

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

**Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase:
avaliação da responsividade ao BH₄ em pacientes acompanhados
no Serviço de Genética Médica do HCPA e que apresentam
controle metabólico adequado**

TATIÉLE NALIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

Porto Alegre, Brasil
2011

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

**Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase:
avaliação da responsividade ao BH₄ em pacientes acompanhados
no Serviço de Genética Médica do HCPA e que apresentam
controle metabólico adequado**

TATIÉLE NALIN

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

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Porto Alegre, Brasil
2011

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

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

13/05/2011

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Carolina Fishinger Moura de Souza
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Chefe do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Euclides e Marlene**,
pelo apoio constante, pelo amor e
incentivo.

A minha irmã **Tamara** pelo apoio e
carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Ida Vanessa Doerdelein Schwartz, que é minha inspiração profissional. Obrigada pela confiança, compreensão, oportunidades proporcionadas, dedicação e acima de tudo, pela amizade e pelas contribuições que me fazem ser melhor a cada dia.

A Profa. Ingrid Dalira Schweigert Perry, por toda a ajuda para que esse trabalho se realizasse, pelo carinho incondicional nos momentos alegres ou tristes e por me fazer acreditar que a Nutrição foi a escolha certa.

A meus pais e minha irmã, pela torcida, compreensão, carinho, incentivo e por serem meu porto seguro em todos os momentos da vida.

Ao meu namorado, pelo carinho, pela compreensão e por ser meu companheiro em qualquer circunstância.

A minha família, pela torcida e incentivo.

Aos meus amigos pela compreensão, incentivo e por todos os momentos de alegria.

As nutris, por tornarem essa profissão mais divertida e bonita.

A equipe do ambulatório de distúrbios metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA, em Cristina Brinckmann Netto, Lilia Farret Refosco e Tatiane Alves Vieira, pela amizade, ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade e a todos que contribuíram para a realização desse estudo, em especial a Silvani, Fernanda, André, Marta, Maria Teresa, Maria Luiza, Cláudio, Filippo, Andressa, Ana Paula, Taiane e Taciane.

A amiga e colega de profissão, Luciana Giugliani, que introduziu os estudos com BH₄, pelo carinho e auxílio no desenvolvimento desse projeto.

As acadêmicas da Nutrição Betânia e Raquel, pela participação na coleta de dados, não foi fácil acordar tão cedo por tantas quintas-feiras consecutivas.

A todos os pacientes e familiares que participaram do estudo, meus sinceros agradecimentos.

A *Merck Serono*, pela doação do medicamento Kuvan®, utilizado nos testes de sobrecarga.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES).

A UFRGS, pelo conhecimento proporcionado.

A Deus, pela proteção.

EPIGRAFE

A pedra

"O distraído nela tropeçou...
O bruto a usou como projétil.
O empreendedor, usando-a, construiu.
O camponês, cansado da lida, dela fez assento.
Para meninos, foi brinquedo.
Drummond a poetizou.
Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...
E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no Homem!
Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio
crescimento."

Fenelon Portilho

RESUMO

Introdução: Estudos recentes, utilizando vários protocolos, têm demonstrado que pacientes com Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH) podem apresentar redução das concentrações plasmáticas de fenilalanina (Phe) mediante a administração de tetrahidrobiopterina (BH₄).

Objetivo: Determinar, em uma amostra de pacientes brasileiros com HPA-PAH, a responsividade à administração de dose única de BH₄ por meio de um protocolo incluindo o teste de sobrecarga simples de Phe e o teste combinado de sobrecarga de Phe+BH₄.

Métodos: Foram incluídos no estudo pacientes com idade ≥ 4 anos, em tratamento dietético e que possuíam mediana de Phe plasmática inferior a 10mg/dL no ano anterior à inclusão. Foram realizados teste de sobrecarga simples de Phe, utilizando 100mg/kg de L-Phe (Teste 1) e teste combinado de Phe+BH₄, utilizando 100mg/kg de L-Phe e 20mg/kg de BH₄ (Teste 2), com intervalo de uma semana entre ambos. A ingestão do BH₄ ocorreu após três horas da ingestão da Phe. Foram realizadas coletas de sangue no ponto basal e após três, 11 e 27h da ingestão de Phe (T0, T1, T2 e T3 dos testes 1 e 2, respectivamente). Para ser considerado responsivo, o paciente deveria apresentar evidência de redução dos níveis de Phe associada à administração do BH₄ de acordo com pelo menos um dos seguintes critérios: critério A – análise das diferenças, em percentual, dos valores de Phe nos pontos T1 e T2 dos Testes 1 e 2; critério B – análise das diferenças, em percentual, dos valores de Phe nos pontos T1 e T3 dos Testes 1 e 2 e critério C – análise da diferença, em percentual, das áreas abaixo da curva de Phe entre os Testes 1 e 2. A classificação de responsividade foi também comparada com quatro critérios adicionais: critério D – análise da diferença, em percentual, dos valores de Phe nos pontos T1 e T2 do Teste 2; critério E – análise da diferença, em percentual, dos valores de Phe nos pontos T1 e T3 do Teste 2; cinco pacientes participaram de estudo anterior do grupo e foram também classificados através do critério F – análise da diferença, em percentual, dos valores de Phe após 8h da sobrecarga simples com BH₄ e do critério G – análise da diferença, em percentual, dos valores de Phe após 24h da sobrecarga simples com BH₄. Para todos os critérios foi utilizado como ponte de corte redução $\geq 30\%$.

Resultados: Dezoito pacientes, com mediana de idade de 12 anos, participaram do estudo. Dez pacientes apresentavam a forma Leve de HPA-PAH e oito a forma Clássica. Seis pacientes foram considerados responsivos de acordo com os critérios adotados (Clássica: 2; Leve: 4). Houve concordância de responsividade entre os critérios A e B em relação ao C

(Índice Kappa=0,557; p=0,017). Dos pacientes com genótipo disponível (n=16), seis possuíam dados de responsividade ao BH₄ descritos na literatura, que foram concordantes com os encontrados no presente estudo.

Conclusão: Dados relativos à responsividade, tipo de HPA-PAH e genotipagem estão de acordo com descrito na literatura. Haja vista a diferença de responsividade dos pacientes ao BH₄ conforme o critério de classificação utilizado, salienta-se a importância de uma definição cautelosa de responsividade e que não seja baseada em um único critério. A comparação entre a sobrecarga simples de Phe e combinada de Phe+BH₄ parece ser um critério adequado para avaliar responsividade ao BH₄ em pacientes com HPA-PAH que apresentam bom controle metabólico quando em tratamento dietético.

Palavras-chave: Erro Inato do Metabolismo, Hiperfenilalaninemia, Fenilcetonúria, Fenilalanina, Tetrahydrobiopterina.

ABSTRACT

Introduction: Recent studies using different protocols showed that patients with hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency (HPA-PAH) may have a reduction in phenylalanine (Phe) plasma concentrations after tetrahydrobiopterin (BH₄) administration.

Objective: To determine responsiveness to the administration of a single dose of BH₄, in a sample of Brazilian patients with HPA-PAH using a protocol that includes the simple Phe loading test and the combined Phe+BH₄ loading test.

Methods: Patients included in the study were ≥ 4 years of age; their median Phe plasma concentration was ≤ 10 mg/dL, and all underwent dietary treatment in the 12 months before inclusion in the study. Participants received a simple Phe loading test using 100mg/kg L-Phe (Test 1) and a combined Phe+BH₄ loading test using 100mg/kg L-Phe and 20mg/kg /BH₄ (Test 2) at a one-week interval. BH₄ was ingested three hours after Phe ingestion. Blood samples were collected at baseline and three, 11 and 27h after Phe ingestion (time points T0, T1, T2 and T3 in Tests 1 and 2). To be classified as responsive, there should be evidence that the patient had a reduction in Phe levels associated with BH₄ administration according to at least one of the criteria used: criterion A – analysis of percentage differences of the Phe values at time points T1 and T2 for Tests 1 and 2; criterion B – analysis of percentage differences of Phe values at time points T1 and T3 for Tests 1 and 2; and criterion C – analysis of percentage differences of the areas under the Phe curve for Tests 1 and 2. Responsiveness classifications were also compared according to four additional criteria: criterion D – analysis of percentage differences of the Phe values at time points T1 and T2 for Test 2; criterion E – analysis of percentage differences of Phe values at time points T1 and T3 for Test 2; criterion F – analysis of percentage difference of Phe values 8h after simple BH₄ loading used for five patients that participated in a previous study conducted by the same authors; and criterion G – analysis of percentage difference of Phe values 24 h after simple BH₄ loading, also used for the patients in the same previous study. The cut-off point for all criteria was a reduction of $\geq 30\%$.

Results: Eighteen patients (median age = 12 years) were included in the study. Ten patients had mild HPA-PAH and eight, classical HPA-PAH. Six patients were responsive according to the criteria used (Classical: 2; Mild: 4). Responsiveness was concordant for criteria A and B when compared with criterion C ($\kappa=0.557$; $p=0.017$). Of the patients whose genotype

was available (n=16), six had data about BH₄ responsiveness described in the literature, and these data were in agreement with our findings.

Conclusion: Data about responsiveness, HPA-PAH type and genotype were in agreement with those described in the literature. The difference in BH₄ responsiveness of patients according to classification criterion emphasizes the importance of a careful definition of responsiveness not based on a single criterion. The comparison of simple Phe loading and combined Phe+BH₄ loading seems to be an adequate criterion to evaluate responsiveness to BH₄ in patients with HPA-PAH and good metabolic control when following a dietary treatment.

Key words: Inborn errors of metabolism, Hyperphenylalaninemia, Phenylketonuria, Phenylalanine, Tetrahydrobiopterin.

LISTA DE FIGURAS

CORPO DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Sistema de Hidroxilação da Fenilalanina22

ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1(A). Phe variation in a patient classified as responsive to BH₄ according to collection time Points.63

Figure 1(B). Phe variation in a patient classified as non-responsive to BH₄ according to collection time Points.....63

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1(A). Representação da variação da Phe plasmática de um paciente classificado como responsivo ao BH₄, de acordo com os Pontos de coleta.....80

Figura 1(B). Representação da variação da Phe plasmática de um paciente classificado como não responsivo ao BH₄, de acordo com os Pontos de coleta.....80

LISTA DE TABELAS

CORPO DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1. Níveis alvo de Phe ao tratamento.....	25
Tabela 2. Resumo de ensaios clínicos de fases II e III do BH ₄ em pacientes com HPA-PAH.....	31

ARTIGO EM INGLÊS

Table 1. Genotype, HPA-PAH type for each patient and comparison of responsiveness in this study with findings in the literature.....	60
Table 2. BH ₄ responsiveness: Phe values and corresponding areas under the curve (n=18 patients)	61
Table 3. BH ₄ responsiveness according to criteria used for classification in this study.....	62

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1. Genótipo, Tipo de HPA-PAH dos pacientes e comparação dos resultados de responsividade obtidos no presente estudo com os descritos na literatura.....	77
Tabela 2. Responsividade ao BH ₄ : valores de Phe e áreas abaixo da curva encontradas no presente estudo (n= 18 pacientes).....	78
Tabela 3. Classificação de responsividade ao BH ₄ , de acordo com critérios avaliados no presente estudo.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ATDM-SGM/HCPA: Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre

BH₄: Tetrahidrobiopterina

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drug Administration*

FM: Fórmula Metabólica

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPA: Hiperfenilalaninemia

HPA-PAH: Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase

PAH: Fenilalanina Hidroxilase

PKU: Fenilcetonúria

Phe: Fenilalanina

Phe/Tyr: Fenilalanina/Tirosina

Tyr: Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	17
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO.....	18
2.2 HIPERFENILALANINEMIA.....	18
2.2.1 CAUSAS.....	19
2.2.2 HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE.....	19
2.2.2.1 Classificação.....	19
2.2.2.2 Aspectos genéticos e epidemiologia.....	20
2.2.2.3 Aspectos bioquímicos.....	21
2.2.2.4 Diagnóstico.....	22
2.2.2.5 Aspectos clínicos.....	23
2.2.2.6 Tratamento.....	24
2.3. TETRAHIDROBIOPTERINA (BH ₄).....	28
2.3.1 DEFINIÇÃO.....	28
2.3.2 PERFIL TERAPÊUTICO E FARMACOLOGIA DO BH ₄	29
2.3.3 BH ₄ NA HPA-PAH.....	30
2.3.3.1 Teste de sobrecarga com BH ₄	32
2.3.3.2 Definindo responsividade ao BH ₄	34
2.3.3.3 Genótipo e responsividade ao BH ₄	34
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. HIPÓTESES.....	38
5. OBJETIVOS.....	39
5.1. OBJETIVO GERAL.....	39
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
6. ARTIGO EM INGLÊS.....	47
7. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	64
8. CONCLUSÕES.....	81
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	83
ANEXO I - Ficha de Registro do Paciente.....	84
ANEXO II – Modelo de Inquérito alimentar.....	86
ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Paciente.....	87
ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes com idade inferior a 18 anos ou com necessidades especiais.....	92
ANEXO V – Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.....	97
ANEXO VI – Valores de fenilalanina plasmática dos pacientes e diferença entre pontos de coleta em mg/dL, nos testes 1 e 2.....	98
ANEXO VII – Valores de fenilalanina plasmática dos pacientes e diferença entre pontos de coleta em mg/dL de acordo com a responsividade ao BH ₄ (através dos critérios A, B e C), nos testes 1 e 2.....	99
ANEXO VIII – Valores apresentados pelos pacientes de neopterinas, biopeterinas+pterinas e % de biopeterinas de acordo com o ponto de coleta no teste 2.....	100
ANEXO IX – Gráficos de valores de fenilalanina plasmática apresentados pelos pacientes, de acordo com o ponto de coleta, nos testes 1 (sobrecarga Phe) e 2 (sobrecarga Phe+BH ₄).....	101

1 INTRODUÇÃO

A Hiperfenilalaninemia por deficiência de Fenilalanina Hidroxilase (HPA-PAH) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, causado pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) que converte a fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr) (PLANA et al, 2006). A prevalência da deficiência de PAH é de aproximadamente 1:12.000, mas é possível ver números de 1:1.000.000 na Finlândia e 1:4.200 na Turquia, mostrando assim a variação da prevalência entre diferentes populações (WALTER; LEE; BURGARD, 2006). Segundo Carvalho (2003) a prevalência da HPA-PAH Leve e Classica no Brasil é de 1:24.780 habitantes.

Ao nascimento, o paciente com HPA-PAH parece normal. Alguns sintomas podem ser vistos no início da vida dos pacientes como, irritabilidade, eczema e odor incomum. A manifestação mais importante nesses pacientes é o retardo mental (NYHAN; OZAND, 1998). O nível de Phe sanguínea está diretamente relacionado ao grau de retardo mental e lesão neurológica, que também se correlacionam com a idade que o tratamento foi iniciado (MARTINS et al., 2006).

O tratamento da HPA-PAH é preconizado em uma dieta de baixa concentração de Phe, capaz de manter baixa concentração plasmática desse aminoácido. Contudo, como a Phe é um aminoácido essencial, é necessário consumo suficiente da mesma para satisfazer as necessidades para o crescimento (NYHAN; OZAND, 1998). A dieta restrita em Phe deve ser iniciada precocemente, idealmente no primeiro mês de vida. Assim os aspectos clínicos indesejáveis da Hiperfenilalaninemia (HPA) persistente serão evitados. Os resultados são bem menos favoráveis quando o tratamento é iniciado tardiamente (LYON; KOLODNY; PASTORES, 2006). A dietoterapia é complexa, de longa duração e, como em qualquer doença crônica, depende da disposição do paciente e de seus familiares de seguir as recomendações médicas e nutricionais prescritas (NYHAN; OZAND, 1998).

Estudos têm sugerido que pacientes com HPA-PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração oral de Tetrahydrobiopeterina (BH₄) (TREFZ et al., 2009a). Habitualmente, a identificação dos pacientes com HPA-PAH sensíveis ao BH₄ realiza-se mediante o teste de sobrecarga com BH₄ (MATALON, 2005). Uma série de diferentes protocolos foi seguida utilizando a administração oral do BH₄ (MUNTAU et al, 2002; PEREZ-DUENAS et al, 2004; BLAU; ERLANDSEN,

2004; DESVIAT et al, 2004; FIEGE et al, 2005; FIEGE; BLAU, 2007; LEVY et al, 2007a; TREFZ et al, 2009a).

Com isso, esta dissertação apresenta um estudo intervencional, com o objetivo determinar, em pacientes brasileiros com HPA-PAH, a responsividade à administração de dose única de BH_4 , por meio de um protocolo que utilizou o teste de sobrecarga simples de Phe e o teste combinado de sobrecarga de Phe+ BH_4 . Esse estudo foi realizado em pacientes com HPA-PAH em tratamento no Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínica de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Archibald Garrod, em 1908, constatou que irmãos, filhos de pais normais e consangüíneos, excretavam altas quantidades de ácido homogentísico e que frequentemente uma ou mais pessoas da mesma irmandade eram afetadas, mesmo sem seus pais ou parentes apresentarem a doença. Garrod e Bateson observaram maior incidência de consanguinidade entre os pais dos indivíduos afetados e nas leis de Mendel, propuseram que esse distúrbio possui um modelo de herança autossômica recessivo. Através de suas observações, o conceito de que algumas doenças ocorrem pela deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica foi desenvolvido. Várias descobertas seguiram-se a essa e através delas foi possível estabelecer o conceito de Erro Inato do Metabolismo (EIM) (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

Os EIM têm como característica a síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, que tem sua atividade reduzida total ou parcialmente. A deficiência ou ausência da atividade dessa enzima pode resultar no bloqueio de uma via metabólica, tendo com consequência o acúmulo de seus substratos e derivados e/ou falta de seu produto, gerando muitas vezes prejuízo no desenvolvimento mental e físico dos indivíduos que são afetados (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

Quando os EIM são mencionados, o que pensamos é que são extremamente raros e que ocorrem em pequenos segmentos da população. Contudo, segundo Martins et al (2006), são descritas mais de 500 doenças classificadas como EIM, sendo essas raras isoladamente, mas com frequência global de 1: 2.500 nascidos vivos. Os mesmos ocorrem em todos os grupos étnicos e existem em todos os continente (SOLIZ; CHANDLER; VASCONCELOS, 2007). Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO

Grupo 1 – Doenças que causam intoxicação: nesse grupo estão incluídos EIM do metabolismo intermediário que podem causar intoxicação aguda ou progressiva pelo acúmulo de compostos que se formam próximos ao local do bloqueio metabólico. São exemplos desse grupo: HPA, Doença da Urina do Xarope do Bordo, Acidúrias Metilmalônica, Propiônica e Isovalérica, Galactosemia, Doença de Menkes, Doença de Wilson e as Porfirias (FERNANDES et al., 2006).

Grupo 2 – Doenças que envolvem o metabolismo energético: os EIM incluídos nesse grupo relacionam-se com sintomas devido à deficiência de produzir ou utilizar energia no fígado, cérebro, músculo e outros tecidos. Podem ser dividido ainda em defeito energético mitocondrial e citoplasmático. São exemplos desse grupo: Glicogenoses, Acidemias Láticas, Doenças Mitocondrias e Defeito de Oxidação de Ácidos Graxos (FERNANDES et al., 2006).

Grupo 3 – Doenças envolvendo acúmulo de moléculas complexas: os EIM incluídos nesse grupo têm como característica o distúrbio na síntese ou catabolismo de moléculas complexas. São exemplos desse grupo: Mucopolissacaridoses, Doenças dos Peroxissomos, Mucolipidoses e Lipofuscinoses (FERNANDES et al., 2006).

2.2 HIPERFENILALANINEMIA

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

2.2.1 CAUSAS

Segundo Smith e Lee (2000) podem ser descritas as seguintes causas para a HPA:

- Deficiência de PAH;
- Defeitos no metabolismo do BH₄;
- Transitória, muitas vezes com prematuridade;
- Alto consumo de proteína;
- Doença hepática incluindo galactosemia e tirosinemia;
- Relacionada a drogas: trimetoprim, metotrexato;
- Resposta inflamatória grave;
- Doença renal.

2.2.2 HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE

2.2.2.1 Classificação

Segundo Marsden e Levy (2006) a HPA-PAH pode ser dividida em Clássica, Leve e HPA Não – Fenilcetonúrica. Pode ser acrescentada ainda a HPA transitória (Quadro 1).

1) Clássica: nível de fenilalanina sanguínea > 1200 µmol/L (> 20mg/dL) em dieta normal.
2) Leve: nível de fenilalanina sanguínea entre 360 – 1200 µmol/L (6 – 20mg/dL) em dieta normal.
3) Hiperfenilalaninemia Não – Fenilcetonúrica: nível de fenilalanina sanguínea entre 120 – 360µmol/L (2 – 6mg/dL) em dieta normal.
4) HPA transitória: devido a prematuridade, iatrogenia, doença neonatal do fígado ou hiperfenilalaninemia materna.

Quadro 1 - Classificação HPAs
Fonte: adaptado de Marsden e Levy (2006)

Medidas de atividade da enzima PAH através de biópsia do fígado de pacientes com HPA-PAH apresentaram variações da atividade enzimática residual, variando de aproximadamente 1% da atividade enzimática normal no tipo Clássico até 35% da atividade enzimática normal na HPA Não – Fenilcetonúrica (BLAU; BONAFÉ; BLASKOVIKS, 2003).

Na Inglaterra o programa de triagem neonatal utiliza a razão Felinalanina/Tirosina (Phe/Tyr) como um marcador secundário de interpretação da classificação da HPA-PAH. Um nível de Phe de 7mg/dL ou maior e uma razão Phe/Tyr maior que 5, são considerados com tipo Clássico. Desde 1999, 27 crianças haviam sido detectadas com tipo Clássico entre o primeiro e quinto dia de vida, a média do nível de Phe nesses foi de 8,8mg/dL (5,7 – 17,1) e a média da razão Phe/Tyr foi 10,6 (3,4 – 28,1). A razão Phe/Tyr aumenta a sensibilidade para a classificação da HPA-PAH (MARSDEN; LEVY, 2006).

2.2.2.2 Aspectos genéticos e epidemiologia

A HPA-PAH foi descrita pela primeira vez por Asbjörn Fölling em 1934 ao observar dois irmãos com retardo mental. Em 1937, Penrose e Quastel denominaram essa enfermidade de Fenilcetonúria (PLANA et al., 2006). Além de ser uma das primeiras doenças neurogenéticas identificadas, foi o primeiro EIM tratado com sucesso (ZSCHOCKE; HOFFMANN, 2004).

A deficiência de PAH é uma doença transmitida com padrão autossômico recessivo, o gene da PAH está localizado no braço longo do cromossomo 12 e são descritas mais de 500 mutações diferentes (WALTER; LEE; BURGARD, 2006).

Um grande número de estudos tem demonstrado correlação entre o genótipo e a tolerância a Phe (fenótipo bioquímico). Em estudo de Ponzzone et al. (2008) com 21 pacientes com resultado positivo na triagem neonatal para HPA-PAH, os pacientes que tiveram duas mutações graves apresentaram fenótipos mais graves, os que tiveram duas mutações leves mostraram fenótipo leve, e, os que tiveram uma mutação grave e uma leve, apresentaram fenótipo moderado ou leve.

Segundo Walter, Lee e Burgard (2006) a prevalência da deficiência de PAH é de aproximadamente 1:12.000, mas é possível ver números de 1:1.000.000 na Finlândia e

1:4.200 na Turquia, mostrando assim a variação da prevalência entre diferentes populações. A doença tem como incidência média na Europa Ocidental 1:8.000, contudo há grandes diferenças entre os países. Nos Países Baixos, a mesma foi calculada em 1:18.000 recém-nascidos vivos entre os anos de 1974 e 1989 (VERKERK et al., 1994a). Em africanos 1:132.000 RN são afetados (ELSAS; ACOSTA, 2003).

No Brasil, segundo Carvalho (2003), a prevalência da HPA-PAH Leve e Clássica é de 1:24.780 habitantes, além disso, através de levantamento realizado em postos de saúde e berçários, estima-se que na cidade de São Paulo são portadores HPA-PAH: 1:12.000 a 1:15.000 RN (SCHMIDT et al., 1987). Na região sul do Brasil, segundo Jardim et al. (1996) a razão é de 1:12.500 RN vivos.

2.2.2.3 Aspectos bioquímicos

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

A Phe sofre sua metabolização principalmente no fígado, através do sistema da PAH. Para que ocorra a hidroxilação de Phe para Tyr é necessário a atividade da enzima PAH e de seu BH_4 , que é formado em três etapas a partir de guanosina trifosfato. Durante a reação de hidroxilação o BH_4 é convertido a Pterina-4a-carbinolamina que é regenerado através de duas enzimas, umas dessas a diidropteridina redutase, via q-dihidrobiopterina (Figura 1).

Dessa maneira, qualquer defeito na PAH ou na produção ou reciclagem de BH_4 , acarretará na HPA (WALTER; LEE; BURGARD, 2006).

Quando a hidroxilação para Tyr é impedida a Phe acumula e pode ser transaminada com o piruvato produzindo o metabólito fenilpiruvato, que é uma fenilcetona. Além disso, ocorre a diminuição da concentração de Tyr, que é responsável pela biossíntese de neurotransmissores como a dopamina e a norepinefrina (LEHNINGER, 2004).

A Phe, o fenilpiruvato e outros metabólitos se acumulam no sangue e tecidos dos pacientes com HPA-PAH e são excretados na urina dos mesmos em níveis elevados (CAMPBELL, 2000).

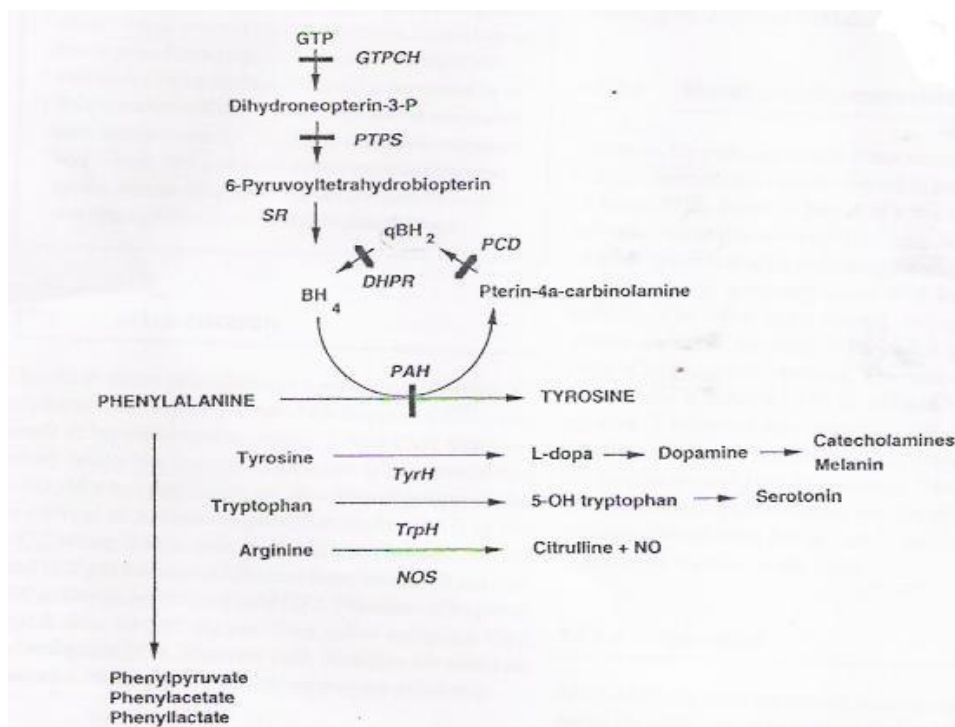


Figura 1 - Sistema de Hidroxilação da Fenilalanina . BH₂, dihidrobiopterina (quinona); BH₄, tetrahydrobiopterina; DHPR, dihidropteridina redutase; GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, guanosina trifosfato ciclohidrolase; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase; P, fosfato; PHA, fenilalanina hidroxilase; PCD, pterina – 4a - carbinolamina desidratase; PTPS, piruvil – tetrahydrobiopterina sintase; SR, sepiapterina redutase; TrpH, triptofano hidroxilase; TyrH, tirosina hidroxilase. Fonte: Walter, Lee e Burgard (2006).

2.2.2.4 Diagnóstico

Em 1963, Guthrie e Susi publicaram a descrição de um método simples para detectar a HPA-PAH em recém nascidos, o mesmo foi baseado na concentração de Phe no sangue (SCRIVER, KAUFMAN, 2001).

Ainda atualmente o diagnóstico da deficiência de PAH é baseado na detecção de uma concentração elevada de Phe plasmática. Deficiência de PAH é comumente diagnosticada através da triagem neonatal, onde uma gota de sangue é coletada do calcanhar do recém-nascido em papel filtro e é realizada a determinação da concentração de Phe. Nos recém nascidos em que o resultado de teste excede o limiar de concentração de Phe, deve ser realizada uma nova dosagem para confirmar a HPA.

Entre os métodos de triagem neonatal para detecção de HPA-PAH utilizados atualmente estão a análise fluorimétrica e a espectrometria de massa em Tandem. O teste genético molecular do gene PAH nessas crianças pode ser usado para confirmar a deficiência de PAH (MITCHELL; SCRIVER, 2010).

Em 1976, o médico Benjamin Schmit iniciou no Brasil, especificamente em São Paulo, o primeiro programa de triagem, que posteriormente tornou-se prática em outros estados (MARTINS et al., 2006). O Estatuto da Criança e do Adolescente, de 1990, determinou que hospitais e outros estabelecimentos de atenção à saúde realizem exames visando o diagnóstico e o tratamento de anormalidades no metabolismo do RN, como também a orientação dos pais (BRASIL, 2009a). Após isso, em 2001, foi criado e implantado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), onde são triadas doenças através do Teste do Pezinho, entre elas a HPA-PAH (BRASIL, 2009b).

2.2.2.5 Aspectos clínicos

Ao nascimento, o paciente com HPA-PAH parece normal. Alguns sintomas podem ser vistos no início da vida dos pacientes como, irritabilidade, eczema e odor incomum. A manifestação mais importante nesses pacientes é o retardo mental. Na ausência de tratamento o paciente pode perder 50 pontos de QI no primeiro ano de vida. O desenvolvimento somático tende a ser normal, contudo a estatura pode ser menor (NYHAN; OZAND, 1998).

Ainda podem ser descritos diminuição da pigmentação de cabelos, pele e íris, devido à reduzida síntese de melanina, crescimento reduzido, microcefalia e comprometimento neurológico. Também podem ser vistos problemas comportamentais que incluem hiperatividade, agressividade e ansiedade (WALTER; LEE; BURGARD, 2006). Estudos neuropatológicos feitos com crianças mais velhas com HPA-PAH que morreram, mostraram redução do volume do cérebro, perda de fibras de mielina e gliose na substância branca (LYON; KOLODNY; PASTORES, 2006).

O nível de Phe sanguínea está diretamente relacionado ao grau de retardo mental e lesão neurológica, que também se correlacionam com a idade que o tratamento foi iniciado (MARTINS et al., 2006). Estudo que avaliou estresse oxidativo em pacientes com HPA-PAH, demonstrou que o mesmo pode ser um mecanismo patológico do dano

tecidual na HPA-PAH e que a longa exposição a altas concentrações de Phe é determinante desse dano (SITTA et al, 2009).

Pacientes que iniciam o tratamento precoce e adequadamente podem sofrer algum déficit, especialmente relacionado à atenção e percepção. Através disso percebe-se a necessidade da continuidade do tratamento, durante a vida inteira, de maneira rigorosa (MARTINS et al., 2006).

Mesmo pacientes adultos que não seguem a dieta restrita em Phe podem apresentar sintomas como depressão, sintomas de ansiedade, agorafobia e dificuldades psicossociais. Até mesmo aumentos transitórios dos níveis de Phe sanguínea podem provocar déficit cognitivo transitório (MARTINS et al., 2006). Estudo realizado com pacientes HPA-PAH com idade entre 16 e 47 anos, mostrou que com o aumento da concentração de Phe plasmática, para valores acima de 10 – 13 mg/dL , a taxa de síntese protéica cerebral diminui em comparação a valores menores de Phe. Isso sugere que o metabolismo protéico cerebral de pacientes adultos não tratados pode ser anormal, por consequência da alta concentração de Phe plasmática (HOEKSMAN et al, 2009).

2.2.2.6 Tratamento

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

O tratamento da HPA-PAH é preconizado em uma dieta de baixa concentração de Phe, capaz de manter baixa concentração plasmática desse aminoácido. Como a Phe é um aminoácido essencial, é necessário consumo suficiente da mesma para satisfazer as necessidades para o crescimento. Por isso é necessária a freqüente avaliação quantitativa da concentração da Phe no sangue (NYHAN; OZAND, 1998).

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

A dieta baseia-se em alimentos com baixo teor de Phe, como as frutas e vegetais. Retiram-se da dieta todos os alimentos ricos em proteínas tanto de origem animal como vegetal (MARTINS et al., 2006). Alguns alimentos que possuem teor médio de Phe podem ser oferecidos na dieta conforme prescrição desse aminoácido. Entre eles estão a batata-doce, batata-inglesa, arroz e massas sem ovos e com farinha de trigo de baixo teor de proteína (MONTEIRO, CÂNDIDO, 2006). Aspartame e edulcorantes alimentares não devem ser consumidos, pois contém 50% de Phe (WALTER; LEE; BURGARD, 2006). Além disso, os pacientes recebem uma fórmula metabólica (FM) isenta de Phe (BLAU; SPRONSEN; LEVY, 2010).

A intervenção nutricional tem entre seus objetivos, o de manutenção das concentrações de Phe plasmática nos valores descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Níveis alvo de Phe ao tratamento

Idade	Phe alvo ($\mu\text{mol/L}$)	Phe alvo (mg/dL)
0 – 12 meses	120 – 360	2 – 6
1- 13 anos	120 – 360	2 – 6
> 13 anos		
- permitido	120 – 900	2 – 15
- desejável	120 – 600	2 – 10
- gestação	120 – 360	2 – 6

Fonte: Blau e Blaskovics (1996)

Mesmo sendo restrito o cardápio da criança com HPA-PAH, o controle da dieta é relativamente fácil no início da vida, contudo torna-se mais difícil a partir da idade escolar. O abandono ou relaxamento da dieta ocorre na adolescência, juntamente com as crises de desenvolvimento (MIRA; MARQUEZ, 2000).

A monitoração do tratamento restrito em Phe deve ser constante, por meio do controle do consumo dietético, desenvolvimento neurológico, físico, intelectual e comportamental. Entre os dados utilizados para monitoramento clínico estão: peso, estatura, perímetro cefálico, estado geral de saúde, desenvolvimento neurológico e psicológico, assim como o nível sanguíneo de Phe, que deve ser monitorado semanalmente nos primeiros anos de vida. Conforme o paciente envelhece esse

intervalo aumenta, chegando a ser de 2 – 3 meses em adolescentes e adultos (WALTER; LEE; BURGARD, 2006).

É de extrema importância que as famílias dos pacientes com HPA-PAH compreendam perfeitamente as exigências nutricionais, a composição dos produtos que são utilizados, as limitações de certos produtos pelo teor de nutrientes e as consequências de não se utilizar as quantidades adequadas (SMITH; LEE, 2000).

O sucesso do tratamento é diretamente relacionado com a adesão ao mesmo. A adesão é a medida do comportamento de uma pessoa que corresponde às recomendações de um profissional da saúde, seja seguindo uma dieta, tomando um medicamento ou mudando seu estilo de vida (WHO, 2003). Apesar de não haver medida padrão para estabelecer adesão, estima-se que as taxas de não adesão aos diversos tratamentos terapêuticos sejam altas (CHIMENTI, 2006). Segundo a OMS, em torno de 50% dos indivíduos portadores de doenças crônicas não seguem as recomendações recebidas (WHO, 2003).

Levantamento realizado na Europa encontrou diferenças importantes entre os centros de tratamento de HPA-PAH em relação ao manejo dietético, como diferentes níveis alvo de concentração da Phe plasmática, definição de alimentos que são liberados na dieta e quantidade de substituto protéico. Além disso, conclui sobre a necessidade de mais estudos que comparem os diferentes tratamentos dietéticos e identifiquem as abordagens que melhorem o controle de Phe plasmática e adesão à dieta (AHRING et al, 2009).

As FM são suplementadas em vitaminas e minerais, para suprir necessidades dos mesmos, normalmente encontrados nos alimentos ricos em proteínas. Contudo, mesmo com essa suplementação, alguns pacientes podem apresentar deficiências como: depleção de ferro, concentrações baixas de zinco e retinol (MARTINS et al., 2006). Além disso, são descritos baixa concentração de cálcio, osteopenia e aumento do risco de fraturas (WALTER; LEE; BURGARD, 2006), assim como deficiência de vitamina B₁₂ em adolescentes e adultos com HPA-PAH (HANLEY et al., 1996).

No Brasil, estudo com pacientes HPA-PAH encontrou níveis abaixo da normalidade de zinco eritrocitário em 37,5% e de selênio plasmático em 90,6% dos pacientes incluídos no estudo (BARRETTO et al, 2008).

Quando ocorre a ingestão insuficiente de proteínas o suprimento de aminoácidos essenciais e/ou nitrogênio torna-se inadequado para o crescimento. Se a síntese de proteína diminuir, a Phe acumula no sangue, pois não é mais usada para o crescimento e

se ocorrer o catabolismo por falta de consumo de aminoácido e/ou nitrogênio a concentração sanguínea de Phe aumenta, pois essa é componente da proteína tecidual. Se a ingestão de energia for insuficiente, acontece o catabolismo tecidual como forma de satisfazer as necessidades energéticas. Nesse caso também ocorre elevação da concentração sanguínea de Phe, pelo mesmo motivo descrito anteriormente. Por isso, para que se garanta uma taxa de crescimento normal, energia suficiente deve ser fornecida através do consumo de alimentos isentos de proteína e com baixo teor da mesma, como também devem ser atingidos valores recomendados de proteína através da utilização da FM (ELSAS; ACOSTA, 2003).

A dieta restrita em Phe mostrou ter efeito positivo para o desenvolvimento mental, mas um efeito negativo no crescimento físico (DOBBELAERE et al., 2003). É especialmente nos primeiros anos de vida que restrição do crescimento é mais evidente (VERKERK et al., 1994b). Giovannini et al. (2007) relata também a presença de sobrepeso em crianças com HPA-PAH, até mesmo nas que tem sua ingestão dietética monitorada rotineiramente.

O acompanhamento de pacientes baseia-se em uma equipe multidisciplinar composta de médico, nutricionista, psicólogo e assistente social, onde ao nutricionista cabe realizar as orientações dietéticas, além do acompanhamento e avaliação de um adequado desenvolvimento antropométrico dos pacientes (BRASIL, 2002).

Mesmo sendo o tratamento com dietas restritas em Phe bem sucedido, a pobre palatabilidade da mesma gera falta de cumprimento da dieta, principalmente por adolescentes e adultos (MITCHELL; SCRIVER, 2010). Por isso algumas terapias estão sendo investigadas, como:

- Suplementação de *Large Neutral Amino Acids*: que reduz a concentração de Phe no cérebro, mesmo com níveis plasmáticos elevados da mesma, através de competição pelo mesmo transportador (MITCHELL; SCRIVER, 2010).
- Administração da enzima fenilalanina amônia liase: a fenilalanina amônia liase é uma enzima autocatalítica que não requer um co-fator. Nessa terapia essa enzima converte a Phe em quantidades metabolicamente insignificantes de amônia e de ácido trans-cinâmico, um metabólico inofensivo que posteriormente é convertido a ácido benzóico e rapidamente excretado na urina como ácido hipurato (MACDONALD; D’CUNHA, 2007).
- Suplementação com BH_4 : a maioria dos pacientes que apresentam formas mais amenas de HPA-PAH pode ser sensível a BH_4 , o mesmo melhorando a tolerância à

Phe da dieta (MITCHELL; SCRIVER, 2010). *Sapropterin dihidrocloro* é uma forma sintética oral do BH₄.

2.3. TETRAHIDROBIOPTERINA (BH₄)

2.3.1 DEFINIÇÃO

No homem a função mais bem estabelecida do BH₄ é como cofator natural para enzimas PAH, tirosina-3-hidroxilase e triptofano-5-hidroxilase. As duas últimas são enzimas chave na biossíntese de aminas biogênicas (SCRIVER et al, 1994).

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

Como a síntese do cofator não é suficiente para controlar a Phe hepática e a homeostase dos neurotransmissores no cérebro, a regeneração do cofator BH₄ é essencial (BLAU et al, 2001).

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

2.3.2 PERFIL TERAPÊUTICO E FARMACOLOGIA DO BH₄

O *sapropterin dihydrochloride*, ingrediente farmacêutico ativo dos comprimidos do Kuvan®, é a forma sintética do BH₄. Um comprimido do Kuvan® contém 100 mg de *sapropterin dihydrochloride* (equivalente a 76,8 mg de base de sapropterin). Cada comprimido contém os seguintes ingredientes inativos: ácido ascórbico, crospovidona, fosfato de cálcio dibásico, D-manitol, riboflavina e fumarato de sódio. A dosagem do Kuvan® é baseada no peso de cada paciente em miligramas por kilogramas. Essa dosagem é normalmente ajustada de acordo com a tolerância de Phe e com os níveis de Phe sanguínea recomendados. As doses do Kuvan® podem variar de 5 a 20 mg/kg/dia (BLAU et al, 2009a; Kuvan® US, Prescribing Information, 2009).

Não são esperadas reações de hipersensibilidade ao produto, assim como não são esperados outros efeitos indesejáveis. Segundo a bula americana do Kuvan®, os efeitos adversos associados ao uso deste medicamento, em ensaios clínicos controlados por placebo nos quais os pacientes receberam 10-20 mg/kg/dia de BH₄ durante 6-10 semanas, foram semelhantes ao do grupo placebo. Esta bula também informa que não existem contra-indicações ao uso do Kuvan®, e que este medicamento deve ser usado com cautela em pacientes com doença hepática; que apresentam alergia a algum dos seus componentes; que façam uso de levodopa ou de medicamentos que afetam o metabolismo do folato ou a vasodilatação mediada por óxido nítrico. Tais situações não costumam ser encontradas em pacientes com HPA-PAH (Kuvan® US, Prescribing Information, 2008).

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

Em relação ao uso desse medicamento em populações específicas, o mesmo não deve ser utilizado durante a amamentação e, além disso, deve ser usado com cautela em mulheres grávidas, somente quando a restrição dietética de Phe não for suficientemente eficaz. Estudos clínicos envolvendo pacientes com HPA-PAH com idade acima de 65 anos ainda não foram realizados. Não se sabe se esses pacientes respondem de maneira diferente do que os pacientes mais jovens (Kuvan® EU, Prescribing Information, 2008). Da mesma forma, a segurança e eficácia do Kuvan®, em pacientes pediátricos menores de 4 anos de idade ainda não foram avaliadas em estudos clínicos. Entretanto, pacientes

pediátricos com HPA-PAH, com idades de 4 a 16 anos, foram tratados com o Kuvan®, havendo sido encontrados resultados positivos em estudos clínicos (BURTON et al. 2007; LEE et al, 2008; TREFZ et al. 2009a).

Na Europa, o Kuvan® é indicado para tratamento de HPA-PAH em pacientes adultos e pediátricos com HPA-PAH (> 4 anos de idade). O freqüente monitoramento dos níveis plasmáticos de Phe é recomendado para pacientes pediátricos com HPA-PAH, garantindo adequado controle nos metabólico (Kuvan® EU, Prescribing Information, 2008).

2.3.3 BH₄ NA HPA-PAH

Em 1999, Kure et al descreveram quatro pacientes com HPA-PAH que responderam à administração de BH₄ por via oral com uma diminuição acentuada da concentração de Phe no sangue, abrindo novas possibilidades terapêuticas para os indivíduos afetados. Desde então, numerosos estudos têm confirmado esta conclusão (BERNEGGER; BLAU, 2002; MUNTAU et al, 2002; PEREZ-DUENAS et al, 2004; MATALON et al, 2004; BLAU; ERLANDSEN, 2004; OKANO et al, 2004; HENNERMANN et al, 2005; MATALON et al, 2005; FIEGE et al, 2005; MITCHELL et al, 2005; FIEGE; BLAU, 2007; LEVY et al, 2007a; TREFZ et al, 2009a; NIELSEN; NIELSEN; GÜTTLER, 2010).

A nova formulação de BH₄ ((6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina dihidroclorido, Sapropterin dihidroclorido, Kuvan®) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) para tratamento de HPA- PAH nos EUA e Europa. A FDA e o EMA concederam ao Kuvan® (*sapropterin dihydrochloride*) o *status* de droga-órfã para o tratamento de HPA-PAH (BURNETT, 2007).

Na tabela 2 são apresentados estudos de fases II e III de pesquisa e de segurança e eficácia com BH₄ em pacientes com HPA-PAH.

Tabela 2: Resumo de ensaios clínicos de fases II e III do BH₄ em pacientes com HPA-PAH

Estudo	Pacientes (n)	Delineamento	Dose de BH ₄	Duração	Achados
Burton <i>et al.</i> , 2007	Pacientes com HPA-PAH maiores de 8 anos, Phe \geq 450 μ mol/L e não aderentes ao tratamento dietético (n=490).	FII, EA	10 mg/kg/dia	8 dias	Presença de responsividade foi considerada quando redução \geq 30% da Phe plasmática. Dos pacientes que finalizaram o estudo (485), 20% foram considerados responsivos ao BH ₄ . Os efeitos adversos foram leves e resolvidos sem complicações em sua maioria. A variabilidade encontrada na redução da Phe indicou que a resposta ao BH ₄ não pode ser prevista pelo nível de Phe basal.
Levy <i>et al.</i> , 2007b	Pacientes que foram considerados responsivos no estudo de Burton <i>et al.</i> , 2007 (n=89).	FIII, R, DC, PC	10 mg/kg/dia	6 semanas	Foram analisados dados de 88 pacientes. A média de redução de Phe plasmática foi 236(\pm 257) μ mol/L no grupo tratado e aumento de 3(\pm 240) μ mol/L no grupo controle. Após 6 semanas 18/41 pacientes tratados e 4/47 pacientes controle apresentaram redução \geq 30% na Phe plasmática, em relação ao valor basal.
Lee <i>et al.</i> , 2008	Pacientes que foram incluídos no estudo de Levy <i>et al.</i> , 2007 (n=80).	EA, EE	5-20 mg/kg/dia	22 semanas	Setenta e nove pacientes completaram o estudo. Foi observada redução dose-dependente na concentração de Phe plasmática através do uso de BH ₄ , e o mesmo foi bem tolerado em doses de 5-20 mg/kg/dia.
Trefz <i>et al.</i> , 2009a	Pacientes com idade entre 4 e 12 anos, tolerância à Phe \leq 1000mg/dia e média de Phe plasmática inferior a 480 μ mol/L por mais de 6 meses anteriores ao estudo (n=45).	FIII, R, DC, PC	20mg/kg/dia	10 semanas	Pacientes tratados apresentaram aumento na tolerância ao suplemento de Phe de em média 20,9 (\pm 15,4)mg/kg/dia, enquanto pacientes do grupo controle toleraram aumento médio de 2,9 (\pm 4,0)mg/kg/dia do suplemento de Phe.

HPA-PAH: Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase; Phe: Fenilalanina; BH₄: Tetrahidrobiopterina.

FII – fase II de pesquisa; FIII – fase III de pesquisa; EA- estudo aberto; R – randomizado; DC – duplo cego; PC – placebo controlado; EE – estudo de extensão.

Embora os estudos sobre o tratamento a longo prazo com BH₄ em pacientes HPA-PAH ainda sejam escassos, eles indicam que a terapia com BH₄ tem um fator positivo, resultando no aumento da tolerância à Phe na dieta (TREFZ; BLAU, 2003; FIEGE *et al.*, 2005; BURLINA; BLAU, 2009).

Os recentes avanços nas pesquisas sobre HPA-PAH e BH₄ sugerem que o tratamento com doses farmacológicas de BH₄ corrige as anormalidades bioquímicas na maioria dos pacientes com fenótipos leves de HPA e também em alguns pacientes com HPA-PAH Clássica (MUNTAU; GERSTING, 2006).

Estudo realizado na Europa por Blau *et al.* (2009b) que abrangeu 93 centros de HPA-PAH de 19 países da Europa, verificou que o teste de sobrecarga com BH₄ é realizado por aproximadamente 54% dos centros respondedores, como prática rotineira,

dos quais 61% aplicaram o teste com uma dose única de BH₄ (20mg/kg durante 24h). Em relação à definição de responsividade ao BH₄, 34% responderam que a mesma define-se pela redução de 30% nos níveis de Phe após 24h, seguidas de 17% e 12% na redução de 30% nos níveis de Phe após qualquer ponto de hora e 8h após a ingestão do medicamento, respectivamente.

Pela dieta restrita ser incômoda para muitos pacientes com HPA-PAH e suas famílias, o tratamento com BH₄ pode melhorar a adesão, especialmente em adolescentes e adultos jovens (BURLINA; BLAU, 2009). Tratamento com BH₄ pode além de auxiliar na melhora dos níveis de Phe, aliviar o manejo da dieta e assim, melhorar o seguimento da mesma, nos pacientes que são BH₄-responsivos (BLAU et al, 2009a).

2.3.3.1 Teste de sobrecarga com BH₄

Habitualmente, a identificação dos pacientes com HPA-PAH sensíveis ao BH₄ realiza-se mediante o teste de sobrecarga com BH₄ (MATALON, 2005). Uma série de diferentes protocolos foi seguida utilizando a administração oral do BH₄. Esses estudos incluem a utilização de uma dieta normal ou de uma dieta restrita em Phe, diferentes doses de BH₄, diferentes períodos de tempo para avaliar os efeitos do BH₄ na concentração sanguínea de Phe (um teste de 24h e/ou 48h pode detectar responsivos lentos mais eficientemente do que um teste de 8h), tratamento de administração de dose única ou doses múltiplas de BH₄, e mensuração dos níveis sanguíneos de Phe ou a meia-vida da redução da Phe no sangue (BLAU et al, 2009a).

O protocolo aprovado pela FDA para terapia inicial com BH₄ consiste em mensuração de Phe no sangue, seguida de uma dose diária inicial de 10mg/kg/dia de BH₄ durante uma semana. Após o término dessa semana, a mensuração de Phe no sangue é repetida. Se a redução clinicamente significativa de Phe não é observada, a dose de BH₄ pode ser aumentada para 20mg/kg/dia e os níveis sanguíneos de Phe são mensurados 1-2 semanas após esse tratamento que tem um período máximo de 1 mês. Após esse período, se o paciente não obteve redução clinicamente significativa de Phe, o tratamento é interrompido e o paciente é detectado como não-responsivo. Mas, se o paciente apresentar redução nos níveis de Phe, ele é detectado como responsivo e assim, a dose de BH₄ é ajustada (alvo: 5-20mg/kg/dia), de acordo com os níveis de Phe no

sangue, que devem ser monitorados frequentemente. Nesse protocolo não há um ponto de corte para a redução de Phe e a restrição dietética de Phe é mantida. Contudo, esse método pode gerar resultados falsos positivos e falsos negativos se os pacientes ajustarem suas dietas durante o protocolo (BLAU et al, 2009a).

Alguns estudos utilizam sobrecarga combinada de Phe e BH₄ (PÉREZ-DUEÑAS et al, 2004; MITCHELL et al, 2005; VÁZQUEZ et al, 2006). Tal protocolo é utilizado em pacientes com bom controle metabólico ou em pacientes que estão em dieta restrita. Os procedimentos desse protocolo são semelhantes aos descritos para monoterapia com BH₄, com exceção da administração de 100mg/kg de Phe 3 horas antes do BH₄. Em condições ideais é necessário realizar uma sobrecarga combinada Phe+BH₄ e uma sobrecarga simples de Phe (BLAU; FIEGE; TREFZ, 2004; BLAU; ERLANDSEN, 2004).

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

2.3.3.2 Definindo responsividade ao BH₄

Embora não haja ainda uma definição padrão-ouro e nem recomendações claras de como interpretar os dados da responsividade ao BH₄ (BLAU et al., 2009b), a maioria dos estudos considera como responsivo aquele indivíduo que responde a administração oral de BH₄ (10-20mg/kg) com redução $\geq 30\%$ de seus níveis sanguíneos de Phe nos pontos 8h e 24h após a ingestão do medicamento. (BLAU; ERLANDSEN, 2004; ZURFLUH et al., 2008; BLAU et al., 2009b). Essa redução de pelo menos 30% nos níveis de Phe no sangue é frequentemente considerada para representar a resposta clinicamente significativa do tratamento; no entanto, é importante notar que a determinação desse limiar é arbitrária e alguns autores consideram uma redução menor como sendo clinicamente significativa (FIEGE; BLAU, 2007; BLAU et al, 2009b).

2.3.3.3 Genótipo e responsividade ao BH₄

A genotipagem representa outro meio de identificação de potenciais pacientes sensíveis ao tratamento com BH₄, e uma série de mutações específicas no gene da PAH foram associadas com responsividade ao BH₄. A lista completa de mutações está disponível no BIOPKU *database* (<http://www.biopku.org/>) (BLAU; ERLANDSEN, 2004).

Algumas mutações associadas à responsividade ao BH₄ foram expressas em sistema de células eucarióticas ou *Escherichia Coli* e as mesmas apresentaram uma substancial atividade residual. Cerca de 62% de todas as mutações estão localizadas no domínio catalítico da PAH, 21% no domínio regulatório, 5% estão localizadas no domínio de tetramerização e 19% são intrônicas (ERLANDSEN, 2004).

Duas mutações graves encontradas nos alelos da PAH estão provavelmente associadas com a HPA-PAH Clássica e, portanto, por haver pouca ou nenhuma atividade enzimática da PAH, esses pacientes são detectados como não responsivos ao BH₄ (BLAU; ERLANDSEN, 2004). Entretanto, alguns pacientes com HPA-PAH Clássica têm sido relatados com responsivos ao BH₄, todas elas com pelo menos um alelo parcialmente ativo (MATALON et al, 2004). Da mesma forma, pacientes com duas mutações leves que demonstram atividade residual relativamente elevada,

provavelmente estão associadas à HPA de formas mais leves e possivelmente são sensíveis ao BH₄. A combinação de uma mutação leve com uma mutação grave será questionável em relação à responsividade ao BH₄, variando conforme a combinação do tipo de mutação presente no genótipo. Assim, a maioria dos genótipos encontrados atualmente consiste em uma mutação leve e uma mutação grave, ou duas mutações relativamente leves (com atividade enzimática elevada) (BLAU; ERLANDSEN, 2004). A responsividade ao BH₄ não foi encontrada naqueles pacientes com duas mutações nulas tanto no estado homoalélico como no heteroalélico. Isso sugere que ter alguma atividade residual na PAH é um pré-requisito para a responsividade ao BH₄ e que mutações severas causando graves distorções na expressão da proteína, podem levar a severa redução ou até mesmo indetectável atividade residual da PAH, não sendo, assim, suscetíveis de serem estimulados pelo BH₄ (ERLANDSEN, 2006).

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

Apesar do presente conhecimento sobre propriedades regulatórias do cofator BH₄ e o substrato Phe, os mecanismos moleculares responsáveis pela responsividade do BH₄ em pacientes HPA-PAH ainda são pouco conhecidas, porém, inúmeras possibilidades estão sendo sugeridas, tais como: (a) Km mutante da PAH com afinidade de ligação reduzida para BH₄; (b) efeito estabilizador do BH₄ na PAH (atividade chaperona); (c) alterações na regulação da biosíntese do BH₄; (d) indução na expressão da PAH pelo BH₄; e (e) estabilização do RNAm da PAH (ERLANDSEN, 2006; ZURFLUH et al, 2008). Acredita-se que os mecanismos responsáveis pela responsividade ao BH₄ em pacientes com HPA-PAH são multifatoriais e certamente mais estudos devem ser realizados para comprovar esses achados (BLAU; ERLANDSEN, 2004; BULINA; BLAU, 2009b).

O uso da genotipagem para prever a responsividade ao BH₄ é complicado pelo fato da maioria dos pacientes serem heterozigotos compostos (TREFZ et al, 2009b). Embora a genotipagem possa ser útil de alguma forma em prever a elevada ou reduzida probabilidade na responsividade ao BH₄ (ZURFLUH et al. 2008), essa

abordagem requer mais investigações antes de ser utilizada como teste diagnóstico definitivo (BLAU, 2009a).

3. JUSTIFICATIVA

HPA-PAH é uma doença relevante para o Sistema Único de Saúde, tanto por ser uma das condições incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal quanto pelo fato das fórmulas metabólicas necessárias para o seu tratamento fazerem parte da lista de componentes especializados de assistência farmacêutica.

O início precoce, bem como o seguimento do tratamento dietético com baixo teor de Phe e, quando necessário, o uso da FM, normalizam os níveis plasmáticos de Phe e dessa forma previnem as manifestações clínicas (MARTINS et al., 2006).

Contudo, a dietoterapia é complexa, de longa duração e, como qualquer doença crônica, depende da disponibilidade do paciente e de seus familiares em seguir as recomendações médicas e nutricionais prescritas (NYHAN; OZAND, 1998). A diferença dos hábitos normais e culturais da alimentação, além das características organolépticas desfavoráveis dos alimentos artificiais, podem levar a um isolamento social (PONZONE et al. 2010). Adesão ao tratamento é insatisfatória em vários casos, resultando em controle metabólico inadequado e risco de complicações, principalmente entre adolescentes e adultos (WALTER; WHITE, 2004).

Estudos já realizados têm sugerido que pacientes com deficiência de PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração de BH₄ (BLAU et al, 2009a). Essa alternativa de terapia pode ajudar a melhorar, futuramente, o tratamento dos pacientes com deficiência de PAH, aumentando, conseqüentemente, a adesão ao tratamento (BURLINA; BLAU, 2009).

O ATDM-SGM/HCPA iniciou suas atividades em 1982 e, desde então, presta assistência médica e nutricional a pacientes com erros inatos do metabolismo, sendo um dos centros de referência para tratamento de HPA-PAH do estado do Rio Grande do Sul.

Estudos internacionais já realizados têm sugerido que pacientes com deficiência de PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração do BH₄, contudo, esses estudos utilizam diferentes protocolos para avaliar a responsividade ao mesmo.

Poucos trabalhos têm sido realizados nessa linha de pesquisa em nível nacional. Por isso, acredita-se ser de grande relevância avaliar a responsividade ao BH₄ e identificar potenciais pacientes respondedores em nosso meio.

4. HIPÓTESES

1) Protocolo incluindo teste de sobrecarga simples de Phe e teste de sobrecarga combinada de Phe+BH₄ é capaz de identificar pacientes com HPA-PAH responsivos ao BH₄;

2) A análise da diferença entre os valores de Phe apresentados 11 e 27 horas após a sobrecarga de L-Phe nos testes de sobrecarga simples de Phe e de sobrecarga combinada de Phe+BH₄, constitui-se em critério adequados para avaliação de responsividade ao BH₄;

3) A análise da diferença entre os valores da área sobre a curva do teste de sobrecarga simples de Phe e combinada de Phe+BH₄, constitui-se em critério adequado para avaliação de responsividade ao BH₄;

4) A prevalência de responsividade ao BH₄ é maior em indivíduos com HPA-PAH Leve;

5) A genotipagem pode ser uma ferramenta útil para verificar a probabilidade de responsividade ao BH₄.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Identificar, por meio de um protocolo envolvendo o teste de sobrecarga simples de Phe e o teste combinado de sobrecarga de Phe+BH₄, pacientes com HPA-PAH e bom controle metabólico que são responsivos à administração de dose única de BH₄ por via oral.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar diferentes critérios de classificação de responsividade ao BH₄;
- 2) Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com o tipo de HPA-PAH apresentada pelo paciente;
- 3) Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com as mutações presentes no gene *PAH*.

REFERÊNCIAS

AHRING, K. et al. Dietary management practices in phenylketonuria across European centres. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 231 – 236, 2009.

BARRETTO, J. R. et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. **Nutrition Research**, v. 28, p. 208 – 211, 2008.

BERNEGGER, C; BLAU, N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 77, n. 4, p. 304 – 313, 2002.

BLAU, N.; BLASKOVICS, M. Hyperphenylalaninemia. In: BLAU, N.; DURAN, M.; BLASKOVICS, M. **Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases**. London: Chapman & Hall, p. 65-78,1996.

BLAU, N. et al. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: SCRIVER, C.R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

BLAU, N.; BONAFÉ, L.; BLASKOVICS, M. E. Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In: BLAU, N.; DURAN, M.; BLASKOVICS M. E.; GIBSON, K. M. **Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases**, 2º ed., Germany, p. 91 – 106, 2003.

BLAU, N.; ERLANDSEN, H. The Metabolic and Molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.

BLAU, N.; FIEGE, B.; TREFZ, F. K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis, treatment, genetics, and international BIOPKU database In: Blau N, Thfny B, editors. **Pterins, Folates and Neurotransmitters in Molecular Medicine**. Heilbronn,Germany: SPS Verlagsgesellschaft mbH; . p. 132–42, 2004.

BLAU, N. et al. Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 96, n. 4, p. 158 – 163, 2009a.

BLAU, N. et al. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. **Molecular Genetics and Metabolism**, 2009b.

BLAU, N; SPRONSEN, F.J.V.; LEVY, H.L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v. 376, p. 1417-1427, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal**, Brasília – DF, 2002.

BRASIL, **Lei Federal 8069 de 13 de julho de 1990**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.planalto.gov.br/ccivil/LEIS/L8069.htm>. Arquivo capturado em 15 de dezembro de 2009a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS nº 822/GM de 06 de julho de 2001**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>. Arquivo capturado em 15 de dezembro de 2009b.

BURLINA, A.; BLAU, N. Effect of BH₄ supplementation on phenylalanine tolerance. **Journal of inherited metabolic disease**, v.32, p.40-45, 2009.

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

BURTON, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 30, p. 700 – 707, 2007.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3º ed., Porto Alegre: ArtMed, 2000.

CARVALHO, T, M. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). **Revista Médica de Minas Gerais**, p. S109 S135, 2003.

CHIMENTI, B. M. et al. Estudo sobre adesão: fatores intervenientes na dieta hipocalórica de coronariopatas internados em um hospital público de São Paulo. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 21, n. 3, p. 204-10, 2006

DESVIAT, L. R., et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH₄ loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 83, p. 157 – 162, 2004.

DOBBELAERE, D. et al. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 26, n. 1, p. 1 – 11, 2003.

ELSAS, L. J.; ACOSTA, P. B. Suporte Nutricional nas Doenças Metabólicas Hereditárias. In: SHILS, M. E. et al. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**, 9º ed., São Paulo: Manole, p. 1069 – 1127, 2003.

ERLANDSEN, H. et al. Correction on kinetic and stability defects of tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v.101. p. 16903-16908, 2004.

ERLANDSEN H. et al. Molecular mechanism of tetrahydrobiopterin-responsiveness. In:BLAU, N. **PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin**, 6° ed., SPS Publications, Heilbronn, p. 377 - 399, 2006.

FERNANDES, J. et al. **Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and treatment**, 4th ed. Heidelberg: Springer, 2006.

FIEGE, B. et al. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, supl. 1, S91-S95, 2005.

FIEGE, B.; BLAU, N. Assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. **Journal of Pediatrics**, n.150, p. 627-30, 2007.

GIOVANNINI, M. et al. Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 30, n. 2, p. 145 – 152, 2007.

HANLEY, W. B. et al. Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria. **European Journal of Pediatric Surgery**, n. 155, sup. 1; p. 148 – 152, 1996.

HENNERMANN, J. B. et al. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.86, supl. 1, p. S86-90, 2005.

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

HOEKSMA, M. et al. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 96, n. 4, p. 177 – 182, 2009

JARDIM, L. B. et al. Maternal hyperphenylalaninaemia as a cause of microcephaly and mental retardation. **Acta Paediatrica**, v. 85, p. 943 – 946, 1996

KURE, S. et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency **J Pediatr**, v.135, p. 375-378, 1999.

Kuvan® US Prescribing Information. Disponível em www.kuvan.com (acesso em 30 de novembro de 2009)

Kuvan® EU Prescribing Information. Disponível em www.ema.europa.eu (acesso em 30 de novembro de 2009).

LEE, P. et al. Safety and Efficacy of 22 Weeks of Treatment With Sapropterin Dihydrochloride in Patients With Phenylketonuria. **American Journal of Medical Genetics**, part A, p. 2851-2859,2008.

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**, 4° ed., New York, p. 656 – 689, 2004.

LEVY, H.L. et al. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in phenylketonuria and its use in treatment. **Genetics and Metabolism**, v.92, p. 287–291, 2007a.

LEVY, H.L. et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. **The Lancet**, v.370, p. 504-10, 2007b.

LINDNER, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 73, n. 1, p. 104 – 106, 2001.

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

MACDONALD, M.J.; D’CUNHA, G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. **Biochem Cell Biol**, v. 85, p. 273-282, 2007.

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

MARTÍNEZ-PARDO, M.; GÁRCIA MUOZ, M. Hiperfenilalaninemia por déficit de cofator BH4. In: SANJURJO, P.; BALDELLON, A. **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias**. 2th ed, Madrid, p.319-27, 2006.

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

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

MATALON, R. et al. Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrabiopterin. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, supl. 1, S17-S21, 2005.

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

MITCHELL, J.J. et al. Tetrahydrobiopterin Responsive Phenylketonuria: The New South Wales Experience. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, p. S81 – S85, 2005.

MITCHELL, J. J.; SCRIVER, C. R. **Phenylalanine Hydroxylase Deficiency**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.geneclinics.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888891&key=PFKG7IJBStkgL&gry=&fcn=y&fw=-Fi5&filename=/profiles/pku/index.html>. Última atualização em 04 de maio de 2010.

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

MUNTAU, A.C. et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. **The New England Journal of Medicine**, n. 347, p. 2122-32, 2002.

MUNTAU, A.C.; GERSTING, S.W. Treatment of patients with tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. In: BLAU, N.; **PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin**, p. 401 - 433, 2006

NIELSEN, J.B.; NIELSEN, K.E.; GÜTTLER, F. Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 33, p. 9 – 16, 2010.

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

OKANO, Y. et al. In vivo Studies of phenylalanine hydroxylase by pheylalanine breath test: diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, **Pediatric Research**, Estados Unidos, v.56, n.5, p. 35- 41, 2004.

PEREZ-DUENAS, B. et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.1083-90, 2004.

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

PLASENCIA, L. M. M.; TORRES, A. J. P.; TAMAYO, L. C. **Impacto social del tratamiento integral de la Fenilcetonuria en Cuba**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.monografias.com/trabajos25/fenilcetonuria/fenilcetonuria.shtml>. Arquivo capturado em 16 de dezembro de 2009.

PONZONE, A. et al. Impact of Neonatal Protein Metabolism and Nutrition on Screening for Phenylketonuria. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, V. 46, n. 5, p. 561 – 569, 2008.

PONZONE, A. et al. Unresponsiveness to tetrahydrobiopterin of phenylalanine hydroxylase deficiency. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 59, p. 645-652, 2010.

SCRIVER, C. R. et al. The hyperphenylalaninemias of man and mouse. **Annual Review of Genetics**, v. 28, p. 141 – 165, 1994.

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

SCHMIDT, B. J. et al. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. **Pediatria al dia**, v. 3, p. 257 – 260, 1987.

SITTA, A. et al. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n.3, p. 243 – 247, 2009.

SMITH, I.; LEE, P. The Hyperphenylalaninaemias. In: FERNANDES, J; SAUDUBRAY, M.; VAN DEN BERGUE, G. **Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment**, 3^o ed., Germany, p. 171 – 184, 2000.

SOLIZ, A.; CHANDLER, B. D.; VASCONCELOS, E. The Enigmatic Baby: A Practical Approach to the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. **International Pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 192 – 196, 2007.

THONY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration, and functions. **Biochemical Journal**, n.347, p.1-26, 2000.

TREFZ, F.K.; BLAU, N. Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria. **Pediatrics**, v, 112, p. 1566 – 1569, 2003.

TREFZ, F.K. et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. 700 – 707, 2009a.

TREFZ, F.K. et al. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**,v. 32, n. 1, p. 22 – 26, 2009b.

VÁZQUEZ, A. B. et al. Tratamiento de La hiperfenilalaninemia por déficit de fenilalanina hidroxilasa con tetrahydrobiopeterina. ? Cuándo y cómo? **Anales de Pediatría (Barcelona)**, v. 64, n. 2, p 146 – 152, 2006.

VERKERK, P. H. et al. Predictors of mean phenylalanine levels during the first years of life in patients with phenylketonuria who where treated early. Dutch National PKU Steering Committee. **Acta Paediatrica**, v. 83, sup 407, p. 70 – 72, 1994a.

VERKERK, P. H. et al. Impaired prenatal and postnatal growth in Dutch patients with phenylketonuria. The National PKU Steering Committee. **Archives of Disease in Childhood**, v. 71, n. 2, p. 114 – 118, 1994b.

WALTER, J. H.; LEE, P. J.; BURGARD, P. Hyperphenylalaninaemia. In: FERNANDES, J. et al. **Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment**, 4^o ed., Germany, p. 222- 232, 2006.

WALTER, J. H.; WHITE, F. J. Blood phenylalanine control in adolescents with Phenylketonuria. **International Journal of Adolescent Medicine and Health**. v. 16, p. 41 – 45, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATIO. **Adherence to Long Term Therapies. Evidence for Action.**; Switzerland, 2003, disponível on-line: http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/lttherapies/en/.

ZSCHOCKE, J.; HOFFMANN, G. **Vademecum Metabolicum Manual of Metabolic Paediatrics**, Germany, 2° ed., 2004.

ZURFLUH, M.R. et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, **Human Mutation**, v. 29, n.1, p.167-175, 2008.

6. ARTIGO EM INGLÊS

Artigo submetido à revista Molecular Genetics and Metabolism

Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH₄) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency

Tatiéle Nalin^a, Ingrid Dalira Schweigert Perry^b, Angela Sitta^c, Carmen Regla Vargas^{d,e}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{d,f}, Roberto Giugliani^{a,d,g,h}, Nenad Blau^{i,j}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{a,d,g}

^a Post-Graduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^b Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Food and Nutrition Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^c Post-Graduation Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^d Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^e School of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^f Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^g Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^h INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil.

ⁱ Division of Clinical Chemistry, University Children's Hospital, Zürich, Switzerland.

^j Zürich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), Zürich, Switzerland.

Address correspondence to:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone + 55 51 3359-8011

E-mail: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Introduction: Recent studies showed that phenylalanine (Phe) plasma concentrations may decrease in some patients with hyperphenylalaninemia (HPA) due to phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, after the administration of tetrahydrobiopterin (BH₄).

Objective: To determine responsiveness to a single dose of BH₄ administered according to an innovative protocol using a combined Phe and BH₄ loading test in Brazilian phenylketonuria (PKU) patients.

Methods: Patient age was ≥ 4 years, and median Phe plasma concentration ≤ 600 $\mu\text{mol/L}$ when following dietary restrictions. Participants received a simple Phe loading test using 100 mg/kg L-Phe (Test 1) and a combined Phe+BH₄ loading test using 100 mg/kg L-Phe and 20 mg/kg/BH₄ (Test 2). Blood samples were collected at baseline and 3, 11 and 27 h after Phe ingestion (T0, T1, T2 and T3). Responsiveness was defined as: criterion A: plasma Phe reduction of $\geq 30\%$ at T1 and T2 for Tests 1 and 2; criterion B: plasma Phe reduction of $\geq 30\%$ at T1 and T3 for Tests 1 and 2; and criterion C: at least 30% difference of the areas under the Phe curve for Tests 1 and 2.

Results: Eighteen patients (median age 12 yrs; 8 classical PKU; 10 mild PKU) participated in the study. Six patients (2 classical PKU; 4 mild PKU) were classified as responsive according to at least one of the criteria. Responsiveness was concordant when criterias A and B we compared with criterion C ($\kappa=0.557$; $p=0.017$). Of the patients whose genotype was available ($n=16$), six had BH₄-responsive mutations described in the literature, data in agreement with our findings.

Conclusion: The comparison of simple Phe loading and combined Phe+BH₄ loading seems to be an optimal method to evaluate responsiveness to BH₄ in patients with good metabolic control.

Key words: Inborn errors of metabolism, Hyperphenylalaninemia, Phenylketonuria, Phenylalanine, Tetrahydrobiopterin.

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU) or hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency is an inborn error of amino acid metabolism characterized by the persistent increase of phenylalanine (Phe) plasma concentration. PAH converts Phe into tyrosine (Tyr), in the presence of its cofactor tetrahydrobiopterin (BH₄) [1].

The standard PKU treatment is based on a Phe-restricted diet and ingestion of a Phe-free amino acid-rich metabolic formula that supplies the daily protein requirements of a patient [1, 2]. Because of the toxic effects of high Phe levels, this condition, if left untreated, may lead to neurological impairment, mental retardation and behavioral disorders [3, 4].

The necessary dietary restriction and the associated difficulty to adhere to the treatment [4-6], have motivated the search for new PKU management strategies [7]. Since the publication of the study by Kure et al. [8], who described the first case of patients with PKU whose Phe levels decreased after BH₄ administration, several studies have been conducted to confirm the efficacy and safety of this medication, which has already been approved by the FDA and the EMEA. Patients are usually evaluated to check their responsiveness and, in case results suggest that they are responsive, that is, that Phe levels will decrease after BH₄ administration, BH₄ supplementation is initiated. Studies, however, have used different protocols to evaluate responsiveness: BH₄ doses are different and may range from 10 to 20 mg/kg/day in a single dose or distributed along the day; test evaluation times range from some hours to weeks or even months; the cut-off point of Phe variation defined to determine responsiveness also varies, and the criterion most frequently adopted is a decrease of 30% in Phe levels 24 hours after BH₄ administration. In addition, different diets are used during tests: normal diets, Phe-restricted diet, or even a Phe-loading diet using, for example, powder milk or L-Phe [7, 9-22].

This study describes responsiveness to a single dose of BH₄ in a sample of Brazilian patients with PKU and good metabolic control. For that purpose, an innovative protocol with a single Phe plus a combined Phe and BH₄ loading tests was used.

2. Material and Methods

This study included patients with PKU seen in the Outpatient Metabolic Disorder Treatment Clinic of the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA), Porto Alegre, Brazil. At the time this study was conducted, 68 patients with different phenotypes were followed up in the ATDM-SGM/HCPA and 64 of them underwent dietary treatment.

This study was approved by the Ethics in Research Committee of HCPA, and all patients or their guardians signed a written informed consent term.

2.1. Patients

Patients included in the study were ≥ 4 years of age; their median Phe plasma level was ≥ 600 $\mu\text{mol/L}$, and all underwent dietary treatment in the 12 months before the start of the study. The Phe cut-off point adopted ensured that patients with the mild form of the disease, good metabolic control, or both were also included in the test. A previous trial conducted by our study team [23] adopted a different protocol and different inclusion criteria to evaluate responsiveness to BH_4 , and most patients had the classical form of the disease and inadequate metabolic control, as their Phe plasma levels had to be ≥ 360 $\mu\text{mol/L}$ in all measurements during the previous 12 months.

Exclusion criteria were: pregnancy, clinical signs suggestive of liver disease; use of levodopa; allergy to any component of BH_4 ; median Phe level > 600 $\mu\text{mol/L}$ in the measurements made in the 12 months before inclusion in the study; irregular follow-up in the ATDM-SGM/HCPA in the same 12 months; and probable non-compliance with study procedures according to evaluations made by the authors.

PKU types were defined according to Nalin et al. [6], and the patients were classified as having classical PKU or mild PKU. Patients with Phe levels ≤ 360 $\mu\text{mol/L}$ on a normal diet were not included in the study ($n = 4$).

2.2. Single Phe and combined Phe+ BH_4 loading tests

The patients were asked to come to two visits in HCPA and to stay under evaluation for 27 hours each time; the two visits were made at a one-week interval.

Simple Phe loading (Test 1)

In the first week, after overnight fasting, blood was collected to measure Phe and Tyr plasma concentrations (T0). After that, patients ingested 100 mg/kg of L-Phe and resumed their usual diet (Phe-restricted diet and supplementation with Phe-free metabolic formula). Blood for Phe and Tyr was then collected at 3 (T1), 11 (T2) and 27 hours (T3) after Phe loading.

Combined Phe and BH₄ loading (Test 2)

In the second week, evaluation was conducted using the protocol described by Blau et al.[24], with a modification, as Phe and Tyr levels were not analyzed 7 hours after Phe loading. The initial phases of Test 2 (collection at T0, Phe loading, food ingestion, and blood collection at T1) were similar to those described for Test 1. In addition, immediately after collection at T1 bloods sample, a single dose of 20 mg/kg BH₄ (sapropterin dihydrochloride, KUVAN®, Merck Serono) was administered orally and samples were collected at 8 hours (T2) and 24 hours (T3) after BH₄ ingestion. Time points T0 and T1 of Tests 1 and 2 were, therefore, equivalent to each other, whereas T2 and T3 were differed in that BH₄ administration was included in Test 2.

L-Phe and BH₄ were dissolved in orange juice before administration. Patients were told to fast for at least one hour before all blood collections.

Phe and Tyr plasma concentrations were measured using tandem mass spectrometry (MS/MS) in the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of SGM/HCPA, as described by Rashed et al. [25]. All measurements were made in duplicate, and the mean of the two measurements was calculated. In Test 2 samples, the levels of BH₄ (total biopterins) were also measured, according to the method of Opladen et al [26].

2.3. Responsiveness to BH₄

Patients were defined as responsive to BH₄ if they met at least one of the criteria listed below:

Criterion A: this criterion used Phe values at T1 [3 hours after Phe loading in Tests 1 (Phe Test1T1) and 2 (Phe Test2T1)] and at T2 [11 hours after Phe loading in Tests 1 (Phe Test1T2) and 2 (Phe Test2T2) and 8 hours after BH₄ administration in Test 2]. The following equation was used for calculations: $[(\text{Phe Test2T2} - \text{Phe Test2T1}) / \text{Phe Test2T1}] \times 100] - [(\text{Phe Test1T2} - \text{Phe Test1T1}) / \text{Phe Test1T1}] \times 100$.

Individuals were responsive if the values found corresponded to a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels in Test 2.

Criterion B: this criterion used Phe values at T1 and T3 [27 hours after Phe loading in Tests 1 (Phe Test1T3) and 2 (Phe Test2T3) and 24 hours after BH₄ administration in Test 2]. The following equation was used for calculations: $[(\text{Phe Test2T3} - \text{Phe Test2T1}) / \text{Phe Test2T1}] \times 100 - [(\text{Phe Test1T3} - \text{Phe Test1T1}) / \text{Phe Test1T1}] \times 100$. Individuals were responsive if the values found corresponded to a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels in Test 2.

Criterion C: this criterion used the percentage difference of the value found for the area under the Phe curve in Tests 1 (AUC1) and 2 (AUC2). The following equation was used for calculations: $[(\text{AUC2} - \text{AUC1}) / \text{AUC1}] \times 100$. Individuals were responsive if the difference was $\geq 30\%$, as long as the Test 1 area was greater than the Test 2 area.

To compare the classification of responsiveness, four additional criteria were used, as described below:

Criterion D: only the Phe values at T1 and T2 of Test 2 were used. The following equation was used for calculations: $[(\text{Phe Test2T2} - \text{Phe Test2T1}) / \text{Phe Test2T1}] \times 100$. Individuals were responsive if the values found corresponded to a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels in time point 2.

Criterion E: only the Phe values at T1 and 3 of Test 2 were used. The following equation was used for calculations: $[(\text{Phe Test2T3} - \text{Phe Test2T1}) / \text{Phe Test2T1}] \times 100$. Individuals were responsive if the values found corresponded to a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels in time point 3.

Criterion F: this criterion was used by the authors in a previous study [23] to evaluate the responsiveness of 5 patients also included in this study, and was defined as a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels 8 hours after simple BH₄ loading.

Criterion G: this criterion was used by the authors in a previous study [23] to evaluate the responsiveness of 5 patients also included in this study, and was defined as a reduction of $\geq 30\%$ in Phe levels 24 hours after simple BH₄ loading.

2.4. Dietary intake of Phe

Phe intake was evaluated using food recalls on the day before and on the first day of Tests 1 and 2, which totaled, therefore, two recalls for each Test. Dietary Phe intake was calculated using the nutrition-support software NutriBase (NB7), Clinical

Edition. All patients received instructions to keep the same dietary Phe prescription that they followed before the beginning of the study.

2.5. Genotype

Genotypes of patients 1 to 17 (Table 1) were established previously and retrieved from their medical charts. Patient 18 was the only patient who had not been genotyped at the time of the study.

2.6. Statistical analysis

The Statistical Package for Social Sciences 18.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL) was used for statistical analysis. Data were described using absolute and relative frequencies. The Stata program was used to calculate the area under the Phe curve. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation or median and interquartile range. The Student *t* test was used to compare Phe intake between the different food recalls, the area under the Phe curve, and the difference in Phe levels between the collection time points for responsive patients versus non-responsive patients. Phe plasma concentrations and Phe:Tyr ratios were analyzed using Generalized Estimating Equations and Bonferroni correction. The comparison between BH₄ responsiveness criteria was made using kappa statistics.

The level of significance was set at 5%.

3. Results

Eighteen patients (11 girls and 5 boys) from 16 nonrelated families were included in the study. Parental consanguinity was found in 1/16 (6.25%) family. Median patient age was 12 (interquartile range: 10-16.5) years; minimum age was 6, and maximum, 31 years.

Mean Phe levels in Tests 1 and 2 at T0 were 255 ± 138 and 333 ± 173 $\mu\text{mol/L}$ ($n= 18$; $p= 0.342$), and at T1, 730 ± 221 and 790 ± 310 ($n= 18$; $p= 1.0$). In both Tests 1 and 2 there were significant increases in Phe levels between T0 and T1 ($p<0.01$). There were no statistically significant differences in Phe:Tyr ratios when the same time points were compared between Tests 1 and 2.

BH₄ plasma levels in Test 2 increased after L-Phe administration (T1) and BH₄ loading (T2) (data not reported).

3.1. Response to BH₄

Six patients (33.3%) were responsive, four according to criterion A, three according to criterion B, and four according to criterion C (Table 2). The comparison of BH₄-responsiveness according to criterion used is shown in Table 3. In the calculation of the Kappa Index, the data reported by Giugliani et al [23] were not included because of the small sample size (5/18 patients included in this study). Kappa was 0.557 when criteria A and B were compared with criterion C ($p=0.017$). For the other criteria, Kappa values indicated a weak agreement.

For responsive patients, mean Phe level variations between time points T1 and T2 and between time points T1 and T3 were different only in Test 2 ($p=0.002$ and 0.011 , respectively), that difference was not found for non-responsive patients (Table 2). The analysis of area under the curve (AUC) revealed a statistically significant difference between Tests 1 and 2 mean values for responsive patients ($p<0.01$), but not for non-responsive patients ($p=0.242$) (Table 2).

Figure 1 shows the Phe plasma concentration values found in this study according to collection time point in Tests 1 and 2 for a BH₄-responsive patient (Figure 1a) and a non-responsive patient (Figure 1b).

3.2. Association between genotype and responsiveness to BH₄ (Table 1).

Data about the genotype, severity of PKU and BH₄-responsiveness are shown in Table 1.

3.3. Dietary intake

The patients ingested in average 705.56 ± 356.77 and 608.89 ± 405.51 mg (mean \pm SD) of Phe per day, according to dietary recalls 1 and 2 of Test 1 ($p=0.446$), and 672.78 ± 406.17 and 572.78 ± 329.47 mg (mean \pm SD) of Phe per day according to dietary recalls 1 and 2 of Test 2 ($p=0.281$). There were no statistically significant differences in Phe intake between Tests 1 (657.2 ± 379.6 mg Phe/day) and 2 (622.7 ± 368 mg Phe/day) ($p=0.564$).

4. Discussion

In this study, patients with PKU that might potentially benefit from the use of BH₄ were identified by comparing their Phe levels after a simple Phe loading test and

after a combined Phe+BH₄ loading test. Although no consensus has been reached in the literature about the most adequate method to identify these individuals, Phe plasma levels should be elevated at the time of BH₄ administration to induce an increase in PAH activity and, consequently, to potentiate the effect of BH₄ [27]. This recommendation adds complexity to the investigation of BH₄ responsiveness in patients with good adherence to dietary treatment. The increase of Phe levels is often achieved by increasing the ingestion of dietary Phe [8, 9, 20, 22, 28-30], which may raise ethical and psychological issues. A single Phe dose using L-Phe may also be administered, with the advantage that the patient's diet does not have to be changed [19, 31-33]; however, Phe levels after this type of loading tend to spontaneously decrease in 24 h even when BH₄ is not been administered [20, 32]. Therefore, BH₄ responsiveness would have to be confirmed by comparing Phe plasma levels after the Phe+BH₄ loading test and after the simple Phe loading test. We have found in the literature only two studies performing the simple Phe loading test and the combined Phe+BH₄ loading test in the same patient. The one conducted by Desviat et al. [20] included six patients with Phe level at diagnosis below 360 $\mu\text{mol/L}$, but classified their responsiveness only according to the combined Phe+BH₄ test; and the one conducted by Ponzzone et al. [31], which included seven patients with different forms of PKU, but did not establish clear criteria for the classification of responsiveness. The analysis of Phe curves in both studies suggests that Phe plasma levels reach similar values at the end of the simple Phe and combined Phe+BH₄ loading tests; although, Phe levels seem to decrease faster when BH₄ is used.

The protocol to evaluate responsiveness in this study is innovative for two reasons: (1) it included the use of a simple Phe and a combined Phe+BH₄ loading test for 18 patients with PKU and good metabolic control; (2) it defined BH₄ responsiveness parameters based on the comparison of results of these two tests. According to the strategy adopted in this study, 33% (6/18) of the patients were classified as responsive, which is in agreement with data in the literature [17-19, 23, 30, 34]. Of the responsive patients, two had the classical PKU (n=2/8; 25.5%) and four, the mild PKU (n=4/10; 40%), which confirmed that responsiveness is greater among individuals with milder forms of PKU. Moreover, of the 16 patients for whom genotypes were available, six had mutations described in the literature as BH₄ responsiveness. There was also an important discordance between the seven criteria used to compare the definition of responsiveness. In the group of 18 individuals, only one was responsive and six were non-responsive according to all criteria. If criteria 4 and 5, which consider the results of combined

Phe+BH₄ loading only, had not been used, a greater number of patients would have concordant results for non-responsiveness (n=10). The use of criteria 4 and 5 independently seems to lead to a greater number of diagnoses of patients responsive to BH₄; this may be explained by the fact that these criteria do not take into consideration that Phe may be excreted spontaneously and not due to BH₄ action.

Comments on dietary ingestion and Phe levels during the Tests

Dietary Phe ingestion did not change in the two recalls in the same Test, and there was also no variation in the comparison of total Phe amount ingested in Test 1 and in Test 2, which suggests that the fall in Phe levels in responsive individuals was secondary to BH₄ administration.

The variation of Phe plasma concentrations along the study revealed an elevation at time point T1 in comparison with time point T0, that is, 3 hours after Phe loading, which demonstrates, therefore, that L-Phe was absorbed by the patient. The collection point 3h after Phe loading was used because it has been described in the literature as the point at which Phe plasma levels peak predominantly [24]. However, in 9 patients in this study, the highest Phe plasma concentration values occurred at least, in one of the Tests, 11 hours after Phe loading, which has also been reported by other studies [19, 20].

Phe plasma concentrations at time points 0 and 1 in the two Tests did not differ from each other, which emphasizes their comparability.

Conclusions

BH₄ has emerged as a new treatment for patients with mostly milder forms of PKU and may substantially improve their quality of life. Numerous positive findings, including increases in Phe tolerance, have been reported in association with the use of this medication. However, no consensus has been reached about the best method and criteria to define responsiveness to BH₄. The validation of methods and criteria for this purpose is fundamental to optimize the treatment with BH₄ also in terms of cost and effectiveness. Our data suggest that, in responsive individuals, Phe levels decrease faster after Phe+BH₄ loading than after simple Phe loading, and confirm that the comparison between simple Phe and combined Phe+BH₄ loading is valid to evaluate responsiveness. Moreover, because of the wide range of variation of responsiveness classification for each patient, more than one criterion should be used to establish a

definition, and these criteria should take into consideration the comparison between the values obtained in single Phe and combined Phe+BH₄ loading tests.

Acknowledgments

The authors thank the following: Halfway House, Statistic Unit, FIPE and the staff of the Medical Genetics Service at HCPA. They also thank the Brazilian Coordinating Agency for Advanced Training of Graduate Personnel (CAPES) and Merck Serono for their support and collaboration in this study. This work was supported in part by the Swiss National Science Foundation grant no. 3100A0-1199852/1 (to NB).

References

- [1] C. Scriver, S. Kaufman, Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency., in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, B. Childs, B. Vogelstein (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 1667–1724.
- [2] National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000 *Pediatrics* 108 (2001) 972-982.
- [3] C.N. Sarkissian, A. Gamez, C.R. Scriver, What we know that could influence future treatment of phenylketonuria *J Inherit Metab Dis* 32 (2009) 3-9.
- [4] N. Blau, F.J. van Spronsen, H.L. Levy, Phenylketonuria *Lancet* 376 (2010) 1417-1427.
- [5] J.H. Walter, F.J. White, S.K. Hall, A. MacDonald, G. Rylance, A. Boneh, D.E. Francis, G.J. Shortland, M. Schmidt, A. Vail, How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 360 (2002) 55-57.
- [6] T. Nalin, I. Perry, L. Refosco, C. Netto, C. Souza, T. Vieira, P. Picon, I. Schwartz, Fenilcetonúria no Sistema Único de Saúde: Avaliação de Adesão ao Tratamento em um Centro de Atendimento do Rio Grande do Sul *Revista HCPA* 30 (2010) 222-232.
- [7] K.T. Friedrich, K.B. Barbara, L. Nicola, C. Mercedes Martinez-Pardo, J.G. Daniel, D. Alex, D.K. Emil, A.C. Eric, K.G. Dorothy, H. Paul, H.L. Mark, M. Andrzej, R. Linda Marie, V. Jerry, B.W. Chester, A.W. Jon, B. Judith, C.-S. Heidi, B.H. Julia, Efficacy of Sapropterin Dihydrochloride in Increasing Phenylalanine Tolerance in Children with Phenylketonuria: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study *The Journal of pediatrics* 154 (2009) 700-707.e701.
- [8] S. Kure, D.C. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki, N. Sugiyama, O. Sakamoto, K. Fujii, Y. Matsubara, K. Narisawa, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *J Pediatr* 135 (1999) 375-378.
- [9] A.C. Muntau, W. Roschinger, M. Habich, H. Demmelmair, B. Hoffmann, C.P. Sommerhoff, A.A. Roscher, Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria *N Engl J Med* 347 (2002) 2122-2132.

- [10] L.J. Spaapen, M.E. Rubio-Gozalbo, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art *Mol Genet Metab* 78 (2003) 93-99.
- [11] N. Blau, H. Erlandsen, The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Mol Genet Metab* 82 (2004) 101-111.
- [12] B. Fiege, L. Bonafe, D. Ballhausen, M. Baumgartner, B. Thony, D. Meili, L. Fiori, M. Giovannini, N. Blau, Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S91-95.
- [13] G. Gramer, P. Burgard, S.F. Garbade, M. Lindner, Effects and clinical significance of tetrahydrobiopterin supplementation in phenylalanine hydroxylase-deficient hyperphenylalaninaemia *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 556-562.
- [14] U. Langenbeck, Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias *J Inherit Metab Dis* 31 (2008) 67-72.
- [15] G. Gramer, S.F. Garbade, N. Blau, M. Lindner, Pharmacokinetics of tetrahydrobiopterin following oral loadings with three single dosages in patients with phenylketonuria *J Inherit Metab Dis* 32 (2009) 52-57.
- [16] C.O. Harding, New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride *Biologics* 4 (2010) 231-236.
- [17] B.K. Burton, D.K. Grange, A. Milanowski, G. Vockley, F. Feillet, E.A. Crombez, V. Abadie, C.O. Harding, S. Cederbaum, D. Dobbelaere, A. Smith, A. Dorenbaum, The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 700-707.
- [18] H.L. Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee, F.K. Trefz, C.B. Whitley, F. Feillet, A.S. Feigenbaum, J.D. Bechuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorenbaum, Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH₄) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study *Lancet* 370 (2007) 504-510.
- [19] B. Perez-Duenas, M.A. Vilaseca, A. Mas, N. Lambruschini, R. Artuch, L. Gomez, J. Pineda, A. Gutierrez, M. Mila, J. Campistol, Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria *Clin Biochem* 37 (2004) 1083-1090.
- [20] L.R. Desviat, B. Perez, A. Belanger-Quintana, M. Castro, C. Aguado, A. Sanchez, M.J. Garcia, M. Martinez-Pardo, M. Ugarte, Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH₄ loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype *Mol Genet Metab* 83 (2004) 157-162.
- [21] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. MacDonald, F.K. Trefz, F. van Spronsen, Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries *Mol Genet Metab* 99 (2010) 109-115.
- [22] F.K. Trefz, B.K. Burton, N. Longo, M.M. Casanova, D.J. Gruskin, A. Dorenbaum, E.D. Kakkis, E.A. Crombez, D.K. Grange, P. Harmatz, M.H. Lipson, A. Milanowski, L.M. Randolph, J. Vockley, C.B. Whitley, J.A. Wolff, J. Bechuk, H. Christ-Schmidt, J.B. Hennermann, Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study *J Pediatr* 154 (2009) 700-707.
- [23] L. Giugliani, A. Sitta, C. Vargas, R. L. da Silva, C. S, T. Nalin, M. Saraiva-Pereira, L. R. Giugliani, I. Schwartz, V, D, Responsividade à tetrahidrobiopterina em

- pacientes brasileiros com deficiência de fenilalanina hidroxilase. *J Pediatr* 87 (2011) 245-251.
- [24] N. Blau, B. Fiege, F. Trefz, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis, treatment, genetics, and international BIOPKU database in: N. Blau, B. Thöny (Eds.), *Pterins, Folates and Neurotransmitters in Molecular Medicine*, Verlagsgesellschaft mbH, Heilbronn, Germany, 2004, pp. 132–142.
- [25] M.S. Rashed, P.T. Ozand, M.P. Bucknall, D. Little, Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry *Pediatr Res* 38 (1995) 324-331.
- [26] T. Opladen, B. Abu Seda, A. Rassi, B. Thöny, G. F. Hoffmann, N. Blau, Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J Inher Metab Dis* 34 (2011) 819-826.
- [27] N. Blau, B.K. Burton, B. Thöny, F.J.v. Sprosen, S. Waisbren, *Phenylketonuria and BH4 Deficiencies*, Bremen, 2010.
- [28] J.B. Nielsen, K.E. Nielsen, F. Guttler, Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation *J Inher Metab Dis* 33 (2010) 9-16.
- [29] B.K. Burton, H. Bausell, R. Katz, H. Laduca, C. Sullivan, Sapropterin therapy increases stability of blood phenylalanine levels in patients with BH4-responsive phenylketonuria (PKU) *Mol Genet Metab* 101 (2010) 110-114.
- [30] A. Bélanger-Quintana, M.J. García, M. Castro, L.R. Desviat, B. Pérez, B. Mejía, M. Ugarte, M. Martínez-Pardo, Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: Evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin *Molecular Genetics and Metabolism* 86 (2005) 61-66.
- [31] A. Baldellou Vázquez, M.I. Salazar García-Blanco, M.P. Ruiz-Echarri Zalaya, C. Campos Calleja, L. Ruiz Desviat, M. Ugarte Pérez, Tratamiento de la hiperfenilalaninemia por déficit de fenilalanina hidroxilasa con tetrahydrobiopterina. ¿Cuándo y cómo? *Anales de Pediatría* 64 (2006) 146-152.
- [32] A. Ponzzone, F. Porta, A. Mussa, A. Alluto, S. Ferraris, M. Spada, Unresponsiveness to tetrahydrobiopterin of phenylalanine hydroxylase deficiency *Metabolism* 59 (2010) 645-652.
- [33] J.J. Mitchell, B. Wilcken, I. Alexander, C. Ellaway, H. O'Grady, V. Wiley, J. Earl, J. Christodoulou, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S81-85.
- [34] B. Fiege, N. Blau, Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria *J Pediatr* 150 (2007) 627-630.

Table 1 – Genotype, PKU phenotype for each patient and comparison of responsiveness in this study with findings in the literature

Patients	Type of PKU	Genotype		Responsiveness to BH ₄ ^a (our study)	Responsiveness to BH ₄ (number of patients included) ^b	Protocol used in the literature ^c
		Allele 1	Allele 2			
1	Classical	p.165T	p.R408W	R	R (3)	BH ₄ (10mg) - 24h (2) BH ₄ (20mg) - 24h (1)
2	Classical	p.V388M	p.V388M	R	R (1) – Slow R (1) ^d	BH ₄ (20mg) - 24h
3	Classical	p.165T	p.R176X	NR	R (1)	BH ₄ (20mg) - 24h
4	Classical	p.R252W	p.R261Q	NR	Nd	Nd
5	Classical	p.165T	p.165T	NR	NR (1)	Phe (100mg) + BH ₄ (20mg) - 8h
6	Mild	p.E390G	p.R408Q	R	Nd	Nd
7	Classical	p.R261X	p.R176X	NR	Nd	Nd
8	Mild	p.R408W	c.165delT	NR	Nd	Nd
9	Mild	p.R408W	c.165delT	NR	Nd	Nd
10	Mild	p.E390G	p.A104D	R	Nd	Nd
11	Mild	p.R408W	p.L348V	NR	R (1)	BH ₄ (20mg) - 24h
12	Mild	p.R408W	p.L348V	NR	R (1)	BH ₄ (20mg) - 24h
13	Mild	p.A300S	p.L311P	R	Nd	Nd
14	Classical	p.R408W	p.R408W	NR	NR(13) Slow R (1) ^d	BH ₄ (20mg) - 24h (13)/Other (1)
15	Mild	p.R261Q	p.V388M	R	R (1)	BH ₄ (10mg) - 8h
16	Mild	p.L249F	p.V388M	NR	NR (2)	BH ₄ (20mg) - 24h
17	Classical	c.165delT	?	NR	-	-
18	Mild	?	?	NR	-	-

PKU: phenylketonuria; Nd: not described; R: Responsive; NR: non-responsive; Siblings: 8 and 9; 11 and 12.

^a To be classified as responsive, patient had to obtain a positive result according to at least one of the criteria used (criteria A, B and C).

^b Data retrieved from BIOPKUdb <http://www.bh4.org/BH4DatabasesBioHPA-PAH.asp>

^c Loading protocol used in other PKU patients with the same genotype (amount of BH₄ per kg of current weight; time used for responsiveness criterion).

^d Patients with a Phe reduction of 20 to 30 % after BH₄ loading.

Table 2 – BH₄ responsiveness: Phe values and corresponding areas under the curve (n=18 patients)

Patients	Test 1			Test 2			Area under Phe curve		Criterion A (%)	Criterion B (%)	Critérien C (%)
	Phe (µmol/L)			Phe (µmol/L)			AUC1	AUC2			
	T1	T2	T3	T1	T2	T3					
Responsive											
1	852	1032	949	1010	823	816	373.1	289.8	-39.6	-30.6	-22.3
2	1193	1314	849	939	895	639	435.2	297.2	-14.8	-3.1	-31.7
6	588	474	136	570	144	74,8	133.8	27.9	-55.3	-10	-79.1
10	522	372	113	612	127	58,4	103.1	19.3	-50.5	-12.1	-81.3
13	744	602	550	748	516	189	207.1	145.2	-11.9	-48.6	-29.9
15	657	822	589	819	498	355	281.6	153.1	-64.3	-46.3	-45.6
µ±sd	759±242	769±358	531±349	783±175*	500±324*	355±312*	255.6±132.0**	155.4±120.9**	-39.4±21.7	-25.1±19.5	-48.3±25.8
Non-responsive											
3	1095	750	706	991	946	808	253.2	327.3	27	17	29.3
4	702	555	462	496	553	390	185.9	186.6	32.4	12.8	0.4
5	517	427	530	652	661	494	161.1	223.4	18.7	-26.7	38.6
7	816	775	617	634	696	542	263.5	239.5	14.8	9.9	-9.1
8	367	425	390	699	726	715	152.9	263.0	-11.9	-3.9	72.0
9	544	626	486	742	736	730	216.4	265.8	-15.8	9	22.8
11	836	655	613	608	513	418	225.7	172.6	6	-4.5	-23.5
12	991	925	717	1095	855	660	311.9	280.7	-15.2	-12	-10.0
14	711	562	296	587	421	197	171.3	123.6	-7.3	-8	-27.8
16	789	640	446	714	637	422	206.6	206.4	8.1	2.5	-0.1
17	790	810	799	1810	1787	1398	293.2	608.1	-3.8	-23.9	107.4
18	422	350	227	489	304	208	111.7	93.1	-20.8	-11.2	-16.7
µ±sd	715±220	625±172	524±174	793±367	736±375	582±323	212.8±60.0	249.2±131.0	2.6±17.8	-3.2±14	15.3±41.1

Phe: phenylalanine; Test 1: simple Phe loading; Test 2: combined Phe+BH₄ loading; Siblings: 8 and 9; 11 and 12.

Criterion A: [(PheTest2T2 – PheTest2T1/PheTest2T1) x 100] - [(PheTest1T2 – PheTest1T1/PheTest1T1) x 100].

Criterion B: [(PheTest2T3 – PheTest2T1/PheTest2T1) x 100] - [(PheTest1T3 – PheTest1T1/PheTest1T1) x 100].

Criterion C: [(AAC2 – AAC1)/AAC1 x 100].

To be classified as responsive, patient had to obtain a positive result according to at least one of the criteria used (criteria A, B and C).

T1 – time point 1: Phe level 3 h after Phe loading; T2 – time point 2: Phe level 11 h after Phe loading and 8 h after BH₄ loading (Test 2); T3 – time point 3: Phe level 27 h after Phe loading and 24 h after BH₄ loading (Test 2); AUC1: Area under the curve in Test 1; AUC2: Area under the curve in Test 2.

*Phe variation between T2 and T1 and between T3 and T1 was statistically significant (p= 0.002 and 0.011). ** Statistically significant difference (p<0.01).

Table 3: BH₄ responsiveness according to criteria used for classification in this study

Patients	Criterion A	Criterion B	Criterion C	Criterion D	Criterion E	Criterion F^a	Criterion G^a
1	R	R	NR	NR	NR	NR	R
2	NR	NR	R	NR	R	-	-
3	NR	NR	NR	NR	NR	R	R
4	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
5	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
6	R	NR	R	R	R	-	-
7	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
8	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
9	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
10	R	NR	R	R	R	-	-
11	NR	NR	NR	NR	R	R	R
12	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR
13	NR	R	NR	R	R	-	-
14	NR	NR	NR	NR	R	-	-
15	R	R	R	R	R	-	-
16	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR
17	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
18	NR	NR	NR	R	R	-	-

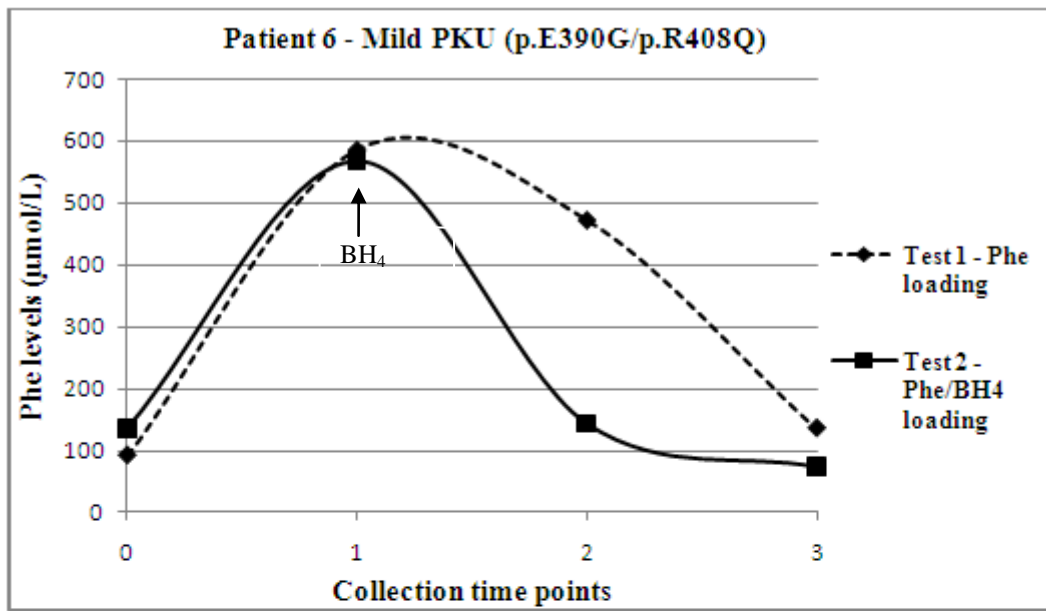
R= responsive; NR= non-responsive;

The criteria are defined in the Methods section of this study

Siblings: 8 and 9; 11 and 12.

^aData reported by Giugliani et al. [23]

A)



B)

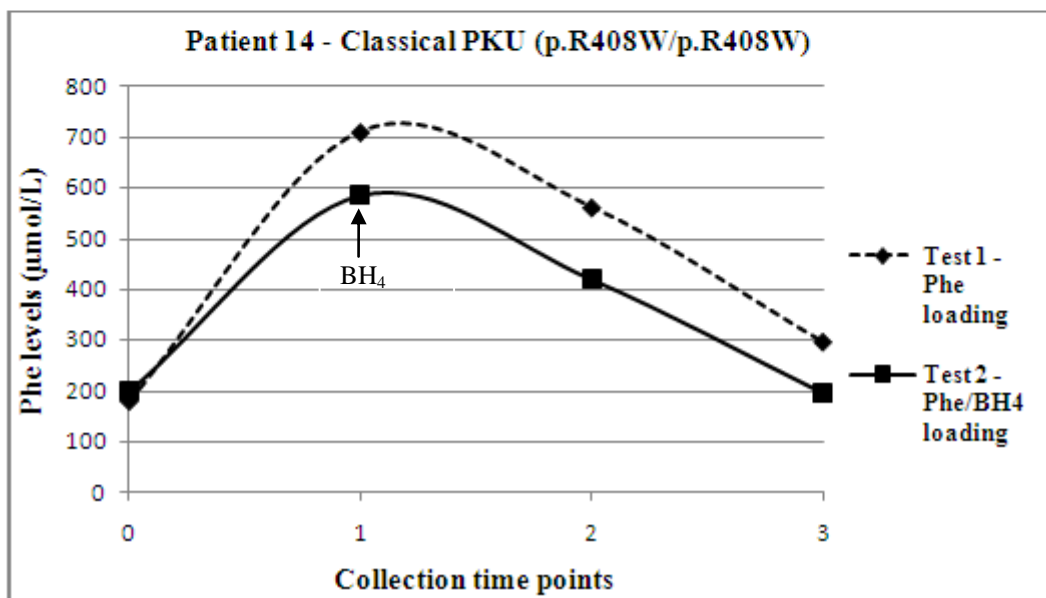


Figure 1: (A) Phe variation in a patient classified as responsive to BH_4 according to collection time points. (B) Phe variation in a patient classified as non-responsive to BH_4 according to collection time points.

7. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Teste otimizado para avaliar a responsividade ao BH₄ em pacientes brasileiros com deficiência de fenilalanina hidroxilase e com controle metabólico adequado

Tatiéle Nalin^a, Ingrid Dalira Schweigert Perry^b, Angela Sitta^c, Carmen Regla Vargas^{d,e}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{d,f}, Roberto Giugliani^{a,d,g,h}, Nenad Blau^{i,j}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{a,d,g}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^b Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; Centro de Estudos em Alimentação e Nutrição do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

^e Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^f Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

^g Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

^h INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brasil.

ⁱ Division of Clinical Chemistry, University Children's Hospital, Zurique, Suíça.

^j Zürich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), Zurique, Suíça.

Correspondência para autor:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 – Porto Alegre – RS – Brasil

Tel + 55 51 3359-8011

Email: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Introdução: Estudos recentes têm demonstrado que pacientes com Hiperfenilalaninemia (HPA) por deficiência de fenilalanina hidroxilase (PAH) podem apresentar redução das concentrações plasmáticas de fenilalanina (Phe) mediante a administração de tetrahydrobiopterina (BH₄).

Objetivo: determinar a responsividade à administração de dose única de BH₄, por meio de um protocolo inovador envolvendo o teste combinado de sobrecarga com Phe e BH₄ em pacientes brasileiros com fenilcetonúria (PKU).

Métodos: Participaram do estudo pacientes com idade ≥ 4 anos que apresentavam, em tratamento dietético, mediana de Phe plasmática ≤ 600 $\mu\text{mol/L}$. Foram realizados Teste de sobrecarga simples de Phe utilizando 100mg/kg de L-Phe (Teste 1), e Teste combinado de Phe+BH₄ utilizando 100mg/kg de L-Phe e 20mg/kg de BH₄ (Teste 2). Foram realizadas coletas de sangue no ponto basal e após três, 11 e 27h da ingestão de Phe (T0, T1, T2 and T3). Como critérios para definir responsividade foram utilizados: critério A: redução de Phe $\geq 30\%$ em T1 e T2 dos Testes 1 e 2; critério B: redução de Phe $\geq 30\%$ em T1 e T3 dos Testes 1 e 2; e critério C: pelo menos 30% de diferença das áreas abaixo da curva de Phe entre os Testes 1 e 2.

Resultados: Participaram do estudo 18 pacientes (PKU Clássica:8; PKU Leve:10), com mediana de idade de 12 anos. Seis pacientes (PKU Clássica: 2; PKU Leve: 4) foram considerados responsivos de acordo com pelo menos um dos critérios utilizados. Houve concordância de responsividade quando comparados os critérios A e B em relação ao C (Índice Kappa=0,557; p=0,017). Dos pacientes com genótipo disponível (n=16), seis possuíam dados de responsividade ao BH₄ descritos na literatura, os quais foram concordantes com os encontrados no presente estudo.

Conclusão: A comparação entre a sobrecarga simples de Phe e combinada de Phe+BH₄ parece ser um método ideal para avaliar responsividade ao BH₄ em pacientes com bom controle metabólico.

Palavras-chave: Erro Inato do Metabolismo, Hiperfenilalaninemia, Fenilcetonúria, Fenilalanina, Tetrahydrobiopterina.

1 Introdução

A fenilcetonúria (PKU) ou a hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (PAH) é um erro inato do metabolismo caracterizado pelo aumento persistente dos níveis plasmáticos de fenilalanina (Phe). A PAH converte Phe em tirosina (Tyr) e requer ação de seu cofator, a tetrahidrobiopterina (BH₄) [1].

O tratamento padrão da PKU é baseado em uma dieta restrita em Phe e no uso de uma fórmula metabólica rica em aminoácidos e isenta de Phe, que fornece o requerimento protéico diário ao paciente [1, 2]. O não tratamento, devido aos efeitos tóxicos dos níveis elevados de Phe, pode ter como consequência o comprometimento neurológico, incluindo retardo mental e distúrbios de comportamento [3, 4].

Haja vista a restrição alimentar necessária e a dificuldade de adesão associada [4-6], torna-se indispensável a busca por novas estratégias de tratamento da PKU [7]. Desde a publicação de Kure et al. [8] que relatou os primeiros pacientes com PKU cujos níveis de Phe diminuíram com a administração de BH₄, vários estudos têm sido realizados com o intuito de confirmar a eficácia e a segurança desse medicamento, o qual já se encontra aprovado para uso pelo FDA e EMEA. Geralmente, os pacientes costumam ser pesquisados em relação à possível responsividade e, caso haja indicação de que sejam responsivos (ou seja, de que haja diminuição dos níveis de Phe associada à administração de BH₄), a suplementação com BH₄ é iniciada. Os estudos, entretanto, têm utilizado diferentes protocolos para avaliar a responsividade: diferentes doses de BH₄ (por exemplo, 10 ou 20mg/kg/dia, em uma dose única ou distribuída durante o dia) são utilizadas; o período de avaliação do teste varia de algumas horas, para semanas ou até meses; o ponto-de-corte de variação de Phe definido para determinar a responsividade também sofre variação, sendo mais freqüentemente adotado como critério uma redução de Phe maior ou igual a 30% em relação à Phe basal após 24 horas da administração do BH₄. Além disso, diferentes dietas são utilizadas durante o teste, entre elas dieta normal, restrita em Phe ou ainda com sobrecarga de Phe (por meio de utilização de leite em pó ou de L- Phe, por exemplo) [7, 9-22].

O presente estudo teve como objetivo descrever, em uma amostra de pacientes brasileiros com PKU e bom controle metabólico, a responsividade à administração de dose única de BH₄. Para tanto, foi utilizado um protocolo inovador envolvendo o teste simples e o teste combinado de sobrecarga com Phe e BH₄.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em pacientes com PKU do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA, Brasil). O ATDM-SGM/HCPA, na época da realização do estudo, acompanhava 68 pacientes com diferentes fenótipos, sendo que 64 estavam em tratamento dietético.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.1. Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes com idade ≥ 4 anos e que possuíam mediana de Phe plasmática ≥ 600 $\mu\text{mol/L}$, em tratamento dietético, no ano anterior à inclusão no estudo. Este ponto-de-corte para o nível de Phe foi adotado para permitir a realização do teste em pacientes com a forma leve da doença e/ou com bom controle metabólico, uma vez que estudo anterior do grupo [23] e que utilizou outro protocolo e diferentes critérios de inclusão para avaliar a responsividade ao BH_4 incluiu predominante pacientes com a forma clássica da doença e com controle metabólico inadequado (os pacientes deveriam apresentar níveis plasmáticos de Phe ≥ 360 $\mu\text{mol/L}$ em todas as medidas realizadas nos últimos 12 meses).

Os critérios de exclusão previstos no presente estudo eram: gestação; presença de manifestações clínicas sugestivas de hepatopatia; uso de levodopa; alergia a algum dos componentes do BH_4 ; mediana de nível de Phe > 600 $\mu\text{mol/L}$ nas análises realizadas nos 12 meses anteriores à data de inclusão no estudo; seguimento irregular no ATDM-SGM/HCPA nesses mesmos 12 meses; e provável não-cooperação com os procedimentos do estudo, de acordo com o julgamento dos investigadores.

A classificação do tipo de PKU dos pacientes foi realizada conforme Nalin *et al* [6] sendo os pacientes classificados como tendo PKU Clássica ou Leve. Pacientes com níveis de Phe ≤ 360 $\mu\text{mol/L}$ em dieta normal não foram incluídos no estudo (n=4).

2.2 Teste de sobrecarga simples de Phe e combinado de Phe+ BH_4

Os pacientes foram instruídos a fazer duas visitas ao HCPA, permanecendo 27 horas em avaliação em cada uma delas; as duas visitas tiveram intervalo de uma semana.

Sobrecarga simples de Phe (Teste 1)

Na avaliação da primeira semana, após jejum noturno, foi realizada coleta de sangue dos pacientes para medida da concentração plasmática de Phe e Tyr (T0). Em seguida, os pacientes ingeriram 100mg/kg de L-Phe e retornaram, então, sua alimentação habitual (dieta com restrição de Phe e suplementação com fórmula metabólica isenta de Phe). Coletas de sangue para dosagem de Phe e Tyr foram então realizadas em 3 (T1), onze (T2) e 27 horas (T3) após sobrecarga de Phe.

Sobrecarga combinada de Phe+BH₄ (Teste 2)

Na avaliação da segunda semana, foi aplicado protocolo descrito por Blau *et al* [24], com uma modificação - os níveis de Phe e Tyr não foram analisados 7 horas após a sobrecarga de Phe. As etapas iniciais do teste 2 (T0, sobrecarga de Phe, início da alimentação e coleta no T1) foram semelhantes às aquelas já descritas para o teste 1. Adicionalmente, logo após a coleta no T1, foram administrados oralmente, em dose única, 20mg/kg de BH₄ (Dicloridrato de Sapropterina, KUVAN®, Merck Serono) e coletas de sangue para análise de Phe e Tyr foram realizadas 8 horas (T2) e 24 horas (T3) após a ingestão do BH₄. Os pontos T0 e T1 dos Testes 1 e 2 são, portanto, equivalentes, ao contrário dos pontos T2 e T3, os quais diferem em relação à administração de BH₄ (presente no Teste 2).

A L-Phe e o BH₄ foram dissolvidos em suco de laranja antes de serem administrados. Além disso, os pacientes foram instruídos a permanecer em jejum por pelo menos uma hora antes de todas as coletas de sangue.

Os níveis de Phe e Tyr no plasma foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS) no Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA, conforme descrito por Rashed *et al* [25]. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas, obtendo-se a média entre as duas dosagens. Nas amostras do Teste 2, também foi realizada, de forma cegada em relação ao momento da coleta, a medida dos níveis de BH₄ (biopterinas totais), de acordo com o método de Opladen *et al.* [26].

2.3. Responsividade ao BH₄

Os pacientes foram considerados responsivos caso preenchessem pelo menos um dos critérios abaixo relacionados:

Critério A: esse critério levou em consideração os valores de Phe no T1 [três horas após a sobrecarga de Phe nos Testes 1 (Phe Teste1T1) e 2 (Phe Teste2T1)] e no T2 [onze horas após a sobrecarga de Phe nos Testes 1 (Phe Teste1T2) e 2 (Phe Teste2T2)], e 8 horas

após a administração do BH₄, no Teste 2]. A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo: $[(\text{Phe Teste2T2} - \text{Phe Teste2T1}/\text{PheTeste2T1}) \times 100] - [(\text{Phe Teste1T2} - \text{Phe Teste1T1}/\text{PheTeste1T1}) \times 100]$. Foram considerados responsivos os indivíduos cujos valores encontrados corresponderam a uma redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no Teste 2.

Critério B: esse critério levou em consideração os valores de Phe no T1 e no T3 [vinte e sete horas após a sobrecarga de Phe nos Testes 1 (Phe Teste1T3) e 2 (Phe Teste2T3), e 24 horas após a administração do BH₄, no Teste 2]. A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo: $[(\text{Phe Teste2T3} - \text{Phe Teste2T1}/\text{PheTeste2T1}) \times 100] - [(\text{Phe Teste1T3} - \text{Phe Teste1T1}/\text{PheTeste1T1}) \times 100]$. Foram considerados responsivos os indivíduos cujos valores encontrados corresponderam a uma redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no Teste 2.

Critério C: esse critério levou em consideração a diferença, em percentual, do valor encontrado para as áreas abaixo da curva de Phe nos Testes 1(AAC1) e 2 (AAC2). A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo: $[(\text{AAC2} - \text{AAC1})/\text{AAC1} \times 100]$. Foram considerados responsivos os indivíduos cuja diferença foi $\geq 30\%$ (desde que a área do Teste 1 > Teste 2).

Para comparação da classificação de responsividade, foram utilizados quatro critérios adicionais, descritos abaixo:

Critério D: levou em consideração somente os valores de Phe em T1 e T2 do Teste 2. A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo: $[(\text{Phe Teste2T2} - \text{Phe Teste2T1}/\text{PheTeste2T1}) \times 100]$. Foram considerados responsivos os indivíduos cujos valores encontrados corresponderam a uma redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no T2.

Critério E: levou em consideração somente os valores de Phe em T1 e T3 encontrados no Teste 2. A seguinte fórmula foi utilizada para cálculo: $[(\text{Phe Teste2T3} - \text{Phe Teste2T1}/\text{PheTeste2T1}) \times 100]$. Foram considerados responsivos os indivíduos cujos valores encontrados corresponderam a uma redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no T3.

Critério F: corresponde ao critério utilizado previamente pelo grupo [23] para avaliar a responsividade de 5 pacientes também incluídos no presente estudo, e que levou em consideração a redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe 8 horas após sobrecarga simples de BH₄.

Critério G: corresponde ao critério utilizado previamente pelo grupo [23] para avaliar a responsividade de 5 pacientes também incluídos no presente estudo, que levou em consideração a redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe 24 horas após sobrecarga simples de BH₄.

2.4. Consumo de Phe

Foi verificado por meio de inquérito alimentar realizado no dia anterior e no primeiro dia dos Testes 1 e 2, totalizando, portanto, dois inquéritos por Teste. O consumo de Phe foi calculado por meio do programa de apoio à nutrição *NutriBase* (NB7 - *Clinical Edition*). Todos os pacientes foram instruídos a seguir a mesma prescrição dietética de Phe que estavam antes do início do estudo.

2.5. Genótipo

O genótipo dos pacientes 1 a 17 (tabela 1) foi previamente estabelecido e obtido por meio de revisão dos prontuários. O paciente 18 foi o único ainda não genotipado até o momento do estudo.

2.6. Análise estatística

Foi realizada através do Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). A análise descritiva foi realizada com o fornecimento das frequências absolutas e relativas. Para cálculo da área abaixo da curva de Phe foi utilizado o programa *Stata*. As variáveis contínuas foram apresentadas como médias \pm desvio padrão ou mediana com intervalo interquartil. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar o consumo de Phe entre os diferentes inquéritos, os valores da área abaixo da curva da Phe e a diferença dos níveis de Phe entre os Pontos de coleta dos pacientes responsivos em relação aos não responsivos. Os valores de Phe plasmática e razão Phe/Tyr foram analisados por Equações de Estimativas Generalizadas com correção de Bonferroni. A comparação entre os critérios de responsividade ao BH₄ foi realizada utilizando o Índice Kappa.

O nível de significância considerado foi de 5%.

3. Resultados

Dezoito pacientes foram incluídos no estudo, oriundos de 16 famílias não-relacionadas (sexo feminino= 11). Consanguinidade parental esteve presente em 1/16 (6,25%) famílias. A mediana de idade dos pacientes foi de 12 (Intervalo Interquartil: 10 -16,5) anos, sendo a idade mínima de 6 e a máxima de 31 anos.

A média dos níveis de Phe no T0 foi 255 ± 138 e 333 ± 173 $\mu\text{mol/L}$ nos Testes 1 e 2 ($n= 18$; $p= 0,342$), e, no T1, 730 ± 221 e 790 ± 310 ($n= 18$; $p= 1,0$), respectivamente. Tanto no Teste 1 quanto no Teste 2 houve um aumento significativo dos níveis de Phe entre T0 e T1

($p < 0,01$). Quanto à razão Phe/Tyr, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparados os mesmos pontos entre os Testes 1 e 2 ($p=1$ para todos os pontos).

Em relação à dosagem de BH_4 , houve aumento dos níveis no Teste 2 associado à L-Phe (Teste 1) e a sobrecarga de BH_4 (Teste 2) (dados não mostrados).

3.1. Resposta ao BH_4

Seis pacientes (33,3%) foram considerados responsivos, sendo quatro de acordo com o critério A, três de acordo com o critério B e quatro de acordo com critério C (tabela 2). A comparação da classificação de responsividade conforme o critério utilizado é demonstrada na Tabela 2. Para cálculo do Índice Kappa, não foi possível a inclusão dos dados de Giugliani *et al* [23], devido ao pequeno tamanho amostral (5/18 pacientes incluídos no presente estudo). O valor do Índice Kappa foi 0,557 quando comparados os critérios A e B em relação ao C ($p=0,017$). Para os demais critérios, esse valor foi considerado fraco.

Para os pacientes responsivos, a média de variação dos níveis de Phe, entre os pontos T1 e T2, e entre os pontos T1 e T3, diferiram somente no Teste 2 ($p=0,002$ e $0,011$, respectivamente), diferença que não ocorre entre os pacientes não responsivos. Em relação à área abaixo da curva, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos Testes 1 e 2 para os responsivos ($p < 0,01$), mas não para os não-responsivos ($p=0,242$).

Na figura 1 são apresentados os valores de Phe plasmática obtidos no presente estudo de acordo com o ponto de coleta, nos Testes 1 e 2, de um paciente responsivo ao BH_4 (Figura 1a) e de um paciente não responsivo (Figura 1b).

3.2. Associação entre genótipo e responsividade ao BH_4 (Tabela 1)

Os dados relativos ao genótipo, tipo de PKU e classificação de responsividade são apresentados na tabela 1.

3.3. Consumo alimentar

Os pacientes consumiram, respectivamente, $705,56 \pm 356,77$ e $608,89 \pm 405,51$ mg de Phe por dia nos inquéritos 1 e 2 do Teste 1 ($p=0,446$), e $672,78 \pm 406,17$ e $572,78 \pm 329,47$ mg por dia nos inquéritos 1 e 2 do Teste 2 ($p=0,281$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de consumo de Phe entre os Testes 1 ($657,2 \pm 379,6$ mg de Phe/dia) e 2 ($622,7 \pm 368$ mg Phe/dia) ($p=0,564$).

4. Discussão

No presente estudo, indivíduos com PKU com potencial benefício de uso do BH₄ foram identificados por meio da comparação entre seus níveis de Phe após teste de sobrecarga simples de Phe e após teste de sobrecarga combinada de Phe+BH₄. Embora não exista consenso relatado na literatura sobre o método mais adequado para identificação de tais indivíduos, recomenda-se que os níveis plasmáticos de Phe estejam elevados no momento da administração do BH₄, a fim de que seja induzido aumento da atividade da PAH e de que, conseqüentemente, o efeito do BH₄ seja potencializado [27]. Esta recomendação aumenta a complexidade da pesquisa da responsividade ao BH₄ em pacientes que apresentam boa adesão ao tratamento dietético. A elevação do nível de Phe é comumente, atingida por meio do aumento da ingestão de Phe presente em alimentos [8, 9, 20, 22, 28-30], o que pode levantar questões éticas e psicológicas. A administração de dose única de Phe utilizando a L-Phe também pode ser realizada, tendo como conveniência o fato de não ser necessária alteração na dieta do paciente [19, 31-33]; entretanto, os níveis da Phe, após esse tipo de sobrecarga, tendem a diminuir em um período de 24h, mesmo que não tenha sido administrado o BH₄ [20, 32]. No caso de sobrecarga única de Phe, seria necessária a confirmação da responsividade ao BH₄ por meio da comparação entre os níveis plasmáticos de Phe após o teste de sobrecarga Phe+BH₄ e após o teste de sobrecarga simples de Phe, aumentando, desta forma, o tempo do paciente em testagem. Foram localizados na literatura apenas dois estudos que realizaram o Teste de sobrecarga simples de Phe e combinada de Phe+BH₄ no mesmo paciente: o de Desviat *et al.* [20], que incluiu seis pacientes com níveis de Phe ao diagnóstico inferior a 360 µmol/L, mas que classificou a responsividade dos mesmos com base somente no Teste combinado de Phe+BH₄; e o de Ponzzone *et al.* [32], que incluiu sete pacientes com diferentes formas de PKU, mas que não estabeleceu critérios claros para classificação da responsividade. Análise das curvas de Phe apresentadas em ambos os estudos sugerem que os níveis de Phe plasmática alcançam valores semelhantes ao final dos Testes de sobrecarga simples de Phe e de sobrecarga combinada de Phe+BH₄; contudo, com a utilização do BH₄, os níveis de Phe parecem decrescer mais rapidamente.

O protocolo para pesquisa de responsividade utilizado no presente estudo é inovador por duas razões: 1) incluiu a utilização de Teste de sobrecarga simples de Phe e do Teste combinado de Phe+BH₄ em 18 pacientes com PKU e bom controle metabólico; 2) tentou definir parâmetros de responsividade ao BH₄ a partir da comparação dos resultados desses dois testes. Por meio da estratégia adotada, seis pacientes (6/18 ou 33 %) foram considerados

responsivos, porcentagem que esta de acordo com os dados da literatura [17-19, 23, 30, 34]. Entre os pacientes responsivos, dois possuíam a forma Clássica (n=2/8; 25%) e quatro a forma Leve (n=4/10; 40%) confirmando que a responsividade é maior entre indivíduos com formas mais atenuadas da PKU. Além disso, dos 16 pacientes com informações disponíveis sobre genotipagem, seis possuíam dados de avaliação de responsividade ao BH₄ descritos na literatura.

Também deve ser frisado o fato de que houve importante discordância entre os sete critérios utilizados para comparação da definição de responsividade. Considerando os 18 indivíduos avaliados, somente um mostrou-se responsivo e seis mostraram-se não-responsivos de acordo com todos os critérios. Se não fossem utilizados os critérios 4 e 5, que levam em consideração somente os resultados da sobrecarga combinada de Phe+BH₄, um maior número de pacientes mostrar-se-ia concordante em relação a não-responsividade (n=10). A aplicação dos critérios 4 e 5, de forma isolada, parece ocasionar, portanto, o diagnóstico de um maior número de pacientes responsivos ao BH₄; isto acontece provavelmente porque tais critérios não levam em consideração a possibilidade de que a Phe seja eliminada espontaneamente e não devido a ação do BH₄.

Observações sobre o consumo alimentar e níveis de Phe durante os testes

O consumo de Phe alimentar não variou entre os dois inquéritos realizados no mesmo Teste e também não apresentou variação quando comparada a quantidade total de Phe consumida no Teste 1 em relação ao Teste 2, o que indica que a queda dos níveis de Phe em indivíduos responsivos foi secundária ao efeito do BH₄.

Ao ser observada a variação dos valores de Phe plasmática ao longo de estudo, percebe-se sua elevação do ponto T1 em relação ao ponto T0, ou seja, após 3 horas da sobrecarga com Phe, demonstrando, dessa forma, que a L-Phe ingerida foi absorvida pelos pacientes. O ponto de coleta de três horas após sobrecarga de Phe foi utilizado porque é descrito na literatura como sendo o ponto onde o pico da Phe plasmática ocorre predominantemente [24]. Contudo, em 9 dos pacientes do presente estudo, o valor máximo alcançado pela Phe plasmática ocorreu, em um dos Testes, 11 horas após a sobrecarga com Phe, o que também é relatado em outros estudos [19, 20].

Os valores de Phe plasmática nos pontos 0 e 1, nos dois Testes realizados, não diferiram entre si, reforçando, dessa forma, a possibilidade de os compararmos.

Conclusões

O BH₄ surgiu como uma nova terapia para pacientes com, principalmente, formas mais atenuadas de PKU, podendo melhorar substancialmente sua qualidade de vida. Vários têm sido os achados positivos relacionados à utilização desse medicamento, incluindo o aumento da tolerância a Phe. Contudo, ainda não existe consenso sobre o melhor método e critérios para definição de responsividade ao mesmo. A validação de métodos e critérios que tenham esta finalidade é fundamental para a otimização, também em termos de custo-efetividade, do tratamento com BH₄. Nossos dados sugerem que, em indivíduos responsivos, os níveis de Phe decrescem mais rapidamente após a sobrecarga com Phe+BH₄ em relação à sobrecarga simples de Phe, e confirmam que a comparação entre a sobrecarga simples de Phe e a sobrecarga combinada de Phe+BH₄ é válida para o fim de avaliação de responsividade. Além disso, devido à grande heterogeneidade de classificação de responsividade encontrada para um mesmo paciente, sugere-se que mais de um critério seja utilizado para sua definição, e que tais critérios levem em consideração a comparação entre os valores obtidos no teste de sobrecarga única de Phe e combinada de Phe+BH₄.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos seguintes serviços do HCPA: Casa de Apoio, Assessoria Estatística, FIPE e a equipe do Serviço de Genética Médica. Também agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à *Merck Serono*, pelo apoio e colaboração no presente estudo. Esse trabalho obteve suporte parcial do *Swiss National Science Foundation grant no. 3100A0-1199852/1* (para NB).

Referências

- [1] C. Scriver, S. Kaufman, Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency., in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, B. Childs, B. Vogelstein (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 1667–1724.
- [2] National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000 *Pediatrics* 108 (2001) 972-982.
- [3] C.N. Sarkissian, A. Gamez, C.R. Scriver, What we know that could influence future treatment of phenylketonuria *J Inher Metab Dis* 32 (2009) 3-9.

- [4] N. Blau, F.J. van Spronsen, H.L. Levy, Phenylketonuria *Lancet* 376 (2010) 1417-1427.
- [5] J.H. Walter, F.J. White, S.K. Hall, A. MacDonald, G. Rylance, A. Boneh, D.E. Francis, G.J. Shortland, M. Schmidt, A. Vail, How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 360 (2002) 55-57.
- [6] T. Nalin, I. Perry, L. Refosco, C. Netto, C. Souza, T. Vieira, P. Picon, I. Schwartz, Fenilcetonúria no Sistema Único de Saúde: Avaliação de Adesão ao Tratamento em um Centro de Atendimento do Rio Grande do Sul *Revista HCPA* 30 (2010) 222-232.
- [7] K.T. Friedrich, K.B. Barbara, L. Nicola, C. Mercedes Martinez-Pardo, J.G. Daniel, D. Alex, D.K. Emil, A.C. Eric, K.G. Dorothy, H. Paul, H.L. Mark, M. Andrzej, R. Linda Marie, V. Jerry, B.W. Chester, A.W. Jon, B. Judith, C.-S. Heidi, B.H. Julia, Efficacy of Sapropterin Dihydrochloride in Increasing Phenylalanine Tolerance in Children with Phenylketonuria: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study *The Journal of pediatrics* 154 (2009) 700-707.e701.
- [8] S. Kure, D.C. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki, N. Sugiyama, O. Sakamoto, K. Fujii, Y. Matsubara, K. Narisawa, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *J Pediatr* 135 (1999) 375-378.
- [9] A.C. Muntau, W. Roschinger, M. Habich, H. Demmelair, B. Hoffmann, C.P. Sommerhoff, A.A. Roscher, Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria *N Engl J Med* 347 (2002) 2122-2132.
- [10] L.J. Spaapen, M.E. Rubio-Gozalbo, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art *Mol Genet Metab* 78 (2003) 93-99.
- [11] N. Blau, H. Erlandsen, The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Mol Genet Metab* 82 (2004) 101-111.
- [12] B. Fiege, L. Bonafe, D. Ballhausen, M. Baumgartner, B. Thony, D. Meili, L. Fiori, M. Giovannini, N. Blau, Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S91-95.
- [13] G. Gramer, P. Burgard, S.F. Garbade, M. Lindner, Effects and clinical significance of tetrahydrobiopterin supplementation in phenylalanine hydroxylase-deficient hyperphenylalaninaemia *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 556-562.
- [14] U. Langenbeck, Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias *J Inherit Metab Dis* 31 (2008) 67-72.
- [15] G. Gramer, S.F. Garbade, N. Blau, M. Lindner, Pharmacokinetics of tetrahydrobiopterin following oral loadings with three single dosages in patients with phenylketonuria *J Inherit Metab Dis* 32 (2009) 52-57.
- [16] C.O. Harding, New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride *Biologics* 4 (2010) 231-236.
- [17] B.K. Burton, D.K. Grange, A. Milanowski, G. Vockley, F. Feillet, E.A. Crombez, V. Abadie, C.O. Harding, S. Cederbaum, D. Dobbelaere, A. Smith, A. Dorenbaum, The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 700-707.
- [18] H.L. Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee, F.K. Trefz, C.B. Whitley, F. Feillet, A.S. Feigenbaum, J.D. Bechuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorenbaum, Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study *Lancet* 370 (2007) 504-510.
- [19] B. Perez-Duenas, M.A. Vilaseca, A. Mas, N. Lambruschini, R. Artuch, L. Gomez, J. Pineda, A. Gutierrez, M. Mila, J. Campistol, Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria *Clin Biochem* 37 (2004) 1083-1090.

- [20] L.R. Desviat, B. Perez, A. Belanger-Quintana, M. Castro, C. Aguado, A. Sanchez, M.J. Garcia, M. Martinez-Pardo, M. Ugarte, Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype *Mol Genet Metab* 83 (2004) 157-162.
- [21] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. MacDonald, F.K. Trefz, F. van Spronsen, Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries *Mol Genet Metab* 99 (2010) 109-115.
- [22] F.K. Trefz, B.K. Burton, N. Longo, M.M. Casanova, D.J. Gruskin, A. Dorenbaum, E.D. Kakkis, E.A. Crombez, D.K. Grange, P. Harmatz, M.H. Lipson, A. Milanowski, L.M. Randolph, J. Vockley, C.B. Whitley, J.A. Wolff, J. Bebchuk, H. Christ-Schmidt, J.B. Hennermann, Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study *J Pediatr* 154 (2009) 700-707.
- [23] L. Giugliani, A. Sitta, C. Vargas, R. L. da Silva, C. S, T. Nalin, M. Saraiva-Pereira, L. R. Giugliani, I. Schwartz, V, D, Responsividade à tetrahidrobiopterina em pacientes brasileiros com deficiência de fenilalanina hidroxilase *J Pediatr* 87 (2011) 245-251.
- [24] N. Blau, B. Fiege, F. Trefz, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis, treatment, genetics, and international BIOPKU database in: N. Blau, B. Thöny (Eds.), *Pterins, Foliates and Neurotransmitters in Molecular Medicine*, Verlagsgesellschaft mbH, Heilbronn, Germany, 2004, pp. 132-142.
- [25] M.S. Rashed, P.T. Ozand, M.P. Bucknall, D. Little, Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry *Pediatr Res* 38 (1995) 324-331.
- [26] T. Opladen, B. Abu Seda, A. Rassi, B. Thöny, G. F. Hoffmann, N. Blau, Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J Inher Metab Dis* 34 (2011) 819-826.
- [27] N. Blau, B.K. Burton, B. Thöny, F.J.v. Sprosen, S. Waisbren, *Phenylketonuria and BH4 Deficiencies*, Bremen, 2010.
- [28] J.B. Nielsen, K.E. Nielsen, F. Guttler, Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation *J Inher Metab Dis* 33 (2010) 9-16.
- [29] B.K. Burton, H. Bausell, R. Katz, H. Laduca, C. Sullivan, Sapropterin therapy increases stability of blood phenylalanine levels in patients with BH4-responsive phenylketonuria (PKU) *Mol Genet Metab* 101 (2010) 110-114.
- [30] A. Bélanger-Quintana, M.J. García, M. Castro, L.R. Desviat, B. Pérez, B. Mejía, M. Ugarte, M. Martínez-Pardo, Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: Evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin *Molecular Genetics and Metabolism* 86 (2005) 61-66.
- [31] A. Baldellou Vázquez, M.I. Salazar García-Blanco, M.P. Ruiz-Echarri Zalaya, C. Campos Calleja, L. Ruiz Desviat, M. Ugarte Pérez, Tratamiento de la hiperfenilalaninemia por déficit de fenilalanina hidroxilasa con tetrahidrobiopterina. ¿Cuándo y cómo? *Anales de Pediatría* 64 (2006) 146-152.
- [32] A. Ponzzone, F. Porta, A. Mussa, A. Alluto, S. Ferraris, M. Spada, Unresponsiveness to tetrahydrobiopterin of phenylalanine hydroxylase deficiency *Metabolism* 59 (2010) 645-652.
- [33] J.J. Mitchell, B. Wilcken, I. Alexander, C. Ellaway, H. O'Grady, V. Wiley, J. Earl, J. Christodoulou, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S81-85.
- [34] B. Fiege, N. Blau, Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria *J Pediatr* 150 (2007) 627-630.

Tabela 1 - Genótipo, Tipo de PKU dos pacientes e comparação dos resultados de responsividade obtidos no presente estudo com os descritos na literatura

Paciente	Tipo de PKU	Genótipo		Responsividade ao BH4 ^a (presente estudo)	Responsividade ao BH4 (Número de pacientes descritos) ^b	Protocolo utilizado na literatura ^c
		Alelo 1	Alelo 2			
1	Clássica	p.165T	p.R408W	R	R (2)	BH4(10mg) - 24h
2	Clássica	p.V388M	p.V388M	R	R (1) – Lento (1) ^d	BH4(20mg) - 24h
3	Clássica	p.165T	p.R176X	NR	nd	nd
4	Clássica	p.R252W	p.R261Q	NR	nd	nd
5	Clássica	p.165T	p.165T	NR	NR (1)	Phe(100mg)/BH4(20mg) - 8h
6	Leve	p.E390G	p.R408Q	R	nd	nd
7	Clássica	p.R261X	p.R176X	NR	nd	nd
8	Leve	p.R408W	c.165delT	NR	nd	nd
9	Leve	p.R408W	c.165delT	NR	nd	nd
10	Leve	p.E390G	p.A104D	R	nd	nd
11	Leve	p.R408W	p.L348V	NR	nd	nd
12	Leve	p.R408W	p.L348V	NR	nd	nd
13	Leve	p.A300S	p.L311P	R	nd	nd
14	Clássica	p.R408W	p.R408W	NR	NR(13) Lento (1) ^d	BH4(20mg) - 24h (13)/Outro (1)
15	Leve	p.R261Q	p.V388M	R	R (1)	BH4(10mg) - 8h
16	Leve	p.L249F	p.V388M	NR	NR (1)	BH4(20mg) - 24h
17	Clássica	c.165delT	?	NR	-	-
18	Leve	?	?	NR	-	-

PKU: fenilcetonúria; nd: não descrito; R: responsivo; NR: não responsivo. Pacientes da mesma irmandade: 8 e 9; 11 e 12.

^a Para ser considerado responsivo, o paciente deveria ter resultado positivo de acordo com pelo menos um dos critérios utilizados (critérios A, B e C).

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

^c Tipo de sobrecarga (quantidade de BH₄ por kg de peso atual) - tempo utilizado para critério de responsividade.

^d Pacientes que apresentaram redução dos níveis de Phe entre 20 e 30% após sobrecarga com BH₄

Tabela 2 – Responsividade ao BH₄: valores de Phe e áreas abaixo da curva encontradas no presente estudo (n= 18 pacientes)

Pacientes	Teste 1			Teste 2			Área abaixo da curva de Phe		Critério A (%)	Critério B (%)	Critério C (%)
	Phe (µmol/L)			Phe (µmol/L)			AAC1	AAC2			
	T1	T2	T3	T1	T2	T3					
Responsivos											
1	852	1032	949	1010	823	816	373,1	289,8	-39,6	-30,6	-22,3
2	1193	1314	849	939	895	639	435,2	297,2	-14,8	-3,1	-31,7
6	588	474	136	570	144	74,8	133,8	27,9	-55,3	-10	-79,1
10	522	372	113	612	127	58,4	103,1	19,3	-50,5	-12,1	-81,3
13	744	602	550	748	516	189	207,1	145,2	-11,9	-48,6	-29,9
15	657	822	589	819	498	355	281,6	153,1	-64,3	-46,3	-45,6
µ±dp	759±242	769±358	531±349	783±175*	500±324*	355±312*	255,6±132,0**	155,4±120,9**	-39,4±21,7	-25,1±19,5	-48,3±25,8
Não-responsivos											
3	1095	750	706	991	946	808	253,2	327,3	27	17	29,3
4	702	555	462	496	553	390	185,9	186,6	32,4	12,8	0,4
5	517	427	530	652	661	494	161,1	223,4	18,7	-26,7	38,6
7	816	775	617	634	696	542	263,5	239,5	14,8	9,9	-9,1
8	367	425	390	699	726	715	152,9	263	-11,9	-3,9	72
9	544	626	486	742	736	730	216,4	265,8	-15,8	9	22,8
11	836	655	613	608	513	418	225,7	172,6	6	-4,5	-23,5
12	991	925	717	1095	855	660	311,9	280,7	-15,2	-12	-10
14	711	562	296	587	421	197	171,3	123,6	-7,3	-8	-27,8
16	789	640	446	714	637	422	206,6	206,4	8,1	2,5	-0,1
17	790	810	799	1810	1787	1398	293,2	608,1	-3,8	-23,9	107,4
18	422	350	227	489	304	208	111,7	93,1	-20,8	-11,2	-16,7
µ±dp	715±220	625±172	524±174	793±367	736±375	582±323	212,8±60,0	249,2±131,0	2,6±17,8	-3,2±14	15,3±41,1

Phe: fenilalanina; Teste 1: sobrecarga simples de Phe; Teste 2: sobrecarga combinada de Phe+BH₄. Pacientes da mesma irmandade: 8 e 9; 11 e 12.

Critério A: [(PheTeste2T2 – PheTeste2T1/PheTeste2T1) x 100] - [(PheTeste1T2 – PheTeste1T1/PheTeste1T1) x 100].

Critério B: [(PheTeste2T3 – PheTeste2T1/PheTeste2T1) x 100] - [(PheTeste1T3 – PheTeste1T1/PheTeste1T1) x 100].

Critério C: [(AAC2 – AAC1)/AAC1 x 100].

Para ser considerado responsivo, o paciente deveria ter resultado positivo de acordo com pelo menos um dos critérios utilizados (critérios A, B e C).

T1 – ponto 1: Phe após 3h da sobrecarga de Phe; T2 – ponto 2: Phe após 11h da sobrecarga de Phe e 8h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2); T3 – ponto 3: Phe após 27h da sobrecarga de Phe e 24h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2); AAC1: Área abaixo da curva no Teste 1; AAC2: Área abaixo da curva no Teste 2.

*A variação de Phe entre T2 e T1, e entre T3 e T1 foi estatisticamente significativa (p= 0,002 e 0,011, respectivamente). ** Diferença estatisticamente significativa (p<0,01).

Tabela 3: Classificação de responsividade ao BH₄, de acordo com critérios avaliados no presente estudo

Pacientes	Critério A	Critério B	Critério C	Critério D	Critério E	Critério F ^a	Critério G ^a
1	R	R	NR	NR	NR	NR	R
2	NR	NR	R	NR	R	-	-
3	NR	NR	NR	NR	NR	R	R
4	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
5	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
6	R	NR	R	R	R	-	-
7	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
8	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
9	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
10	R	NR	R	R	R	-	-
11	NR	NR	NR	NR	R	R	R
12	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR
13	NR	R	NR	R	R	-	-
14	NR	NR	NR	NR	R	-	-
15	R	R	R	R	R	-	-
16	NR	NR	NR	NR	R	NR	NR
17	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
18	NR	NR	NR	R	R	-	-

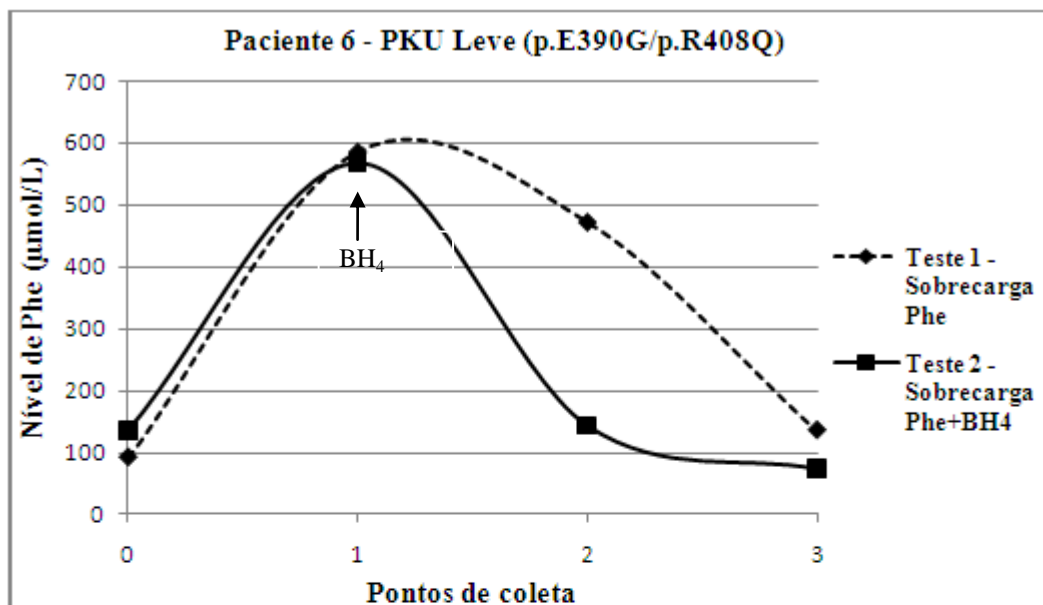
R= responsivo; NR= não-responsivo

A definição dos critérios é descrita no item metodologia deste artigo.

Pacientes da mesma irmandade: 8 e 9; 11 e 12.

^aDados relativos ao estudo Giugliani *et al* [23]

A)



B)

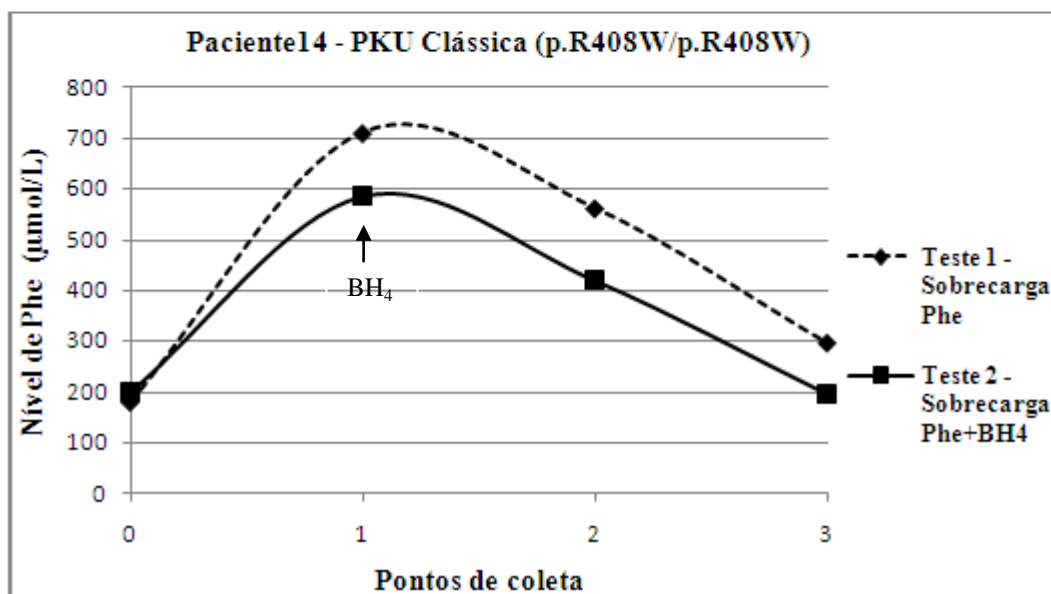


Figura 1: A) Representação da variação da Phe plasmática de um paciente classificado como responsivo ao BH_4 , de acordo com os pontos de coleta. B) Representação da variação da Phe plasmática de um paciente classificado como não responsivo ao BH_4 , de acordo com os pontos de coleta.

8. CONCLUSÕES

Objetivo Geral: Identificar, por meio de um protocolo envolvendo o teste de sobrecarga simples de Phe e o teste combinado de sobrecarga de Phe+BH₄, pacientes com HPA-PAH e bom controle metabólico que são responsivos à administração de dose única de BH₄ por via oral.

Foram considerados responsivos ao BH₄, através da comparação entre os testes de sobrecarga simples de Phe e sobrecarga combinada de Phe+BH₄, seis dos 18 (33%) pacientes que participaram do estudo, o que está de acordo com a literatura. Sendo assim, considera-se que uma parcela expressiva de pacientes com HPA-PAH brasileiros poderia ser beneficiada com a utilização do BH₄ como uma forma de tratamento dessa condição.

Objetivo específico 1: Comparar diferentes critérios de classificação de responsividade ao BH₄.

Os critérios A e B e o critério C foram considerados semelhantes entre si e parecem ser adequados para avaliar a responsividade ao BH₄ em pacientes em dieta restrita e bom controle metabólico. A não comparação entre a sobrecarga combinada de Phe+BH₄ e a sobrecarga simples de Phe (critérios D e E), não parece ser um bom método para avaliar a responsividade, pois superestima o número de pacientes considerados responsivos. Acrescenta-se ainda, que classificar um paciente de forma definitiva como não responsivo ao BH₄, pela utilização de um único critério, pode ser uma conduta precipitada. Sugere-se que a aplicação de mais de critério antes de estabelecer a não responsividade de um paciente, seja o mais adequado.

Objetivo específico 2: Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com o tipo de HPA-PAH apresentada pelo paciente.

Um maior número de pacientes com HPA-PAH Leve foram considerados responsivos ao BH₄, independente do critério utilizado no presente estudo. Contudo, pacientes com HPA-PAH Clássica também responderam positivamente ao BH₄, dessa forma, torna-se plausível a inclusão desses pacientes nos testes avaliação de responsividade.

Objetivo específico 3: Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com as mutações presentes no gene PAH.

Os achados do presente estudo referentes à genotipagem dos pacientes estão de acordo com o descrito na literatura disponível. O estudo cada vez mais amplo da associação entre responsividade ao BH₄ e o genótipo poderá talvez estabelecer o mesmo como um preditor fidedigno de classificação de responsividade ao BH₄.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Algumas considerações devem ser feitas em relação à escolha do protocolo de pesquisa de responsividade ao BH₄ utilizado nessa dissertação. Embora tenha sido necessária a presença do paciente, em nosso serviço, em dois momentos distintos (o que não é desejável para um teste de triagem), foi feita a opção pela realização de sobrecarga com L-Phe ao invés de Phe alimentar. Acreditamos que a realização de sobrecarga com Phe alimentar, havendo a possibilidade de realização de sobrecarga com L-Phe, não é um procedimento facilmente justificável do ponto de vista ético, principalmente em pacientes com controle metabólico adequado, uma vez que coloca os mesmos em contato com alimentos que não fazem parte da sua dieta habitual, como o leite em pó. Mesmo que a possibilidade de ocorrência de algum evento adverso neurológico associado ao aumento da Phe seja muito baixa (e, pelo menos teoricamente, não-dependente da origem da Phe utilizada na sobrecarga), outros eventos adversos (como os psicológicos) são, na nossa opinião, de maior probabilidade de ocorrência na sobrecarga de Phe alimentar (acreditamos, por exemplo, que esse último tipo de sobrecarga poderia afetar de forma negativa, findo o período do teste, o seguimento do tratamento convencional pelo paciente).

Por se tratar de um medicamento de alto custo, o BH₄ pode ser uma realidade distante para os pacientes com HPA-PAH brasileiros, haja vista as dificuldades existentes para incorporação de novas tecnologias de saúde no Sistema Único de Saúde. Sendo assim, talvez, no futuro, o BH₄ possa ser disponibilizado como opção de tratamento para pacientes com HPA-PAH brasileiros previamente identificados como responsivos em estudos semelhantes ao ora apresentado.

Em relação às dificuldades encontradas na realização deste estudo, frisamos o número elevado de diferentes protocolos utilizados na literatura e que, infelizmente, são, muitas vezes, sucintamente descritos nas publicações.

Como perspectivas, planejamos o desenvolvimento de outros estudos nesta área, tais como: avaliar a influência da administração de BH₄ nos níveis de citocinas de pacientes com HPA-PAH; explorar a atividade chaperona do BH₄ em estudos *in-vitro* envolvendo outras doenças genéticas metabólicas; realizar ensaio clínico utilizando o BH₄ em pacientes com HPA-PAH responsivos ao mesmo; e criar um registro nacional sobre pacientes com deficiência de BH₄.

ANEXO I - Ficha de Registro do Paciente

Nome do paciente/Número protocolo:

Data de Nascimento:

Sexo: () Feminino () Masculino

Estado Civil:

Naturalidade:

Nome do Pai:

Nome da Mãe:

Endereço Completo

Rua/Av: _____ No: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Celular: _____ Fax _____ e-mail: _____

Idade do Diagnóstico:

Nível de Phe ao diagnóstico:

Tipo de HPA:

Genótipo:

Número de dosagens realizadas no último ano e resultados:

Data	Phe (mg/dL)	Observação

Mediana e média de Phe plasmática no último ano:

Data/valor do último nível de Phe:

Dieta atualmente prescrita:

Usa algum tipo de medicamento: () Não

() Sim. Quais?

É gestante: () Não
() Sim

Tem envolvimento hepática clinicamente: () Não
() Sim

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

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

Data de realização do teste:

Peso:

Quantidade de Phe:

Quantidade de BH₄:

Resultados:

Coletas sobrecarga simples de Phe

Ponto de coleta	Valor Phe	Observações
0 (0 horas)		
1 (3 horas)		
2 (11 horas)		
3 (27 horas)		

Coletas com sobrecarga combinada de Phe+BH₄

Ponto de coleta	Valor Phe	Observações
0 (0 horas)		
1 (3 horas)		
2 (11 horas)		
3 (27 horas)		

ANEXO II – Modelo de Inquérito alimentar

INQUÉRITO ALIMENTAR

Nome Paciente: _____

DATA ___/___/___

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

ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Paciente

Projeto: Tratamento da Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase: avaliação da responsividade ao BH4 apresentada pelos pacientes do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA

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

Paciente: _____

Prezado paciente,

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

Esta pesquisa tem por objetivo a identificação de indivíduos responsivos à administração de dose única de BH4 por via oral. Esse estudo será realizado em pacientes com hiperfenilalaninemia por deficiência da fenilalanina hidroxilase em tratamento no Ambulatório de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), que apresentem a maioria dos seus níveis de

fenilalanina inferiores a 10 mg/dL nos últimos doze meses, que tenham no mínimo 4 anos de idade, que não apresentem problemas no fígado, que não tenham alergia a algum dos componentes do BH₄, que não estejam também tomando alguns medicamentos específicos, e que, no caso do sexo feminino, não sejam gestantes.

Caso você decida participar dessa pesquisa, será necessário que você (paciente) permaneça um dia e meio em duas semanas consecutivas no HCPA fazendo avaliações (total: 3 dias). No início do primeiro dia, você será submetido à coleta de 4 mL de sangue para dosagem de fenilalanina (em jejum; este é o momento 0). Logo após a coleta, você deverá ingerir uma dose única de 100 mg/kg de fenilalanina na forma de comprimido. Novas coletas de 4mL de sangue serão realizadas 3 horas (momento 1), 11 horas (momento 2) e 27 horas (momento 3) após a ingestão da fenilalanina, para dosagem da mesma.

Na segunda semana, você será submetido à coleta de 4mL de sangue para dosagem de fenilalanina (em jejum; momento 0). Logo após a coleta, você deverá ingerir novamente uma dose única de 100 mg/kg de fenilalanina, após 3 horas nova coleta de 4mL de sangue (momento 1) será realizada e em seguida você deverá ingerir 20mg/kg de BH₄ (cada comprimido de BH₄ tem 100 mg; este é o único momento do estudo no qual será administrado o medicamento). Novas coletas de 4mL de sangue serão realizadas 8 horas (momento 2) e 24 horas (momento 3), para dosagem de fenilalanina.

Durante todo o período do estudo, você deverá alimentar-se da maneira usual, ou seja, como você faz normalmente durante todos os outros dias, inclusive usando a sua fórmula metabólica.

Também serão revisados dados do seu histórico médico, presentes no seu prontuário, e que auxiliarão os pesquisadores deste estudo a entender os resultados obtidos. Os resultados das suas medidas de fenilalanina serão comunicados a você assim que estiverem disponíveis (imagina-se que no máximo até 3 meses após a realização do teste).

RISCOS E DESCONFORTOS

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

As pessoas que usam BH₄ e fazem sobrecarga de fenilalanina não costumam apresentar efeitos adversos, mas, assim como acontece com qualquer medicamento, reações

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

CUSTOS

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

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

AUTORIZAÇÕES

Você (paciente) autorizou:

1) A coleta de 4mL de sangue nos pontos de hora: 0/3/11/27h (momentos 0, 1, 2 e 3) na primeira semana do estudo (lembre que será realizada sobrecarga de fenilalanina entre os momentos 0 e 1).

() Sim

() Não

2) A coleta de 4mL de sangue nos pontos de hora: 0/3/11/27h (momentos 0, 1, 2 e 3), na segunda semana do estudo (lembre que será realizada sobrecarga de fenilalanina entre os momentos 0 e 1 e de BH4 entre os momentos 1 e 2).

() Sim

() Não

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

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

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

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

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

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz (Fone: 51- 99017418 ou 3359-8011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

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

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

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

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

Data: ___/___/_____

Assinatura do paciente: _____

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

Data: ___/___/_____

Nome: _____

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

ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes com idade inferior a 18 anos ou com necessidades especiais.

Projeto: Tratamento da Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase: avaliação da responsividade ao BH4 apresentada pelos pacientes do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA

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

Paciente: _____

Prezados pais ou responsáveis,

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

Esta pesquisa tem por objetivo a identificação de indivíduos responsivos à administração de dose única de BH4 por via oral. Esse estudo será realizado em pacientes com hiperfenilalaninemia por deficiência da fenilalanina hidroxilase em tratamento no Ambulatório de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), que apresentem a maioria dos seus níveis de

fenilalanina inferiores a 10 mg/dL nos últimos doze meses, que tenham no mínimo 4 anos de idade, que não apresentem problemas no fígado, que não tenham alergia a algum dos componentes do BH₄, que não estejam também tomando alguns medicamentos específicos, e que, no caso do sexo feminino, não sejam gestantes. Esse é o caso de seu(sua) filho(a).

Caso o Sr. (a) decida que seu(sua) filho(a) participe da pesquisa, será necessário que o mesmo permaneça, acompanhado de um responsável um dia e meio em duas semanas consecutivas no HCPA fazendo avaliações (total: três dias). Na primeira semana, seu(sua) filho(a) será submetido à coleta de 4 mL de sangue para dosagem de fenilalanina (em jejum; este é o momento 0). Logo após a coleta, seu(sua) filho(a) deverá ingerir uma dose única de 100 mg/kg de fenilalanina, na forma de comprimido. Novas coletas de 4mL de sangue serão realizadas 3 horas (momento 1), 11 horas (momento 2) e 27 horas (momento 3) após a ingestão da fenilalanina, para dosagem da mesma.

Na segunda semana, seu(sua) filho(a) será submetido à coleta de 4mL de sangue para dosagem de fenilalanina (em jejum; momento 0). Logo após a coleta, o mesmo deverá ingerir novamente uma dose única de 100 mg/kg de fenilalanina, após 3 horas nova coleta de 4mL de sangue (momento 1) será realizada e em seguida o mesmo deverá ingerir 20mg/kg de BH₄ (cada comprimido de BH₄ tem 100 mg; este é o único momento do estudo no qual será administrado o medicamento). Novas coletas de 4mL de sangue serão realizadas 8 horas (momento 2) e 24 horas (momento 3), para dosagem de fenilalanina.

Durante todo o período do estudo, seu(sua) filho(a) deverá alimentar-se da maneira usual, ou seja, como faz normalmente durante todos os outros dias, inclusive usando a sua fórmula metabólica.

Também serão revisados dados do histórico médico do seu(sua) filho(a), presentes no seu prontuário, e que auxiliarão os pesquisadores deste estudo a entender os resultados obtidos. Os resultados das suas medidas de fenilalanina serão comunicados ao Sr.(a) assim que estiverem disponíveis (imagina-se que no máximo até 3 meses após a realização do teste).

RISCOS E DESCONFORTOS

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

As pessoas que usam BH₄ e fazem sobrecarga de fenilalanina não costumam apresentar efeitos adversos, mas, assim como acontece com qualquer medicamento, reações

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

CUSTOS

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

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

AUTORIZAÇÕES

Você (pai ou responsável) autorizou:

1) A coleta de 4mL de sangue de seu(sua) filho(a) nos pontos de hora: 0/3/11/27h (momentos 0, 1, 2 e 3) na primeira semana do estudo (lembre que será realizada sobrecarga de fenilalanina entre os momentos 0 e 1).

() Sim

() Não

2) A coleta de 4mL de sangue de seu(sua) filho(a) nos pontos de hora: 0/3/11/27h (momentos 0, 1, 2 e 3), na segunda semana do estudo (lembre que será realizada sobrecarga de fenilalanina entre os momentos 0 e 1 e de BH₄ entre os momentos 1 e 2).

() Sim

() Não

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

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

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

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

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz (Fone: 51- 99017418 ou 3359-8011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

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

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

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

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

Nome do paciente: _____

Data: ___/___/_____

Assinatura do responsável legal: _____

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

Data: ____/____/____

Nome: _____

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

ANEXO V – Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO****COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100048**Versão do Projeto:** 18/04/2010**Versão do TCLE:** 13/05/2010**Pesquisadores:**

INGRID DALIRA SCHWEIGERT

MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA

ROBERTO GIUGLIANI

CARMEN REGLA VARGAS


TATIELE NALIN

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

Título: Tratamento da Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase: avaliação da responsividade ao BH4 apresentada pelos pacientes do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 19 de maio de 2010.



Prof. Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO VI – Valores de fenilalanina plasmática dos pacientes e diferença entre pontos de coleta em mg/dL, nos testes 1 e 2

Pacientes	Idade (anos)	Teste 1							Teste 2						
		Níveis de Phe (mg/dL)				Diferença entre pontos (mg/dL)			Níveis de Phe (mg/dL)				Diferença entre pontos (mg/dL)		
		Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Pontos T0 - T1	Pontos T1 - T2	Pontos T1 - T3	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Pontos T0 - T1	Pontos T1 - T2	Pontos T1 - T3
1	30	3,9	14,1	17,1	15,7	10,2	3	1,6	9,4	16,7	13,6	13,5	7,3	-3,1	-3,2
2	12	7,0	19,7	21,7	14,0	12,7	2	-5,7	8,9	15,5	14,8	10,6	6,6	-0,7	-4,9
3	11	7,5	18,1	12,4	11,7	10,6	-5,7	-6,4	10,6	16,4	15,6	13,4	5,8	-0,8	-3
4	9	3,8	11,6	9,2	7,6	7,8	-2,4	-4	2,0	8,2	9,1	6,4	6,2	0,9	-1,8
5	31	1,8	8,5	7,1	8,8	6,7	-1,4	0,3	2,8	10,8	10,9	8,2	8	0,1	-2,6
6	15	1,5	9,7	7,8	2,2	8,2	-1,9	-7,5	2,3	9,4	2,4	1,2	7,1	-7	-8,2
7	12	6,5	13,5	12,8	10,2	7	-0,7	-3,3	4,7	10,5	11,5	9,0	5,8	1	-1,5
8	17	1,1	6,1	7,0	6,4	5	0,9	0,3	6,1	11,6	12,0	11,8	5,5	0,4	0,2
9	11	2,9	9,0	10,3	8,0	6,1	1,3	-1	7,6	12,3	12,2	12,1	4,7	-0,1	-0,2
10	10	2,0	8,6	6,1	1,9	6,6	-2,5	-6,7	2,8	10,1	2,1	1,0	7,3	-8	-9,1
11	23	5,8	13,8	10,8	10,1	8	-3	-3,7	3,9	10,0	8,5	6,9	6,1	-1,5	-3,1
12	19	7,9	16,4	15,3	11,9	8,5	-1,1	-4,5	10,1	18,1	14,1	10,9	8	-4	-7,2
13	9	1,9	12,3	10,0	9,1	10,4	-2,3	-3,2	4,6	12,4	8,5	3,1	7,8	-3,9	-9,3
14	10	3,0	11,8	9,3	4,9	8,8	-2,5	-6,9	3,3	9,7	7,0	3,3	6,4	-2,7	-6,4
15	13	3,9	10,9	13,6	9,7	7	2,7	-1,2	5,2	13,5	8,2	5,9	8,3	-5,3	-7,6
16	10	5,8	13,0	10,6	7,4	7,2	-2,4	-5,6	4,8	11,8	10,5	7,0	7	-1,3	-4,8
17	13	7,0	13,1	13,4	13,2	6,1	0,3	0,1	7,6	29,9	29,5	23,1	22,3	-0,4	-6,8
18	6	2,6	7,0	5,8	3,8	4,4	-1,2	-3,2	2,5	8,1	5,0	3,4	5,6	-3,1	-4,7
μ		4,2	12,1	11,1	8,7	7,8	-0,9	-3,3	5,5	13,1	10,9	8,4	7,5	-2,1	-4,7
dp		2,3	3,7	4,1	3,9	2,1	2,2	2,8	2,9	5,1	6,1	5,4	3,8	2,6	3,0

Phe: fenilalanina; μ: média; dp: desvio padrão.

Teste 1: sobrecarga simples de Phe; Teste 2: sobrecarga combinada de Phe+BH₄;

Pacientes da mesma irmandade: 8 e 9; 11 e 12.

Ponto T0: Phe basal; Ponto T1: Phe após 3h da sobrecarga de Phe; Ponto T2: Phe após 11h da sobrecarga de Phe e 8h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2); Ponto T3: Phe após 27h da sobrecarga de Phe e 24h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2).

ANEXO VII – Valores de fenilalanina plasmática dos pacientes e diferença entre pontos de coleta em mg/dL de acordo com a responsividade ao BH₄ (através dos critérios A, B e C), nos testes 1 e 2

Pacientes	Teste 1							Teste 2						
	Níveis de Phe (mg/dL)				Diferença entre pontos (mg/dL)			Níveis de Phe (mg/dL)				Diferença entre pontos (mg/dL)		
	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Pontos T0 - T1	Pontos T1 - T2	Pontos T1 - T3	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Pontos T0 - T1	Pontos T1 - T2	Pontos T1 - T3
Responsivos														
1	3,9	14,1	17,1	15,7	10,2	3	1,6	9,4	16,7	13,6	13,5	7,3	-3,1	-3,2
2	7,0	19,7	21,7	14,0	12,7	2	-5,7	8,9	15,5	14,8	10,6	6,6	-0,7	-4,9
6	1,5	9,7	7,8	2,2	8,2	-1,9	-7,5	2,3	9,4	2,4	1,2	7,1	-7	-8,2
10	2,0	8,6	6,1	1,9	6,6	-2,5	-6,7	2,8	10,1	2,1	1,0	7,3	-8	-9,1
13	1,9	12,3	10,0	9,1	10,4	-2,3	-3,2	4,6	12,4	8,5	3,1	7,8	-3,9	-9,3
15	3,9	10,9	13,6	9,7	7	2,7	-1,2	5,2	13,5	8,2	5,9	8,3	-5,3	-7,6
μ	3,4	12,6	12,7	8,8	9,2	0,2	-3,8	5,5	12,9	8,3	5,9	7,4	-4,7	-7,0
dp	2,0	4,0	5,9	5,8	2,3	2,6	3,5	3,0	2,9	5,4	5,2	0,6	2,7	2,5
Não Responsivos														
3	7,5	18,1	12,4	11,7	10,6	-5,7	-6,4	10,6	16,4	15,6	13,4	5,8	-0,8	-3
4	3,8	11,6	9,2	7,6	7,8	-2,4	-4	2,0	8,2	9,1	6,4	6,2	0,9	-1,8
5	1,8	8,5	7,1	8,8	6,7	-1,4	0,3	2,8	10,8	10,9	8,2	8	0,1	-2,6
7	6,5	13,5	12,8	10,2	7	-0,7	-3,3	4,7	10,5	11,5	9,0	5,8	1	-1,5
8	1,1	6,1	7,0	6,4	5	0,9	0,3	6,1	11,6	12,0	11,8	5,5	0,4	0,2
9	2,9	9,0	10,3	8,0	6,1	1,3	-1	7,6	12,3	12,2	12,1	4,7	-0,1	-0,2
11	5,8	13,8	10,8	10,1	8	-3	-3,7	3,9	10,0	8,5	6,9	6,1	-1,5	-3,1
12	7,9	16,4	15,3	11,9	8,5	-1,1	-4,5	10,1	18,1	14,1	10,9	8	-4	-7,2
14	3,0	11,8	9,3	4,9	8,8	-2,5	-6,9	3,3	9,7	7,0	3,3	6,4	-2,7	-6,4
16	5,8	13,0	10,6	7,4	7,2	-2,4	-5,6	4,8	11,8	10,5	7,0	7	-1,3	-4,8
17	7,0	13,1	13,4	13,2	6,1	0,3	0,1	7,6	29,9	29,5	23,1	22,3	-0,4	-6,8
18	2,6	7,0	5,8	3,8	4,4	-1,2	-3,2	2,5	8,1	5,0	3,4	5,6	-3,1	-4,7
μ	4,6	11,8	10,3	8,7	7,2	-1,5	-3,2	5,5	13,1	12,2	9,6	7,6	-1,0	-3,5
dp	2,4	3,6	2,9	2,9	1,7	1,9	2,6	2,9	6,1	6,2	5,3	4,7	1,6	2,5

Phe: fenilalanina; μ: média; dp: desvio padrão; Teste 1: sobrecarga simples de Phe; Teste 2: sobrecarga combinada de Phe+ BH₄;

Pacientes da mesma irmandade: 8 e 9; 11 e 12.

Para ser considerado responsivo, o paciente deveria ter resultado positivo de acordo com pelo menos um dos critérios utilizados (critérios A, B e C).

Ponto T0: Phe basal; Ponto T1: Phe após 3h da sobrecarga de Phe; Ponto T2: Phe após 11h da sobrecarga de Phe e 8h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2); Ponto T3: Phe após 27h da sobrecarga de Phe e 24h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2).

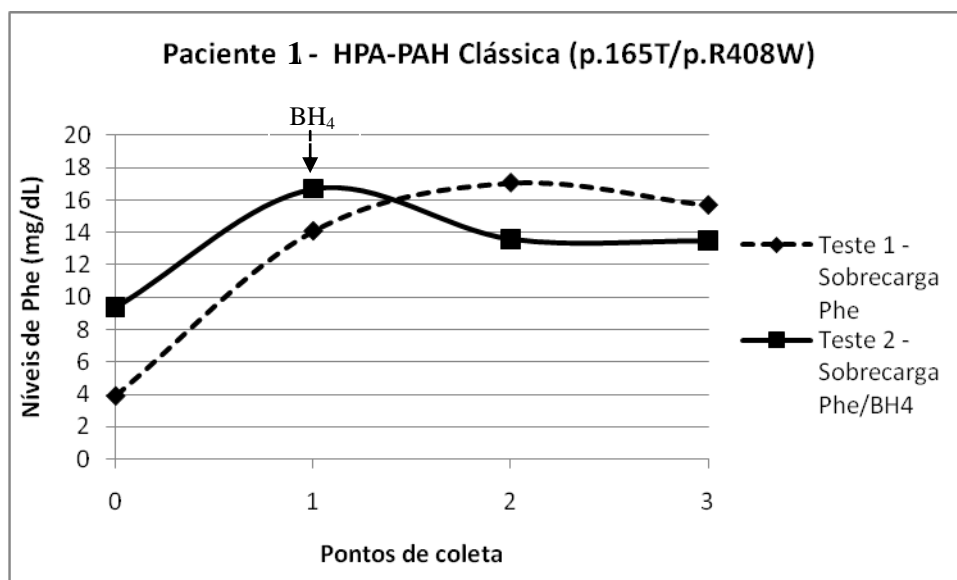
ANEXO VIII – Valores apresentados pelos pacientes de neopterinas, biopeterinas+pterinas e % de biopterinas de acordo com o ponto de coleta no teste 2

Pacientes	Neopterinas (nmol/g Hb)				Biopterinas + Pterinas (nmol/g Hb)				% de Biopterinas			
	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3	Ponto T0	Ponto T1	Ponto T2	Ponto T3
1	0,38	0,4	0,46	0,45	1,01	2,04	2,48	1,45	72,74	83,78	84,37	76,38
2	0,58	0,57	0,58	0,5	1,42	3,51	4,08	2,18	71	86,04	87,63	81,5
3	0,45	0,55	0,64	0,56	1,06	2,86	2,89	1,82	70,32	83,96	81,83	76,4
4	0,32	0,4	0,58	0,47	0,66	1,75	3,33	1,12	67,56	81,21	85,26	70,23
5	0,2	0,25	0,25	0,26	1,2	1,43	10,19	1,55	85,95	84,97	97,58	85,85
6	0,26	0,26	0,32	0,27	0,8	0,97	3,08	1,3	75,75	78,66	90,53	82,99
7	0,29	0,28	0,39	0,44	0,83	1,53	2,6	1,08	73,87	84,79	86,83	71,13
8	0,48	0,42	0,59	0,39	0,97	1,2	7,33	2,1	66,72	73,91	92,53	81,21
9	0,39	0,41	0,62	0,48	1,42	2,04	4,02	1,86	78,41	83,39	86,56	79,52
10	0,51	0,41	0,47	0,53	0,64	1,13	2,49	0,75	55,82	73,21	84,06	58,58
11	0,25	0,27	0,3	0,26	0,59	3	3,3	1,3	70,58	91,82	91,73	83,48
12	0,43	0,45	0,51	0,59	0,75	1,98	4,32	1,36	63,48	81,49	89,5	69,83
13	0,51	0,4	0,45	0,4	1,07	1,59	2,38	0,95	67,87	80,04	84,02	70,4
14	0,24	0,23	0,41	0,33	0,47	0,87	3,43	1,09	66,65	78,94	89,29	76,8
15	0,27	0,31	0,32	0,33	0,93	1,38	2,66	1,21	77,18	81,82	89,11	78,67
16	0,43	0,49	0,57	0,5	1,51	2,71	2,97	1,67	77,75	84,79	84,02	77
17	0,31	0,34	0,36	0,37	1,68	1,48	3,44	1,94	84,28	81,2	90,62	83,91
18	0,21	0,21	0,25	0,26	0,3	0,62	1,28	0,8	58,21	74,96	83,82	75,68
μ	0,36	0,37	0,45	0,41	0,96	1,78	3,68	1,42	71,34	81,61	87,74	76,64
dp	0,12	0,11	0,13	0,11	0,38	0,80	2,04	0,43	7,97	4,61	3,99	6,71

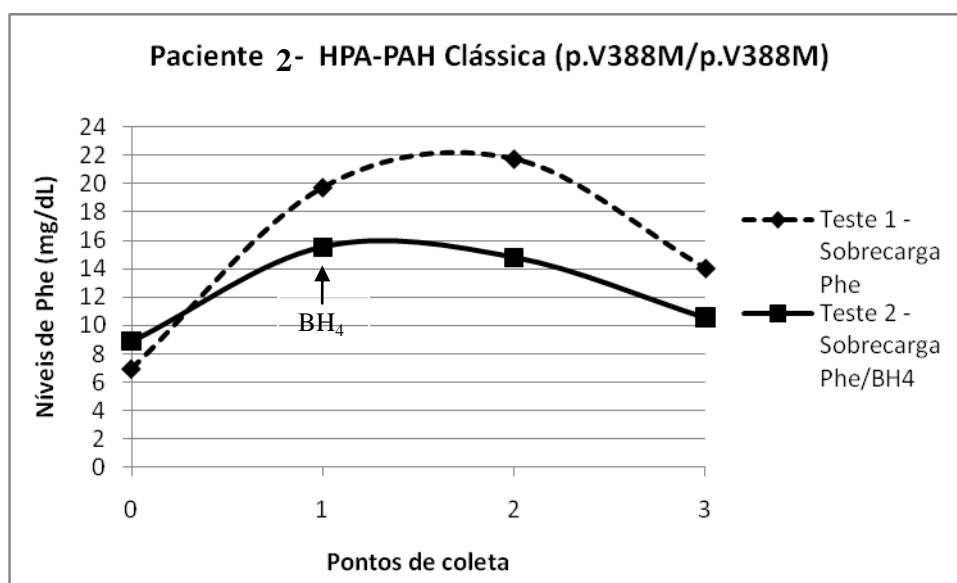
μ: média; dp: desvio padrão

PontoT 0: Phe basal; Ponto T1: Phe após 3h da sobrecarga de Phe; Ponto T2: Phe após 11h da sobrecarga de Phe e 8h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2); Ponto T3: Phe após 27h da sobrecarga de Phe e 24h após sobrecarga de BH₄ (Teste 2).

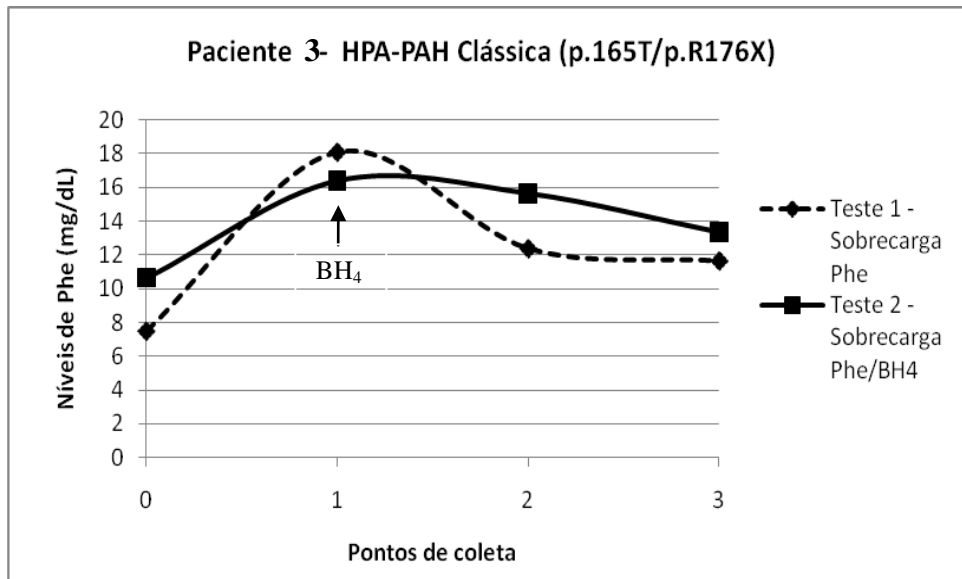
ANEXO IX – Gráficos de valores de fenilalanina plasmática apresentados pelos pacientes, de acordo com o ponto de coleta, nos testes 1 (sobrecarga Phe) e 2 (sobrecarga Phe+BH₄).



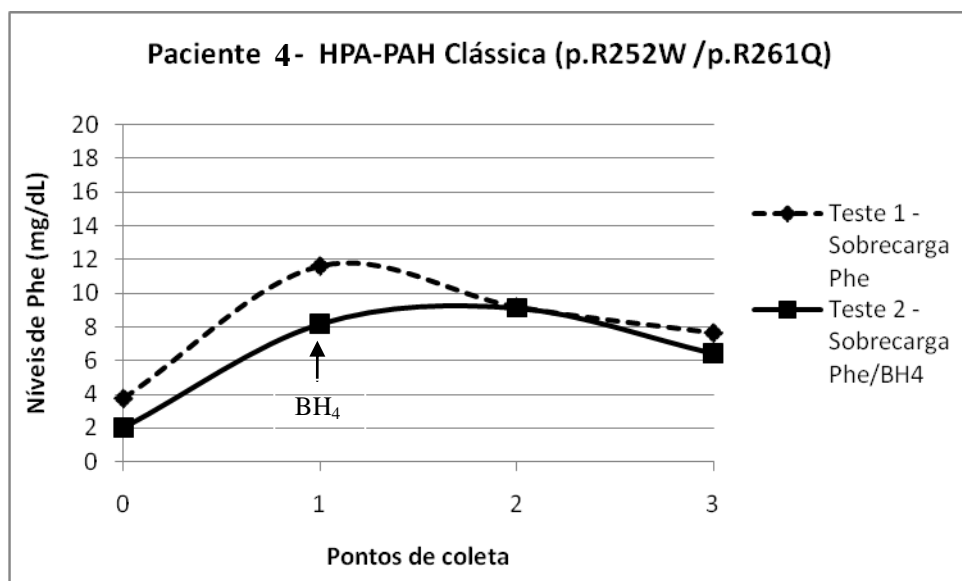
Paciente considerado responsivo ao BH₄.



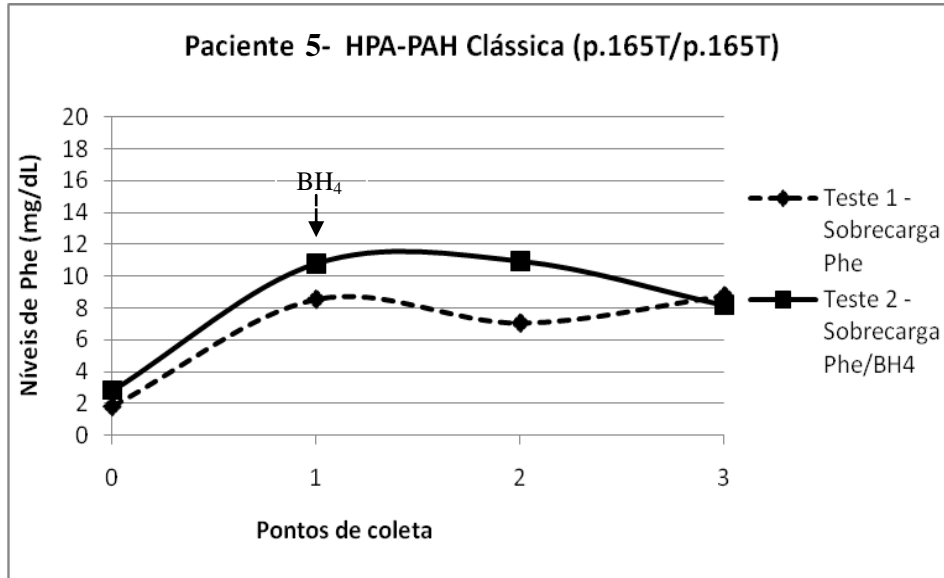
Paciente considerado responsivo ao BH₄.



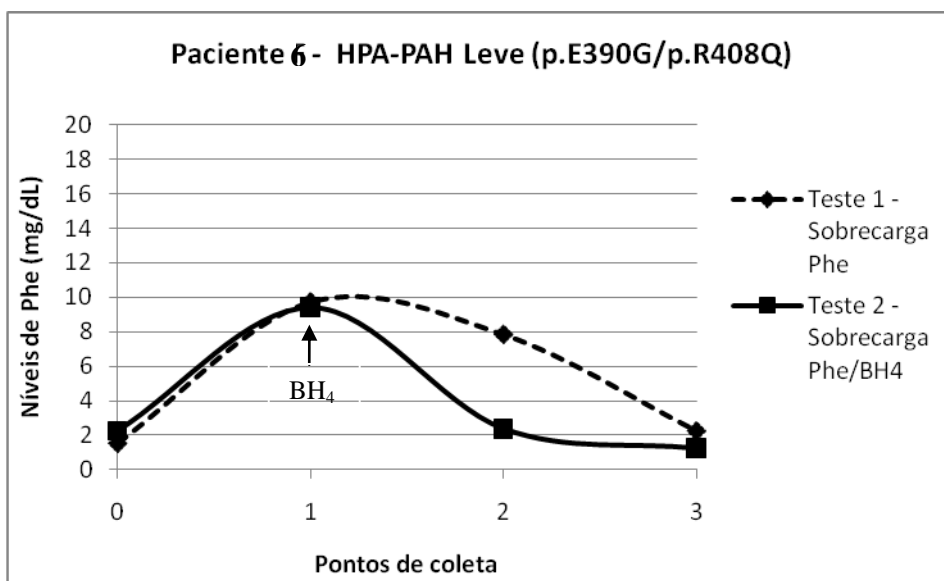
Paciente considerado não responsivo ao BH₄.



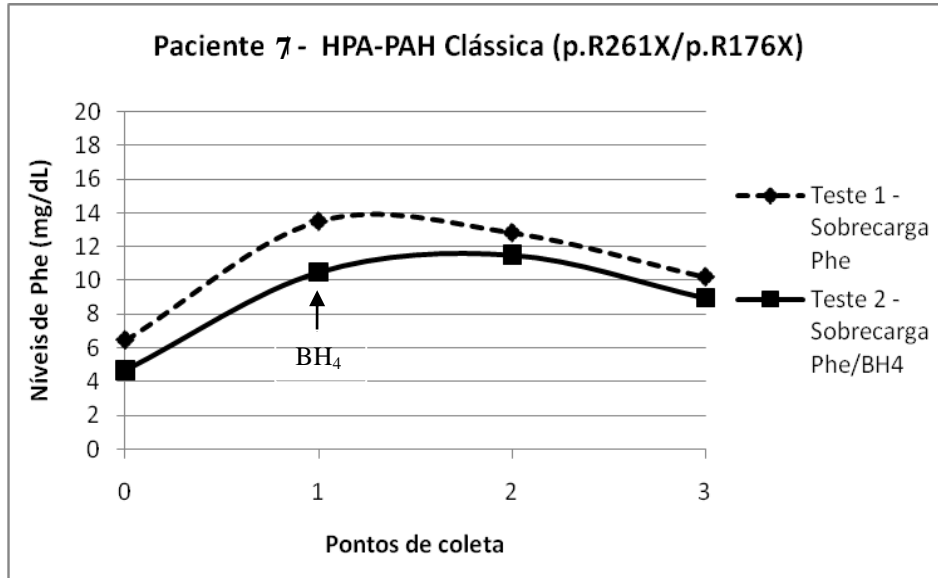
Paciente considerado não responsivo ao BH₄.



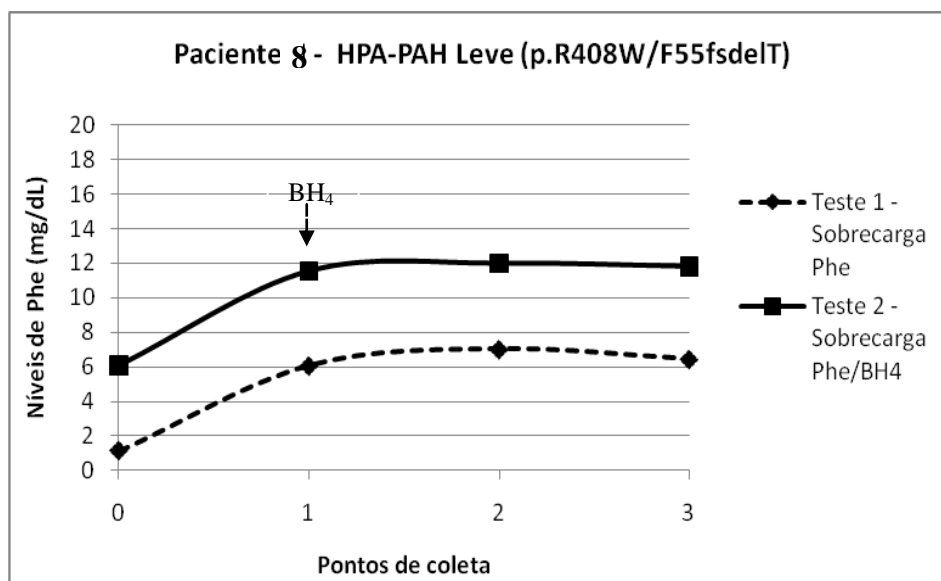
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



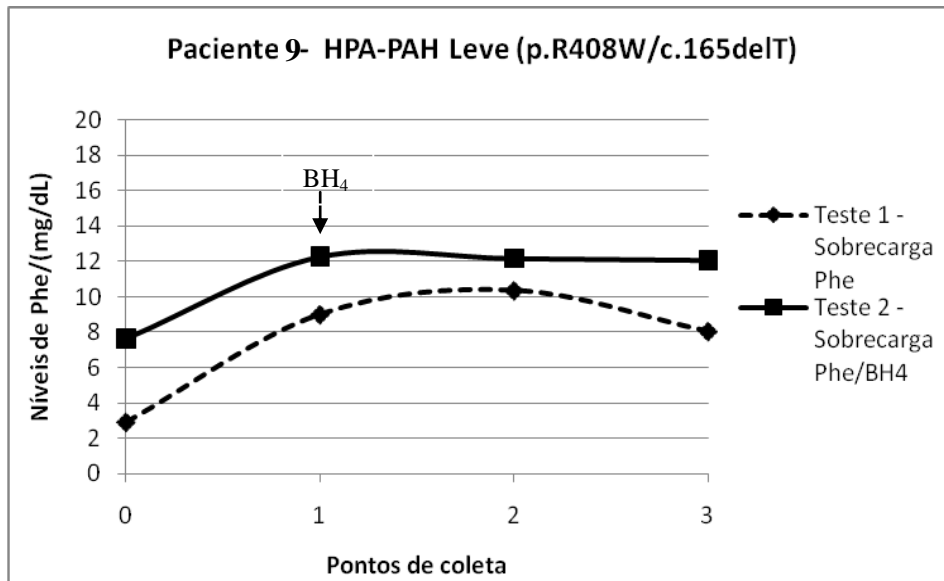
Paciente considerado responsivo ao BH_4 .



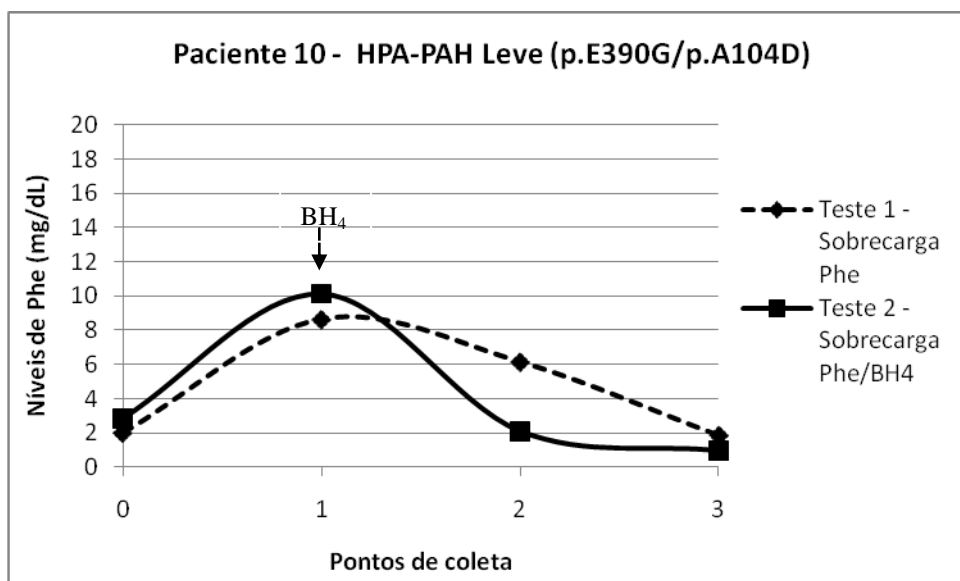
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



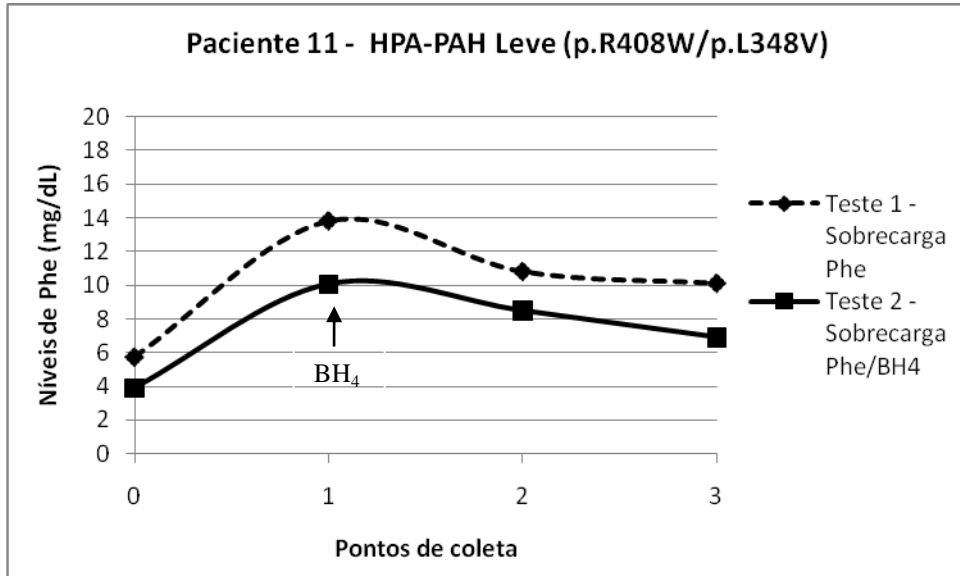
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



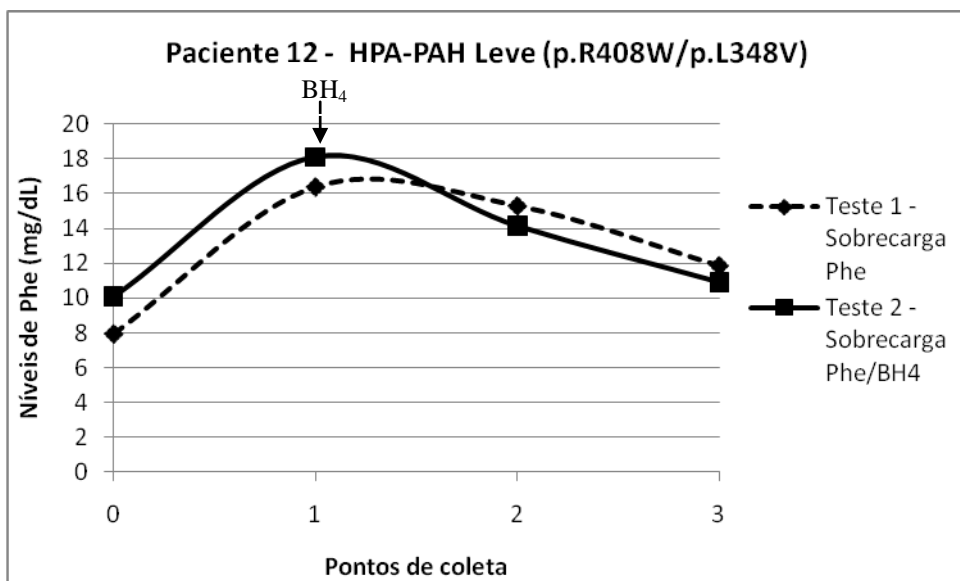
Paciente considerado não responsivo ao BH₄.



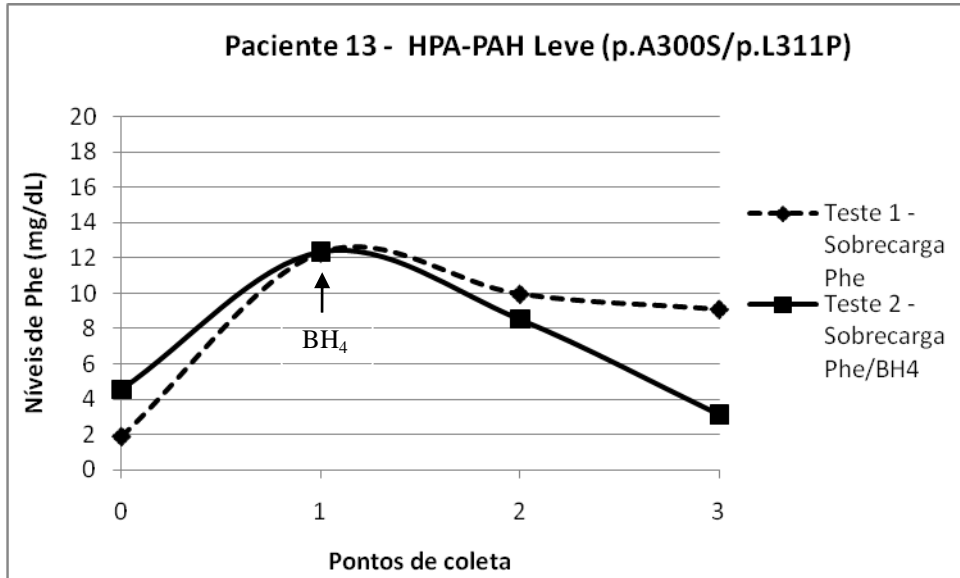
Paciente considerado responsivo ao BH₄.



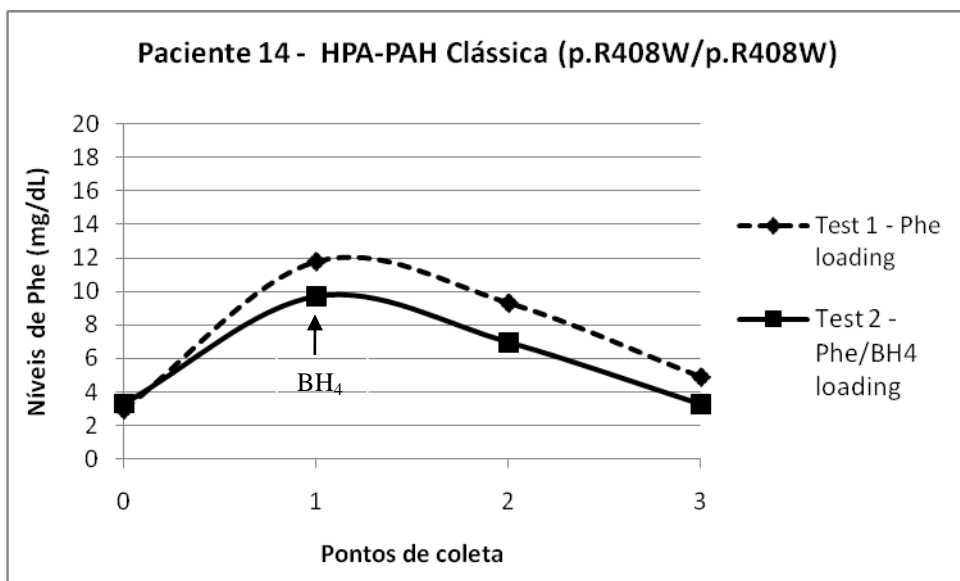
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



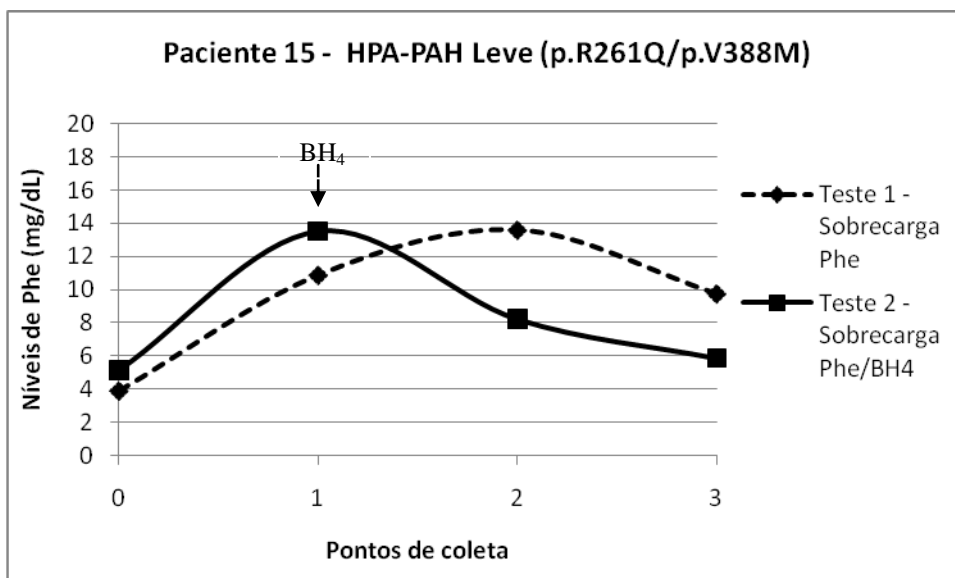
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



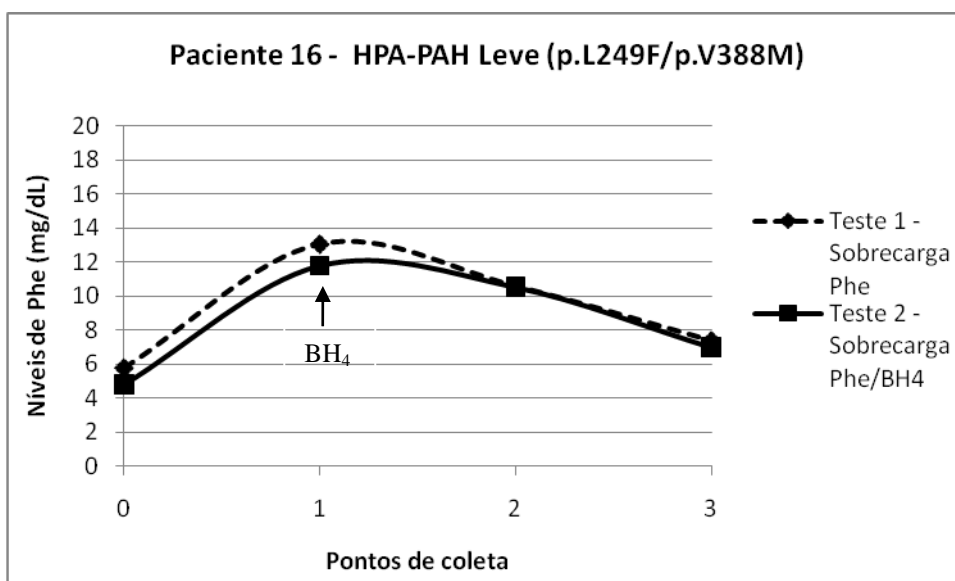
Paciente considerado responsivo ao BH_4 .



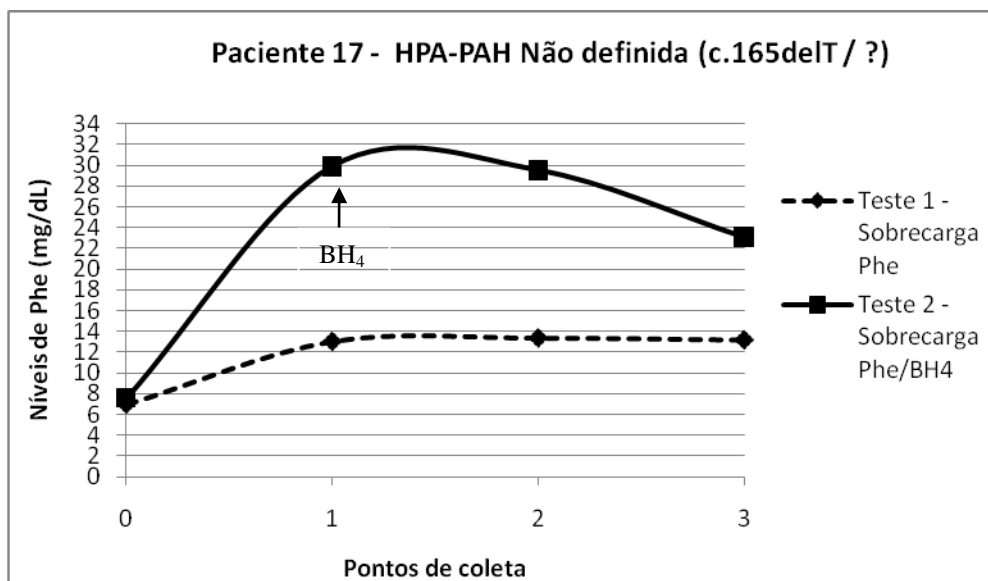
Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



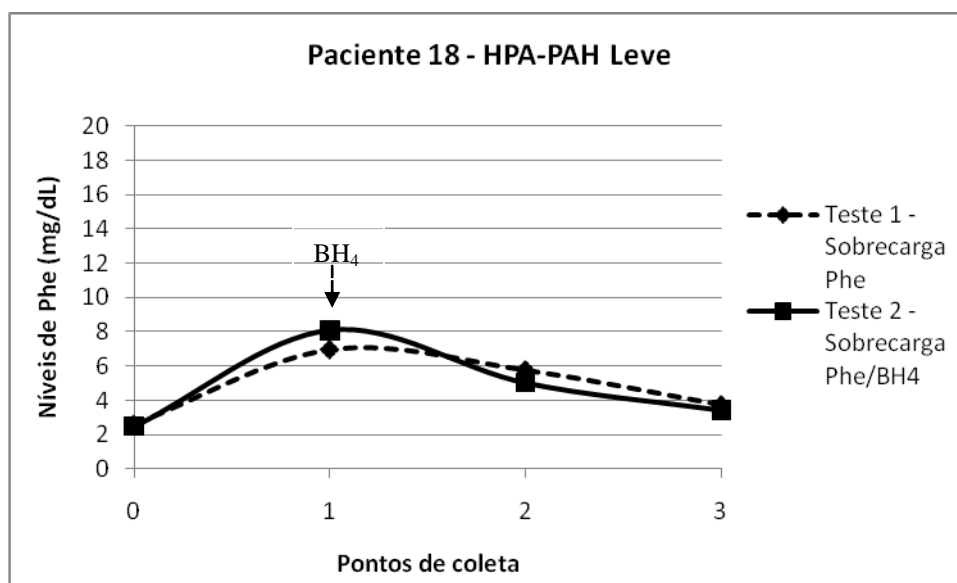
Paciente considerado responsivo ao BH_4 .



Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .



Paciente considerado não responsivo ao BH_4 .