UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

MÉDICAS: PEDIATRIA

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA TRIAGEM NEONATAL PARA FENILCETONÚRIA NO RIO GRANDE DO SUL – 1986-2003: UM ESTUDO DE COORTE

SIMONE DE MENEZES KARAM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2004

K18a Karam, Simone de Menezes

Avaliação epidemiológica da triagem neonatal para fenilcetonúria no Rio Grande do Sul – 1986-2003 : um estudo de coorte / Simone de Menezes Karam ; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Laura Bannach Jardim. – 2004.

119 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Fenilcetonúrias : Diagnóstico 2. Recém-nascido 3. Estudos de coortes 4. Rio Grande do Sul I. Giugliani, Roberto II. Jardim, Laura Bannach III.Título.

NLM: WD 205.5.A5

Catalogação Biblioteca FAMED/HCPA

“ Curar, às vezes

aliviar freqüentemente,

confortar sempre,

prevenir esperançosamente”

Ambrose Paré

Agradecimentos

A todos os pacientes entrevistados e suas famílias o meu profundo agradecimento e a minha esperança de que um dia a ciência lhes traga algo melhor.

Aos meus orientadores Roberto e Laura,

demorou, é verdade, mas não poderia ser diferente. Quando o vi em meus braços entendi que a partir dali viveria de outra forma, pois minha vida já não era só minha e meu tempo muito menos me pertencia. A clínica, os alunos, a pesquisa, tudo passou a ter uma outra dimensão. Talvez tenha perdido "tempo", alguma oportunidade ou deixado de produzir. Contudo, esse tempo foi também de refletir, refletir sobre o ensinar e o educar que tanto encantam e que na minha opinião devem ser também motivo para buscar este título. Ainda assim, isso poderia ser postergado, mas não o primeiro sorriso, os primeiros passos, o colo ou as horas amamentando.

Aprendi muito com vocês e com seus diferentes estilos.

Obrigada pela compreensão e, é claro, pela orientação.

Ao Bernardo, que ao longo de nossa convivência me têm sido um exemplo, sobretudo profissional e companheiro nesses momentos finais e decisivos "de mestranda".

Do casamento de um epidemiologista e uma geneticista só poderia nascer uma avaliação epidemiológica sobre uma doença rara. Que a vida continue a nos aproximar!

Aos meus pais, sempre incentivadores, independentemente da ausência ou da distância e apesar de toda idade sempre querendo descobrir e entender meu trabalho e minhas escolhas.

Aos meus quatro irmãos, pois minha vida seria muito vazia sem dividir com eles os sonhos e as expectativas de nossas diferentes profissões.

A Ida Vanessa Schwartz, colega e amiga com quem divido as alegrias, as angústias e as esperanças dessa especialidade que escolhemos pra viver.

À minha mãe Ruth, a Maria Júlia e especialmente a Gessi ("dadá") que cuidaram do meu filho com muito afeto, permitindo horas de tranqüilidade para eu findar este estudo.

Ao CTN Diagnósticos e sua equipe, em especial a Adriana Brittes pelo acesso aos dados e o incansável esclarecimento de dúvidas.

Ao Laboratório de Rastreamento Neonatal - Faculdade de Farmácia – UFRGS, também pelo acesso aos dados e especialmente a Ana Stela Goldbeck e Mara Moreira, pela atenção e disponibilidade incondicionais do início ao fim deste estudo.

Ao colega Ricardo Flores Pires que permitiu meu "trânsito livre" pelo Ambulatório de Fenilcetonúria do HCPA, possibilitando entrevistar e rever antigos pacientes.

A Lília Farret Refosco, nutricionista do Ambulatório de Fenilcetonúria – HCPA, pelo empenho em me ajudar a localizar alguns pacientes e também pela sua amizade.

Ao Centro de Referência Estadual para Triagem Neonatal/HMIPV, Dra. Paula Regla Vargas e Michele Saraiva, que, com extrema presteza permitiram o meu acesso aos pacientes daquele Serviço e sempre estiveram disponíveis a inúmeras informações.

Terminar uma dissertação, uma tese, "coisas do gênero" exige sempre muita dedicação por parte de quem a projeta, executa e por fim escreve. Porém, esse tipo de trabalho também se constrói com a colaboração de inúmeras pessoas, seja na sua função ou freqüentemente desviando-se dela e atendendo a um favor. A todas essas pessoas meu sincero obrigada:

Silvia Brustolin (SIEIM), Camila Giugliani, Zeniara Soares Lompa, Janice Carneiro Coelho, Denize Zandoná, Jacira Purper, Valdenize Ribeiro, Aline Lompa, Gustavo Boff Megawa, Rosane Blanguer (secretária PPG-Ped), Centro de Pesquisas Epidemiológicas – UFPel, aos grandes companheiros Lea, Cariri, Silvinha e Richie.

Dedicado aos meus filhos, Alexandre, que no começo disso tudo me veio trazendo uma outra percepção da vida, e Camila, chegando ao final para trazer um pouco de inspiração.

Resumo

A fenilcetonúria clássica (PKU), que afeta 1: 10.000 nascimentos em populações caucasianas, é um erro inato do metabolismo determinado pela deficiência da enzima hepática fenilalaninahidroxilase (PAH), com o conseqüente bloqueio na conversão de fenilalanina (Phe) em Tirosina (Tyr) e aumento da concentração plasmática de Phe. A PKU foi descrita há 70 anos pelo médico norueguês Asbjörn Folling. Desde então muitas foram as descobertas a seu respeito, como a caracterização e mapeamento do seu gene, a identificação de mutações, a determinação da estrutura da enzima, características clínicas e bioquímicas dos afetados, correlações genótipo-fenótipo, a identificação do risco teratogênico quando da condição materna, o estabelecimento da triagem neonatal e ainda o seu tratamento. Se não diagnosticada e tratada precocemente, a PKU causa retardo mental, microcefalia, espasmos infantis, odor de rato na urina e hipopigmentação de pele, cabelos e olhos, além de outros sinais e sintomas.

Com o objetivo de identificar a população submetida à triagem neonatal no Rio Grande do Sul (Brasil), a incidência de Fenilcetonúria e de outras hiperfenilalaninemias e correlacionar época do diagnóstico, início do tratamento e desfecho clínico, elaborou-se este estudo delineado como uma coorte ambispectiva que avaliou 54 pacientes fenilcetonúricos entre 6 meses a 16 anos de idade. Foram realizadas entrevistas telefônicas com os responsáveis indagando-se alguns dados demográficos e outros relativos à patologia. Crianças de 6 meses a 7 anos foram avaliadas com relação aos marcos do DNPM. Acima dessa idade, foram investigados sobre escolaridade e presença de sintomas neurológicos. Após análise estatística e estratificação da amostra por ano de nascimento, não se observou uma tendência histórica do diagnóstico ter se

tornado mais precoce ou de o controle laboratorial ter se tornado melhor com o passar dos anos. Foi encontrada associação entre o controle de Phe e a cognição, mas não a entre a idade do diagnóstico e a evolução clínica.

Abstract

The aim of this study was to identify the population submitted to newborn screening in Rio Grande do Sul state,Brazil, and to estimate the incidence of Phenylketonuria and other hyperphenylalaninaemias, correlating time of diagnosis, onset of treatment and clinical outcome. This study was designed as an ambidirectional cohort. Phone interviews were performed with the parents (or legal guardian), asking about demographic aspects, informations concerning the pathology, date of screening test, age of diagnosis and at onset of treatment, knowledge about inheritance, and satisfaction with follow-up. Children between 6 months and 7 years of age were assessed for neuropshychomotor milestones; for the ones older than age 7, their parents were asked about school performance and neurological problems. After statistic analysis and sample stratification per year of birth, we did not observe a historical trend for an earlier diagnosis or a better laboratory control along the years; neither we observed a significant association between age at diagnosis and clinical course of the disease. There was no increase in the proportion of earlier diagnosis, as well as the nutritional control did not improve with time. Good biochemical control at Phe blood level did not depend on the earliness of diagnosis but was directly related to the patients age. The absence of individuals with psychomotor impairment attests the effectiviness of newborn screening for phenylketonuria.

Abreviaturas e siglas

BH_4	Tetraidrobiopterina
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
EEG	Eletroencefalograma
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FC	Fibrose Cística
Hbpatias	Hemoglobinopatias
HC	Hipotireoidismo congênito
HT	Hiperfenilalaninemia transitória
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PAL	Fenilalanina amônialiase
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
QI	Quosciente de inteligência
RDNPM	Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
RFLP	Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição
RNM	Ressonância nuclear magnética
SRTN	Sistema de Referência em Triagem Neonatal
Tyr	Tirosina

Lista de figuras

Figura 1: Teste de Guthrie .....pág: 03

Figura 2: Rota metabólica da fenilalanina .....pág: 05

Figura 3: Modo de transmissão herança autossômica recessiva .....pág: 09

Figura 5: Conversão da L-fenilalanina .....pág: 15

Lista de tabelas

Tabela 1: Incidência de PKU no Brasil e em diversos países….....pág: 08

Tabela 2: Principais mutações encontradas nas regiões Sul e

Sudeste do Brasil.....pág: 13

Tabela 3: Principais alimentos distribuídos de acordo com

seu teor de Phe.....pág:16

Tabela 4: Testagem genética e prevenção de doenças.....pág: 23

Tabela 5: Marcos de desenvolvimento de acordo com a idade.....pág: 39

Tabelas do artigo

Tabela 1. Marcos do desenvolvimento de acordo com a idade.....pág:71

Tabela 2. Características das 54 crianças e adolescentes que

realizaram triagem neonatal para PKU no RS entre 1986 e 2003.....pág: 72

Tabela 3. Número total de testes para triagem neonatal.....pág: 73

Tabela 4. Idade ao diagnóstico de acordo com o ano de

nascimento.....pág: 74

Tabela 5. Dosagens alteradas de Phe conforme os períodos

de vida dos indivíduos acompanhados, após instituição da dieta.....pág: 74

Tabela 6. Idade de diagnóstico e controle de Phe, de acordo com

a proporção de exames alterados nos 2 primeiros anos de vida.....pág: 75

Tabela 7. Proporção de dosagens alteradas de Phe nos primeiros

6 anos de vida de acordo com o ano de nascimento.....pág: 75

Tabela 8. Distribuição dos pacientes de 0 a 7 anos de idade com

falhas ou não do DNPM de acordo com o ano de nascimento.....pág: 75

Tabela 9. Falhas nos marcos do DNPM de acordo com o

número de dosagens alteradas de Phe.....pág: 76

Índice

Agradecimentos

1.Introdução…….….pág: 01

1.1 Histórico inicial……..pág: 02

1.2 Definição…… ……..pág: 03

1.3 Classificação…… ….pág: 06

1.4 Epidemiologia…… …..…pág: 08

1.5 Aspectos genéticos…… pág: 09

1.5.1 Herança…… ……pág: 09

1.5.2 Aspectos Moleculares……pág: 09

1.5.3 Variações genótipo/fenótipo……..pág: 14

1.5.4 Aspectos bioquímicos……pág: 14

1.5.5 Tratamento…….pág: 15

1.5.6 Diagnóstico pré-natal…….pág: 22

2. Revisão da literatura: as triagens neonatais.....pág: 23

3. Justificativa.....pág: 32

4. Hipóteses.....pág: 32

5. Objetivos.....pág: 33

5.1 Objetivo geral.....pág: 33

5.2 Objetivos específicos.....pág: 33

6. Metodologia.....pág: 34

6.1 População alvo.....pág: 34

6.2 Amostra estimada.....pág: 35

6.3 Delineamento.....pág:36

6.4 Critérios de inclusão.....pág: 37

6.5 Critérios de exclusão.....pág: 37

6.6 Instrumento.....pág: 37

6.7 Processamento e análise dos dados.....pág: 38

6.8 Desfechos.....pág: 38

6.9 Exposições de interesse.....pág: 40

6.10 Limitações do estudo.....pág: 40

7. Aspectos éticos.....pág: 42

8. Referências bibliográficas.....pág: 43

9. Resultados.....pág: 51

10. Artigo submetido à publicação.....pág: 77

11. Considerações finais.....pág: 96

12. Anexos

Anexo I : questionário

Anexo II: ficha de identificação laboratorial

Anexo III: versão resumida do questionário

1. Introdução

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças genéticas bastante conhecidas e estudadas. Dentre elas, a condição mais clássica é a fenilcetonúria (PKU), pois a história da aquisição de seu conhecimento gerou um paradigma. Nos 70 anos que transcorreram desde sua descoberta grandes conhecimentos foram estabelecidos, tais como: caracterização e mapeamento do gene; identificação de mutações; determinação da estrutura da enzima e sítios funcionantes; identificação das características clínicas e bioquímicas; correlações genótipo-fenótipo; diagnóstico pré-natal; reconhecimento do risco teratogênico quando da condição materna; desenvolvimento do tratamento e prevenção do retardo mental; produção de modelos animais, estabelecimento da triagem neonatal e ainda um tratamento (1). Então talvez pudéssemos estar satisfeitos e não mais investigar essa condição (2). Apesar disso, muitas questões permanecem aguardando uma resposta adequada.

1.1 Histórico inicial

A Fenilcetonúria foi descrita há quase 70 anos pelo médico norueguês Asjbörn Folling como EIM, cuja manifestação era um retardo mental grave descrito em um casal de irmãos. Após o seu relato, a doença foi identificada em várias crianças ao redor do mundo (3). Em 1935, Lionel Penrose, geneticista, reconheceu a PKU, a qual denominou Doença de Folling, como a primeira forma de retardo mental a ter uma característica química identificada. Penrose introduziu a idéia de que a PKU poderia ser tratada e observou ainda uma distribuição não randômica, de herança provavelmente recessiva. Em 1951 Woolf e Vulliamy pensaram na possibilidade de que o fenótipo químico da doença poderia responder à restrição dietética de fenilalanina, idéia que foi posta em prática anos depois, conjuntamente por Bickel (RU) e Amstrong e Tyler (EUA). Entre 1958 e 1961 começou a ser testada a possibilidade de se estabelecer um método de triagem de massa usando amostras de urina e posteriormente sangue em papel filtro (4). Esse teste é baseado no crescimento de bactérias que ocorre na presença de fenilalanina na amostra de sangue acima de uma certa concentração. Assim, apenas no sangue de crianças com níveis altos de fenilalanina persiste o crescimento dessas bactérias (5). Para a triagem neonatal os discos de papel de filtro são colocados num meio de cultura e então incubados, sendo a intensidade do crescimento bacteriano diretamente proporcional à quantidade de fenilalanina presente no sangue. A concentração de fenilalanina costuma ser estimada por comparação com uma série de padrões que são colocados no centro da placa (6) (Figura 1). Uma década depois, o

diagnóstico neonatal para PKU através do teste de Guthrie tornou-se uma das mais importantes tecnologias da genética aplicadas à saúde pública. Todas essas fases médicas da história da PKU anteciparam-se às fases científicas propriamente ditas (2).

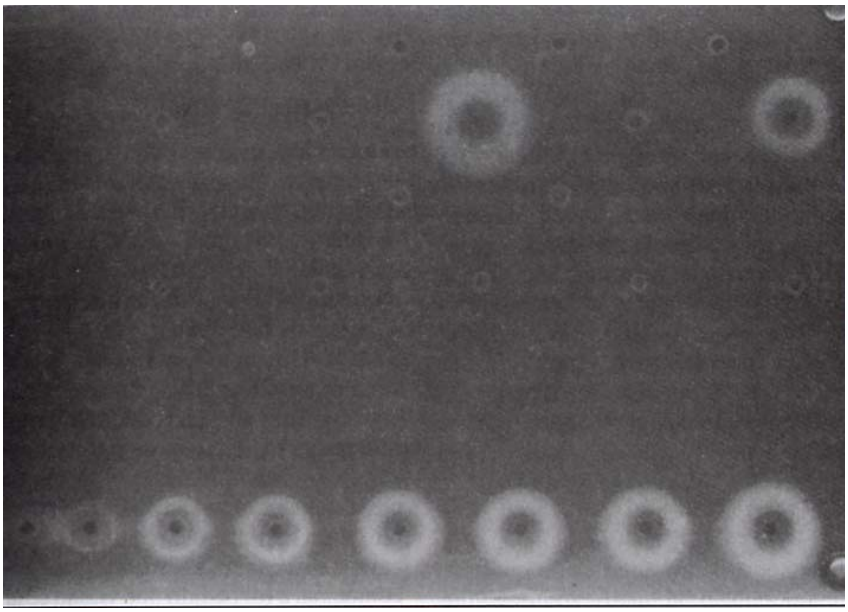


Figura 1: Teste de Guthrie.

1.2 Definição

A hiperfenilalaninemia (HPA) é definida como a razão fenilalanina/tirosina sangüínea persistentemente maior do que três (a variação normal para concentrações sangüíneas sendo: a de fenilalanina 0,58 a 2 mg ou 35-120 µmol/l e a de tirosina 0,67 a 2,2 mg ou 40-130 µmol/l). O aumento da concentração de fenilalanina decorre, em 98% dos casos, de um bloqueio na conversão de

fenilalanina em tirosina (precursor da catecolamina) devido a um defeito na enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH) (7). Nos casos restantes, esse aumento de Fenilalanina (Phe) é atribuído a um defeito no metabolismo do co-fator tetraidrobiopterina (BH4) (5,7). Em casos ainda mais raros de hiperfenilalaninemia primária, a mesma pode ser atribuída a outros defeitos das biopterinas como as deficiências de Guanosina-trifosfato-ciclohidrolase, 6-piruvoiltetrahidropterina-sintase e dihidropteridina redutase (7).Tanto a deficiência da enzima quanto a falta do seu co-fator promoverão o aumento de fenilalanina e seus metabólitos secundários no sangue e nos tecidos, levando aos principais sinais e sintomas da doença que são o odor de ninho de rato na urina devido à excreção de ácido fenilacético, o retardo mental, os espasmos infantis com hipssarritmia, a microcefalia, a hipopigmentação da pele, cabelos e olhos claros quando comparados aos dos pais e dos irmãos. Além disso, alterações de comportamento como atratividade, automutilação, manifestações psicóticas, convulsões tipo grande mal e sinais extrapiramidais também podem ocorrer (7,8).

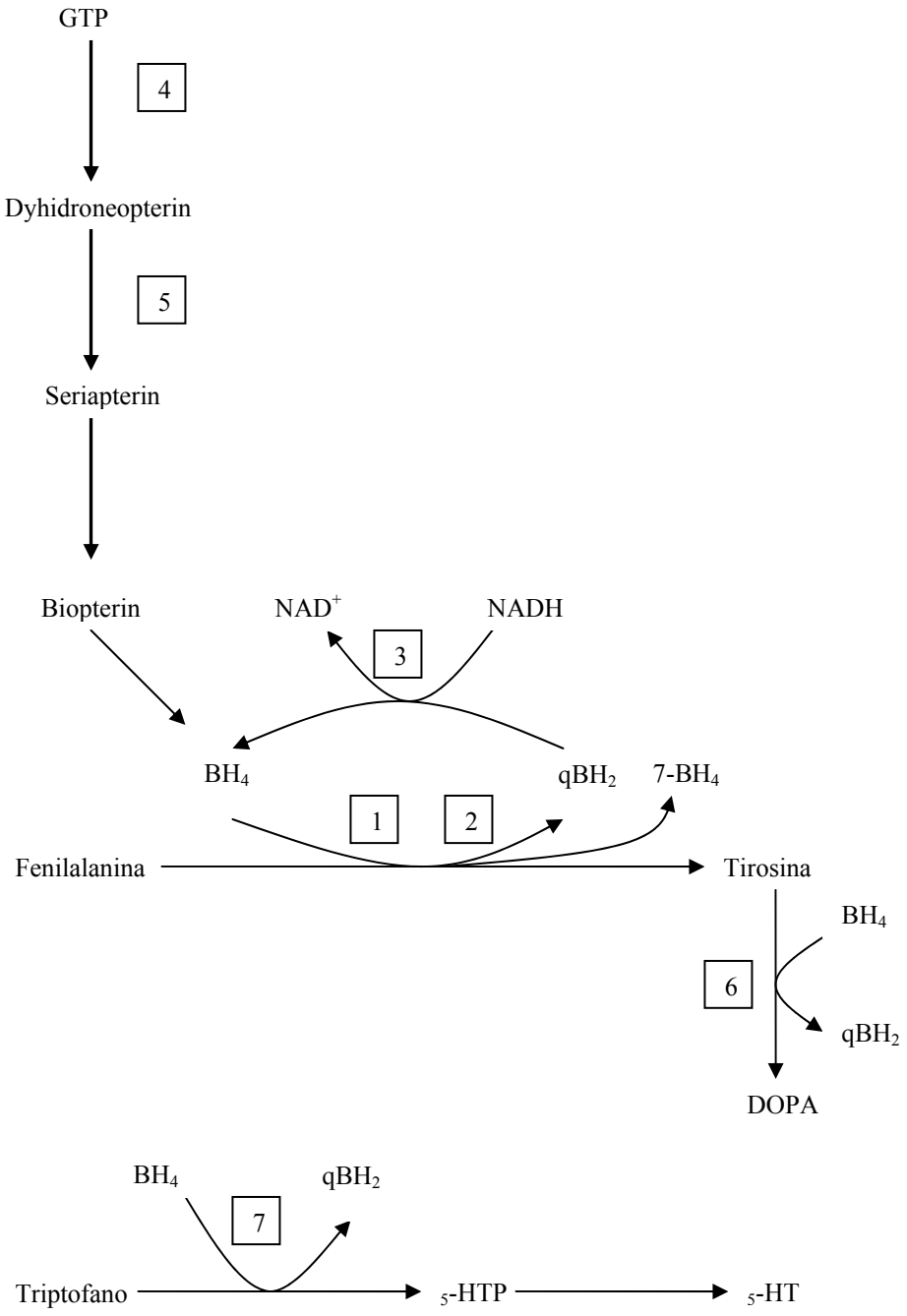


Figura 2. Rota metabólica da fenilalanina (Clarke, 1996).

1.3 Classificação

a) PKU Clássica

É causada pela deficiência da enzima PAH, impedindo sua conversão em tirosina (conforme figura 2) e levando ao quadro clínico descrito acima.

Nessa condição, os níveis de Phe são costumeiramente maiores do que 10mg/dl (600 µmol/L) e a atividade enzimática é menor do que 1% (7).

b) Hiperfenilalaninemia Persistente Benigna

Condição caracterizada por uma redução parcial da atividade da enzima PAH. Os níveis de Phe no plasma permanecem entre 2 e 6 mg/dl (120 e 360 µmol/L) , sem prejuízos ao paciente (7, 8). A atividade enzimática é em torno de 1 a 5% (7). Essa condição é, portanto, subclínica e não necessita tratamento dietético. Ocorre com uma freqüência de 1/ 20.000 a 1/ 30.000 nascimentos (5).

c) Hiperfenilalaninemia Transitória (HT)

Causada pela imaturidade temporária da enzima PAH, a hiperfenilalaninemia transitória caracteriza-se por níveis plasmáticos elevados de Phe que regridem após poucas semanas de vida pós-natal. Geralmente se relaciona à prematuridade, ao uso de algumas drogas como metotrexate e trimetoprim, às doenças renais ou ainda a uma resposta inflamatória. Não se acompanha da elevação de tirosina. Quando a tirosina também está aumentada, além da prematuridade, uma dieta inadequada com alta ingesta proteica pode

levar a esse quadro. Com menos freqüência, é causada também por outras doenças metabólicas como a Galactosemia e a Tirosinemia (7,8).

d) Deficiência de Tetraidrobiopterina (BH4)

Determinada pela deficiência do co-fator tetraidrobiopterina, necessário para a ativação da PAH. Essa deficiência associa-se à hiperfenilalaninemia e a um retardo mental grave, convulsões, irritabilidade e parkinsonismo. Como o co-fator BH4 é também necessário para a conversão da Tirosina (Tyr) em diihidroxifenilalanina e de triptofano em 5-hidroxitriptofano, precursores da dopamina, as manifestações clínicas são mais graves do que na PKU clássica e não são corrigidas apenas pela restrição dietética de Phe (7,8).

e) Fenilcetonúria Materna (PKU Materna)

Quadro caracterizado por baixo peso de nascimento, microcefalia, retardo mental, retardo de crescimento pós-natal, agenesia/hipoplasia de corpo caloso, cardiopatia congênita de complexidade variável e dismorfias faciais (fendas palpebrias pequenas, epicanto, filtro longo, lábio superior curto) em filhos de mulheres que apresentam níveis elevados de fenilalanina plasmática na gestação (9,10). Outras anomalias menos freqüentes são estenose pilórica, gastrosquise e pé-torto congênito (11).

Essas crianças não são portadoras de um EIM. Seus níveis séricos de Phe são normais. Trata-se de uma síndrome teratogênica, na qual o agente teratogênico é a hiperfenilalaninemia durante a vida intra-uterina, que ocorre em mulheres fenilcetonúricas. Essa situação pode ser evitada através da restrição rigorosa de

fenilalanina iniciada, pelo menos 3 meses antes da concepção e mantida até o parto (11).

1.4 Epidemiologia

A PKU é considerada uma doença pan-étnica devido a sua grande variabilidade genética. A incidência pode variar nos diversos países e em suas diferentes regiões. A média mundial é estimada em 1:10.000 nascimentos, conforme tabela 1 (7,8,10,12,13, 65). Na América Latina a PKU é o EIM mais freqüentemente diagnosticado, o que ocorre não somente devido à sua elevada freqüência, mas também, pela simplicidade da técnica diagnóstica e pelos avanços nos programas de rastreamento neonatal. (14).

Tabela 1. Incidência PKU no Brasil e em diversos países

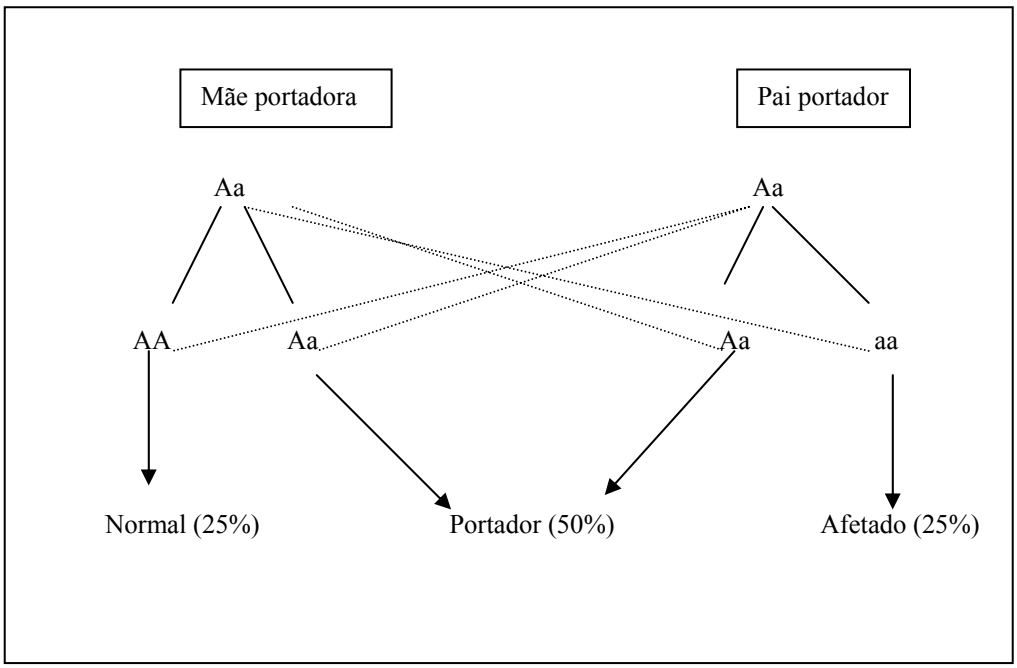
País	Incidência PKU	Referências
Países Baixos	1: 18.000	Verkerk, 1994
Reino Unido	1: 10.000 – 1.13.000	Clark, 1992; Simpson, 1997.
França	1: 17.000	Abadie, 2001.
Irlanda	1: 4.000	Whithead, 1996; Magee, 2002.
Canadá	1 : 22.000	Scriver, 1995.
Áustria	1: 9.600	Scheibenreiter, 1996.
Portugal	1: 12.500	Vaz-Osório, 1999.
Brasil	1:12.000-1:15.000	Jardim, 1992; Schimdt, 1996.

1.5 Aspectos Genéticos

1.5.1 *Herança*

A PKU, como a maioria dos EIM, é de herança autossômica recessiva, o que significa um risco de recorrência para a irmandade de 25%, a cada gestação de um casal heterozigoto portador (7,8,9,10). A figura 3 representa as possibilidades de 2 portadores de um gene recessivo terem filhos afetados, portadores ou normais.

Figura 3. Representação da herança autossômica recessiva.



Adaptado de Nowacki *et al*, 1997.

1.5.2 *Aspectos Moleculares*

Vinte por cento das mutações até hoje descritas envolvem o exon 7 e mais de 80% afetam as regiões dos exons 5-12. Pelo menos uma dúzia de mutações PAH

já descobertas conservam uma atividade enzimática residual, o que pode ser importante em termos de prognóstico e aconselhamento (2). Atualmente mais de 460 mutações já foram descritas (15,16) com haplotipos polimórficos, populações e regiões geográficas, causando graus variados de perda da atividade enzimática. As mutações foram identificadas em cerca de 4400 cromossomos mutantes ao redor do mundo. A freqüência de alelos mutantes na população é de 0.01, o que significa que 2% da população é heterozigota (17). Devido ao grande número de mutações causadoras da doença, com freqüência os pacientes PKU apresentam duas mutações distintas, sendo heterozigotos compostos e não homozigotos verdadeiros. Parte da variação fenotípica pode ser atribuída a isso (8). Há também mutações silenciosas (polimorfismos), as quais não possuem associação com a deficiência de PAH e são encontradas tanto em cromossomos normais como mutantes (15).

Como já se deixou antever na classificação, sabe-se que o traço gênico "deficiência de PAH" é clínica e bioquimicamente heterogêneo, com fenótipos metabólicos, que vão desde a PKU Clássica até a hiperfenilalaninemia leve. Há mais de 30 anos, Woolf sugeriu haver, pelo menos, 4 diferentes alelos mutantes no *locus* da PAH, o que poderia explicar a diversidade fenotípica. Baseando-se nos exames de Phe plasmática e nas concentrações de Tirosina em pais de crianças com deficiência de PAH, Rosenblat e Scriver simultaneamente concluíram que "numerosos alelos controlam o metabolismo da Phe no homem".

A descoberta, de oito sítios polimórficos para restrição de endonucleases ao longo do gene da PAH, permitiu a análise de Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLPs do inglês *restriction fragment length*

polymorphism) em famílias com deficiência de PAH. A correlação entre os haplótipos RFLP e os fenótipos metabólicos foi observada e essa informação levou à estratégia que culminou com o seqüenciamento dos 2 primeiros alelos PKU em crianças com a forma clássica. Mais tarde, a expressão das mutações da PAH foi medida e foi demonstrado que cada mutação da PAH tem um efeito particular e quantitativo na atividade enzimática (15).

O *locus* do gene PAH está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q22-q24) (16), apresenta 90 kb, é dividido em 13 exons e apresenta vários marcadores polimórficos. Seu produto é suficiente para a atividade da PAH na presença do co-fator. A região PAH do cromossomo 12 humano é rica em polimorfismos que podem ser usados para descrever cromossomos mutantes e normais, muitos dos quais podem ser analisados por PCR. Em conjunto, a priori, o sistema de haplotipos polimórficos pode manifestar mais de 6000 combinações diferentes, ou seja, poderíamos aumentar a existência de mais de 6000 haplótipos. Somente uma pequena fração disso é observada na prática, nos cromossomos estudados (2). Exceto em alguns casos as mutações são pequenas alterações genéticas que afetam somente um ou poucos nucleotídeos no gene da PAH. O efeito na atividade enzimática depende fortemente do tipo e da posição da mutação. A alteração mais comum é a substituição de um nucleotídeo por outro. Ocorre a modificação de um códon de um aminoácido para especificar outro aminoácido o quê resulta na substituição de um único aminoácido no produto gênico traduzido (*missense);* ou sem sentido (*nonsense*): é produzido um códon finalizador que resulta no término prematuro da tradução. O segundo tipo mais freqüente, é a mutação do tipo *frameshift* que é produzido pela adição ou

deleção de um ou mais nucleotídeos. Este termo é usado para denotar que a mutação muda o quadro de leitura, ao mudar toda a sucessão de códons subseqüentes a ela. Uma das mutações mais comuns causadoras de PKU no ocidente é a substituição de um nucleotídeo Citosina por Timina (C→T) que converte o codon normal (CGG) para arginina (R) na posição 408 da enzima para o codon (TGG) codificando para triptofano (W), sendo por isso designada R408W (15,17). Essa mutação contribui com 50% das mutações que ocorrem no Leste Europeu (6). Dados publicados sugerem que pacientes do Sul do Brasil, cuja população possui uma alta proporção de indivíduos orieundos de Prtugal, Itália, Alemanha e Polônia, podem ser haplotipicamente similares aos europeus (18). Estudo realizado em 23 pacientes PKU não relacionados parentalmente encontrou uma alta freqüência da mutação I65T nessa população (19,5%), similar à encontrada em pacientes australianos e irlandeses, e bastante superior a freqüência da mesma encontrada em pacientes de São Paulo (3,5%).A maioria dos portadores da mutação I65T no RS são descendentes de origem germânica. Na Alemanha, porém tal mutação é rara (18). A tabela 2 ilustra as principais mutações encontradas no Brasil.

Tabela 2: Principais mutações encontradas em algumas regiões do Brasil.

População	n	V388M	R261Q	IVS10	165T	R252W	R261X	R408W	IVS12
RS e SC	23	9,8	9,8	2,4	19,5	0	9,8	9,8	4,9
MG	70	19,3	16,4	11,5	6,4	6	1,4	1	0,7

Fonte: Silva e cols., 2003., Carvalho e cols, 2003.

Em Minas Gerais (MG), no centro do país, a freqüência da mutação V388M é a maior já descrita no mundo, sendo o dobro das de São Paulo (SP) e Portugal e o triplo do RS e da Espanha. A mutação R261Q, associada principalmente às populações suiça e turca, é a segunda mais freqüente em MG e em Portugal um pouco mais elevada no estado de SP e menor no RS . É causada pela conversão de uma arginina em glutamina na posição 261 de aminoácido (6).

Como foi visto na classificação, o diagnóstico do tipo de hiperfenilalaninemia é baseado nos níveis séricos de Phe ao diagnóstico ou na tolerância à fenilalanina na dieta. Entretanto, há dificuldades na classificação desses pacientes: 1) a enzima PAH só se expressa no fígado, o que nos obriga a estimar a gravidade da doença com base apenas na dosagem das concentrações séricas de seu substrato; 2) Os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico não permitem que se estabeleça de maneira segura o tipo de hiperfenilalaninemia; 3) A tolerância à fenilalanina na dieta, que é o parâmetro mais confiável, só se estabiliza por volta dos seis meses de vida (19). O lugar da genética molecular no diagnóstico da PKU continua, então, sendo explorado. A detecção de mutações pode ser um bom preditor do fenótipo bioquímico e do grau de restrição de Phe a ser buscado pela dieta. Entretanto, dada a forte associação entre o desfecho clínico e o perfil de fenilalanina sangüínea no início da vida, a detecção de mutações não parece ter a mesma utilidade para pacientes com formas leves (4,7).

1.5.3 *Variações Genótipo/Fenótipo*

A heterogeneidade molecular da PKU resulta numa ampla heterogeneidade fenotípica contribuindo para a individualidade bioquímica. Em alguns casos é possível predizer a atividade enzimática baseando-se no genótipo da PAH. Ainda não foi possível, contudo, estabelecer boas correlações entre genótipo e fenótipo clínico na PKU (20). Existem indivíduos com deficiência completa da atividade enzimática, nos quais a concentração sangüínea da Phe pode ser 30 vezes maior do que a normal, mas entre esses doentes também há variações no retardo mental. Sabe-se que mesmo não tratados, um em cada seis pacientes poderá atingir condições para receber educação em escola normal (7). Entre irmãos, os quais compartilham o mesmo genótipo no *locus* da PAH, ocorre discordância fenotípica (20), dados que sugerem que o retardo mental decorrente da HPA não depende exclusivamente dos níveis séricos de Phe, mas também de outros modificadores ambientais e genéticos.

1.5.4 *Aspectos Bioquímicos*

A L-fenilalanina é um aminoácido essencial, mas apenas uma proporção de sua ingestão normal é usada para a síntese de proteínas. A maior parte é oxidada primariamente em tirosina e uma parte bem menor em outros metabólitos, primariamente o ácido fenilpirúvico. A para-hidroxilação da fenilalanina para formar tirosina é uma reação complexa. A hidroxilase consiste em dois componentes proteicos, um dos quais é lábil e só encontrado no fígado, enquanto o outro é estável, encontrado em vários outros tecidos, contendo uma pteridina como co-fator. O componente lábil do sistema enzimático é o que está afetado na

PKU (5). Para a reação normal de hidroxilação da fenilalanina, a enzima PAH, o oxigênio, a L-fenilalanina e o co-fator tetraidrobiopterina são essenciais. O co-fator pterina é reciclado para a função como um catalisador na enzima de hidroxilação, uma rota que requer a ação da proteína de estimulação da fenilalanina hidroxilase. Interações entre a enzima PAH, seu substrato e o co-fator contribuem para a homeostase da fenilalanina. Ainda é preciso conhecer como a subunidade opera ao nível de homopolímero, como liga substrato e co-fator e como a atividade é regulada (2).

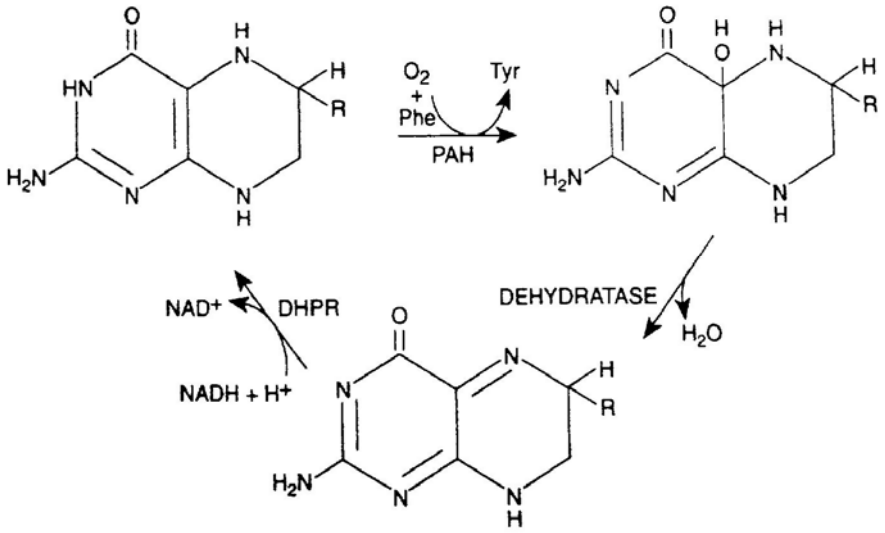


Figura 5: Conversão de L-fenilalanina em L-tirosina catalizada pelo sistema de hidroxilação da fenilalanina. Fonte: Scriver, 1994.

1.5.5 *Tratamento*

O primeiro tratamento para PKU foi instituído experimentalmente em dezembro de 1951 por Bickel e colaboradores, ao se manufaturar o hidrolisado de caseína cogitado pela primeira vez por L. I. Woolf (21).

O tratamento baseia-se na restrição dietética de Phe e, quando instituído precocemente, ou seja, até o vigésimo dia de vida, previne de maneira eficaz o retardo mental (22). A dieta sempre deve considerar idade, peso, necessidades calóricas, hídricas e protéicas de cada paciente (13). Os objetivos do manejo nutricional devem incluir a manutenção das concentrações plasmáticas de Phe entre 2-5 mg/dL (120-300µmol/L) e de Tirosina 0,58 – 1,95 mg/dL (35-115 µmol/L), para propiciar o crescimento e o desenvolvimento normais e para prevenir o catabolismo proteico (23). Alimentos como carne, leite e seus derivados são proibidos. A tabela a seguir mostra os principais alimentos e seu respectivo teor de Phe.

Tabela 3. Principais alimentos distribuídos de acordo com seu teor de Phe.

Teor de Phe por porção	*Alimentos*
Alto (300 mg)	Carne, peixe, queijo, ovos, grãos.
Médio (25–50mg)	Leite, iogurtes, cremes, arroz, batata, espinafre, brócolis e cereais.
Baixo (- 25 mg)	Gorduras refinadas, carboidratos, frutas e outros vegetais.

Por ser a Phe um aminoácido essencial, alguma ingesta é necessária para as funções biológicas básicas como a síntese de proteínas (7,8). Para se chegar a

uma dieta hipofenilalaninêmica sem desencadear desnutrição proteica, complementos alimentares, obtidos a partir de hidrolizados de caseína, pobres ou isentos em Phe, vêm sendo administrados aos doentes junto com uma ingesta mínima de proteína natural para ofertar Phe. Os complementos obtidos provêm 50-90% de equivalentes de proteínas, 90-100% de vitaminas e 50-70% de energia, cobrindo aproximadamente 75-95% das necessidades protéicas.

A falta de mais estudos faz com que sejam seguidas para os indivíduos fenilcetonúricos as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), as quais consideram a necessidade proteica igual a dos indivíduos sadios. No entanto, têm sido demonstrado que a necessidade energética de bebês fenilcetonúricos, alimentados com essas misturas de aminoácidos livres, é cerca de 25% maior do que aquela de crianças sadias, quando os aminoácidos livres suprem a maior parte das proteínas (13). Em outras palavras, o delineamento da dieta é bastante complexo e sujeito a desequilíbrios que podem, por um lado, não prevenir o retardo mental se a Phe não for reduzida; ou, por outro, desencadear deficiência proteica e energética, se o controle for excessivo.

A deficiência proteica e energética resulta em catabolismo proteico, retardo de crescimento, baixas concentrações plasmáticas de transtiretina, osteopenia, alopécia e diminuição da tolerância à restrição de Phe e aumento da concentração plasmática da mesma (23).

Os problemas associados ao tratamento dietético estimularam estudos recentes sobre uma possível aplicação da terapia gênica somática para a PKU. Nessa forma de tratamento, a tecnologia de transferência do gene poderia ser usada para introduzir um gene normal recombinante no fígado ou em outros

tecidos de um indivíduo afetado para substituir a função do gene defeituoso. Essa abordagem requer: a clonagem da PAH que produza a proteína funcional PAH; um vetor que possa eficientemente transferir este clone aos hepatócitos ou a outra célula alvo somática onde a proteína PAH possa funcionar apropriadamente; e um modelo animal, no caso camundongos, para determinação da relativa eficiência dos diferentes métodos de transferência gênica. Os resultados em animais mostraram-se bons a curto prazo (1, 24), mas o efeito terapêutico obtido não persiste por longo tempo e uma administração repetida não replica o efeito original, o que sugere que uma resposta imune contra o vetor, no caso adenovírus, possa ter sido a responsável pela falência no tratamento repetido (24).

Um tratamento alternativo testado em camundongos foi a combinação da terapia enzimática oral com Fenilalanina amônialiase (PAL) e o controle da ingesta proteica substituindo a dependência das dietas semi-sintéticas depois da infância. A PAL é uma enzima autocatalítica que, ao contrário da PAH, não requer um co-fator. A PAL converte fenilalanina em quantias metabolicamente insignificantes de amônia e de ácido trans-cinâmico, um metabólito inofensivo que posteriormente é convertido em ácido benzóico e rapidamente excretado na urina como hipurato. Os estudos foram interrompidos, pois a PAL não está disponível em quantidade suficiente e seus custos são proibitivos (25). Recentemente foi testado um protocolo sobre Tetraidrobiopterina oral em pacientes com PKU leve. Os 31 indivíduos testados recebiam BH4 na dose de 20mg/Kg 1 hora após a última refeição, na qual haviam ingerido 100/mg de Phe por Kg de peso corporal. Os resultados sugeriram que essa terapia, por longo

tempo, poderia levar a um aumento da tolerância à Phe. O tratamento com o co-fator ao invés de uma dieta restrita em Phe seria possível e poderia melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes. O tratamento com BH4 também poderia ser benéfico nos casos de PKU Materna, pois o controle metabólico, que é a chave da prevenção de sérios efeitos adversos na prole, é difícil de ser mantido durante a gravidez. Contudo, a segurança da terapia com BH4 no período gestacional ainda não foi estabelecida. Em cerca de 350 pacientes com deficiência de BH4 o tratamento com o co-fator vêm sendo testado. Reações adversas como distúrbios do sono, poliúria e fezes amolecidas têm sido relatados com freqüência. Ainda há, portanto, muitos obstáculos a serem ultrapassados até que a terapia com BH4 possa se tornar rotineira. O primeiro é o fato de a droga não ter sido aprovada para uso terapêutico em muitos pacientes. O segundo é que a mesma é cara. O terceiro é que ainda são necessários ensaios clínicos e outros estudos para determinar a biodisponibilidade e os efeitos a longo prazo dessa terapia em pacientes com deficiência de PAH (26).

Em relação ao tratamento convencional, duas grandes questões são discutidas: uma é a eficácia do tratamento precoce e a outra, sua manutenção ou não por toda vida. Em relação à primeira, estudos deixam clara a influência da idade de início do tratamento no desfecho posterior. Há uma relação inversa entre a idade de início do tratamento e o QI mesmo em pacientes tratados precocemente (27). Sobre a segunda questão muitos estudos sobre o desfecho intelectual, cognitivo e comportamental vêm sendo realizados. Os referidos estudos apresentam limitações que incluem amostras pequenas, comparações inconsistentes entre os diferentes grupos e uma confiança excessiva nos testes de

inteligência como principal medida de desfecho, mas guardadas tais limitações, os diferentes estudos de seguimento em diversos países confirmam que há prejuízo quando a dieta é descontinuada (27).

O Estudo de Paris (28), o qual foi prospectivo e controlado acompanhou pacientes com PKU clássica após 5 anos de relaxamento da dieta, cuja interrupção se deu aos 5 anos de idade, e seus respectivos controles. Na idade de 11 anos, 57% dos pacientes necessitaram repetir um ano escolar contra 39% dos controles. Dezoito por cento dos pacientes e 21% dos controles, repetiram 2 anos escolares. Além disso, achados de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) relacionaram deterioração neurológica em adultos jovens com descontinuidade da dieta ou com sua manutenção inadequada durante a segunda infância (28). Estudo longitudinal na Áustria revela uma diferença estatísticamente significativa entre o QI de fenilcetonúricos e seus respectivos irmãos saudáveis (29).

Em Praga, República Tcheca, 58 adolescentes foram acompanhados. Os autores ressalvam que uma conclusão definitiva não foi possível, mas todos os dados sugerem forte associação com o início do tratamento (menos de 2 meses de idade), a manutenção dos níveis de Phe abaixo de 6mg (360 µmol/L) nos primeiros 10 anos de vida; abaixo de 8 mg (480µmol/L) até os 15 anos, e um melhor desempenho intelectual e educacional (30). Segundo Thompson e colaboradores, crianças com mais de 6 anos mostraram decréscimo no desempenho escolar, alterações de comportamento e deterioração neulógica quando descontinuaram a dieta (31). Vários estudos correlacionam níveis sangüíneos de Phe com a capacidade da criança e do adulto fenilcetonúrico de

realizar cálculos e fixar a atenção, observando que aqueles com bom controle da dieta e por conseqüência, da Phe sangüínea, apresentam melhor desempenho (32). Outros estudos realizados com crianças de 0-12 anos mostraram que aquelas com dieta mal controlada, apresentaram pior escore de QI (33, 34). Também foram evidenciadas alterações neurológicas na RNM geralmente de padrão anatômico simétrico na substância branca da região parieto-occipital. Os mesmos estudos apontaram uma correlação entre a gravidade do achado no exame de imagem, os parâmetros bioquímicos e o controle da dieta (35,36). Na Itália, Cerone e colaboradores acompanharam 16 pacientes com idade entre 14 e 19 anos que iniciaram tratamento precocemente e o seguiram corretamente até os 11 anos quando todos apresentavam suas funções neurológicas e intelectuais preservadas. Após 6 anos de relaxamento da dieta, a avaliação mostrou em 15 dos 16 pacientes, a presença de sinais neurológicos menores, incluindo tremor de intenção, aumento dos reflexos tendinosos, presença de clônus aquileu e incoordenação. Houve também uma queda no QI se comparado com o nível anterior (na vigência de dieta) a qual foi estatisticamente significativa. Além disso, as alterações na RNM desapareceram após 6 meses naqueles indivíduos que retomaram a dieta. Esse último achado sugere que não há uma desmielinização permanente, mas sim um efeito tóxico da Phe em níveis elevados (37). Outros autores, apesar de não terem encontrado outros problemas nos 57 pacientes que estudaram, exceto déficit de atenção, ressaltam que somente esse já justificaria a restrição de Phe na dieta, pois trouxe prejuízos nas atividades diárias dos pacientes (36). Além disso, relatam também maior incidência de tremores e redução das habilidades motoras finas nos mesmos pacientes (36).

A principal implicação desses achados é que, mesmo na idade adulta, o controle contínuo da dieta pode trazer benefícios aos fenilcetonúricos. Esses benefícios, entretanto, não podem ser medidos simplesmente por testes psicométricos padronizados, como, por exemplo, o QI (38). Assim, faz-se necessário mostrar aos pacientes a importância da dieta, até porque no presente momento não se pode excluir que a deterioração neurológica venha a ocorrer em uma fase tardia da vida (36,38) e também porque ainda é necessário determinar o quanto os fenótipos comportamentais correspondem a mutações genéticas específicas (38). Ao mesmo tempo em que se evidenciam tais dados, persiste a dificuldade de adesão à dieta, como demonstra estudo multicêntrico no Reino Unido e Austrália que acompanhou 330 pacientes. Em crianças menores de 4 anos, 30% apresentavam concentrações de Phe acima do recomendado, já no grupo de 15 a 19 anos esse percentual ultrapassa os 80% e se mostra intimamente ligado ao não seguimento da dieta. Além disso, adolescentes e adultos também não aderem ao monitoramento das concentrações de Phe. Contudo, sendo a PKU comprovadamente perigosa (39), conforme todos os estudos supra-citados, tanto em adultos como em crianças, é de extrema importância a manumissão da dieta e do controle, como também a busca de outros modos de tratamento mais aceitáveis (39).

1.5.6 *Diagnóstico Pré-natal*

Testes bioquímicos como a dosagem de fenilalanina e tirosina geralmente produzem sobreposição entre indivíduos normais e portadores. Assim, prefere-se

a análise mutacional direta ou ainda o diagnóstico indireto de ligação com marcadores RFLP (5,7).

2. As triagens neonatais

A testagem genética na prevenção de doenças deve seguir diretrizes básicas, como mostra a tabela a seguir (40).

Tabela 4. Testagem genética e prevenção de doenças

Pontos considerados no uso da testagem genética na prevenção de doenças
1. Impacto da doença na saúde pública: incidência, prevalência, morbidade, mortalidade
2. Prevalência do Genótipo
3. Qualidades laboratoriais: sensibilidade, especificidade e valor preditivo do teste genético
4. Magnitude da associação entre genótipo e doença: riscos relativo, absoluto e atribuível
5. Interação com conhecidos fatores de risco modificáveis para a doença.
6. Intervenção disponível ou métodos preventivos
7. Custo do teste
8. Considerações éticas, legais e sociais

Fonte: Khoury, 1996.

Rastreamento pode ser definido como testes realizados em pessoas aparentemente saudáveis para identificar aquelas que possuem um risco aumentado para uma determinada doença. Há várias implicações éticas. Um teste

de rastreamento difere dos testes tradicionalmente usados em diversos aspectos. Por exemplo, um paciente que consulta seu clínico a respeito de uma queixa ou problema, muitas vezes necessita um teste que prontamente excluirá ou confirmará o diagnóstico. Como esse paciente está com problemas e requereu ajuda, o risco e a despesa do teste são bem aceitos por ele. Em contraste, testes de rastreamento recrutam indíviduos aparentemente saudáveis, sem uma doença, uma queixa ou mesmo pedindo ajuda médica. Em algumas situações, como para osteoporose e câncer de ovário, podem levar a programas caros e de valor duvidoso. Um outro aspecto é que muitos testes podem ser desconfortáveis como a sigmoidoscopia e a colonoscopia ou caros como a mamografia. Uma outra questão pode ocorrer depois do rastreamento: os falsos-positivos e também verdadeiros-positivos levando a intervenções perigosas. É preciso, assim, ser muito criterioso e conhecer a prevalência da doença e sua história natural. Deve existir uma intervenção efetiva e a política de saúde deve considerar custo e benefício do programa, facilidade diagnóstica e tratamento disponível. Em relação ao teste em si, deve ser seguro e válido (41). Avaliar esse tipo de programa, portanto, exige sempre a análise de custos e benefícios. Deve-se considerar cuidadosamente não só sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo dos testes, mas também a prevalência da condição e as implicações do número de falsos-positivos e negativos (41, 42). A fenilcetonúria é um bom exemplo de doença a ser triada na população, por ser freqüente, por estar associada a uma elevada morbidade se não tratada e por possuir teste diagnóstico simples, barato e aceitável. Esse teste é propositadamente mais sensível do que específico, já que o custo de perder um caso é muito alto. O lado negativo é o

grande número de falsos-positivos, o que causa angústia desnecessária aos familiares de um caso desses, e um teste subseqüente (42).

Os métodos laboratoriais utilizados para triagem e diagnóstico da PKU variam de um local para o outro. Os métodos qualitativos (semiquantitativos) são o já referido Teste de Guthrie e a cromatografia de aminoácidos em camada delgada, a qual permite identificar o aumento de Phe e de outros aminoácidos, possibilitando o diagnóstico de outros distúrbios metabólicos. Os métodos quantitativos são a análise fluorimétrica e a espectrometria de massa *in tandem*. Esse tipo de método tem como grande vantagem a maior sensibilidade e especificidade produzindo assim menos falsos-positivos e negativos (43)

Preconiza-se que testes de triagem de HPA, sejam eles qualitativos ou quantitativos, sejam realizados a partir de amostras de sangue em papel filtro colhidas entre o 3º e 7º dias de vida do recém-nascido. Os resultados alterados devem ser confirmados em uma segunda coleta através de testes específicos, preferencialmente realizados em amostras de soro, sangue total ou urina. Os casos confirmados devem então ser encaminhados para tratamento específico e/ou investigações adicionais em serviços de referência (44).

A triagem neonatal como rotina foi introduzida primeiramente nos estados do Oregon e Massachusetts (EUA) em 1961, inicialmente para PKU (45). No Canadá, o programa iniciou em 1969, sendo que em 1971 teve início o rastreamento voluntário na urina que, 15 anos depois, havia triado 1.000.000 de crianças. As mães recebem um *kit* (papel filtro, envelope de retorno e instruções) e coletam urina em casa. O sangue é colhido na alta hospitalar (46, 47). Nos EUA, todos os estados e provincias realizam triagem para diversas doenças

infecciosas e metabólicas, muitas vezes sem a devida atenção à incidência ou ao impacto na saúde pública e sem o adequado conhecimento médico para avaliação e seguimento (45). No Brasil não tem sido diferente. A introdução dos programas de triagem neonatal ocorreu de forma desorganizada, sem controle de qualidade e precedeu à discussão ética. A primeira doença a ser triada foi a PKU, em trabalho realizado pela APAE/SP em 1976 (43). Em Porto Alegre (RS), a partir de 1982, quando foi criado o Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo (LREIM), a PKU foi a doença mais freqüentemente diagnosticada num período de 13 anos avaliando 10.000 pacientes (48). Atualmente, a triagem pode ser feita tanto em laboratórios privados, quanto pelo sistema público e pode detectar até 4 grupos de doenças dependendo do Estado. Uma triagem neonatal efetiva para PKU exige o funcionamento de um sistema integrado complexo e multidisciplinar com a participação de médico geneticista, psicólogo, enfermeiro, nutricionista e assistente social. O processo se inicia pela coleta do exame no período adequado e através de um procedimento correto incluindo desde o transporte até a análise laboratorial. Tal processo deve permitir o fornecimento do resultado em tempo razoável, a localização e o contato com as famílias daqueles cujo resultado foi alterado e assim, a confirmação diagnóstica e o manejo dos casos em tempo hábil (43). De acordo com essas necessidades foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). A portaria 822 do Ministério da Saúde (MS), de 06 de junho de 2001, estabelece a obrigatoriedade de que hospitais e demais estabelecimentos de saúde que prestem assistência a gestantes, sejam esses públicos ou particulares, realizem exames para diagnóstico de anormalidades metabólicas no recém-nascido, permitindo o desenvolvimento

de uma política adequada de controle e avaliação, regulamentando o PNTN (49). Outra portaria, número 223, de 22 de junho de 2001, inclui os procedimentos referentes ao PNTN nas tabelas SIA/SUS e no sistema APAC (Autorização de Procedimento Ambulatorial de Alta Complexidade/Custo) (50). Além disso, a partir de junho de 2002, foi normatizado também o fornecimento dos insumos necessários para o tratamento das patologias detectadas no Programa através de recursos públicos (49). Dos 27 estados brasileiros, 24 estão habilitados e participam do PNTN. Desse programa fazem parte 32 Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTNs) distribuídos em todos os Estados, sendo que o Rio de Janeiro possui 3 e São Paulo 7. O modelo do PNTN foi idealizado para ser adequado à realidade do País e viável no Ministério da Saúde (MS). Fundamenta-se em 3 ações básicas: 1) realização dos exames de triagem neonatal; 2) confirmação diagnóstica; 3) acompanhamento e tratamento de pacientes detectados no programa. Doze estados (Acre, Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Rondônia, Sergipe e Tocantins) estão habilitados na fase I do Programa, o que significa que estão aptos a realizar triagem para PKU e Hipotireoidismo Congênito (HC); Dez estados, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernanbuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, estão habilitados na Fase II e realizam triagem para PKU, HC e Hemoglobinopatias (Hbpatias) e os estados do Paraná e de Santa Catarina estão habilitados na Fase III realizando, além dos já referidos exames, a triagem para Fibrose Cística (FC) (49,51). Três estados brasileiros não estão credenciados ao programa: Amapá, Roraima e Piauí (49). Segundo o último levantamento

nacional do Sistema de Referência em Triagem Neonatal (SRTN), de agosto de 2003, a cobertura média do País é de 72,7%. A média mais elevada está na região Centro-Oeste (84,7%) e a menor na Nordeste (52,6%). Na região Sul, a cobertura é de 69,8% (49). Estes dados mostram aumento da cobertura populacional e consolidação do PNTN, pois no ano de 2000, segundo estatísticas não oficiais do MS, cerca de metade dos 3.000.000 de recém-nascidos não realizaram o teste do pezinho (52). Além da falta de cobertura, também havia a ausência de um sistema de controle de qualidade para análise das diversas variáveis que interferem no programa: idade de coleta do exame, entrada do material, comunicação do resultado aos pais, falsos positivos, entre outros (49).

Para obter-se um bom sistema de rastreamento é essencial um diálogo permanente entre pediatras e bioquímicos, os quais devem ter treinamento amplo e específico. Um laboratório bem equipado é um pré-requisito absoluto. A cooperação entre laboratórios pode dar bons resultados (54). Além da integração de vários profissionais de saúde, a colaboração das famílias é importante. Pela complexidade, pode ser difícil monitorar esse tipo de programa (55), mas diversos países o estão fazendo. No Reino Unido, foi realizada auditoria, no período de abril de 1994 a março de 1996, sobre o rastreamento de fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. Os resultados mostraram que todos os bebês, exceto por recusa dos pais, têm sido triados e os casos positivos iniciam o tratamento até a quarta semana de vida, o que pode ser considerado satisfatório (56). Em Portugal, o programa nacional de diagnóstico precoce apresenta uma taxa de cobertura de 99%, considerando que a amostra é colhida fora do hospital, e o tempo médio de início do tratamento é de 13 dias. A triagem para PKU nesse

país teve início em 1979 e, desde então, 143 crianças foram diagnosticadas (57). Na França, país onde a triagem neonatal para PKU começou em 1966, existe desde 1978 uma associação nacional para organizar o programa e controlar sua eficácia (58).

Além dos exemplos dados pela literatura, os quais relatam alterações de neuro-imagem, déficit de atenção, tremores e prejuízos no desempenho escolar, análises sobre os custos dos programas de triagem para PKU também têm sido realizadas através de várias metodologias. Todas sugerem que o rastreamento para PKU e seu tratamento representam uma economia para a sociedade (24). No Brasil, a implantação do PNTN levou a um impacto quantitativo e principalmente qualitativo em todo o país. Os estados ou regiões sem programa de triagem neonatal organizada ou com baixa cobertura populacional apresentaram maior evolução após a implantação do Programa Nacional (49).

O advento do tratamento da PKU e seu rastreamento foram os grandes marcos da história da doença, capazes de mudar seu curso, levando a uma geração de indivíduos intelectualmente normais e obviamente capazes de se reproduzir. A partir daí temos uma nova questão de saúde pública, a fenilcetonúria materna, um exemplo paradigmático de teratogênese química, que exige uma preocupação constante por parte dos programas de triagem e de aconselhamento genético. Recomenda-se que todas as mulheres em idade fértil com níveis elevados de fenilalanina, incluindo aquelas com PKU e também formas brandas de hiperfenilalaninemias, sejam identificadas e aconselhadas sobre seus riscos e sobre os efeitos dos níveis não controlados de Phe durante a gravidez (59). Mulheres adultas portadoras de PKU devem manter-se em dieta,

preferencialmente pré-concepcional (61,62) para que os níveis de Phe não ultrapassem 6 mg/dl. Além disso, preconiza-se também o uso de ácido fólico, capaz de reduzir em até 40% as anomalias conotruncais (63). O quadro é considerado grave e por isso em alguns países europeus é recomendado o aborto terapêutico nos casos em que a fenilalanina materna se mantenha acima de 11,7 mg/dl (702 µMol/L). Nos EUA, o nível para tal procedimento é a partir de 14,9 mg/dl (894 µMol/L) (64).Vários estudos demonstram a importância disso. Um estudo realizado com 574 mulheres, agrupadas de acordo com seus níveis de Phe, no período de 1984-1995, concluiu que todas as mulheres com PKU devem manter seus níveis entre 2-6mg/dl (120-360 µmol/L) antes da concepção e até a 10ª semana de gravidez para que a prole tenha um QI normal (59,64). O Estudo Colaborativo de Fenilcetonúria Materna, que engloba países como EUA, Canadá e Alemanha, acompanhou 576 mulheres em 12 anos. Nesse período, 28% delas (n=162) sofreram abortos eletivos ou espontâneos. Das restantes 414, 7,5% (n=31) tiveram filhos cardiopatas. Vale ressaltar que o problema cardíaco se mostrou diretamente relacionado ao nível de Phe, já que todas essas crianças eram filhos de mulheres com níveis acima de 10mg/dl (600µmol/L). A avaliação do desenvolvimento também se mostrou melhor na prole de mulheres com melhor controle de dieta (64). Na Irlanda do Norte, onde a incidência da doença é de 1:4000 nascimentos, um estudo longitudinal acompanhou 28 gestações de 15 mulheres com PKU Clássica. Foi detectado um aborto e 12 crianças com anomalias congênitas e RDNPM. O mesmo estudo seguiu 17 mulheres com Hiperfenilalaninemia (HPA) que fizeram dieta pré e periconcepcional. O DNPM das crianças foi considerado normal e nenhuma apresentou anomalias (11).

Estudos randômicos para rastreio de doenças raras são difíceis, mas dados observacionais de estudos prospectivos colaborativos podem prover informações sobre o teste, o programa e os efeitos clínicos para guiar decisões políticas. Isto exige estratégias coordenadas e recursos, os quais são vitais para que os programas de triagem neonatal sirvam às crianças e às suas famílias e não simplesmente à tecnologia (65).

3. Justificativa

Por ser a PKU uma doença freqüente, cujo diagnóstico é fácil, barato e aceitável e possuir bom prognóstico se diagnosticada e tratada precocemente, justifica-se este tipo de estudo para avaliação de seu programa de triagem e possíveis inferências. Por outro lado, o fato de os pacientes estarem recebendo atendimento médico e nutricional especializado ao longo dos anos, no Ambulatório de PKU do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pela Secretaria de Saúde, torna-os potencialmente fáceis de serem contactados, motivando ainda mais este estudo.

4. Hipóteses

Nossas hipóteses são as seguintes

- a de que a triagem neonatal está sendo realizada cada vez mais precocemente
- A de que o manejo nutricional, também, se esteja tornando progressivamente mais adequado.
- E a de que o desfecho cognitivo também esteja sendo mais satisfatório nos pacientes triados ao longo do tempo.

5. Objetivos

5.1 Objetivo Geral

■ Identificar a população submetida à triagem neonatal no Rio Grande do Sul entre 1986 e 2003, cujo teste foi positivo para hiperfenilalaninemia.

5.2 Objetivos Específicos

■ Estimar a incidência das hiperfenilalaninemias no Rio Grande do Sul

■ Verificar os níveis de controle de fenilalanina

■ Identificar pacientes em risco para PKU materna

■ Identificar pacientes triados para outras hiperfenilalaninemias

■ Correlacionar os diferentes anos de realização do Teste, com o início do tratamento e com a evolução do quadro clínico, através do DNPM e escolaridade.

6. Metodologia

6.1 População alvo

A população-alvo deste estudo foi composta por jovens e crianças com idade entre 6 meses e 16 anos de idade, que realizaram Teste do Pezinho nos dois laboratórios de referência do Estado (CTN Diagnósticos e Faculdade de Farmácia – UFRGS) ou que foram atendidas nos ambulatórios de referência (Ambulatório de PKU do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e o Centro de Referência em Triagem Neonatal do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas) para PKU no Rio Grande do Sul.

A partir do cadastro dos laboratórios e dos ambulatórios, os pacientes foram identificados e então listados para a pesquisa. Através de tais registros, foi possível selecionar para entrevista os pacientes fenilcetonúricos, separando-os de pacientes com outras hiperfenilalaninemias. Uma vez selecionados, iniciou-se a coleta de dados por entrevista telefônica. Para os quais este meio de comunicação não estava disponível, a entrevista foi feita pessoalmente no ambulatório do HCPA. Alguns desses pacientes, porém, não compareceram no dia previsto para consulta e outros tinham telefone registrado no prontuário hospitalar, mas o mesmo estava desatualizado. Nesses casos, foi enviada uma correspondência explicando o motivo da pesquisa, a importância dos dados e convidando-os a entrar em contato com a investigadora principal, através de uma ligação a cobrar. A carta determinava um horário para a ligação e também os números a serem contactados. Quando dessa maneira não houve resposta, foi enviada nova correspondência contendo uma carta da investigadora principal, um questionário

de versão simplificada e dirigido especificamente para aquela criança (ver anexos) e um envelope já selado e endereçado, caso o responsável aceitasse participar da pesquisa. O caso foi dado como perda após 20 dias dessa última tentativa sem qualquer resposta do paciente ou retorno da correspondência enviada.

Em casos que o registro não elucidava completamente o tipo de hiperfenilalaninemia a família foi igualmente contactada por telefone para esclarecimento.

Com o objetivo de maximizar o acompanhamento destes pacientes e conseqüentemente reduzir a probabilidade de ocorrência de viés de seleção, foi feito também contato com as clínicas metabólicas e com instituições que sabidamente acompanham esses pacientes, como por exemplo, a APAE.

6.2 Amostra estimada

Sabe-se que a incidência de PKU, no RS, é de 1 bebê em cada 12.000 nascimentos (66). Estima-se que a cobertura do programa de triagem neonatal, no nosso estado, seja em torno de 50%. Como a taxa de nascimentos no RS é de, aproximadamente, 180.000 por ano, estima-se que 15 novos casos de PKU estejam nascendo por ano, mas que apenas 7 deles sejam diagnosticados pela triagem neonatal. Como o nosso estudo cobriu 17 anos (1986-2003), deveria ele incluir os 112 jovens e crianças com PKU, diagnosticadas pelo programa de triagem neonatal no mesmo período. Entretanto, estimou-se que alguns poucos casos seriam perdidos, por volta de 30%, já que existem poucas clínicas metabólicas no estado, como mencionado anteriormente, o que facilitaria a

identificação dos pacientes, mesmo para aqueles que mudaram de endereço. Assim, foi estimado para o estudo que o número de pacientes a serem identificados seria de 80. Com este número, teríamos um poder estatístico superior a 80%, para demonstrar as principais associações de interesse para o estudo. Poder estatístico denota a probabilidade de que a hipótese nula seja rejeitada quando ela é realmente falsa (67).

6.3 Delineamento

O presente estudo caracterizou-se como sendo uma coorte ambispectiva, já que as variáveis de exposição e o início do acompanhamento dos pacientes aconteceram no passado, isto é, no momento em que realizaram a triagem neonatal. Por outro lado, o desfecho medido acontece no momento do estudo. A possível ocorrência de sintomas neurológicos decorrentes de um mau controle dos níveis de fenilalanina foi medida na entrevista com pais ou responsáveis. A avaliação do controle laboratorial foi feita através da revisão dos exames realizados anteriormente.

As vantagens desse delineamento consistem na sua fácil execução, curta duração, baixo custo e aplicabilidade a doenças raras de baixa incidência e para avaliação de desfechos, cujo tempo de latência é longo. Além de permitir a varredura de outros fatores e ter reprodutibilidade (68, 69, 70).

6.4 Critérios de inclusão

a) Nascimento entre janeiro de 1986 e março de 2003

b) Ter sido submetido à triagem neonatal, com resultado positivo para HPA subseqüentemente confirmado.

6.5 Critérios de exclusão

a) Crianças e jovens com PKU que tiveram diagnóstico tardio, ou seja, após manifestações secundárias que levaram a solicitação de exames metabólicos e conseqüentemente dosagem de fenilalanina, mas não realizaram triagem neonatal.

b) Crianças e jovens submetidos à triagem neonatal nascidos anteriormente a 1986 ou após março de 2003.

c) Crianças, cujo seguimento laboratorial evidenciou tratar-se de uma Hiperfenilalaninemia Transitória.

6.6 Instrumento

Foi aplicado um questionário padronizado e pré-codificado (ver anexos) contendo variáveis demográficas, como: nome do paciente e do responsável entrevistado, data de nascimento, endereço, telefone para contato e sexo; e outras específicas sobre a patologia, tais como: idade na coleta do teste de triagem, idade ao diagnóstico, local e época de início do acompanhamento clínico e presença de sintomas como hiperatividade, convulsões, dificuldades escolares e ainda questões sobre desenvolvimento. Para crianças de 7 anos foram indagados sobre os marcos do desenvolvimento e também sobre escolaridade.

Indagou-se às pacientes do sexo feminino com mais de 10 anos de idade e/ou a seus responsáveis, se já haviam sido informadas sobre riscos e cuidados com a PKU materna. Ao final do estudo, será enviado folder informativo sobre o assunto sugerindo que o mesmo possa ser discutido com seu médico responsável. Após a entrevista, foi preenchida a ficha de identificação laboratorial (anexo II) onde foram registradas todas as dosagens desde a primeira até julho de 2003.

6.7 Processamento e Análise de Dados

Ao longo da coleta os dados foram registrados no programa EPI INFO (71), formando um banco de dados, onde foi definida a amplitude das variáveis (valores mínimos e máximos) e programada a sua consistência. A análise foi realizada através dos programas estatísticos Stata (72) e SPSS (73).

As variáveis principais foram as seguintes:

6.8 Desfechos:

a) Evolução do quadro clínico: através dos marcos do desenvolvimento (tabela 5) para crianças até 7 anos de idade. Para aqueles com idade superior, foram feitas perguntas relativas à escolaridade, presença de sintomas neurológicos e uso de medicações, conforme anexo.

b) Controle da fenilalanina: número de vezes em que o nível de fenilalanina esteve acima do valor limite superior (10 mg/dL ou 600 μmol/L) dividido pelo número de exames realizados, obtida através da ficha de controle laboratorial do paciente.

Tabela 5. Marcos do desenvolvimento de acordo com a idade

Idade	Desenvolvimento	Idade	Desenvolvimento
0 – 12 meses	Sorriso social Sustento cefálico Senta com apoio Senta sem apoio Segura objetos Aponta objetos	12 – 18 meses	Bebe água no copo Fica em pé s/ apoio Caminha sozinho Sobe escadas? Fala uma palavra
18 –24 meses	Fica em pé s/ apoio Sobe escadas Corre Escova dentes com ajuda Usa talheres	2 – 3 anos	Fala 6 palavras Forma frases Identifica figuras Identifica amigos Conhece partes do corpo (6)
3 – 4 anos	Caminha/Idade Forma frases Conhece adjetivos Conhece cores (4) Veste-se sem ajuda	4 –5 anos	Caminha/Idade Dança Conta objetos Desenha formas Veste-se sem ajuda
5 – 6 anos	Caminha/Idade Frases/Idade? Joga bola? Copia/ desenha formas/pessoas		

6.9 Exposições de interesse:

a) Idade de diagnóstico: idade em dias na qual foi feito o diagnóstico de PKU.

b) Ano do nascimento

Para avaliar se houve uma tendência histórica de a idade do diagnóstico se tornar mais precoce nos últimos anos, a amostra total foi estratificada de acordo com o ano de nascimento e foi usado o teste de qui-quadrado. O teste de qui-quadrado para tendência linear também foi utilizado, permitindo assim avaliar se além de ter havido ou não uma tendência ao aumento na proporção de diagnósticos precoces, se esse aumento ocorreu de uma forma linear.

A análise de variância foi utilizada para averiguar uma possível associação entre a evolução clínica e a idade do diagnóstico ou o ano de diagnóstico.

Também foi buscada uma possível associação entre a idade do diagnóstico e o controle da Phe, mas, mais importante ainda, entre o ano do diagnóstico e o controle da Phe (Anova).

Para avaliar o efeito conjunto do número de dosagens de Phe alteradas (acima de 10mg% ou 600 μMol/L) e da idade do diagnóstico sobre o DNPM, foi utilizada análise de regressão logística.

6.10 Limitações do Estudo

Por se tratar de um estudo ambispectivo, as informações coletadas retrospectivamente, no que diz respeito à idade da coleta do exame, início do tratamento, controle da PKU e risco de recorrência, podem estar sujeitas a viéses de memória (de informação), ou seja, as informações originadas podem ser

incompletas em virtude do longo tempo decorrido. Os estudos de coorte também estão sujeitos ao viés de perda de acompanhamento, o qual pode ocorrer ao longo do tempo por diversos motivos, entre eles, óbito, não-cooperação, migração, dificuldades em manter o seguimento ou ainda, falta de registros adequados (74). No presente caso, a perda pode estar associada, tanto à exposição, quanto à doença resultando no chamado viés de perda seletiva de seguimento. Uma situação possível neste estudo seria, por exemplo, crianças com diagnóstico mais tardio e, portanto, com pior prognóstico, abandonarem mais facilmente o acompanhamento clínico e com isso, maior a probabilidade de não serem encontradas. Felizmente, como veremos nos resultados, parece que isso não ocorreu, foram identificados 58 pacientes e desses 54 fizeram parte da pesquisa.

7. Aspectos Éticos

Por ser este um projeto concretizado através de entrevista telefônica, supomos que a aceitação do indivíduo em prestar informações espontâneas, orais, constituiu-se em um consentimento implícito à realização dessa investigação e ao aproveitamento dos dados. É claro que, na entrevista, foi garantido o respeito à privacidade dos dados e o anonimato dos casos. Os sujeitos entrevistados, poderiam apenas recusar-se a participar seja qual for o meio pelo qual foram contactados.

Esse tipo de entendimento da figura do consentimento informado já foi apresentado e aceito pelos revisores de bioética em outros estudos realizados no âmbito deste Hospital (vide projeto, "As Manifestações Depressivas na doença de Machado-Joseph" de Laura Jardim e colaboradores) particularmente em estudos que aplicaram instrumentos de avaliação de qualidade de vida e de saúde psicológica.

8. Referências Bibliográficas

1. Levy LH. Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment. Proc. Natl. Acad. Sci, 96:1811-1813, 1999
2. Scriver CR. Acta Paediatr Suppl 407: 11-18, 1994
3. Centerwall AS, Centerwall W. The discovery of Phenylketonuria: The Story of a Young Couple, Two Retarded Children, and a Scientist. Pediatrics, 105: 89-103, 2000.
4. Guthrie R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S4- S5, 1996.
5. Vogel F, Motulsky AG. Capítulo 7, pág: 236-237 In: Genética Humana, Problemas e Abordagens. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 3 ed, 2000.
6. Hoffee PA. Distúrbios hereditários monogênicos. Capítulo 11, pág:230-231 In: Genética Médica Molecular. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 1 ed, 1998.
7. Smith I, Lee P. The Hyperphenylalaninemias In: Fernandes J, Saudubray JM e van den Berghe G. Inborn Metabolic Diseases 3rd ed . Springer, 2000, 171-179.
8. Scriver CR *et al.* The Hyperphenylalaninemias. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherted Disease, 7th ed , New York, MacGraw-Hill, 1995, 1015-1079.
9. Clarke JTR. A clinical guide to inherted metabolic diseases. Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
10. Lyon G, Adams R D, Kolodny EH. Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1996.

11. Magee AC, Ryan K, Moore A, Trimble ER. Follow up of fetal outcome in cases of maternal phenylketonuria in Northern Ireland. Arc Dis Child Fetal Neonatal , 87: 141-143, 2002.

12. Pires RF. Aminoacidopatias. In: Carakuchansky, G. Doenças Genéticas em Pediatria. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

13. De Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. Rev Saúde Pública; 34 (1):86-96, 2000.

14. Giugliani R, Coelho JC. Diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo na América Latina. Revista Brasileira de Genética, 20(1), suplemento, 147-154, 1997.

15. Gütler F, Guldberg P. The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S6-S10, 1996.

16. www.mcgill.ca/pahdb.

17. Nowacki P, Byck S, Prevost L, Scriver CR. The PAH mutation analysis consortium database: update 1996. Nucleic Acids Research, 25(1):139-142, 1997.

18. Silva LCS, Carvalho TS, Silva FB, Morari L, Fachel AA, Pires R, Refosco LF, Desnick RJ, Giugliani R e Pereira MLS. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. Molecular Genetics and Metabolism, 79:17-24, 2003.

19. Carvalho MRS et al. Fenilcetonúria – Mutações mais freqüentes, perspectivas futuras. Anais do II Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal. Belo Horizonte, 24-27 de setembro/2003.Rev. Med Minas Gerais; 13 (1 supl 2): S132-135, 2003.

20. Bugard P, Rupp A, Konecki DS, Trefz FK, Schimidt H, Lichter-Konecki U. Phenylalanine Hydroxylase genotypes, predicted residual enzyme activity and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155, suplemento 1:11-15, 1996.

21. Bickel H. The first treatment of phenylketonuria. Eur J Pediatr (Suppl 1): S2-S3, 1996.

22. Council Working Party on Pheylketonuria. Recomendations on the dietary management of phenylketonuria. Arch Dis Child, 68(3):426-427,1993.

23. Acosta P. Nutrition Management of patients with phenylketonuria. Rev Med Minas Gerais; 13 (1 Supl 2): S129, 2003.

24. Einensmith RC, Woo SLC. Gene Therapy for Phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155, suplemento 1, 16-19, 1996.

25. Sarkissian et al. A different aproach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. Proc. Natl. Acad. Sci, 96:2339-2344, 1999.

26. Muntau AC et al. Tetrahydrobiopterin as na alternative treatment for mild phenylketonuria. N Eng J Med, 347 (26): 2122-2132, 2002.

27. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Phenylketonuria: screening and management. October 16-18, 2000.

28. Rey F; Abadie V; Plainguet F; Rey J. Long-term follow up of patients with classical phenylketonuria after diet relaxation at 5 years of age. The Paris Study. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S39-S44, 1996.

29. Scheibenreiter S et al. Austrian report on longitudinal outcome in phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S45-S49, 1996.

30. Cechak P; Hejcmanova L; Rupp A. Long-term follow up of patients treated for phenylketonuria (PKU). Results from the Prague PKU Center. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S59-S63, 1996.

31. Thompson AJ et al. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. Lancet 336:602-606, 1990.

32. Schimidt E, Bugard P, Rup A. Effects of concurrent phenylalanine levels on sustained attention and calculation speed in patients treated for phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155, suppl 1:S82-S86, 1996.

33. Azen C, Koch R, Friedman E, Wenz E, Fischer K. Summary of findings from the United States Colaborative Study of children treated for phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155 suppl 1: S29-S32, 1996.

34. Bugard P, Schimidt E, Rup A, Schneider W, Bremer HJ. Intelectual devlopment of the patients of the German collaborative study of children treated for phenylketonuria. Eur J Ped, 155, suppl 1: S33-S38, 1996.

35. Pietz J, Meyding-Lamadé UK, Schimidt H. Magnetic resonance imaging of the brain in adolescents with phenylketonuria and in one case of 6-pyruvoyl tetrahydropteridine synthase deficiency. Eur J Pediatr, 155, suppl 1: S69-S73, 1996.

36. Pietz J et al. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. Eur J Pediatr, 157: 824-830, 1998.

37. Cerone R; Schiaffino MC, Di Stefano S; Veneselli E. Phenylketonuria: diet for life or not? Acta Paediatr 88:664-666, 1999.

38. Ris DM; Williams SE; Hunt MM; Berry HK; Leslie N. Early-treated phenylketonuria: Adult neuropsychologic outcome. The Journal of Pediatrics, 124(3): 388-392.

39. Walter JH et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? Lancet, 360:55-57, 2002.

40. Khoury JM. From Genes to Public Health: The applications of Genetic Technology in Disease Prevention. Am J Public Health, 86(12):1717-1722, 1996.

41. Grimes DA, Schulz KF. Uses and abuses of screening tests. Lancet, 359 (9) :881-884, 2002.

42. Ades AE. Evaluating screening tests and screening programes. Lancet :792-795.

43. Souza CMF, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem Neonatal de Distúrbios Metabólicos. Ciência e Saúde Coletiva, 7 (1):129-137, 2002.

44. Schwartz IVD, Neto EC, Giugliani R. Considerações sobre o momento da da colheita da Triagem Neonatal. Jornal de Pediatria, 76 (6):474-5, 2000.

45. Buist NRM, Tuerck JM. The practioner's role in newborn screening. Pediatric Clinics of North America, 39(2):199-211, 1992.

46. Charbonneau M, Laberge C, Scriver CR, Dussault JH, Lemieux B, Melançon S. The Quebec Network of Genetic Medicine. Canadian Journal of Public Health, 78:79-82, 1987.

47. Lemieux B, Auray-Blais C, Giguére R, Shapcott D, Scriver CR. Newborn Urine Screening Experience with one Million Infants in the Quebec Network of Genetic Medicine. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 11:45-55, 1988

48. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr, 156:650-654, 1997.

49. Carvalho TM. Programa Nacional de Triagem Neonatal – Resultados obtidos e a experiência dos programas consolidados. Rev Med Minas Gerais; 13 (1 Supl 2): S109-S110, 2003.

50. Vargas PR. Controle e Avaliação pelo SUS – APAC's e medicamentos excepcionais. Rev Med Minas Gerais; 13 (1 Supl 2): S123-S124, 2003.

51. Carvalho TM. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN) 2001/2002. Rev Med Minas Gerais; 13 (1 Supl 2): S120-S121, 2003.

52. Ministério da Saúde: Portaria 822, 6 de junho de 2001.

53. Ashton-Prolla P, Schwartz IVD, Burin M, Giugliani R. Estratégias de prevenção dos erros inatos do metabolismo. In: Carakuchansky G. Doenças Genéticas em Pediatria. Ed. Guanabara –Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

54. Duran M, Dorlan L, Wadman SK, Berger R. Group tests for selective screening of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr, 153, suplemento 1:27-32, 1994.

55. Galloway A, Stevenson J. Performance of neonatal screening programme must be monitored. BMJ, 312:1158, 1996.

56. Simpson N, Randall R, Lenton S, Walker S. Audit of neonatal screening programme for phenylketonuria and hypothyroidism. Arh Dis Child Fetal Neonatal, 77:228-234, 1997.

57. Vaz-Osório R, Vilarinho L, Soares JP, Almeida MF, Carmona C, Martins E. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (20 anos de rastreio neonatal). Arquivos de Medicina 13(3): 163-168, 1999.

58. Abadie V, Berthelot J, Feilet F, Maurin N, Mercier A, de Baulny HO, Parscau L. Neonatal screening and long term follow-up of phenylketonuria: the French database. Early Human Dev, 65(2): 149-158, 2001.

59. American Academy of Pediatrics, Comitee on Genetics. Maternal Phenylketonuria. Pediatrics, 107 (2):427-428, 2001

60. Boy R. Rastreamento de Doenças Genéticas no Recém-nascido. In: Carakuchansky G: Doenças Genéticas em Pediatria. Ed. Guanabara-Koogan, 2001.

61. American Academy of Pediatrics, Comitee on Genetics. Maternal Phenylketonuria. Pediatrics, 95(3):54-55, 1997.

62. Koch R et al. Maternal Phenylketonuria (PKU): An International Study. Abstracts SSIEM 39th Annual Symposium. Praga. Journal of Inherted Metabolic Disease 24, suplemento 1, 2001.

63. Michals-Matalon K; Platt DL; Acosta P; Azen C; Walla CA. Nutrient intake and congenital heart defects in maternal phenylketonuria. Am J Obstet Gynecol, August 441-444, 2002.

64. Platt DL et al. The international study of pregnancy outcome in Women with Maternal Phenylketonuria: Report of a 12-year study. Am J Obstet Gynecol, 182(2): 326-333, 2000.

65. Leonard JV. Screening for inherited metabolic disease in newborn infants using tandem mass spectrometry. BMJ, 324:4-5, 2002.

66. Jardim BL, Silveira EL, Leite JCL, Barth ML, Giugliani R. Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. Jornal de Pediatria 68 :189-191, 1992.

67. Last JM. A Dictionary of Epidemiology.4th ed. Oxford University Press, Oxford, 2001.

68. Rouquayrol MZ. Epidemiologia e Saúde.Cap 5:169-203. 3 Ed.MEDSI, Rio de Janeiro, 1990.

69. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner, EH. Epidemmiologia Clínica, 3 ed, Artes Médicas, Porto Alegre, 1996.

70. Sackett DL et al. Clinical Epidemiology. Litte, Brown and Company, Boston, 1991.

71. Dean AG, Dean JA, Burton AH, Dicker RC. Epi Info version 6.0: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. USD, Incorporated, Georgia, 2001.

72. Statistics Data Analysis 7.0. Texas, USA, 2001.

73. SPSS for Windows. Chicago:SPSS Inc, 1998.

74. Werneck GL; Almeida LM: Validade em estudos epidemiológicos. Capítulo 14 *In*: Medronho RA e col. Epidemiologia. Ed. Atheneu, São Paulo, 1ª ed, 2002.

9. Resultados

Os resultados referentes a este trabalho estão descritos no artigo seguinte, cuja versão é em Português.

A Triagem Neonatal no Rio Grande do Sul: como evoluiu a coorte de fenilcetonúricos em 17 anos de seguimento.

Karam SM, Jardim LB e Giugliani R

Resumo

Com o objetivo de identificar a população submetida à triagem neonatal no Rio Grande do Sul (Brasil), a incidência de Fenilcetonúria e de outras hiperfenilalaninemias e correlacionar época do diagnóstico, início do tratamento e desfecho clínico, elaborou-se este estudo delineado como uma coorte ambispectiva que avaliou 54 pacientes fenilcetonúricos entre 6 meses a 16 anos de idade. Foram realizadas entrevistas telefônicas com os responsáveis, indagando-se sobre alguns dados demográficos, outros relativos à patologia, como data da coleta da triagem, idade ao diagnóstico, início do tratamento, conhecimento sobre a herança e satisfação com o acompanhamento. Crianças de 6 meses a 7 anos foram avaliadas com relação aos marcos do DNPM; Crianças com mais de 7 anos, seus pais foram indagados a respeito da escolaridade e presença de problemas neurológicos. Após análise estatística e estratificação da amostra por ano de nascimento, não se observou uma tendência histórica do diagnóstico ter se tornado mais precoce ou de o controle laboratorial ter se tornado melhor, com o passar dos anos. Também não se observou uma associação significativa entre a idade do diagnóstico e a evolução clínica.

Palavras-chave: PKU, estudos de coorte, triagem neonatal.

Key words: PKU, cohort studies, neonatal screening.

Introdução

A fenilcetonúria clássica (PKU), que afeta 1: 10.000 nascimentos em populações caucasianas (1), é um erro inato do metabolismo determinado pela deficiência da enzima hepática fenilalaninahidroxilase (PAH), com o conseqüente bloqueio na conversão de fenilalanina (Phe) em Tirosina (Tyr) e aumento da concentração plasmática de Phe. A PKU foi descrita há 70 anos pelo médico norueguês Asbjörn Folling. Desde então muitas foram as descobertas a seu respeito, como a caracterização e mapeamento do seu gene, a identificação de mutações, a determinação da estrutura da enzima, características clínicas e bioquímicas dos afetados, correlações genótipo-fenótipo, a identificação do risco teratogênico quando da condição materna, o estabelecimento da triagem neonatal e ainda e principalmente, o seu tratamento (2). Se não diagnosticada e tratada precocemente, a PKU causa retardo mental, microcefalia, espasmos infantis, odor de rato na urina e hipopigmentação de pele, cabelos e olhos, além de outros sinais e sintomas (1,3). Em razão disso, a partir de 1958, começou a ser testada a possibilidade de se estabelecer um método de triagem de massa usando amostras de urina, e posteriormente sangue, em papel filtro. Essa técnica, denominada teste de Guthrie, teve um papel importante para o desenvolvimento da triagem neonatal até ser substituída por métodos quantitativos automatizados, embora ainda seja usada em alguns centros até os dias de hoje.

A triagem neonatal para PKU teve início em 1961 nos EUA (4) e posteriormente no Canadá, em 1969 (5). No Brasil, a triagem neonatal iniciou em 1976 através de um trabalho pioneiro da APAE-SP (6). Em Porto Alegre (RS), a partir de 1982, quando foi criado o Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LREIM - HCPA), a PKU foi a doença mais freqüentemente diagnosticada num período de 13 anos (7). Atualmente a triagem neonatal pode ser feita tanto em laboratórios privados, como pelo sistema público e pode incluir até 4 grupos diferentes de doenças *(Hiperfenilalaninemias, Hipotireoidismo Congênito, Fibrose Cística e Hemoglobinopatias)* , dependendo do Estado da federação. Não diferentemente de outros países, a introdução dos programas de rastreamento neonatal no Brasil ocorreu de forma desorganizada, sem controle de qualidade e precedeu à discussão ética (6). Por isso, muitas vezes, questões básicas a serem consideradas na testagem e prevenção de doenças genéticas como incidência, impacto na saúde pública e adequado conhecimento médico não foram bem avaliadas (8,4). Desde 2001, de acordo com a portaria 822 do Ministério da Saúde (MS), foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) que se fundamenta em 3 ações básicas: 1) realização dos exames de triagem neonatal; 2) confirmação diagnóstica; 3) acompanhamento e tratamento dos pacientes detectados no programa. Fazem parte desse programa 24 dos 27 Estados brasileiros. O Rio Grande do Sul, entre outros, realiza triagem para PKU, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias.

O presente estudo foi elaborado a partir da suposição de que a triagem neonatal estivesse sendo realizada mais precocemente e que o desfecho cognitivo se apresentasse mais satisfatório ao longo do tempo, desde o advento do teste do pezinho no nosso Estado. Os objetivos foram: (1) identificar a população submetida à triagem neonatal no RS entre 1986 e 2003, cujo teste foi positivo para hiperfenilalaninemia; (2) estimar a incidência da PKU no RS; e (3) correlacionar época de realização da triagem, idade do diagnóstico, início do tratamento e evolução do quadro clínico, através do controle bioquímico e do desenvolvimento cognitivo.

Métodos

A população alvo do presente estudo foram jovens e crianças entre 6 meses e 16 anos de idade (nascidos entre janeiro de 1986 e março de 2003) submetidos a triagem neonatal para PKU no estado do Rio Grande do Sul. Considerando-se que a incidência da doença no Estado seria de 1.12.000 nascimentos (9) e que a cobertura do programa de triagem neonatal no RS tenha sido cerca de 50%, esperava-se encontrar uma coorte de 80 indivíduos. A partir daí foram revisados os cadastros dos dois principais laboratórios que realizam triagem neonatal e também dos dois principais locais de acompanhamento de pacientes PKU. O contato com os pacientes foi feito por telefone ou pessoalmente, em sua clínica de acompanhamento, quando o paciente não dispunha desse meio de comunicação. Durante os meses de abril a setembro de 2003, foi aplicado um questionário padronizado e pré-codificado, contendo variáveis demográficas e outras como: local e data da coleta do exame, local e início do tratamento, satisfação com as informações recebidas e conhecimento sobre o risco de recorrência da PKU.

Para crianças com 7 anos de idade ou menos, foram feitas questões sobre desenvolvimento psicomotor (DNPM), conforme os marcos esperados até os 6 anos de idade, conforme tabela 1. Foram incluídos indivíduos com até 7 anos pois, embora alguns já estivessem na primeira série do primeiro grau, na época da entrevista não a teriam concluído, sendo mais fidedignos os dados relativos ao seu DNPM do que os dados ditos de escolaridade. Para aqueles com 8 anos ou mais de idade, foram feitas perguntas sobre escolaridade, atividades, presença de sintomas neurológicos e uso de medicações. Após a entrevista, foi revisada a ficha de controle laboratorial do paciente. Para ambas as situações, obteve-se consentimento verbal do responsável pelo paciente.

O presente estudo caracterizou-se como uma coorte ambispectiva, pois as variáveis de exposição e o início do acompanhamento dos pacientes aconteceram no passado (momento da triagem neonatal) e os principais desfechos medidos, a evolução do quadro clínico e o controle de Phe, aconteceram no momento do estudo.

Para avaliar uma possível tendência histórica de o diagnóstico ter se tornado mais precoce, foi utilizado o teste do qui-quadrado comparando a idade do diagnóstico com o ano de nascimento. Para averiguar uma possível tendência a um aumento na proporção de diagnósticos precoces e se a mesma foi linear, utilizou-se o teste do qui-quadrado para tendência linear. A análise de variância foi usada para verificar uma possível associação entre evolução clínica e idade do diagnóstico, bem como entre evolução clínica e ano de diagnóstico. O mesmo tipo de análise foi usado também para avaliar associações entre o ano de diagnóstico e o controle de Phe e entre a idade de diagnóstico e o controle de Phe e análise de regressão logística para avaliar o efeito conjunto de idade do diagnóstico e controle de Phe sobre o atraso no DNPM.

Resultados

Amostra

Através dos registros laboratoriais e dos centros de acompanhamento, foram identificados, no período do estudo, 418 pacientes com teste alterado para fenilalanina (Phe > 4 mg/dl). Trezentos e oitenta e três desses 418 pacientes apresentaram hiperfenilalaninemia transitória, incluindo-se nesse número (383) tanto aqueles casos causados por dieta inadequada, quanto possíveis casos falsos-positivos. Pacientes com Phe acima de 4 mg/dl que não retornaram para a segunda coleta e não foram

encontrados em nenhum centro de tratamento, totalizaram 9, sendo que um deles faleceu antes mesmo do resultado da primeira coleta. Esses 9 casos foram considerados como perdas da triagem neonatal, correspondendo a 2% (ou 9/418) dos casos inicialmente triados. Cinqüenta e oito (58) dos 418 RN inicialmente identificados foram confirmados como fenilcetonúricos. Desses 58, dois casos foram perdidos do seguimento; um caso foi encontrado, mas acabou por ser excluído do estudo, pois realizava acompanhamento em outro estado; e uma quarta criança foi a óbito aos 3 meses de idade, por problemas não relacionados à PKU. Dos 54 que permaneceram na coorte, 6 foram classificados como provável PKU não clássica. Esses 54 casos de PKU correspondem a 53 famílias independentes: uma das famílias apresentou recorrência (na verdade, dos 53 casais incluídos, oito tiveram outros filhos após o nascimento do primeiro filho com PKU, e desses oito, apenas um foi também afetado, tendo sido incluído na coorte). As principais características da coorte de pacientes com PKU encontram-se na tabela 2.

Incidência

A incidência da PKU, tanto a clássica quanto a não clássica, no nosso Estado, pôde ser inferida ano a ano, no período averiguado. Entretanto, os anos nos quais a cobertura foi maior foram os de 2001 e 2002, nos quais respectivamente 57 e 67% da população de RN foi efetivamente testada. A incidência nesse último ano, provavelmente mais confiável do que nos demais, foi de 1: 17.778 nascimentos.

A Tabela 3 mostra o número total de triagens neonatais realizadas, e de pacientes PKU identificados a partir de 1992. Essa tabela considera os casos investigados apenas a partir desse ano, pois os dados anteriores, referentes aos

resultados normais dos laboratórios de triagem neonatal, estavam incompletos. Nenhum teste foi positivo para deficiência de BH_4. A tabela não incluiu os casos de hipertirosinemia transitória.

Dados subjetivos

A maioria dos pais ou responsáveis, ou 75,93% (41/53), quando indagada sobre a satisfação com as informações recebidas sobre a doença de seus filhos, respondeu estar satisfeita. Apenas 24,07% (13/53) mencionaram sentir-se insuficientemente informados. Em relação ao risco de recorrência da PKU para futuros filhos do casal, 15 informantes (ou 27,78%) responderam que esse risco é de 25-30%, enquanto 39 informantes (72,22%) responderam que não sabiam, não lembravam ou deram respostas incorretas, tais como: risco de 100%, 89%, "risco apenas para filhos dos filhos" ou "nenhum risco", pois aquele filho já era afetado. Três meninas com mais de 10 anos de idade e/ou suas mães responderam perguntas sobre o risco de PKU Materna: duas delas sabiam dos riscos para seus futuros filhos e também desejavam mais informações a respeito.

Dados objetivos

Idade de diagnóstico

A idade do diagnóstico relacionou-se diretamente ao início do tratamento. Este se deu até o trigésimo dia de vida para 53,7% (n = 29) dos pacientes; entre 31 e 60 dias de vida para 33,3% (n = 18) e com mais de 60 dias para 13% (n = 7) deles. Na Tabela 4, esses três grupos estratificados de acordo com a idade do diagnóstico foram distribuídos de acordo com os seus anos de nascimento. A intenção era observar se com o passar dos anos cronológicos, a idade de diagnóstico e, conseqüentemente, o início do tratamento, não se estariam tornando mais precoces e mais eficazes. Pode ver-se que a idade do diagnóstico mostrou uma leve tendência a se tornar mais precoce nos últimos anos (2000 em diante), mas essa diferença em relação aos anos anteriores não foi estatisticamente significante.

Dos 54 pacientes fenilcetonúricos identificados, 53 estão em acompanhamento e 1 abandonou o seguimento ambulatorial há 6 anos. Todos os pacientes em acompanhamento seguem uma dieta restrita em Fenilalanina (Phe) e recebem complementos alimentares a partir de hidrolizados de caseína

Controle de Phe

A manutenção e a eficácia do tratamento nutricional da PKU foram inferidas indiretamente, através dos resultados das dosagens plasmáticas da Phe, realizadas periodicamente. Variações observadas no controle bioquímico poderiam acontecer em função dos mais diferentes fatores. No presente estudo, buscou-se, a princípio, observar- se as descompensações metabólicas – evidência de um pior controle nutricional - teriam apresentado alguma tendência a aumentar ou a diminuir (1) com a idade em que se fez o diagnóstico e se instituiu a dieta; (2) com a própria idade dos afetados; e (3) quanto ao ano de nascimento. Mais tarde, tentou-se reconhecer se esses

descontroles repercutiram no DNPM. Para avaliar isso, calculou-se quantas vezes o indivíduo apresentou descompensações clinicamente relevantes dentre as vezes em que dosou a Phe, arbitrando-se que essas corresponderiam a dosagens de Phe plasmática acima de 10 mg%. Estabeleceu-se, portanto, uma relação do número de exames alterados (Phe acima de 10 mg%) sobre o número total de exames feitos para cada caso. Esses dados estão apresentados na tabela 5. Essa tabela mostra o período de vida dos indivíduos, a média do número total de dosagens de Phe e a média de dosagens alteradas de Phe, ambas com o respectivo desvio-padrão. A média do total de exames realizados nos primeiros 6 meses de vida, por exemplo, foi de 5,35 (DP=2,05) e a média de amostras com concentração de Phe acima de 10mg/dl nesse mesmo período foi de 2,75 (DP= 1,78), mas consideraram-se apenas as dosagens a partir do sexto mês de vida, quando seguramente todos já estavam em dieta restrita em Phe. Ressalta-se que em alguns casos a dieta foi instituída após 2 ou 3 dosagens. Foram realizadas, no total, 1164 dosagens plasmáticas de Phe nos 53 doentes em estudo. Destes exames, 546 apresentaram resultados de Phe superiores a 10 mg%. Pode observar-se, pela Tabela 5, que as descompensações metabólicas se vão tornando cada vez mais freqüentes, de uma maneira bastante linear, à medida que a criança cresce: entre os 6 e os 12 meses, 48,0% dos exames apresentaram-se descompensados, enquanto a partir dos 10 anos praticamente todos os resultados (ou 100%), dado que apresentou associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Relação entre idade do diagnóstico e controle de Phe

No que diz respeito à possível relação entre o descontrole e a idade do diagnóstico, a tabela 6 mostra, de acordo com a proporção de exames alterados nos

dois primeiros anos de vida, que não houve associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$), ou seja, entre os 3 grupos analisados, a proporção de dosagens alteradas de Phe foi semelhante, não estando relacionada a um diagnóstico mais precoce ou mais tardio.

Relação entre os anos cronológicos estudados (ou condições gerais do Sistema de Saúde) e o controle da Phe

O efeito das mudanças nas condições gerais do Sistema de Saúde no atendimento dos casos de PKU, triados a partir do teste do pezinho poderia ser inferido através da relação entre o ano de nascimento do propósito com o seu controle (ou descontrole) nutricional. Para averiguar isso, examinou-se o controle bioquímico dos exames realizados, através da proporção de exames alterados, entre os 6 e 24 meses de vida, conforme o ano de nascimento. A tabela 7 mostra que houve uma tendência à queda na proporção de exames acima de 10mg% de 1986 até o ano 2000 e, depois, uma aparente elevação, de 2001 a 2003.

Avaliação do DNPM e da escolaridade

A presença de cognição normal, meta de todo o tratamento nutricional da PKU, não pôde ser diretamente examinada no presente estudo. Em seu lugar, os marcos do DNPM (Tabela1) até os 7 anos de idade, e, depois, a escolaridade, deram uma medida grosseira da performance cognitiva dos propósitos. Arbitrou-se que 2 falhas ou lapsos seriam indício de redução da capacidade cognitiva esperada. Setenta e dois por cento

(n= 29) dos 40 pacientes até 7 anos de idade não apresentaram nenhuma falha nos marcos do desenvolvimento para sua idade e 15% (n=6) apresentaram falhas em dois ou mais. Um paciente teve 5 falhas, mas, por ser portador de síndrome de Down, foi excluído da análise. Na tabela 8, esses dados estão estratificados de acordo com o ano de nascimento.

A cognição atingida é, novamente, dependente de uma série de fatores concorrentes durante o tratamento da PKU. Tentou-se aqui observar se a idade do diagnóstico (a), se o descontrole bioquímico (b) e se o ano do nascimento (c) se associaram diretamente à capacidade intelectual, inferida através do questionário. A Tabela 9 relaciona o DNPM com com o número de descompensações. Apesar de o valor de *p* encontrado não ser significativo, observa-se uma tendência clara de aumento no número de falhas no DNPM, conforme o maior número de dosagens acima de 10 mg%. Ainda sobre o controle da Phe, buscou-se avaliar o efeito conjunto do mesmo e da idade ao diagnóstico sobre as falhas nos marcos do DNPM, para as crianças com até 7 anos de idade. Para tal, foi usada análise de regressão logística, a qual sugeriu que pacientes com 3 ou mais exames alterados nos dois primeiros anos de vida apresentam uma razão de chances 11 vezes maior para falhas nos referidos marcos ($p > 0,05$; IC 95% 0,941 – 78,455).

Em relação aos 13 pacientes com idade entre 8 e 16 anos, 4 relataram ter repetido uma vez algum ano escolar e um deles repetiu duas vezes. Um paciente está em escola especial e ainda não foi alfabetizado. Houve, portanto, 2/13 casos (ou 15,3% do grupo) com redução da capacidade cognitiva esperada.

Discussão

Por ser uma doença pan-étnica, a PKU têm uma incidência variável e que pode sofrer variações geográficas em um mesmo país. No Brasil, já foi estimada em 1:15.000 nascimentos no Estado de São Paulo (SP) (10); 1: 20.000 em Minas Gerais (MG) (11) e em estudo anterior no RS (9) 1:12.500 nascimentos. Deve considerar-se que nesse Estado, a natalidade que era de 180.000 nascimentos/ ano caiu nos últimos anos para 160.000 (12).

A freqüência da PKU, seu modo de herança e o grave quadro clínico que acarreta, motivaram a organização dos programas de rastreamento da doença que tiveram início em diversos países a partir da década de 60. Revisões recentes em vários desses países concluem que o rastreamento neonatal da PKU é um esforço necessário em termos financeiros, mas de benefício variável para cada país, dependendo da incidência e da cobertura financeira provida pelo sistema de saúde. Além disso, o sucesso do programa de rastreamento neonatal não depende somente da qualidade de sua organização, mas também do manejo e do seguimento dos pacientes afetados (13).

O presente estudo encontrou 54 pacientes, 53 dos quais em seguimento ambulatorial (tabela 2). Pelos dados de prevalência anteriormente publicados (9), estimava-se encontrar 80 casos, desde que a cobertura fosse realmente de 50% dos nascimentos ocorridos no período. Há 3 possíveis explicações para o número de diagnósticos ter sido menor do que o esperado: (1) o sistema apresentou perdas; (2) a cobertura foi menor; e/ou (3) a incidência da condição na verdade é menor do que a anteriormente estimada. Pelos registros dos diagnósticos realizados, houve 9 perdas iniciais mais 3 perdas posteriores à triagem. Portanto, o número de perdas não chega a explicar o número menor de diagnósticos observados do que o n esperado. Já a cobertura variou bastante, de ano para ano (embora oscilasse de fato ao redor dos

50%). A incidência calculada, de 1: 17.000, menor do que as anteriormente registradas (9), pode ser a melhor explicação para esse número total de diagnósticos.

A qualidade da informação compreendida sobre a PKU, normalmente transmitida à família através do aconselhamento genético, parece ter sido bastante aquém do desejável. Não só o risco de recorrência não foi bem compreendido, como parece haver uma resignação dos pais quanto ao seu pouco domínio do assunto (pois a maioria das famílias disse estar satisfeita com os conhecimentos sobre a condição).

Uma das intenções do presente estudo era observar se, com o passar dos anos cronológicos, a idade de diagnóstico e, conseqüentemente, o início do tratamento, não se estariam tornando mais precoces e mais eficazes, revelando assim um progresso no Sistema de Saúde voltado ao seu atendimento. Pode ver-se, pela Tabela 4, que a idade do diagnóstico mostrou uma leve tendência a se tornar mais precoce nos últimos anos (2000 em diante), mas essa diferença em relação aos anos anteriores não foi ainda estatisticamente significante. É possível que a ausência de significado estatístico seja devida ainda ao tamanho da amostra.

A manutenção e a eficácia do tratamento nutricional da PKU foram inferidas indiretamente, como já foi dito, através dos resultados das dosagens plasmáticas da Phe, realizadas periodicamente. Variações observadas no controle bioquímico poderiam acontecer em função dos mais diferentes fatores. No presente estudo, buscou-se a princípio se observar se as descompensações metabólicas – evidência de um pior controle nutricional - teriam apresentado alguma tendência a aumentar ou a diminuir (1) com a idade em que se fez o diagnóstico e se instituiu a dieta; (2) com a própria idade dos afetados; e (3) quanto ao ano de nascimento. Mais tarde, tentou-se reconhecer se esses descontroles repercutiram no DNPM. A maior ou menor

precocidade do diagnóstico não parece ter interferido no controle bioquímico posteriormente atingido (Tabela 6).Entretanto, ao se observar a Tabela 5, vê-se que as descompensações metabólicas vão se tornando cada vez mais freqüentes, de uma maneira bastante linear, à medida que a criança cresce: entre os 6 e os 12 meses, 48,0% dos exames apresentam-se descompensados, enquanto a partir dos 10 anos praticamente todos os resultados (ou 100%), dado que apresentou associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Esse achado demonstra que, à medida que o indivíduo cresce, se torna cada vez mais difícil a manutenção do controle bioquímico a partir da dieta, dado já várias vezes mencionado na literatura (13, 14, 15, 16, 17). O que não se sabia era que esse descontrole, no nosso meio, era tão precoce – desde os 10 anos – e nem tão prevalente: praticamente todos os indivíduos estão descontrolados durante todo o tempo, a partir dessa idade.

Como dissemos, o efeito das mudanças nas condições gerais do Sistema de Saúde no atendimento dos casos de PKU triados a partir do teste do pezinho poderia ser inferido através da relação entre o ano de nascimento do propósito com o seu controle (ou descontrole) nutricional. A hipótese subjacente era a de que o sistema se teria aperfeiçoado, no que diz respeito à prescrição da dieta, à informação dada aos pais, à obtenção do alimento especial e/ou à aderência às orientações nutricionais. Tantas variáveis seriam inferidas apenas a partir do controle bioquímico, dado que estava disponível para a presente análise. Embora tenha havido uma tendência a um melhor controle bioquímico, com o passar dos anos, desde 1986 até 2000 (Tabela 4), essa tendência desapareceu nos últimos anos, justamente os anos nos quais se atingiu uma melhor cobertura dos nascimentos. Assim, o que se observou foi um

aperfeiçoamento inicial no tratamento desses doentes e, posteriormente, um retrocesso (Tabela 7).

Finalmente, a presença de cognição normal, meta de todo o tratamento nutricional da PKU, não pôde ser diretamente examinada no presente estudo. Isso se deveu principalmente à ausência de dados clínicos a respeito da evolução do quociente de inteligência dos pacientes fenilcetonúricos. Essa foi, certamente, a principal limitação do presente estudo. Para repará-la, optou-se por se inferir a performance cognitiva através dos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor até os 7 anos de idade. Aqui encontramos uma segunda dificuldade: os casos mais antigos, em tese, os provavelmente menos bem controlados, não se recordariam bem dos marcos do DNPM. Por isso, embora tal decisão implicasse na perda de dados provavelmente muito relevantes, analizou-se o DNPM dos 41 indivíduos com até 7 anos de vida em 2003, examinando-se os demais 13 (que estavam com 8 a 16 anos) apenas através do histórico sobre a sua escolaridade. Isso significa que todos esses casos não foram analisados conjuntamente com os primeiros. Além disso, arbitrou-se que 2 falhas ou lapsos seriam indício de redução da capacidade cognitiva esperada.

Embora a cognição atingida fosse dependente de uma série de fatores concorrentes durante o tratamento da PKU, no presente estudo tentou-se apenas observar se a idade do diagnóstico (a), se o descontrole bioquímico (b) e se o ano do nascimento (c) se associaram diretamente à capacidade intelectual, inferida através do questionário.

Os resultados assim obtidos não conseguiram revelar uma relação significativa entre a idade do diagnóstico e a cognição, inferida através do DNPM, conforme análise de regressão logística. Por outro lado, infelizmente, não foi possível avaliar-se a

associação entre o passar dos anos (e as mudanças do sistema de saúde) e a performance do DNPM, pois os dados eram muito rarefeitos. Finalmente, apesar da fragilidade das inferências sobre a cognição, foi possível se demonstrar que, na presente amostra, houve associação entre o descontrole da Phe (inferido por suas médias e proporções) e a aquisição dos marcos do DNPM, resultado que era esperado (18, 19, 20).

Começamos nossas conclusões observando que, antes de tudo, houve poucas perdas de casos diagnosticados com PKU no nosso Estado, nesses anos todos. Isso significa que o sistema de recuperação dos casos positivos, detectados pela triagem, é bastante satisfatório.

Em segundo lugar, a incidência da PKU na nossa região é um pouco menor tanto do que o relatado anteriormente, como do que a incidência observada em outras regiões do mundo e do país (1, 3, 9, 10, 11, 21, 22).

Em terceiro lugar, concluímos que o controle bioquímico da Phe não dependeu da precocidade ou não do diagnóstico, dado que foi observado ao longo dos anos, enquanto esteve, ao contrário, diretamente relacionado à idade dos doentes. Isso pode estar sugerindo que crianças mais velhas e adolescentes, mais autônomos nas suas escolhas alimentares, não compreenderam bem a repercussão da HPA sobre a sua saúde. Esses resultados também implicam que um maior rigor deva ser buscado na aderência dessas crianças e adolescentes ao seu tratamento nutricional.

Em quarto lugar, concluímos que o controle nutricional não melhorou com o passar do tempo o que pode indicar a presença de dificuldades gerais no atendimento desses doentes e que são comuns aos demais usuários do sistema público de saúde.

Sobre o desfecho principal, que é a inteligência atingida pelos propósitos, concluímos que o nosso instrumento de averiguação foi falho. Ainda assim, retardos de DNPM grosseiros não foram observados, como o seriam se nenhuma dieta e nenhum controle nutricional fossem instituídos a tempo. A ausência de indivíduos com retardo de DNPM finalmente atesta a eficácia do tratamento da PKU e da existência da sua triagem neonatal. Se não houvesse a triagem neonatal, provavelmente quase todos os 54 indivíduos aqui estudados teriam algum grau de retardo mental. Esse resultado, porém, não deve ocultar a necessidade de avaliação adequada do desenvolvimento e da busca por um melhor e permanente controle nutricional.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes e seus familiares, a Adriana Brittes, Ana Stela Goldbeck, Lília Farret Refosco, Paula Regla Vargas e Ricardo Flores Pires, pois sem sua grande colaboração este estudo não seria possível.

1.Smith I, Lee P. The hyperphenylalaninemias *In*: Fernandes J, Saudubray JM e van den Berghe G. Inborn Metabolic Diseases 3 rd ed. Springer, 2000, 171-179.

2.Levy LH. Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment. Proc. Natl. Acad Sci, 96:1811-1813, 1999.

3.Scriver CR et al. The Hyperphenylalaninemias *In*: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherted Disease, 7 th ed, New York, MacGraw-Hill, 1995, 1015-1079.

4.Buist NRM, Tuerck JM. The practioners role in newborn screening. Pediatric Clinics of North America, 39(2):199-211, 1992.

5.Charbonneau M, Laberge C, Scriver CR, Dussault JH, Lemieux B, Melançon S. The Quebec Network of Genetic Medicine. Canadian Journal of Public Health, 78:79-82, 1987.

6.Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem Neonatal de Distúrbios Metabólicos. Ciência e Saúde Coletiva, 7(1):129-137, 2002.

7.Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr, 156:650-654, 1997.

8.Khoury JM. From Genes to Public Health: The applications of Genetic Technology in Disease Prevention. Am J Public Health, 86 (12):1717-1722, 1996.

9.Jardim BL, Silveira EL, Leite JCL, Barth ML, Giugliani R. Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. Jornal de Pediatria 68:189-191, 1992.

10.Schimdt BJ et al. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. Pediatria al dia; 3: 257-60, 1987.

11.Carvalho MRS et al. Fenilcetonúria – Mutações mais freqüentes, perspectivas futuras. Anais do II Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal. Belo Horizonte, 24-27 de setembro/2003.Rev. Med Minas Gerais; 13 (1 supl 2): S132-135, 2003.

12.*www.datasus.gov.br*

13.Abadie V *et al.* Neonatal screening and long-term follow-up of phenylketonuria: the French database. Early Human Development 65: 149-158, 2001.

14.Cerone R; Schiaffino MC, Di Stefano S; Veneselli E. Phenylketonuria: diet for life or not? Acta Paediatr 88:664-666, 1999.

15.Cechak P; Hejcmanova L; Rupp A. Long-term follow up of patients treated for phenylketonuria (PKU). Results from the Prague PKU Center. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S59-S63, 1996.

16.Walter JH et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? Lancet, 360:55-57, 2002.

17.Scheibenreiter S et al. Austrian report on longitudinal outcome in phenylketonuria. Eur J Pediatr, 155 (Suppl 1): S45-S49, 1996.

18.Ris DM; Williams SE; Hunt MM; Berry HK; Leslie N. Early-treated phenylketonuria: Adult neuropsychologic outcome. The Journal of Pediatrics, 124(3): 388-392.

19.Bugard P, Schimidt E, Rup A, Schneider W, Bremer HJ. Intelectual devlopment of the patients of the German collaborative study of children treated for phenylketonuria. Eur J Ped, 155, suppl 1: S33-S38, 1996.

20.National Institutes of Health Consensus Development Conference. Phenylketonuria: screening and management. Outubro, 16-18, 2000.

21.Lyon G, Adams R D, Kolodny EH. Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1996.

22.Pires RF. Aminoacidopatias. In: Carakuchansky, G. Doenças Genéticas em Pediatria. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

Tabela 1: Marcos do desenvolvimento de acordo com a idade.

Idade	**Desenvolvimento**	**Idade**	**Desenvolvimento**
0 – 12 meses	Sorriso social Sustento cefálico Senta com apoio Senta sem apoio Segura objetos Aponta objetos	12 – 18 meses	Bebe água no copo Fica em pé s/ apoio Caminha sozinho Sobe escadas? Fala uma palavra
18 –24 meses	Fica em pé s/ apoio Sobe escadas Corre Escova dentes com ajuda Usa talheres	2 – 3 anos	Fala 6 palavras Forma frases Identifica figuras Identifica amigos Conhece partes do corpo (6)
3 – 4 anos	Caminha/Idade? Forma frases Conhece adjetivos Conhece cores (4) Veste-se sem ajuda	4 –5 anos	Caminha/Idade Dança Conta objetos Desenha formas Veste-se sem ajuda
5 – 6 anos	Caminha/Idade? Frases/Idade? Joga bola? Copia/ desenha formas/pessoas		

Tabela 2. Características das 54 crianças e adolescentes que realizaram triagem neonatal para PKU no RS entre 1986 e 2003.

Característica	N (54)	%
Sexo		
Masculino	27	50,0
Feminino	27	50,0
Idade em 2003:		
0 – 2 anos	20	37,0
3 – 7 anos	21	38,9
8 – 16 anos	13	24,1
Origem		
Capital e região Metropolitana	18	34,0
Interior	36	66,0
Irmãos subseqüentes dos 53 casos índices		
Sim	8*	14,8
Não	45	85,2
Irmãos afetados		
Sim	1	12,5
Não	7	87,5
Acompanhamento		
Sim	53	98,2
Não	1	1,8
Local Acompanhamento		
HCPA	38	70,4
HMIPV	15	27,7
Outro	1	1,9

- Casos índice 53
- Caso recorrente 1

* Uma gestação subseqüente por família, cada um dos irmãos subseqüentes pertencentes a uma família independente.

Tabela 3: Número total de testes para triagem neonatal e casos confirmados de PKU

Ano	Número total de testes	Número de testes positivos na primeira coleta *	Número de PKUs confirmados	Número de testes de BH4 realizados
1992	Não disponível	6	2	2
1993	64360	10	2	2
1994	67248	10	0	0
1995	77495	18	3	1
1996	82059	6	1	1
1997	84239	32	0	0
1998	89687	38	3	1
1999	113454	94	4	1
2000	111428	58	4	1
2001	92114	60	8	0
2002	108210	54	9	0
2003	20172**	32	3	0
Total	910466	418	39	9

- * Este número inclui também possíveis falsos-positivos.
- ** Número total referente a apenas um laboratório

Tabela 4: Idade ao diagnóstico de acordo com ano do nascimento.

Ano de nascimento	Diagnóstico			
	Até 30 dias	31-60 dias	> 60 dias	Total
1986-95	7 (50,0%)	4 (28,6%)	3 (21,4%)	14 (100,0%)
1996-00	12 (50,0%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	24 (100,0%)
2001-03	10 (62,5%)	5 (31,3%)	1 (6,2%)	16 (100,0%)

X^2 $p > 0,05$

Tabela 5: Dosagens alteradas da Phe conforme os períodos de vida dos indivíduos acompanhados, após instituição da dieta.

Período de vida	Número de casos com exames realizados	Número médio de dosagens de Phe (DP)	Dosagens de Phe alteradas: média (DP)	Pacientes com exame alterado: N (%)
6-12 meses	50	3,14 (1,72)	0,7 (0,81)	24 (48,0)
13-18 meses	45	2,74 (1,34)	0,73 (0,86)	24 (53,3)
19-24 meses	43	2,55 (1,21)	0,90 (1,17)	22 (51,2)
25-30 meses	37	2,22 (0,73)	0,81 (1,02)	18 (48,6)
31-36 meses	36	2,22 (1,19)	0,80 (0,92)	19 (52,8)
3 anos	33	4,16 (2,03)	2,12 (2,14)	22 (66,7)
4 anos	27	3,96 (1,71)	2 (1,94)	20 (74,1)
5 anos	23	3,81 (1,68)	2 (2,11)	15 (65,2)
6 anos	17	4,58 (2,00)	3,05 (2,22)	13 (76,5)
7 anos	15	3,76 (1,69)	2,53 (1,76)	12 (80,0)
8 anos	11	4,12 (2,41)	3 (2,36)	9 (81,8)
9 anos	11	3,54 (1,91)	2,63 (2,01)	9 (81,8)
10 anos	7	3,42 (2,37)	3,14 (2,41)	7 (100,0)
11 anos	4	3,25 (2,06)	2,75 (2,36)	4 (100,0)
12 anos	2	5 (2,82)	4 (1,41)	2 (100,0)
13 anos	3	3	3	3 (100,0)
14 anos	1	3	3	1 (100,0)
15 anos	1	3	3	1 (100,0)
16 anos	1	3	3	1 (100,0)
Total	53	1164	546	

DP = Desvio-padrão.

Tabela 6: Idade de diagnóstico e controle de Phe, de acordo com a proporção de exames alterados nos 2 primeiros anos de vida.

Idade de diagnóstico	N	Proporção de exames alterados (%)	Razão de prevalências	IC 95%
Até 30 dias	28	43,6	1	-
31-60 dias	18	43,6	0,96	(0,38 – 2,38)
+ 60 dias	7	44,3	1,01	(0,29 – 3,53)

IC = Intervalo de confiança; $p > 0,05$

Tabela 7: Proporção de dosagens alteradas de Phe nos primeiros 2 anos de vida de acordo com o ano de nascimento.

Ano de nascimento	Pacientes com exames realizados	Proporção de exames alterados	Razão de Prevalências	IC 95%
1986-95	14	47,1	0,85	(0,30 – 2,36)
1996-00	24	32,6	0,59	(0,22 – 1.53)
2001-03	16	55,6	1	-

IC= Intervalo de confiança

Tabela 8: Distribuição dos pacientes de 0 a 7 anos de idade com falhas ou não do DNPM de acordo com o ano de nascimento.

Ano de nascimento	N	Falhas no DNPM			
		0	1	2	3
1995	1	1 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
1996-00	23	17 (73,9%)	3 (13,0%)	2 (8,7%)	1 (4,4%)
2001-03	16	11 (68,8%)	2 (12,5%)	3 (18,7%)	0 (0,0%)
Total	40	29	5	5	1

$p > 0,05$

Tabela 9. Falhas nos marcos do DNPM de acordo com o número de dosagens alteradas de Phe

Número de dosagens Phe alteradas (> 10mg%)	Número de falhas nos marcos do DNPM (%)		Total
	0	1 ou +	
0 a 2	13 (92,9%)	1 (7,1%)	14 (100,0%)
3 a 5	10 (71,4%)	4 (28,6%)	14 (100,0%)
6 ou +	11 (64,7%)	6 (35,3%)	17 (100,0%)
Total	34 (75,6%)	11 (24,4%)	45 (100,0%)

$P > 0,05$

Newborn Screening for PKU in Southern Brazil: a 17-year follow-up

Simone M. Karam (1,2), Laura B. Jardim (1,3) and Roberto Giugliani (1,2,4)

(1) Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil;
(2) Postgraduate Course in Pediatrics, UFRGS, Brazil;
(3) Department of Internal Medicine, UFRGS, Brazil;
(4) Department of Genetics, UFRGS, Brazil

Corresponding author: S. Karam
Rua Triunfo, 3080. Pelotas – RS, Brazil CEP: 96090-790
Phone/Fax: 55 53 226 17 06
e-mail: s.karam@brturbo.com

PKU screening in Southern Brazil

Key words*:* Inborn errors of metabolism, newborn screening, phenylketonuria, amino acid disorders, community genetics.

Abstract

Aim: To identify the population submitted to newborn screening in Rio Grande do Sul state,Brazil, and to estimate the incidence of Phenylketonuria and other hyperphenylalaninaemias, correlating time of diagnosis, onset of treatment and clinical outcome.

Methods: This study was designed as an ambidirectional cohort. Phone interviews were performed with the parents (or legal guardian), asking about demographic aspects, informations concerning the pathology, date of screening test, age of diagnosis and at onset of treatment, knowledge about inheritance, and satisfaction with follow-up. Children between 6 months and 7 years of age were assessed for neuropshychomotor milestones; for the ones older than age 7, their parents were asked about school performance and neurological problems.

Results: After statistic analysis and sample stratification per year of birth, we did not observe a historical trend for an earlier diagnosis or a better laboratory control along the years; neither we observed a significant association between age at diagnosis and clinical course of the disease.

Conclusion: There was no increase in the proportion of earlier diagnosis, as well as the nutritional control did not improve with time. Good biochemical control at Phe blood level did not depend on the earliness of diagnosis but was directly related to the patients age. The absence of individuals with psychomotor impairment attests the effectiviness of newborn screening for phenylketonuria.

Introduction

Classical Phenylketonuria (PKU), which affects around 1: 10.000 births in Caucasian populations [1], is an inborn error of metabolism caused by the deficiency of the hepatic enzyme phenylalaninehydroxylase (PAH). If not diagnosed and treated early, PKU causes mental retardation, microcephaly, infantile spasms, “mousy” smell, and hypopigmentation of skin, hair and eyes, besides other signs and symptoms [1, 3]. Newborn screening for PKU began in the 1960´s in the USA and Canada [4,5]. In Brazil, newborn screening began in 1976, in São Paulo [6]. In Porto Alegre (RS), Brazil, since the Regional Laboratory of Inborn Errors of Metabolism started to operate in 1982, PKU was the most frequently diagnosed disease in a period of 13 years [7]. Currently, in Brazil, newborn screening can be performed in the public system, and may include up to 4 different conditions *(Hiperphenylalaninaemias, Congenital Hypothyroidism, Cystic Fibrosis and Hemoglobinopathies)*, depending on the federal state. The introduction of newborn screening programs in Brazil was a disorganized event, without official guidelines and quality control, and preceded the ethic discussion [6]. Basic matters to be considered in the testing and prevention of genetic diseases, like incidence, impact in public health, and appropriate medical knowledge, were not well evaluated [8,4]. In 2001, the National Program of Newborn Screening (NPNS) was created, based on 3 basic actions: 1) performance of neonatal screening tests; 2) diagnostic confirmation; and 3) follow-up and treatment of patients.

The objectives of this study were: [1] to identify the population submitted to newborn screening in RS state between 1986 and 2003, whose test was positive for hyperphenylalaninaemia; [2] to estimate the incidence of PKU in RS state; and [3] to correlate time of screening test, time of onset of treatment, and evolution the of clinical picture.

Methods

The target population in the present study was children and teenagers between 6 months and 16 years old (born in the time period between January 1986 and March 2003) submitted to newborn screening for PKU in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. We searched for PKU children, in the records of the two main laboratories which perform newborn screening and also of the two clinics for PKU patients. The patients were contacted by telephone or personally, and a standard and pre-codified questionnaire was applied, containing demographic variables and others such as: site and date of test, site and date of onset of treatment, satisfaction with the information received and knowledge about recurrence risk of PKU.

For children 7 years old or less, we applied questions about psychomotor development (PMD), according to the expected milestones for children up to 6 years old. Those older than 8 years were asked about school performance, activities, presence of neurological symptoms, and use of medications. After the interview, the patient's laboratory control file was reviewed. For both situations, we obtained verbal consent from the patient's legal guardian.

Data analyses were mainly performed with Stata and SPSS software. Chi-square test, linear trend chi-square, analyses of variance (ANOVA) and a logistic regression analyses model were used.

Results

Sample

Based on laboratory records and follow-up centers, 418 patients with an altered test for phenylalanine (Phe > 4 mg/dl) were identified during the study period. Of these 418 patients, 351 presented transient hyperphenylalaninaemia. Nine patients with Phe above 4 mg/dl did not return for a second test and were not found in any treatment center . These 9 cases were considered newborn screening losses, corresponding to 2% (or 9/418) of initially screened patients.

Fifty-eight (58) of the 418 newborns initially identified were confirmed to have PKU. From those 58 cases, two cases were lost during follow-up, one case was excluded from the study because she was being followed in another state and a fourth child died with 3 months of age due to problems not related to PKU. From those 54 patients which remained in the cohort, six were classified as non-classical PKU. These 54 cases of PKU correspond to 53 independent families: one of the families presented recurrence. Table 1 shows the main characteristics of the cohort of patients with PKU. The incidence of PKU, including classical and non-classical cases, in our state, could be inferred yearly during the inquired period. However, the years with the greatest coverage were 2001 and 2002, when 57 and 67% of the population, respectively, was effectively tested. The incidence in 2002, probably more reliable than the one of previous years, was estimated as 1: 17.778 births.

The majority of parents or legal guardians, (41/53 or 75. 9%), were satisfied with the information received about the disease of their children. Concerning the risk of recurrence of PKU for future children of the couple, 15 informers (or 27.8% of parents) answered that this risk is was of 25-30%, whereas 39 informers (or 72.2% of parents)

answered that they didn't know, didn't remember or gave incorrect answers, such as 100% or 89% risk, "risk only for the children of the children" or "no risk", since there was already an affected child.

With respect to the age of diagnosis, 53.7% of the patients were diagnosed in the first 30 days of life, 33.3% between 31 and 60 days of life and 13% after 60 days. There was a slight trend towards an earlier age of diagnosis in the last years (since 2000), but this difference compared to the previous years was not statistically significant (Table 2).

Of the 54 phenylketonuric patients identified, only one abandoned outpatient follow-up 6 years ago and the remaining 53 are being followed. All the patients being followed have a Phe-restricted diet and receive food complements derived from protein hydrolizates.

The maintenance and effectiveness of nutritional treatment of PKU were indirectly inferred through the assay of plasma Phe levels, performed periodically. Only the dosages after the sixth month of life were considered, when all the patients were securely on a Phe-restricted diet. A total of 1164 dosages of plasmatic Phe were performed in the 53 patients in the study. Out of these tests, 546 presented results of Phe above 10 mg|%. We can observe, according to Table 3, that the metabolic unbalance become progressively more frequent, in a linear pattern, according to the child's growth: between 6 and 12 months, 48% of tests showed poor compliance, whereas after 10 years of age, practically all the results (or 100%) showed poor compliance, and this association was statistically significant $p \leq 0,05$).

Table 4 shows that there was no association between age of diagnosis and poor dietary control.

The effect of the modifications in the general conditions of the Health System on the assistance of PKU cases detected by newborn screening could be inferred through the association of the patient's year of birth with its nutritional control. To inquire this, the biochemical control of the tests performed was examined, through the proportion of altered tests, between 6 and 24 months of life, according to the year of birth. Table 5 shows that there was a trend towards a decrease in the mean of tests above 10mg% from 1986 to 2000, and afterwards it showed an apparent elevation, from 2001 to 2003. The presence of normal cognition, goal of every nutritional treatment for PKU, could not be directly examined in the present study. Instead, the PMD milestones until 7 years of age, and later, school performance, provided a rough measure of the patients' cognitive performance. The presence of 2 failures was considered an index of reduction of expected cognitive capacity. Seventy-two percent (n= 29) of the 40 patients up to 7 years old did not present any failures in developmental milestones for the correspondent age and 15% (n=6) presented failures in two or more. One patient had 5 failures, but was excluded from the analysis because he had Down Syndrome. Still concerning Phe control, we intended to evaluate its whole effect on the failures in PMD milestones for children up to 7 years old. Those patients with 3 or more altered tests in the first 2 years of life present an odds ratio 11 times greater for failures in the referred milestones (IC 95% 0.941 – 78.455).

Regarding the 13 patients with age between 8 and 16, four reported having failed a school year once, and one of them failed twice. One patient attends special school and is still not alphabetized. Therefore, there were 2/13 cases (or 15, 3% of the group) with reduction of expected cognitive capacity.

Discussion

Because it is a pan-ethnic disease, PKU has a variable incidence and may suffer geographical variations within a same country. In Brazil, it was estimated to be 1:15.000 births in the state of São Paulo (SP) [10]; 1: 20.000 in Minas Gerais (MG) [11] and 1:12.500 births in a previous study in RS [9]. It should be considered that in the later state, the birth rate, that was 180.000 births/year, decreased in the last years to 160.000 births/year [12].

The frequency of PKU, its inheritance pattern, and the severe clinical picture associated with the disease, motivated the organization of screening programs that began in some countries in the 60s. Recent reviews in many of these countries conclude that newborn screening of PKU is a necessary effort in financial terms, but brings variable benefit for each country depending on the incidence and on the level of organization and coverage provided by the health system. Moreover, the success of a newborn screening program does not depend uniquely on the quality of the organization of the screening itself, but also on the management and follow-up of affected patients [13].

There are three possible causes for the number of diagnosis being lower than expected: (1) the system presented losses; (2) the coverage was smaller; and/or (3) the incidence of the condition is lower than the previously estimated one. According to the records of evidenced diagnosis, there were 9 initial losses, and 3 losses after screening. Therefore, the number of losses apparently does not explain the lower than expected number of diagnosis observed. The coverage varied significantly each year (although maintaining

an oscillation around 50%). An actual incidence of 1: 17.000, lower than those previously registered [9], may be the best explanation for this total number of diagnosis.

The quality of information about PKU understood by the family, normally transmitted by genetic counseling, was lower than what would be desirable. Not only the recurrence risk was misunderstood, but also there seems to be a parental resignation concerning their poor dominium about the matter.

One of the intentions of this study was to observe if the age of diagnosis and, consequently, the onset of treatment were becoming more precocious and effective along the years, reflecting progress in the Health System. According to Table 2, we can see that the age of diagnosis showed a slight trend towards becoming earlier in the last years (year 2000 and on), but this difference compared to the previous years was not statistically significant. It's also possible that the absence of statistical significance could be due to the small sample size.

The earliness of diagnosis was not related with the posterior biochemical control (Table 2). However, when observing Table 3, we can see that metabolic unbalanced situations become progressively more frequent, in a very much linear pattern, according to the child's growth: between 6 and 12 months, 48,0% of tests showed poor control, whereas practically all tests (100%) of children older than 10 years showed poor control. The latter association was statistically significant ($p < 0,05$).

This finding demonstrates that, as soon as the individual gets older, it becomes progressively more difficult to maintain biochemical control with diet, similar finding have been reported elsewhere [13, 14, 15, 16, 17]. The scarce availability in Brazil of

special products for PKU diet to be used in late childhood and adolescence may play a major role on this findings.

Finally, the presence of normal cognition could not be directly examined in the present study. This was certainly the major limitation of the present study. In order to repair it, we opted to infer cognitive performance through psychomotor developmental milestones until 7 years of age and assessing the older cases only through the school history in order to avoid memory bias. We did not notice a relationship between age of diagnosis and cognition, inferred through PMD, according to logistic regression analysis. In spite of the fragility of the cognition inferences, it was possible to demonstrate that, in the present sample, there was an association between lack of control of Phe (inferred by it's means and proportions) and acquisition of PMD milestones, which was an expected result [18, 19, 20].

We begin our conclusions by observing that, first of all, there were a few losses of cases diagnosed with PKU in our state within all these years. This means that there is a satisfactory retrieval system for positive cases. Second, the incidence of PKU in our region is slightly lower compared to the previously reported one, and to the incidence observed in other regions of the world and country [1, 3, 9, 10, 11, 21, 22]. Third, we conclude that way information about the disease is transmitted to the parents should be modified, because they demonstrated to have poor understand.

Fourth, we concluded that Phe biochemical control did not depend on the earliness of diagnosis, instead, it was directly related to the patient's age. These results also implicate that the adherence of these children and adolescents to their nutritional treatment should me more strictly controlled, or that the goals of the treatment on these age groups should be reviewed.

In fifth place, we concluded that nutritional control did not improve with time fact that can indicate the presence of general difficulties in the assistance of these patients, as with other users of the public health system.

Concerning the main outcome, that is the intelligence attained by the patients, although our inquiry instrument was not the most appropriate. Rough signs of PMD delay were not observed, and could have been so if no diet or nutritional control was instituted on time. The absence of individuals with PMD delay attests the effectiveness of PKU screening and treatment. If there was no such screening, probably almost all the 54 individuals tested in this study would have a certain degree of mental retardation. This result, however, should not conceal the need for appropriate assessment of development and for the search for a better and permanent nutritional control.

Acknowledgements

The authors would like to thank firstly to the patients and their families. We also thanks to CTN laboratory, Adriana Brittes, Ana Stela Goldbeck, Lília Farret Refosco, Paula Regla Vargas and Ricardo Flores Pires, as this study would not be possible without their collaboration.

References

75. Smith I, Lee P. The Hyperphenylalaninemias In: Fernandes J, Saudubray JM e van den Berghe G. Inborn Metabolic Diseases 3rd ed. Springer, 2000, 171-179.

76. Levy LH. Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment. Proc. Natl. Acad. Sci 1999; 96:1811-1813.

77. Scriver CR et al. The Hyperphenylalaninemias in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherted Disease, 7th ed, New York, MacGraw-Hill, 1995, 1015-1079.

78. Buist NRM, Tuerck JM. The practioner's role in newborn screening. Pediatric Clinics of North America 1992; 39(2):199-211.

79. Charbonneau M, Laberge C, Scriver CR, Dussault JH, Lemieux B, Melançon S. The Quebec Network of Genetic Medicine. Canadian Journal of Public Health 1987; 78:79-82.

80. Souza CMF, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem Neonatal de Distúrbios Metabólicos. Ciência e Saúde Coletiva 2002; 7 (1):129-137.

81. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. Eur J Pediatr 1997; 156:650-654.

82. Khoury JM. From Genes to Public Health: The applications of Genetic Technology in Disease Prevention. Am J Public Health 1996; 86(12):1717-1722.

83. Jardim BL, Silveira EL, Leite JCL, Barth ML, Giugliani R. Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. Jornal de Pediatria 1992; 68:189-191.

84. Schimdt BJ et al. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. Pediatria al dia 1987; 3: 257-60.

85. Carvalho MRS et al. Fenilcetonúria – Mutações mais freqüentes, perspectivas futuras. Anais do II Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal. Belo Horizonte, 24-27 de setembro/2003.Rev. Med Minas Gerais 2003; 13 (1 supl 2): S132-135.

86. *www.datasus.gov.br*

87. Abadie V *et al.* Neonatal screening and long-term follow-up of phenylketonuria: the French database. Early Human Development 2001; 65: 149-158.

88. Cerone R; Schiaffino MC, Di Stefano S; Veneselli E. Phenylketonuria: diet for life or not? Acta Paediatr 1999; 88:664-666.

89. Cechak P; Hejcmanova L; Rupp A. Long-term follow up of patients treated for phenylketonuria (PKU). Results from the Prague PKU Center. Eur J Pediatr 1996; 155 (Suppl 1): S59-S63.

90. Walter JH et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? Lancet 2002; 360:55-57.

91. Scheibenreiter S et al. Austrian report on longitudinal outcome in phenylketonuria. Eur J Pediatr 1996; 155 (Suppl 1): S45-S49.

92. Ris DM; Williams SE; Hunt MM; Berry HK; Leslie N. Early-treated phenylketonuria: Adult neuropsychologic outcome. The Journal of Pediatrics 1994; 124(3): 388-392.

93. Bugard P, Schimidt E, Rup A, Schneider W, Bremer HJ. Intelectual devlopment of the patients of the German collaborative study of children treated for phenylketonuria. Eur J Ped 1996; 155, suppl 1: S33-S38.

94. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Phenylketonuria: screening and management 2000; October, 16-18.

95. Lyon G, Adams R D, Kolodny EH. Early infantile neurometabolic disorders with a relentlessly progressive course in: Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1996.

96. Pires RF. Aminoacidopatias in: Carakuchansky, G. Doenças Genéticas em Pediatria 2nd ed, Guanabara-Koogan, 2001, Rio de Janeiro.

Table 1. Characteristics of the PKU cohort

Characteristic	N (54)	%
Sex		
Male	27	50,0
Female	27	50,0
Age (2003):		
0 – 2 years	20	37,0
3 – 7 years	21	38,9
8 – 16 years	13	24,1
Birthplace		
Metropolitan area	18	34,0
Other areas	36	66,0
Subsequent brothers (or sisters) of the 53 index cases		
Yes	8*	14,8
No	45	85,2

Affected brothers or sisters		
Yes	1	12,5
No	7	87,5
Follow-up		
Yes	53	98,2
No	1	1,8
Site of follow-up		
(1)HCPA	38	70,4
(2) HMIPV	15	27,7
Other	1	1,9

- Index cases: 53
- (1) HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- (2) HMIPV – Hospital Materno Infantil Presidente Vargas
- Recurrent case: 1

* One subsequent pregnancy per family, each one of the subsequent brothers (or sisters) belonging to an independent family.

Table 2: Age of diagnosis according to birth date.

Birth date	Diagnosis			
	0 - 30 days	31-60 days	> 60 days	Total
1986-95	7 (50,0%)	4 (28,6%)	3 (21,4%)	14 (100,0%)
1996-00	12 (50,0%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	24 (100,0%)
2001-03	10 (62,5%)	5 (31,3%)	1 (6,2%)	16 (100,0%)

X^2 $p > 0,05$

Table 3: Unbalanced Phe dosages according to life period of the individuals, after Phe restricted diet institution.

Life period	Number of cases	Mean number of Phe assays (SD)	Mean number of increased results: N (SD)	Patients with high Phe levels: N (%)
6-12 months	50	3,14 (1,72)	0,7 (0,81)	24 (48,0)
13-18 months	45	2,74 (1,34)	0,73 (0,86)	24 (53,3)
19-24 months	43	2,55 (1,21)	0,90 (1,17)	22 (51,2)
25-30 months	37	2,22 (0,73)	0,81 (1,02)	18 (48,6)
31-36 months	36	2,22 (1,19)	0,80 (0,92)	19 (52,8)
3 years	33	4,16 (2,03)	2,12 (2,14)	22 (66,7)
4 years	27	3,96 (1,71)	2 (1,94)	20 (74,1)
5 years	23	3,81 (1,68)	2 (2,11)	15 (65,2)
6 years	17	4,58 (2,00)	3,05 (2,22)	13 (76,5)
7 years	15	3,76 (1,69)	2,53 (1,76)	12 (80,0)
8 years	11	4,12 (2,41)	3 (2,36)	9 (81,8)
9 years	11	3,54 (1,91)	2,63 (2,01)	9 (81,8)
10 years	7	3,42 (2,37)	3,14 (2,41)	7 (100,0)
11 years	4	3,25 (2,06)	2,75 (2,36)	4 (100,0)
12 years	2	5 (2,82)	4 (1,41)	2 (100,0)
13 years	3	3	3	3 (100,0)
14 years	1	3	3	1 (100,0)
15 years	1	3	3	1 (100,0)
16 years	1	3	3	1 (100,0)
Total	53	1164	546	

SD = Standard Deviation.

Table 4: Age of diagnosis and Phe control according with the proportion of increased Phe levels in the first 2 years of life.

Age of diagnosis	N	Proportion of increased levels (%)	Prevalence ratio	CI 95%
0 - 30 days	28	43,6	1	-
31-60 days	18	43,6	0,96	(0,38 – 2,38)
+ 60 days	7	44,3	1,01	(0,29 – 3,53)

C I = Confidence Interval; p > 0, 05

Table 5: Proportion of increased Phe assay resultsls in the first 2 years of life according to birth date.

Birth date	Number of patients	Proportion of altered exams	Prevalence ratio	CI 95%
1986-95	14	47,1	0,85	(0,30 – 2,36)
1996-00	24	32,6	0,59	(0,22 – 1.53)
2001-03	16	55,6	1	-

CI= Confidence Interval

11. Considerações finais

Algumas considerações finais podem ser feitas sobre o presente estudo. Uma delas se relaciona com a avaliação do DNPM e da escolaridade. É reconhecido que os métodos usados para avaliar essas variáveis têm falhas e são pouco precisos. Contudo, um teste de QI adequado não é realizado rotineiramente e, em verdade, é bastante difícil de ser obtido em nosso meio. Além disso, seria preciso envolver no estudo profissionais especializados, haveria acréscimo no orçamento e seria preciso contar com maior disponibilidade dos pacientes e de suas famílias. Em relação à utilização da escolaridade como indicador, esta foi preferida em relação aos marcos do DNPM para os indivíduos mais velhos, para evitar o viés de memória para fatos distantes no tempo. Ainda que sendo um pouco grosseiros, provavelmente subestimando os dados relativos a possíveis atrasos do desenvolvimento e dificuldades escolares, o que seria menos freqüente com métodos mais precisos, crê-se que os dados obtidos servem como alerta para se investir mais na investigação de tais indivíduos. Em um âmbito mais amplo, sugere-se que esse tipo de avaliação seja realizado pelo sistema de saúde.

Sobre a questão da PKU Materna, nossos resultados foram prejudicados porque só 3 meninas estavam na faixa etária determinada pelo estudo. Contudo é preciso lembrar que 50% da amostra estudada é do sexo feminino e que, portanto, mais cedo ou mais tarde essas pacientes necessitarão de um adequado aconselhamento genético, exigindo um grande esforço por parte das clínicas de atendimento, para sua conscientização com vistas à manutenção do seguimento ambulatorial e de adequados níveis de Phe na adolescência, para prevenir o nascimento de filhos com retardo mental e malformações congênitas. Apesar do PNTN contemplar a PKU Materna em seus objetivos, acredita-se que seja preciso enfatizar tal situação.

Sobre a idade do diagnóstico, foi observado que a mesma tornou-se mais precoce, mas que essa tendência não se manteve. Acredita-se que essa é uma informação bastante relevante gerada por este estudo, e que deve merecer do Sistema de Saúde uma melhor investigação.

Por fim, acreditamos que este estudo, uma avaliação da coorte de fenilcetonúricos do RS, trouxe informações relevantes, e que poderia ser aperfeiçoado e realizado periodicamente, preferencialmente numa ação conjunta com o PNTN.

12. Anexos

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Pediatria
Projeto de Dissertação de Mestrado :
Avaliação Epidemiológica da Triagem Neonatal Para Fenilcetonúria no Rio Grande do Sul – 1986-2003: um estudo de coorte

Caso PKU n : *DN:*
Nome:
Sexo: (1) masculino (2) feminino
Endereço:

Cidade:

Telefone:

Vou fazer algumas perguntas sobre seu tratamento (do seu filho):

1)Realiza acompanhamento? (1) sim (2) não

2)Com quem faz o acompanhamento? (1) Geneticista (2) Pediatra (3) Outro

3)Local: (1) HCPA (2) Outra instituição:

4)Quando iniciou o tratamento?.....

5)Qual o tipo de tratamento? .....

6) Vocês tiveram outros filhos depois do nascimento de (nome do paciente)? (1) sim Quantos?.... (2) não

7) Eles fizeram teste do pezinho? (1) sim (2) não

8) Algum deles foi também afetado? (1) Sim _____ (2) não

9) A Sra. está satisfeita sobre o que lhe foi informado sobre as causas da doença de seu filho? (1) sim (2)não

10) Pode me dizer qual a chance de um futuro filho seu (hipotético) vir a apresentar PKU? _____

DN: __ __/ __ __/__ _

Caso __ __ __

Sexo __

Cidade: __ __

Acomp __

Quem __

Local __

Iniciotto __ __

Tipotto __

Filhos __

Pezinho __

Afetado __

Satisf __

Chance __ __

11) (Se for menina). Já ouviu falar dos problemas que poderão acontecer para os futuros filhos de sua filha (nome da paciente) ? (1) sim (2) não

12) Gostaria de ser melhor informada a respeito? (1) sim (2) não

4 Crianças 6 a 12 meses

(1) sim **(2) não**

Sorriu ?

Firmou a cabeça

Sentou com apoio

Sentou sem apoio

Segura objetos

Fica em pé com apoio

5 Crianças 12-18 meses

Bebe água no copo?

Fica em pé sem apoio?

Caminha sozinho?

Sobe escadas?

Fala 1 palavra?

6 Crianças 18-24 meses

Fica em pé sem apoio?

Sobe escadas?

Corre?

Escova os dentes com ajuda?

Usa talheres?

Probfilha __

Inform __

Sorriu __

Firmou __

Capoio__

Sapoio __

Segob __

Pecapoio __

Copo __

Pé s/apoio __

Casozinho __

Escadas __

1palavra __

pés/apoio __

escadas __

corre __

dentescom __

talheres __

7 Crianças 2 – 3 anos

Fala 6 palavras?

Forma frases?

Identifica figuras?

Identifica amigos?

Conhece algumas partes do corpo (6)?

Crianças de 3 a 4 anos

Caminha bem ? Desde que idade?

Forma frases?

Conhece alguns adjetivos? (feio, bonito)

Conhece cores (4)?

Veste-se sem ajuda?

8 Crianças de 4 a 5 anos

Caminha? Desde que idade?

Dança?

Conta objetos?

Consegue desenhar formas (círculo, quadrado)?

Veste-se sem ajuda?

Crianças de 5 a 6 anos

Caminha? Desde que idade?

Forma frases? Desde que idade?

Joga bola?

9
6palavras __

frases __

figuras __

amigos __

corpo __

Caminhabem __ __

Frases __ __

Adjetivos __

4cores __

vestesem __

idcaminha __ __

dança __ __

contaob __

desenhaform __

veste __

caminhaida __ __

frasesid __ __

bola __

Sabe copiar ou desenhar formas?

Sabe desenhar uma pessoa?

Crianças acima de 6 anos

Em qual série escolar ele (ela) se encontra? _____ série _____ grau

Já repetiu alguma série? (1) Sim (2) Não _____ séries. Quantas vezes? ____

Apresenta dificuldade em uma área específica? (1) Sim Qual? _____ (2) Não

Além da escola o (nome do paciente) faz algum outro tipo de atividade? Qual?_____

Ele (ela) apresenta algum problema neurológico?

(1) convulsões
(2) alterações marcha
(3) hiperatividade
(4) outras alterações de comportamento: _____

Apresenta outros problemas de saúde? Quais? _____

Necessita usar algum remédio? (1) Sim (2) Não Qual?_____

copiaform __

desenhapes __

Série __/__

Reserie __
Vezes __

Dific __
Qual __

Ativi __

Neuro __

Saúde __ __

Remedio __

Qual __

Anexo II

Ficha de identificação laboratorial

Caso número: _____

Primeira coleta: __ __/__ __/__ __ Valor Phe: _____

Idade diagnóstico: _____

Laboratório: (1) Farmácia-UFRGS (2) CTN (3) Outro

Teste para BH4: sim ( ) não ( ) Resultado:

Idade	**Phe (mg%) Janela terapêutica 2-10**	**Phe (mg%) limite superior da janela**	**Phe (mg%) abaixo da janela**	**Número de coletas/período**
1^0 semestre de vida				
6 – 12 meses				
Até 18 meses				
19-24 meses				
25-30 meses				
30-36 meses				
3 anos				
4 anos				
5 anos				
6 anos				
7 anos				
8 anos				
9 anos				
10 anos				
11 anos				
12 anos				
13 anos				
14 anos				
15 anos				
16 anos				

Anexo III

Questionário versão resumida

1) Com que idade _____ (nome da criança) iniciou o tratamento para Fenilcetonúria?

a) Menos de 1 mês de idade
b) Entre 1 e 2 meses de idade
c) Depois dos 2 meses de idade

2) Depois de _____ (nome da criança), você teve outros filhos?

a) Sim, quantos?_____ b) não

3) Eles também fizeram "Teste do Pezinho"?

a) Sim b) Não

4) Algum deles também têm fenilcetonúria?

a) Sim b) Não

5) Responda esta pergunta mesmo que você não queira ou não possa mais ter filhos: Se você ficasse grávida (do pai do –nome da criança), qual a chance de este filho também nascer com o mesmo problema do (nome da criança)?

a) Nenhuma b) 25% c) 50% d) 100% e) Não lembra

Marcos do desenvolvimento de acordo com a idade (tabela 5) ou inquérito sobre escola e outras atividades, conforme versão original.