; ZHANG, M.; CHEN, R.G. (1995) Phenylketonuria mutations in southern Chinese detected by denaturing gradient gel electrophoresis in exon 7 of PAH gene. *J. Inher. Metab. Dis.* 18: 753-754.
- GULDBERG, P. e GÜTTLER, F. (1993) A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 21: 2261-2262.
- GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. (1993a) Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* 17: 141-146.
- GULDBERG, P.; ROMANO, V.; CERATTO, N.; BOSCO, P.; CIUNA, M.; INDELICATO, A.; MOLLICA, F.; MELI, C.; GIOVANNINI, M.; RIVA, E.; BIASUCCI, G.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. (1993b) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: Implications for diagnosis of hyperphenylalaninaemia in Southern Europe. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1703-1707.
- GULDBERG, P.; LEVY, H.L.; KOCH, R.; BERLIM Jr, C.M.; FRANCOIS, B.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. (1994) Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency. Inheritance and expression of the hyperphenylalaninaemias. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 645-651.

- GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; SIPILÄ, I.; GÜTTLER, F.; CHAPELLE, A. (1995) Phenylketonuria in a low incidence population: Molecular characterisation of mutations in Finland. *J. Med. Genet.* 32: 976-978.
- GULDBERG, P.; LEVY, H.L.; HANLEY, W.B.; KOCH, R.; MATALON, R.; ROUSE, B.M.; TREFZ, F.; De la CRUZ, F.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: Report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 84-94.
- GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; MAMMEN, K.C.; LEVY, H.L.; GÜTTLER, F. (1997a) Large deletions in the phenylalanine hydroxylase gene as a cause of phenylketonuria in India. *J. Inher. Metab. Dis.* 20: 845-846.
- GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; MAMMEN, K.C.; LEVY, H.L.; GÜTTLER, F. (1997b) A molecular survey of phenylketonuria in Iceland: Identification of a founding mutation and evidence of predominant Norse settlement. *Eur. J. Hum. Genet.* 5: 376-381.
- GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; LOU, H.C.; GÜTTLER, F. (1998a) Aberrant phenylalanine metabolism in phenylketonuria heterozygotes. *J. Inher. Metab. Dis.* 21: 365-372.
- GULDBERG, P.; REY, F.; ZSCHOCKE, J.; ROMANO, V.; FRANÇOIS, B.; MICHIELS, L.; ULLRICH, K.; HOFFMANN, G.F.; BURGARD, P.; SCHMIDT, H.; MELI, C.; RIVA, E.; DIANZANI, I.; PONZONE, A.; REY, J.; GÜTTLER, F. (1998b) A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: Classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 63:71-79.
- GUTHRIE, R. e SUSI, A. (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 32: 338-343.
- GUTHRIE, R. (1996) The introduction of newborn screening for phenylketonuria: a personal history. *Europ. J. Pediat.* 155 (suppl. 1): 4-5.
- GÜTTLER, F. (1980) Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediat. Scand.* 280 (suppl.): 1-80.
- GÜTTLER, F. e WOO, S.L.C. (1986) Molecular genetics of PKU. *J. Inher. Metab. Dis.* 9 (suppl.1): 58-68.

- GÜTTLER, F.; DiLELLA, A.G.; LEDELY, F.D.; LIDSKY, A.S.; KWOK, S.C.M.; MARVIT, J.; WOO, S.L.C. (1987) Molecular biology of phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 146 (suppl. 1): A5-A11.
- GÜTTLER, F.; GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; MIKKELSEN, I., OLSEN, B.; LOU, H. (1993a) Molecular basis for the phenotypical diversity of phenylketonuria and related hyperphenylalaninaemias. *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 602-604.
- GÜTTLER, F.; GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F. (1993b) Mutation genotype of mentally retarded patients with phenylketonuria. *Dev. Brain. Dys.* 6: 92-96.
- GÜTTLER, F. e GULDBERG, P. (1994) Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: Genetic determinants for the phenotypical heterogeneity of hyperphenylalaninaemia. *Acta Paediatr.* 407 (suppl. 1): 49-59.
- GÜTTLER, F. e GULDBERG, P. (1996) The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 155 (suppl. 1): S6-S10.
- GÜTTLER, F.; AZEN, C.; GULDBERG, P.; ROMSTAD, A.; HANLEY, W.B.; LEVY, H.L.; MATALON, R.; ROUSE, B.M.; TREFZ, F.; De la CRUZ, F.; KOCH, R. (1999) Relationship among genotype, biochemical phenotype, and cognitive performance in females with phenylalanine hydroxylase deficiency: Report from the Maternal Phenylketonuria Collaborative Study. *Pediatrics.* 104: 258-262.
- GUZZETTA, V.; BONAPACE, G.; DIANZANI, I.; PARENTI, G.; LECORA, M.; GIANNATTASIO, S.; CONCOLINO, D.; STRISCIUGLIO, P.; SEBASTIO, G.; ANDRIA, G. (1997) Phenylketonuria in Italy: Distinct distribution pattern of three mutations of the phenylalanine hydroxylase gene. *J. Inher. Metab. Dis.* 20: 619-624.
- HASHEM, N.; BOSCO, P.; CHIAVETTA, V.; CALI, F.; CERATTO, N.; ROMANO, V. (1996) Preliminary studies on the molecular basis of hyperphenylalaninaemia in Egypt. *Hum. Genet.* 98: 3-6.
- HOANG, L.; BYCK, S.; PREVOST, L.; SCRIVER, C.R. (1996) PAH Mutation Analysis Consortium Database: a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH *locus*. *Nucleic Acids Res.* 24: 127-131.
- HOMMES, F. A. (1994) Loss of neurotransmitter receptors by hyperphenylalaninaemia in the HPH-5 mouse brain. *Acta Paediatr.* 407 (suppl.):120-121.
- HORST, J.; EIGEL, A.; KALAYDJIEVA, L.; DWORNICZAK, B. (1993) Phenylketonuria in Germany: Molecular heterogeneity and diagnostic implications. *Dev. Brain Dys.* 6: 32-38.

- HUFTON, S.E.; JENNINGS, I.G.; COTTON, R.G.H. (1995) Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* 311: 353-366.
- HUNTLEY, C.C. e STEVENSON, R.E. (1969) Maternal phenylketonuria: course of two pregnancies. *Obstet. Gynec.* 34: 694-700.
- JARDIM, L.B.; SILVEIRA, E.L.; LEITE, J.C.L.; BARTH, M.L.; GIUGLIANI, R. (1992) Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. *Jornal de Pediatria.* 68: 189-191.
- JARUZELSKA, J.; MATUSZAK, R.; LYONNET, S.; REY, F.; REY, J.; FILIPOWICZ, J.; BORSKI, K.; MUNNICH, A. (1993) Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J. Med. Genet.* 30: 232-234.
- JENNINGS, I.G. e COTTON, R.G.H. (1990) Structural similarities among enzyme pterin binding sites as demonstrated by a monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Biol. Chem.* 265: 1885-1889.
- JENNINGS, I.G.; KEMP, B.E.; COTTON, R.G.H. (1991) Localisation of cofactor binding sites with monoclonal anti-idiotypic antibodies: Phenylalanine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5734-5738.
- JERVIS, G.A. (1947) Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of metabolic error. *J. Biol. Chem.* 169: 651-656.
- JERVIS, G.A. (1953) Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 514-515.
- JOHN, S.W.M.; ROZEN, R.; LAFRAMBOISE, R.; LABERGE, C.; SCRIVER, C.R. (1989) Novel PKU mutation on haplotype 2 in French-Canadians. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 905-909.
- JOHN, S.W.M.; SCRIVER, C.R.; LAFRAMBOISE, R.; ROZEN, R. (1992) *In vitro* and *in vivo* correlations for the I65T and M1V mutations at the phenylalanine hydroxylase *locus*. *Hum. Mutat.* 1: 147-153.
- KALAYDJIEVA, L.; DWORNICZAK, B.; KREMENSKY, I.; KOPRIVAROVA, R.; RADEVA, B.; HORST, J. (1993) Population genetics of phenylketonuria in Bulgaria. *Dev. Brain Dys.* 6: 39-45.
- KAMARYT, J.; MRSKOS, A.; PODHRADSKA, O.; KOLCOVA, V.; CABALSKA, B.; DUZYNSKA, N.; BORZYMOWSKA, J. (1978) PKU *locus*: Genetic linkage with human amylase (AMY) *loci* and assignment to linkage group 1. *Hum. Genet.* 43: 205-210.

- KAPPOCK, T.J. e CARADONNA, J.P. (1996) Pterin-dependent amino acid hydroxylases. *Chem. Rev.* 96: 2659-2756.
- KAYAALP, E.; TREACY, E.; WATERS, P.J.; BYCK, S.; NOWACKI, P.; SCRIVER, C.R. (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninaemia phenotypes: A metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 1309-1317.
- KAUFMAN, S.; MAX, E.E.; KANG, E.S. (1975) Phenylalanine hydroxylase activity in liver biopsies from hyperphenylalaninaemia heterozygotes: Deviation from proportionality with gene dosage. *Pediatr. Res.* 9: 632-634.
- KAUFMAN, S. (1999) A model of human phenylalanine hydroxylase metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3160-3164.
- KERR, G.R.; CHAMOVE, A.S.; HARLOW, H.F.; WAISMAN, H.A. (1968) "Fetal PKU": the effect of maternal hyperphenylalaninaemia during pregnancy in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Pediatrics.* 42: 27-36.
- KLEIMAN, S.; LI, J.; SCHWARTZ, G.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C.; SHILOH, Y. (1993) Inactivation of phenylalanine hydroxylase by a missense mutation, R270S, in Palestinian kinship with phenylketonuria. *Hum. Mol. Genet.* 2: 605-606.
- KLEIMAN, S.; AVIGAD, S.; VANAGAITE, L.; SHMUELEVITZ, A.; DAVID, M.; EISENSMITH, R.C.; BRAND, N.; SCHWARTZ, G.; REY, F.; MUNNICH, A.; WOO, S.L.C.; SHILOH, Y. (1994) Origins of hyperphenylalaninaemia in Israel. *Eur. J. Hum. Genet.* 2: 24-34.
- KNAPP, A.; TINTSCHEWA, R.; SCHEIBE, E.; SCHIEBE, E.; JAGER, B.; BIEBLER, K.E. (1982) The genetic linkage between the PKU *locus* and the *loci* for amylase-2, Fy, PGM-1, and RH and the question of assignment of the PKU *locus* to chromosome n° 1. *Hum. Genet.* 60: 122-125.
- KNAPPSKOG, P.M.; EIKEN, H.G.; MARTINEZ, A. ; OLAFSDOTTIR, S.; HAAVIK, J.; FLATMARK, T.; APOLD, J. (1993) Expression of wild type and mutant forms of human phenylalanine hydroxylase in *E. coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 338: 59-62.
- KNAPPSKOG, P.M.; EIKEN, H.G.; MARTINEZ, A. ; FLATMARK, T.; APOLD, J. (1995) The PKU mutation S349P causes complete loss of catalytic activity in the recombinant phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum. Genet.* 95: 171-173.
- KNAPPSKOG, P.M.; EIKEN, H.G.; MARTINEZ, A.; BRULAND, O.; APOLD, J.; FLATMARK, T. (1996) A PKU mutation (D143G) associated with an apparent high

- residual enzyme activity: Expression of a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase in three different systems. *Hum. Mutat.* 8: 236-246.
- KOBE, B.; JENNINGS, I.G.; HOUSE, G.M.; MICHELL, B.J.; GOODWILL, K.E.; SANTARSIERO, B.D.; STEVENS, R.C.; COTTON, R.G.H.; KEMP, B.E. (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Struct. Biol.* 6: 442-448.
- KONECKI, D.S.; WANG, Y.; TREFZ, F.K.; LICHTER-KONECKI, U.; WOO, S.L.C. (1992) Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 31: 8363-8368.
- KOZÁK, L.; BLAZKOVA, M.; KUHROVA, V.; PIJACKOVA, A.; RUZICKOVA, S.; ST'ASTNA, S. (1997) Mutation and haplotypes analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: Identification of four novel mutations. *J. Med. Genet.* 34: 893-898.
- KOWLESSUR, D.; YANG, X.J.; KAUFMAN, S. (1995) Further studies of the role of Ser-16 in the regulation of the activity of phenylalanine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4743-4747.
- KUSMIN, A.I.; EISENSMITH, R.C.; GOLTSOV, A.A.; SERGEEVA, N.A.; SCHWARTZ, E.I.; WOO, S.L.C. (1995) Complete spectrum of PAH mutations in Tataria: Presence of Slavic, Turkic and Scandinavian mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 3: 246-255.
- KWOK, S.C.M.; LEDLEY, F.D.; DILELLA, A.G.; ROBSON, K.J.H.; WOO, S.L.C. (1985) Nucleotide Sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry.* 24: 556-561.
- LABRUNE, P.; MELLE, D.; REY, F.; BERTHELON, M.; CAILLAUD, C.; REY, J.; MUNNICH, A.; LYONNET, S. (1991) Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1115-1120.
- LEANDRO, P.; RIVERA, I.; RIBEIRO, V.; ALMEIDA, I.T.; LECHNER, M.C. (1993) Sequencing analysis of PAH genomic DNA reveals 4 novel mutations affecting exons 7 and 11 in a Portuguese PKU populations. (Abstract). SSIEM, Manchester.
- LEDBETTER, S.A.; LEDBETTER, D.H.; LEDLEY, F.D.; WOO, S. (1987) Localization of phenylalanine hydroxylase (PAH) and alpha-1 antitrypsin (AAT) *loci* in mouse genome by *in situ* hybridization. (Abstract). *Am. J. Hum. Genet.* 41: A173.

- LEDLEY, F.D.; GRENETT, H.E.; DiLELLA, A.G.; KWOK, S.C.M.; WOO, S.L.C. (1985) Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science*. 228: 77-79.
- LEDLEY, F.D.; LEVY, H.L.; WOO, S.L.C. (1986) Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia in families with both disorders. *N. Engl. J. Med.* 314: 1276-1280.
- LEUZZI, V.; TRASIMENI, G.; GUALDI, G.F.; ANTONOZZI, I. (1995) Biochemical, clinical and neuroradiological (MRI) correlations in late-detected PKU patients. *J. Inher. Metab. Dis.* 18: 624-634.
- LEVY, H (1998) Different attitudes toward prenatal diagnosis for PKU in different social and cultural contexts. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (suppl. 3): 34-35.
- LEVY, H.L. (1999) Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1811-1813.
- LI, J.; EISENSMITH, R.C.; WANG, T.; LO, W.H.Y.; HUANG, S.Z.; ZENG, Y.T.; YUAN, L.F.; LIU, S.R.; WOO, S.L.C. (1992) Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. *Genomics.* 13: 894-895.
- LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; DiLELLA, A.G.; BRAYTON, K.; MARVIT, J.; HAHN, T.M.; TREFZ, F.K.; WOO, S.L.C. (1988) Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 27: 2881-2885.
- LICHTER-KONECKI, U.; RUPP, A.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K.; SCHMIDT, H.; BURGARD, P. (1994) Relation between phenylalanine hydroxylase genotypes and phenotypic parameters of diagnostic and treatment of hyperphenylalaninaemic disorders. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 362-365.
- LIDSKY, A.S.; ROBSON, K.J.H.; THIRUMALACHARY, C.; BARKER, P.E.; RUDDLE, F.H.; WOO, S.L.C. (1984) The PKU *locus* in man is on chromosome 12. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 527-533.
- LIDSKY, A.S.; GUTTLER, F.; WOO, S.L.C. (1985a) Prenatal diagnosis of classic phenylketonuria by DNA analysis. *Lancet.* 1: 549-551.
- LIDSKY, A.S.; LAW, M.L.; MORSE, H.G.; KAO, F.T.; RABIN, M.; RUDDLE, F.H.; WOO, S.L.C. (1985b) Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria *locus* in the human genome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82: 6221-6225.
- LIDSKY, A.S.; LEDLEY, F.D.; DiLELLA, A.G.; KWOK, S.C.M.; DAIGER, S.P.; ROBSON, K.J.H.; WOO, S.L.C. (1985c) Extensive restriction site polymorphism at the human

phenylalanine hydroxylase *locus* and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 619-634.

LILLEVÄLI, H.; ÕUNAP, K.; METSPALU, A. (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes. *Eur. J. Hum. Genet.* 4: 296-300.

LIN, C.H.; HSIAO, K.J.; TSAI, T.F.; CHAO, H.K.; SU, T.S. (1992) Identification of a missense phenylketonuria mutation at codon 408 in Chinese. *Hum. Genet.* 89: 593-596.

LYONNET, S.; REY, R.; CAILLAUD, C.; ABADIE, V.; MUNNICH, A.; REY, J. (1988) Bases moléculaires de la phénylcétonurie en France: De l'invasion celte à la bataille de Poitiers. *Médecines/sciences.* 4: 544-552.

MARVIT, J.; DILELLA, A.G.; BRAYTON, K.; LEDLEY, F.D.; ROBSON, K.J.H.; WOO, S.L.C. (1987) GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res.* 15: 5613-5628.

MATALON, R.; JUSTICE, P.; DEANCHING, M.N. (1977) Phenylalanine hydroxylase in human placenta: novel system for study of phenylketonuria. (Letter) *Lancet* 1: 853-854.

MARTINEZ, A.; KNAPPSKOG, P.M.; OLAFDOTTIR, S.; DØSKELAND, A.P.; EIKEN, H.G.; SVEBAK, R.M.; BOZZINI, M.; APOLD, J.; FLATMARK, T. (1995) Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochemistry. J.* 306: 589-597.

McCAMAN, e Robins, E. (1962) Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.* 59: 885-890.

McDONALD, J.D. e BODE, V. (1988) Hyperphenylalaninaemia in the hph-1 mouse mutant. *Pediatr. Res.* 23: 63-67.

McDONALD, J.D.; BODE, V.C.; DOVE, W.F.; SHEDLOVSKY, A. (1990) Pah^{hph-5}: A mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1965-1967.

McDONALD, J.D. (1994) The PKU mouse project: its history, potential and implications. *Acta Paediatr.* 407 (suppl.): 122-123.

McDONALD, J.D.; RYLANCE, G.W.; ASPLIN, D.A.; HALL, K.; HARRIS, G.; BOOTH, I.W. (1994) Feedings problems in young PKU children. *Acta Paediatr.* 407 (suppl.): 73-74.

- McDONALD, A. e CHARLTON, C.K. (1997) Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase *locus*. *Genomics*. 39: 402-405.
- MELLE, D.; VERELST, P.; REY, F.; BERTHELON, M.; FRANÇOIS, B.; MUNNICH, A.; LYONNET, S. (1991) Two distinct mutations at a single *Bam*HI site in phenylketonuria. *J. Med. Genet.* 28: 38-40.
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- MIRCHAUD, J.; BRODY, L.C.; STEEL, G.; FONTAINE, G.; MARTIN, L.S.; VALLE, D.; MITCHEL, G. (1992) Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics*. 13: 389-394.
- MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A.; CHAPPELL, D. (1996) *Biochemistry*. Pp. 249-294. 6th edition. Iowa: Mosby.
- MORALES, G.; REQUENA, G.M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; LOPEZ, M.C.; UGARTE, M.; ALONSO, C. (1990) Sequence and expression of the *Drosophila* phenylalanine hydroxylase mRNA. *Gene*. 93: 213-219.
- NEWTON, J.M. e GRAHM, A. (1994) *PCR*. 1st. Ed. United Kingdom, Bios Scientific Publishers Limited, p. 161.
- NOWACKI, P.M.; BYCK, S.; PREVOST, L.; SCRIVER, C.R. (1997) The PAH Mutation Analysis Consortium Database: update 1996. *Nucleic Acids Res.* 25: 139-142.
- NOWACKI, P.M.; BYCK, S.; PREVOST, L.; SCRIVER, C.R. (1998) PAH Mutation Analysis Consortium Database 1997: prototype for relational locus-specific mutation databases. *Nucleic Acids Res.* 26: 220-225.
- OKANO, Y.; EISENSMITH, R.C.; GÜTTLER, F.; LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K.; DASOVICH, M.; WANG, T.; HENRIKSEN, K.; LOU, H.; WOO, S.L.C. (1991) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* 324: 1232-1238.
- OKANO, Y.; HASE, Y.; LEE, D-H.; FURUYAMA, J.I.; SHINTAKU, H.; OURA, T.; ISSHIKI, G. (1992) Frequency and distribution of phenylketonuric mutations in Orientals. *Hum. Mutat.* 1: 216-220.
- OKANO, Y.; HASE, Y.; LEE, D-H.; TAKADA, G.; SHIGEMATSU, Y.; OURA, T.; ISSHIKI, G. (1994) Molecular and population genetics of phenylketonuria in Orientals: Correlations between phenotype and genotype. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 156-159.

- OKANO, Y.; MINORU, A.; YOUNGBO, K.; YASUAKI, N.; YUTAKA, H.; TOSHIAKI, O.; ISSHIKI, G. (1998) Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. *Hum. Genet.* 103: 613-618.
- ONISHI, A.; LIOTTA, L.J.; BENKOVIC, S.J. (1991) Cloning and expression of *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase in *Escherichia coli* and comparison of amino acid sequence with mammalian aromatic amino acid hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 266: 18454-18459.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2766-2770.
- ÖZALP, I.; COSKUN, T.; CEYHAN, M.; TOKOL, S.; ORAN, O.; ERDEM, G.; TEKINALP, G.; DURMUS, Z.; TARIKAHYA, Y. (1986) Incidence of phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia in a sample of the newborn population. *J. Inher. Metab. Dis.* 9 (suppl. 2): 237-239.
- PAINE, R.S. (1957) The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics.* 20: 290-302.
- PAUL, T.D.; BRANDT, I.K.; ELSAS, L.J.; JACKSON, C.E.; MAMUNES, P.; NANCE, C.S.; NANCE, W.E. (1978) Phenylketonuria heterozygote detection in families with affected children. *Am. J. Hum. Genet.* 30: 293-301.
- PAUL, T.D.; BRANDT, I.K.; ELSAS, L.J.; JACKSON, C.E.; NANCE, C.S.; NANCE, W.E. (1979a) Linkage analysis using heterozygote detection in phenylketonuria. *Clin. Genet.* 16: 217-232.
- PAUL, T.D.; GRECO, J.; BRANDT, T.K.; JACKSON, C.E.; NANCE, W.E. (1979b) Is there a heterozygote advantage in the birthweight and number of children born to PKU heterozygotes? *Am. J. Hum. Genet.* 31 (suppl.): A104.
- PENROSE, L.S. (1935) Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria). *Lancet.* 2: 192-194.
- PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. (1995) Expression analysis of mutation P244L, which causes mild hyperphenylalaninaemia. *Hum. Mutat.* 5: 188-190.
- PERÉZ, B.; DESVIAT, L.R.; De LUCCA, M.; SCHMIDT, B.; LOGHIN-GROSSO, N.; GIUGLIANI, R.; PIRES, R.F.; UGARTE, M. (1996) Mutation analysis of phenylketonuria in South Brazil. *Hum. Mutat.* 8: 262-264.

- PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. (1997) Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: Mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 95-102.
- PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; De LUCCA, M.; CORNEJO, V.; RAIMANN, E.; UGARTE, M. (1999) Molecular characterization of phenylalanine hydroxylase deficiency in Chile. Mutation in brief n° 243 (Online). *Hum. Mutat.* 13: 503.
- PHILIPS, R.E. (1967) Tyrosine in serum. In: TURNER, G.K. (ed.). *Manual of fluorimetric clinical procedures.* Palo Alto, G.K. Turner Associates.
- PONZONE, A.; CARBONARA, C.; SPADA, M. (1998) Phenylalanine tolerance and metabolism in PKU: impact on newborn and heterozygote screening. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (suppl. 3): 8-13.
- POPESCU, A.; ANDRIAN, T.; GÜTTLER, F.; GULDBERG, P. (1994) Genotype-phenotype correlation in 11 Romanian PKU families. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 374-375.
- RAMUS, S.J.; FORREST, S.M.; PITT, D.D.; SALEEBA, J.A.; COTTON, R.G.H. (1993) Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J. Med. Genet.* 30: 401-405.
- RAMUS, S.J.; TREACY, E.P.; COTTON, R.G.H. (1995) Characterization of phenylalanine hydroxylase alleles in untreated phenylketonuria patients from Victoria, Australia: Origin of alleles and haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1034-1041.
- RAMUS, S.J.; FORREST, S.M.; PITT, D.D.; COTTON, R.G.H. (1999) Genotype and intellectual phenotype in untreated phenylketonuria patients. *Pediatr. Res.* 45: 474-481.
- RAVINE, D. (1999) Automated mutation analysis. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 503-518.
- RIVERA, I.; LEANDRO, P.; LICHTER-KONECKI, U.; ALMEIDA, I.T.; LECHNER, M.C. (1998) Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J. Med. Genet.* 35:301-304.
- ROBSON, K.J.H.; CHANDRA, T.; MacGILLIVRAY, R.T.A.; WOO, S.L.C. (1982) Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4701-4705.
- ROBSON, K.J.H.; BEATTIE, W.; JAMES, R.J.; COTTON, R.C.H.; MORGAN, F.J.; WOO, S.L.C. (1984) Sequence comparison of rat liver phenylalanine hydroxylase and its cDNA clones. *Biochemistry.* 23: 5671-5673.
- ROMANO, V.; ANELLO, G.; KAUFMAN, S. (1998) Genotype-phenotype relationship in PAH deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (suppl. 3): 13-16.

- ROUSE, B.; AZEN, C.; KOCH, R.; MATALON, R.; HANLEY, W.; de la CRUZ, F.; TREFZ, F.; FRIEDMAN, E.; SHIFRIN, H. (1997) Maternal phenylketonuria collaborative study (MPKUCS) offspring: facial anomalies, malformations, and early neurological sequelae. *Am. J. Med. Genet.* 69: 89-95.
- SARKISSIAN, C.N.; SHAO, Z.; BLAIN, F.; PEEVERS, R.; SU, H.; HEFT, R.; CHANG, T.M.S.; SCRIVER, C.R. (1999) A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96: 2339-2344.
- SAUGSTAD, L.F. (1975) Frequency of phenylketonuria in Norway. *Clin. Genet.* 7: 40-51.
- SAUGSTAD, L.F. (1977) Heterozygote advantage for the phenylketonuria allele. *J. Med. Genet.* 14: 20-24.
- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. (1995a) The hyperphenylalaninaemias. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Pp. 1015-1075. New York: McGraw Hill.
- SCRIVER, C.R. (1995b) Whatever happened to PKU ? *Clin. Biochem.* 28: 137-144.
- SCRIVER, C.R.; WATERS, P.J.; SARKISSIAN, C.; RYAN, S.; PREVOST, L.; COTE, D.; NOVAK, J.; TEEBI, S.; NOWACKI, P.M. (2000) PAHdb: a *locus*-specific knowledgebase. *Hum. Mutat.* 15: 99-104.
- SHEDLOVSKY, A.; McDONALD, J.D.; SYMULA, D.; DOVE, W.F. (1993) A mouse model for human PKU. *Genetics.* 134: 1205-1210.
- SHEFFIELD, V.C.; BECK, J.S.; KWITEK, A.E.; SANDSTROM, D.W.; STONE, E.M. (1993) The sensitivity of Single Strand Conformation Polymorphism Analysis for the detection of single base substitution. *Genomics.* 16: 325-332.
- SILVA, L.C.S.; PIRES, R.F.; COELHO, J.C.; JARDIM, L.B.; GIUGLIANI, R. (1997) Evaluation of an aspartame loading test for the detection of heterozygotes for classical phenylketonuria. *Clin. Genet.* 51: 231-235.
- SNEDECOR G.W. e COCHRAN, W.G. (1973) *Statistical methods*. 6th ed. p. 381-418. Iowa: The Iowa State University Press.
- SPADA, M.; DIANZANI, I.; BONETTI, G.; BIONDI, A.; LEONE, L.; GIANNATTASIO, S.; PONZONE, A (1998) Phenylalanine and tyrosine metabolism in phenylketonuria heterozygotes: Influence of different phenylalanine hydroxylase mutations. *J. Inher. Metab. Dis.* 21: 236-239.

- STEGINK, L.D.; WOLF-NOVAK, L.C.; FILER Jr, L.J.; BELL, E.F.; ZIEGLER, E.E.; KRAUSE, H.L.; BRUMMEL, M.C. (1987) Aspartame-sweetened beverage: Effect on plasma amino acid concentrations in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria. *J. Nutr.* 117: 1989-1995.
- SVENSSON, E.; ANDERSON, B.; HAGENFELDT, L. (1990) Two mutations within the coding sequence of the phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Genet.* 85: 300-304.
- SVENSSON, E.; von DÖBELN, U.; HAGENFELDT, L. (1991) Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase *locus* and their relation to phenotype in Swedish phenylketonuria families. *Hum. Genet.* 87: 11-17.
- SVENSSON, E.; EISENSMITH, R.C.; DWORNICZAK, B.; von DÖBELN, U.; HAGENFELDT, L.; HORST, J.; WOO, S.L.C. (1992) Two missense mutations causing hyperphenylalaninaemia associated with DNA haplotype. *Hum. Mutat.* 1: 129-137.
- SVENSSON, E.; von DÖBELN, U.; EISENSMITH, R.C.; HAGENFELDT, L.; WOO, S.L.C. (1993) Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia patients. *Eur. J. Pediatr.* 152: 132-139.
- SVENSSON, E.; ISELIUS, L.; HAGENFELDT, L. (1994) Severity of mutation in the phenylalanine hydroxylase gene influences phenylalanine metabolism in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia heterozygotes. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 215-222.
- TAKAHASHI, K.; KURE, S.; MATSUBARA, Y.; NARIZAWA, K. (1992) Novel phenylketonuria mutation detected by analysis of ectopically transcribed phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblast. *Lancet.* 340: 1473.
- TAYLOR, R.P.; SMITH, I.C.; STANDING, S.J. (1993) Rapid automated measurement of phenylalanine in plasma and blood spots. *Clin. Chim. Acta.* 218: 207-214.
- THOMPSON, A.J.; SMITH, I.; KENDALL, B.E.; YOUL, B.D.; BRÉNTON, D. (1991) Magnetic resonance imaging changes in early treated patients with phenylketonuria. *Lancet.* 337: 1224.
- TREACY, E.; BYCK, S.; CLOW, C.; SCRIVER, C.R. (1993) "Celtic" phenylketonuria chromosomes found ? Evidence in two regions of Quebec. *Eur. J. Hum. Genet.* 1: 220-228.
- TREACY, E.P.; DELENTE, J.J.; ELKAS, G.; CARTER, K.; LAMBERT, M.; WATERS, P.J.; SCRIVER, C.R. (1997) Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and

- hyperphenylalaninaemia phenotypes using L-[1-¹³C] phenylalanine oxidation rates *in vivo*: A pilot study. *Pediatric Res.* 42: 430- 435.
- TREFZ, F.K.; BURGAD, P.; KONIG, T.; GOEBEL-SCHREINER, B.; LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; SCHMIDT, E.; SCHMIDT, H.; BICKEL, H. (1993) Genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta.* 217: 15-21.
- TSAI, T.F.; HSIAO, K.J.; SU, T.S. (1990) Phenylketonuria mutation in Chinese haplotype 44 identical with haplotype 2 mutation in northern-European Caucasians. *Hum. Genet.* 84: 409-411.
- TYFIELD, L.A.; ZSCHOCKE, J.; STEPHENSON, A.; COCKBURN, F.; HARVIE, A.; BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.P.; HUNT, L.P. (1995) Discordant phenylketonuria phenotypes in one family: The relationship between genotype and clinical outcomes is a function of multiple effects. *J. Med. Genet.* 32: 867-870.
- TYFIELD, L.A.; STEPHENSON, A.; COCKBURN, F.; HARVIE, A.; BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.P.; PILZ, D.T.; HARPER, P.; SMITH, I. (1997) Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 388-396.
- VAJRO, P.; STRISCIUGLIO, P.; HOUSSIN, D.; HUAULT, G.; LAURENT, J.; ALVAREZ, F.; BERNARD, O. (1993) Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. (Letter). *N. Eng. J. Med.* 329: 363.
- VERELST, P.; FRANÇOIS, B.; CASSIMAN, J.J.; RAUS, J. (1993) Heterogeneity of phenylketonuria in Belgium. *Dev. Brain Dys.* 6: 97-108.
- VERKERK, P.H.; SPRONSEN, F.J.; HOUTEN, M.; SMIT, G.P.A.; SENGERS, R.C.A. (1994) Predictors of mean phenylalanine levels during the first five years of life in patients with phenylketonuria who were treated early. *Acta Paediatr.* 407 (suppl.): 70-72.
- WANG, S.T.; PIZZOLATO, S.; DEMSHAR, H.P. (1997) Receiver operating characteristics plots to evaluate Guthrie, Wallac and Isolab phenylalanine kit performance for newborn phenylketonuria screening. *Clin. Chem.* 43: 1838-1842.
- 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. (1991) Missense mutations prevalent in Orientals with phenylketonuria: Molecular characterization and clinical implications. *Genomics.* 10: 449-456.
- WANG, Y.; DeMAYO, J.L.; HAHN, T.M.; FINEGOLD, M.J.; KONECKI, D.S.; LICHTER-KONECKI, U.; WOO, S.L.C. (1992) Tissue-and-development-specific expression of

- the human phenylalanine hydroxylase/chloramphenicol acetyltransferase fusion gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 267: 15105-15110.
- WATERS, P.J.; HEWSON, A.S.; SCRIVER, C.R.; TREACY, E.P.; MARTINEZ, A.; KNAPPSKOG, P.M.; PARNIAK, M.A. (1997) Comparative analysis of phenylalanine hydroxylase A104D mutant, associated with variant phenylketonuria, and wild-type enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 362S.
- WATERS, P.J.; PARNIAK, M.A.; NOWACKI, P.; SCRIVER, C.R. (1998a) *In vitro* Expression Analysis of Mutations in Phenylalanine Hydroxylase: Linking Genotype to Phenotype and Structure to Function. *Hum. Mutat.* 11: 4-17.
- WATERS, P.J.; PARNIAK, M.A.; HEWSON, A.S.; SCRIVER, C.R. (1998b) Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*). *Hum. Mutat.* 12: 344-354.
- WATERS, P.J.; PARNIAK, M.A.; AKERMAN, B.R.; JONES, A.O.; SCRIVER, C.R. (1999) Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: A mechanism underlying phenylketonuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 208-212.
- WATERS, P.J.; PARNIAK, M.A.; AKERMAN, B.R.; SCRIVER, C.R. (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation phenotype. *Mol. Genet. Metab.* 69: 101-110.
- WEINSTEIN, M.; EISENSMITH, R.C.; ABADIE, V.; AVIGAD, E.; LYONNET, S.; SCHWARTZ, G.; MUNNICH, A.; WOO, S.L.C.; SHILOH, Y. (1993) A missense mutation S349P, completely inactivates phenylalanine hydroxylase in North African Jews with phenylketonuria. *Hum. Genet.* 90: 645-649.
- WOO, S.L.C.; GILLAM, S.S.; WOOLF, L.I. (1974) The isolation and properties of phenylalanine hydroxylase from human liver. *Biochemistry. J.* 139: 741-749.
- WOO, S.L.C.; LIDSKY, A.S.; GUTTLER, F.; CHANDRA, T.; ROBSON, K.J.H. (1983) Cloned human phenylalanine hydroxylase gene permits prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature.* 306: 151-155.
- WOO, S.L.C.; LIDSKY, A.S.; GUTTLER, F.; THIRUMALACHARY, C.; ROBSON, K.J.H. (1984) Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by gene mapping. *J.A.M.A.* 251: 1998-2002.

- WOO, S.L.C. (1988) Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) *locus*. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 43: 781-783.
- WOOLF, L.I. e VULLIAMY, D.G. (1951) Phenylketonuria with a study of the effect upon it of glutamic acid. *Arch. Dis. Child.* 26: 487-494.
- WOOLF, L.I. (1986) The heterozygote advantage of phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 38: 461-469.
- ZSCHOCKE, J.; GRAHAM, C.A.; CARSON, D.J.; NEVIN, N.C. (1995) Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: A rapid stepwise approach. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1311-1317.
- ZSCHOCKE, J.; MALLORY, J.P.; EIKEN, H.G.; NEVIN, N.C. (1997) Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum. Genet.* 100: 189-194.
- ZYGULSKA, M.; EIGEL, A.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; PIETRZYK, J.J.; HORST, J. (1991) Molecular analysis of PKU haplotypes in the population of southern Poland. *Hum. Genet.* 86: 292-294.

ENDEREÇOS ELETRÔNICOS:

<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/>

<http://www.blizzard.cc.mcgill.ca/pahdb/sequence/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.unizh.ch/~blau/bh4.html>

8. ANEXOS

ANEXO 1: CARTA CONVITE PARA PARTICIPAR DO ESTUDO "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE EM FENILCETONÚRICOS DO SUL DO BRASIL".

Porto Alegre, dia/mês/ano

Prezados Pais,

Visto que o (a) seu filho apresenta Fenilcetonúria, cujo diagnóstico laboratorial e tratamento estão sendo realizados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, vimos através desta pedir sua cooperação em participar de um estudo específico para portadores desta doença e seus familiares. O nosso objetivo é a melhor caracterização molecular de Fenilcetonúria no Brasil. É importante mencionar que, para o referido estudo, é necessário apenas a coleta de sangue, não culminando em nenhuma complicação para os participantes e a sua participação, bem como de sua família, será de grande importância.

Este estudo já conta com a participação de várias pessoas, bem como do apoio de hospitais estrangeiros. Para informações mais detalhadas, assim como para a marcação da coleta de sangue, favor entrar em contato com o Biomédico Luiz Carlos Santana da Silva no Serviço de Genética Médica (2º andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) ou através do telefone (051) 3168011.

Gostaria de lembrar que a coleta de sangue da sua família será no dia ---/---/---. Caso surja algum impedimento, favor entrar em contato com os Drs. Luiz Carlos Santana da Silva, Roberto Giugliani e Maria Luiza Saraiva Pereira, antes desta data. Certos de sua compreensão e apoio, desde já manifestamos nossos agradecimento.

Atenciosamente,

Luiz Carlos Santana da Silva

Dra. Maria Luiza Pereira

Dr. Roberto Giugliani

ANEXO 2: FICHA COM OS DADOS DOS PACIENTES

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA - HCPA

PACIENTES COM FENILCETONÚRIA

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome do Paciente: _____ DN: _____
 Sexo: _____ Cor: _____ Naturalidade: _____
 Ficha Clínica: _____ Ficha de EIM: _____ Registro/HCPA: _____
 Nome do Pai: _____
 Nome da Mãe: _____
 Endereço: _____ Fone: _____
 Cidade: _____ CEP: _____ Estado: _____
 Idade de Diagnóstico: _____
 Apresentava sintomas clínicos na época do diagnóstico () Sim () Não
 Outros casos na família: () Sim () Não
 Ascendência Étnica: Avô paterno: _____ Avó Paterna: _____
 Avô Materno: _____ Avó Materna: _____

Heredograma:

DADOS LABORATORIAIS:

Análise Molecular:

Procedimento	Resultado	Data
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Mutações encontradas: _____

ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo caracterizar as mutações presentes no gene da fenilalanina hidroxilase, a qual está deficiente em pacientes com Fenilcetonúria, e determinar a freqüência destas mutações na população estudada.

Para a participação no estudo, uma amostra de sangue periférico (de 5 a 10 mL) será colhida para posterior extração de DNA. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos envolvidos na coleta realizada para exames laboratoriais de rotina. O material colhido será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. Fica garantido ao paciente ou familiares o acesso a estas informações a qualquer momento.

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida relacionada à pesquisa, da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e do caráter confidencial das informações.

Nome do Paciente:

Assinatura do Responsável Legal:

Pesquisador:

ANEXO 4: CARTA CONVITE PARA PARTICIPAR DO ESTUDO "AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE SOBRECARGA DE ASPARTAME PARA A DETECÇÃO DE HETEROZIGOTOS PARA FENILCETONÚRIA".

Porto Alegre, dia/mês/ano

Prezados Senhores (as),

Vimos através desta pedir sua cooperação em participar do estudo "Avaliação de um Teste de Sobrecarga de Aspartame para a Detecção de Heterozigotos para Fenilcetonúria", que será por nós realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. É importante mencionar que tal estudo consiste em coletas de sangue ante e após o consumo de aspartame (um adoçante), e não traz nenhum risco ou complicação para os participantes.

Para termos pleno êxito nesta pesquisa, convém também lembrar que os participantes deste estudo deverão vir em jejum no dia da coleta de sangue, marcada para o dia ---/---/---, pela parte da manhã.

Sua participação será de grande importância, uma vez que pretendemos, com o presente estudo, desenvolver uma técnica simples e de baixo custo para a detecção de heterozigotos (portadores) do gene da Fenilcetonúria, contribuindo, assim, para a prevenção da doença em nossa população.

Contando com a sua compreensão e o seu apoio, desde já manifestamos nossos agradecimentos

Atenciosamente,

Luiz Carlos Santana da Silva

Dra. Roberto Giugliani

ANEXO 5: RESUMO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Paciente 1 (R261X/IVS10nt-11g>a): 8 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação R261X de origem paterna e a mutação IVS10nt-11g>a de origem materna. Diagnosticado tardiamente (2 anos e 5 meses). Na primeira consulta, foi observado a presença de RNPM. Apresentou episódios de convulsão, hipereflexia difusa e EEG alterado. Freqüente escola especial desde os 3 anos e 7 meses. Somente aos 6 anos de idade controlou os esfínteres. Apresenta controle metabólico é inadequado devido à dieta irregular. A última dosagem de Phe foi de 1241 $\mu\text{mol/L}$, níveis elevados para sua idade atual.

Paciente 2 (I65T/IVS2nt5g>c): 16 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação I65T de origem paterna e a mutação IVS2nt5g>c de origem materna. Diagnosticado tardiamente (10 anos). Na primeira consulta, foi observado a presença de ceratose folicular e dermatite seborréica. Apresentou tomografia computadorizada do crânio e EEG normais, mas o teste psicomotor revelou retardo mental. Nunca apresentou convulsões. Freqüentou escola especial até aos 11 anos de idade. Está cursando a 4^o série da escola normal com deficiência no aprendizado. Às vezes, vem à consulta sem acompanhante, prepara e controla a dieta. No entanto, não tem um bom controle metabólico.

Paciente 3 (R261X/?): 5 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação R261X de origem materna. Diagnosticado precocemente (13 dias) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi iniciado imediatamente, mas durante o mesmo, apresentou níveis de Phe elevados e associados à presença de hiperatividade e dieta irregular. Não é considerado um bom controle metabólico.

Paciente 4 (P281L/R408W): 6 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação P281L de origem paterna e a mutação R408W de origem materna. Diagnosticado tardiamente (1 ano e 10 meses). Na primeira consulta, foi observado a presença de RNPM e rins em ferradura. Apresentou episódios de convulsão e EEG alterado. Apresentou níveis de Phe elevados quando em situação de IVAS e infecção bacteriana. O controle metabólico é considerado regular. A última dosagem de Phe foi de 702 $\mu\text{mol/L}$, valor elevado para sua idade atual.

Paciente 5 (R408W/R408W): 6 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos para a mutação R408W. Diagnosticado precocemente (50 dias) através de programa de triagem neonatal. O tratamento começou aos 2 meses, o qual foi abandonado aos 2 anos. Ficou sem tratamento durante 5 meses e, quando retornou, à dieta apresentou níveis elevados de Phe para a idade (1174 $\mu\text{mol/L}$), vômitos, diarréia e hiperatividade. A última dosagem de Phe foi de 651 $\mu\text{mol/L}$, um pouco elevada para a idade atual.

Paciente 6 (V388M/IVS2nt-13t>g): 6 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação IVS2nt-13t>g de origem paterna e a mutação V388M de origem materna. Diagnosticado tardiamente (5 meses). Na primeira consulta, apresentou irritabilidade, lesões cutâneas e cabelos claros e quebradiços. Após a introdução da dieta, os cabelos ficaram escuros, as lesões cutâneas desapareceram e houve melhora do quadro neurológico. Com 1 ano e 8 meses apresentou convulsão, mas o EEG foi normal. Freqüenta escola normal, mas continua agitado. Não tem bom controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 878 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade.

Paciente 7 (IVS2nt5g>c/IVS2nt5g>c): 7 anos, sexo feminino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos para a mutação IVS2nt5g>c. Diagnosticado precocemente (34 dias) por programa de triagem neonatal. O tratamento começou aos 2 meses e, durante o mesmo, algumas vezes apresentou níveis de Phe alterados e associados à presença de infecção das vias aéreas superiores (IVAS) com febre e dieta irregular. Freqüenta escola normal com bom aproveitamento, mas apresenta dificuldade motora. A última dosagem de Phe foi de 1168 $\mu\text{mol/L}$, sendo muito elevada para sua idade atual.

Paciente 8 (R261X/R261X): 9 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos para a mutação R261X. Diagnosticado tardiamente (2 anos e 6 meses). Na primeira consulta, foi verificada a presença de RDNPM, aparente microcefalia, irritabilidade e lesões cutâneas. Após a introdução da dieta, apresentou melhora psicomotora. Aos 5 anos apresentou convulsões. Freqüenta escola especial, mas continua agitado e hiperativo. O tratamento é considerado bom. A última dosagem de Phe foi de 726 $\mu\text{mol/L}$, sendo um pouco elevada para a sua idade. Tem uma irmã com

deficiência de PAH, diagnosticada tardiamente (11 anos e 9 meses). Na primeira consulta, foi verificada a presença de RM, cabelos claros e crânio atípico. Após a introdução da dieta, os cabelos ficaram mais escuros e houve melhora do quadro neurológico. Freqüente escola normal, cursando a 6ª série e com alguma dificuldade em matemática.

Paciente 9 (F55fsdelT/R408W): 7 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação F55fsdelT de origem paterna e a mutação R408W de origem materna. Diagnosticado precocemente (55 dias) por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Algumas vezes, os níveis de Phe estavam alterados, geralmente relacionados com a presença de IVAS com febre e dieta irregular. O controle metabólico é considerado excelente e sua última dosagem de Phe foi de 393 $\mu\text{mol/L}$, valor adequado para a idade do paciente.

Paciente 10 (IVS2nt5g>c/IVS2nt5g>c): 7 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos para a mutação IVS2nt5g>c. Diagnosticado precocemente (45 dias) através de programa de triagem neonatal. O tratamento foi introduzido aos 2 meses, o qual foi abandonado aos 3 anos e 3 meses. Ficou sem tratamento durante 4 meses e, quando retornou à dieta, apresentou níveis elevados de Phe para a idade. Durante o tratamento, os níveis de Phe, algumas vezes, foram elevados devido à dieta irregular. Apresenta um tratamento adequado para a idade e sua última dosagem foi de 339 $\mu\text{mol/L}$ de Phe.

Paciente 11 (R408Q/1378G>T): 5 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação R408Q de origem paterna e a mutação 1378g>t de origem materna. Diagnosticado precocemente (2 meses) por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Apresenta um excelente controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 260 $\mu\text{mol/L}$, sendo adequada para sua idade.

Paciente 12 (R252W/?): 4 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação R252W de origem materna. Diagnosticado precocemente (27 dias) por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. No início do tratamento, apresentou episódios de vômitos. Freqüente escola normal desde os 3 anos de idade. Durante o tratamento, apresentou níveis de Phe elevados e

associados à IVAS com febre e dieta irregular. Apresenta controle metabólico satisfatório. A última dosagem de Phe foi de 599 $\mu\text{mol/L}$, nível elevado para sua idade.

Paciente 13 (I65T/I65T): 6 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos para a mutação I65T. Diagnosticado precocemente (14 dias) por programa de triagem neonatal. Na primeira consulta, apresentou cianose e hepatite neonatal. Tratamento dietético foi introduzido imediatamente e foi abandonado aos 2 anos e 9 meses e a sua última dosagem de Phe foi de 781 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade.

Paciente 14 (R158Q/R270K): 17 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios para a deficiência de PAH. Diagnosticado tardiamente (7 meses). Na primeira consulta, foi observado a presença de RDNPM e microcefalia. A terapia dietética foi iniciada imediatamente, a qual foi abandonada por 8 anos. Apresentou episódios de convulsão, agressividade e EEG alterado. O controle metabólico do paciente é inadequado devido à dieta irregular.

Paciente 15 (I65T/IVS12nt1g>a): 9 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação IVS12ntg>a de origem paterna e a mutação I65T de origem materna. Diagnosticado precocemente (1 mês) por programa de triagem neonatal. Na primeira consulta, apresentou quadro de cianose. Freqüente escola normal desde os 6 anos de idade com excelente desempenho. Apresenta um bom controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 660 $\mu\text{mol/L}$, sendo um pouco elevada para sua idade.

Paciente 16 (N133/Q134delATCA/?): 17 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação N133/Q134delATCA de origem materna. Diagnosticado tardiamente (2 anos e 10 meses). A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Na primeira consulta, não falava, apresentava retardo mental leve e fácies atípicas e sem controle esfinteriano. Após o início da dieta, começou a falar e controlar os esfíncteres. Freqüente escola normal e está na 3ª série com dificuldade no aprendizado. Durante o tratamento, apresentou níveis de Phe elevados e associados a

uma dieta irregular. Apresenta controle metabólico satisfatório. A última dosagem de Phe foi de 890 $\mu\text{mol/L}$, nível adequado para sua idade.

Paciente 17 (I65T/R261X): 10 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação I65T de origem paterna e a mutação R261X de origem materna. Diagnosticado precocemente por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Está na 5^o série da escola normal, mas apresenta dificuldade em matemática e é hiperativo. Apresentou EEG normal. Em algumas ocasiões, durante o tratamento, os níveis de Phe estavam elevados e associados com a presença de IVAS com febre e dieta irregular. A última dosagem de Phe foi de 901 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade.

Paciente 18 (R261Q/R408W): 10 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação R408W de origem paterna e a mutação R261Q de origem materna. Diagnosticado tardiamente (13 meses). Na primeira consulta, foi observado a presença de RDNPM, agressividade e lesões cutâneas. Apresentou episódios de convulsão. Após a introdução da dieta, ficou mais calmo. Não tem um bom controle metabólico, pois sempre apresenta níveis elevados de Phe.

Paciente 19 (I65T/IVS2nt5g>c): 6 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação IVS2nt5g>c de origem paterna e a mutação I65T de origem materna. Diagnosticado precocemente (18 dias) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi iniciado imediatamente. Está na escola normal com bom aproveitamento. Em algumas ocasiões, durante o tratamento, os níveis de Phe estavam elevados e associados com a presença de IVAS com febre e dieta irregular. A última dosagem de Phe foi de 478 $\mu\text{mol/L}$, sendo adequada para sua idade.

Paciente 20 (I65T/?): 7 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação I65T de origem materna. Diagnosticado precocemente (20 dias) por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Apresentou duas dosagens normais de Phe e abandonou o tratamento. Retomou ao mesmo com 1 ano e 4 meses, apresentando níveis elevados de Phe, irritabilidade e EEG alterado. Após o reinício da dieta, a irritabilidade diminuiu e apresentou EEG normal. Durante o

tratamento, apresentou níveis de Phe elevados e associados a uma dieta irregular e a IVAS com febre. Apresenta bom controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 253 $\mu\text{mol/L}$, nível adequado para sua idade e, no momento, está com dieta livre.

Paciente 21 (I65T/P281L): 7 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação P281L de origem paterna e a mutação I65T de origem materna. Diagnosticado precocemente (26 dias) por programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Em algumas ocasiões, os níveis de Phe estavam elevados e associados à dieta irregular. Está na escola normal com bom aproveitamento. A última dosagem de Phe foi de 867 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade. Tem uma irmã com deficiência de PAH, diagnosticada tardiamente (1 ano). O tratamento foi iniciado imediatamente. Na primeira consulta, foi verificado a presença de retardo mental, irritabilidade e hipotonia generalizada. Apresentou crises convulsivas e EEG alterado. Após o início do tratamento, as crises convulsivas desapareceram. Está na escola especial com bom aproveitamento. Em algumas ocasiões, durante o tratamento, os níveis de Phe estavam alterados e associados à dieta irregular. A última dosagem de Phe foi de 794 $\mu\text{mol/L}$, sendo adequada para sua idade atual.

Paciente 22 (V388M/IVS7nt1g>a): 13 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação V388M de origem paterna e a mutação IVS7nt1g>a de origem materna. Diagnosticado precocemente (2 meses) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi iniciado imediatamente. Na primeira consulta, foi observado a presença de transtornos de comportamento. Está na 7^o série da escola normal com bom desempenho. No entanto, durante o tratamento, apresentou níveis de Phe elevados e associados a uma dieta irregular. A última dosagem de Phe foi de 1108 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade.

Paciente 23 (R408W/?): 13 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos, sendo a mutação R408W de origem paterna. Diagnosticado tardiamente (5 anos e 6 meses). A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Na primeira consulta, foi observado a presença de retardo mental, irritabilidade e não falava. Apresentou convulsões e hipotonia. Durante quase 3 anos, ficou sem acompanhamento médico, mas os pais conservaram a dieta. Após o reinício da dieta, começou a falar e está menos

agitado. Apresenta bom controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 623 $\mu\text{mol/L}$, nível adequado para sua idade. Tem uma irmã com deficiência de PAH diagnosticada tardiamente (2 anos). A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Na primeira consulta, foi observado a presença de retardo mental. Também ficou 3 anos sem acompanhamento médico, mas com dieta controlada. Está na 1ª série da escola normal com aproveitamento regular. Apresenta um controle metabólico satisfatório. A última dosagem de Phe foi de 654 $\mu\text{mol/L}$, nível levemente alterado para sua idade.

Paciente 24 (R261Q/R261Q): 8 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos para a mutação R261Q. Diagnosticado precocemente (37 dias) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi iniciado aos 48 dias de vida. Durante o tratamento, algumas vezes os níveis de Phe se apresentaram elevados devido à dieta irregular. Freqüenta escola normal com bom desempenho no início, mas atualmente com aprendizado deficiente. O tratamento é considerado satisfatório e a última dosagem de Phe foi de 672 $\mu\text{mol/L}$, sendo um pouco elevada para sua idade.

Paciente 25 (I65T/I65T): 20 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Os pais são heterozigotos para a mutação I65T. Diagnosticado tardiamente (10 anos e 8 meses). Na primeira consulta, foi verificada a presença de RDNPM grave, comportamento autista e agressividade. Apresentou convulsões e EEG alterado. Após a introdução da dieta, apresentou sinais de melhora no comportamento. O tratamento foi abandonado por 4 anos e, durante este período, apresentou crises convulsivas. Após o retorno à terapia dietética, o controle metabólico do paciente tem sido considerado bom, sendo 297 $\mu\text{mol/L}$ a última dosagem de Phe.

Paciente 26 (L15/S16fsdelCT/ L15/S16fsdelCT): 8 anos, sexo masculino e filho de pais consangüíneos. Diagnosticado precocemente (50 dias) através de programa de triagem neonatal. A terapia dietética foi iniciada imediatamente. Passou um período de 9 meses sem tratamento e, quando retornou ao mesmo, apresentou níveis elevados de Phe para a idade. Durante o tratamento, em muitas vezes os níveis de Phe se apresentaram elevados devido à dieta irregular e associados a quadro de IVAS com febre. Freqüenta escola normal desde os 5 anos de idade com bom desempenho.

Atualmente, o tratamento é considerado satisfatório e a última dosagem de Phe foi de 811 $\mu\text{mol/L}$, sendo elevada para sua idade atual.

Paciente 27 (V388M/V388M): 6 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos para a mutação V388M. Diagnosticado tardiamente (1 ano). Na primeira consulta, foi verificada a presença de atraso do DNPM e relato de convulsões. O EEG apresentou atrofia cerebral. Durante o tratamento, os níveis de Phe se apresentaram elevadas devido à dieta irregular. O controle metabólico é inadequado e a última dosagem de Phe foi de 962 $\mu\text{mol/L}$.

Paciente 28 (R261Q/IVS12nt1g>a): 4 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação R261Q de origem paterna e a mutação IVS12nt1g>a de origem materna. Diagnosticado precocemente (34 dias) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi iniciado imediatamente. Apresenta um excelente controle metabólico. A última dosagem de Phe foi de 200 $\mu\text{mol/L}$, sendo adequada para sua idade.

Paciente 29 (I65T/?): 20 anos e do sexo masculino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação I65T de origem paterna. Diagnosticado tardiamente (5 anos). O tratamento foi introduzido imediatamente. Na primeira consulta, apresentou agressividade. Freqüente escola normal com bom desempenho. Apresenta um controle metabólico satisfatório. A última dosagem de Phe foi de 926 $\mu\text{mol/L}$, nível adequado para sua idade.

Paciente 30 (IVS12nt1g>a/?): 13 anos e do sexo feminino. Os pais são heterozigotos obrigatórios, sendo a mutação IVS12nt1g>a de origem materna. Diagnosticado precocemente (2 meses) por programa de triagem neonatal. O tratamento foi introduzido imediatamente. Freqüente a 6ª série da escola normal com bom desempenho. Apresenta um controle metabólico satisfatório. A última dosagem de Phe foi de 999 $\mu\text{mol/L}$, valor um pouco elevado para sua idade.

ANEXO 6: ARTIGO

**ASPARTAME LOADING TEST IN PKU HETEROZYGOUS INDIVIDUALS BEARING
SEVERE AND MODERATE MUTATIONS**

Letter to the Editor

Aspartame loading test in PKU heterozygous individuals bearing severe and moderate mutations

To the Editor:

Phenylketonuria (PKU) is a disease of amino acid metabolism caused by mutations in the liver enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). The interindividual variation in disease severity observed among PKU patients is the result of extensive allelic heterogeneity at the PAH locus. To date, more than 400 mutations in the PAH gene have been reported worldwide (1, 2). Mental retardation is the main symptom observed in non-treated PKU patients (3). Several methods have been developed for the detection of PKU heterozygous individuals, based on measurements of plasma phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr) levels or analysis of the Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios (4, 5). However, results obtained in most of these studies showed an important overlap among heterozygous and normal individuals.

Several studies have been performed in order to analyze possible effects of aspartame sweetener and related components on Phe and Tyr levels in heterozygous individuals for PAH deficiency (6–8). The correlation among results of Phe loading tests and mutations in the gene have not been extensively studied (9–11). This study investigated the extent to which mutant PAH alleles influence Phe and Tyr metabolism in PKU heterozygotes after oral aspartame loading.

Mutations carried by 12 PKU heterozygous individuals were identified by restriction endonuclease or sequence analyses, following DNA extraction from peripheral blood by standard methods. After an overnight fast (12 h), carriers and six controls were submitted to an oral aspartame loading test (100 mg/kg of aspartame dissolved in 300 ml of orange juice). Blood samples were collected prior to and 30 min after aspartame loading, and Phe and Tyr plasma concentrations were determined fluorimetrically (12, 13). Individuals were divided into three different groups: heterozygous individuals bearing a severe mutation, which leads to an enzyme activity below 1% (P281L, R408W or IVS12nt1g > a); heterozygous

individuals bearing a moderate mutation, which leads to significant (15–50%) residual enzyme activity (V388M, R261Q or I65T); and controls.

Table 1 shows Phe and Tyr plasma concentrations and Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios before and after the loading test for each individual tested. Results were statistically compared by the Student's t-test for paired and independent samples.

Results obtained show a significant increase of Phe levels and Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios in individuals with severe mutations after the loading test. In individuals with moderate mutations only, the Phe/Tyr ratio was significantly higher ($p < 0.05$) after the loading test. Comparison of measurements across groups of heterozygotes revealed the only statistically significant difference to be a higher mean level of Phe before aspartame loading ($p < 0.05$) in heterozygotes with moderate mutations. No significant differences were seen between both groups of heterozygotes after aspartame loading.

Phe levels, Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios of both groups of heterozygotes were significantly different from the control group ($p < 0.05$) before and after the loading test, and no overlapping values were detected. In addition, significantly higher values ($p < 0.05$) of Tyr were seen in controls than in either or both groups of heterozygotes after aspartame loading. A recent study showed that Tyr monitoring following oral Phe loading appears to be very effective in the detection of heterozygotes, but such a scheme is not useful for evaluation of mutation severity in PKU heterozygotes (10). According to our results, Tyr level after aspartame loading is similarly not useful for predicting severity of mutations.

Results presented here show that the baseline Phe plasma concentration determined in heterozygotes bearing moderate mutations was significantly higher than in heterozygotes bearing severe mutations, although overlap of values was observed. These results are in agreement with a previous study, which reported that plasma Phe and Tyr

Table 1. Outcome of the oral aspartame loading test (100 mg/kg) in PKU heterozygotes bearing severe or moderate mutations and in six normal controls

Group	Mutant allele	Before loading				After loading			
		Phe*	Tyr*	Phe/Tyr	Phe ² /Tyr	Phe*	Tyr*	Phe/Tyr	Phe ² /Tyr
Severe Mutation (n = 4)	P281L	77	67	1.15	88	94	59	1.59	149
	R408W	93	60	1.55	145	107	62	1.73	185
	IVS12nt1g→a	108	73	1.48	160	124	70	1.77	220
	IVS12nt1g→a	70	57	1.23	86	109	73	1.50	164
Range		70–108	57–73	1.15–1.55	86–160	94–124	59–73	1.50–1.77	149–220
Mean ± SD		87 ± 17 ^a	64 ± 7	1.35 ± 0.19 ^a	120 ± 38 ^a	109 ± 9 ^{a,b}	66 ± 7	1.65 ± 0.13 ^{a,b}	180 ± 31 ^{a,b}
Moderate Mutation (n = 8)	V388M	105	57	1.84	194	91	50	1.82	1.65
	R261Q	113	69	1.63	185	126	64	1.97	249
	R261Q	116	64	1.82	210	149	77	1.93	288
	I65T	94	77	1.22	115	113	68	1.66	187
	I65T	113	94	1.20	135	106	71	1.50	159
	I65T	113	102	1.10	125	103	94	1.09	112
	I65T	111	46	2.40	267	130	51	2.57	335
	I65T	95	58	1.64	156	85	52	1.63	139
Range		94–116	46–102	1.10–2.40	115–267	85–149	50–94	1.09–2.57	112–335
Mean ± SD		108 ± 9 ^{a,c}	71 ± 19	1.61 ± 0.43 ^a	173 ± 51 ^a	113 ± 21 ^a	66 ± 15	1.77 ± 0.43 ^{a,b}	204 ± 78 ^a
Controls (n = 6)									
Range		53–66	60–87	0.70–1.01	38–83	64–84	64–93	0.76–1.01	54–79
Mean ± SD		59 ± 5	73 ± 11	0.83 ± 0.13	49 ± 10	75 ± 7 ^b	82 ± 11 ^a	0.93 ± 0.1	69 ± 11 ^b

Severe mutation: heterozygotes bearing a severe mutation; moderate mutation: heterozygotes bearing a moderate mutation; controls: normal individuals; SD = standard deviation.

* Phe and Tyr values are expressed in $\mu\text{mol/l}$.

^a Significant differences between heterozygote and control groups ($p < 0.05$).

^b Significant effect of aspartame loading in each group ($p < 0.05$).

^c Significant differences between groups of heterozygotes ($p < 0.05$).

concentrations did not predict the severity of mutations in the PAH gene in heterozygotes after an overnight fast (9).

In conclusion, Phe/Tyr and Phe²/Tyr ratios both before and after aspartame loading seem to be the most reliable measurements to discriminate controls from PKU heterozygotes. We are aware that results presented here relate to plasma concentrations of Phe and Tyr in heterozygotes bearing specific PAH mutations and, as such, cannot be generalized to all mutations. However, these findings suggest that further studies with a larger number of heterozygous individuals could provide valuable data about the diagnostic potential of such loading tests to detect and to distinguish severe and moderate mutations.

*Luiz Carlos Santana da Silva
Tiago Santos Carvalho
Fernanda B. da Silva
Ricardo Flores Pires
Roberto Giugliani
Maria Luiza Saraiva Pereira*

Acknowledgements

The authors are grateful to patients and their parents who kindly agreed to take part in this study, as well as to referring physicians of the Medical Genetics Service. This work was supported by the following Brazilian agencies: CNPq, CAPES, FAPERGS, FIPE-HCPA, PROPESQ-UFRGS and PRONEX (no. 76.97.1025.00).

References

- Nowacki PM, Byck S, Prevost L, Scriver CR. PAH Mutation Analysis Consortium Database 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 220–225.
- Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann G, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzone A, Rey J, Güttler F. A European multicenter study for 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.
- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. The hyperphenylalaninurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1015–1075.
- Lehmann WD, Theobald N, Heinrich HC, Clemens P, Gruttner R. Detection of heterozygous carriers for

- phenylketonuria by a L-[2H5] phenylalanine stable isotope loading test. *Clin Chim Acta* 1984; 138: 59–71.
5. Güneral F, Özalp I, Tatlidil H. Heterozygous carriers of classical phenylketonuria in a sample of the Turkish population: detection by a spectrofluorimetric method. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 741–748.
 6. Stegink LD, Wolf-Novak LC, Filer LJ, Bell EF, Ziegler EE, Krause WL, Brummel MC. Aspartame-sweetened beverage: effect on plasma amino acid concentrations in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria. *J Nutr* 1987; 117: 1989–1995.
 7. Blau N, Curtius HCh, Endres W. Effect of high-protein meal plus aspartame ingestion on plasma phenylalanine concentrations in obligate heterozygotes for phenylketonuria. *Metabolism* 1994; 43: 413–416.
 8. Silva LCS, Pires RF, Coelho JC, Jardim LB, Giugliani R. Evaluation of an aspartame loading test for the detection of heterozygotes for classical phenylketonuria. *Clin Genet* 1997; 51: 231–235.
 9. Svensson E, Iselius L, Hagenfeldt L. Severity of mutation in the phenylalanine hydroxylase gene influences phenylalanine metabolism in phenylketonuria and hyperphenylalaninemia heterozygotes. *J Inher Metab Dis* 1994; 17: 215–222.
 10. Spada M, Dianzani I, Bonetti G, Biondi A, Leone L, Giannattasio S, Ponzzone A. Phenylalanine and tyrosine metabolism in phenylketonuria heterozygotes: influence of different phenylalanine hydroxylase mutations. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 236–239.
 11. Guldberg P, Henriksen KF, Lou HC, Güttler F. Aberrant phenylalanine metabolism in phenylketonuria heterozygotes. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 365–372.
 12. McCaman M, Robins E. Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J Lab Clin Med* 1962; 59: 885–890.
 13. Philips RE. Tyrosine in serum. In: Turner GK, ed. *Manual of fluorimetric clinical procedures*. Palo Alto: GK Turner Associates, 1967.

Correspondence:

Luiz C. Santana da Silva
Medical Genetics Service
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos
2350 90035-003 Porto Alegre
RS, Brazil
Tel: + 55 51 316 8011
Fax: + 55 51 316 8010
E-mail: lcass@myway.com.br