

FENILCETONÚRIA

Heidi Pinto MARTINS

Pesquisadora Científica da Seção de Imunologia
do Instituto Adolfo Lutz*

RIALA6/794

MARTINS, H.P. - Fenilcetonúria Phenylketonuria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):47-52, 1996.

RESUMO: O interesse pelas doenças genéticas têm aumentado nos países de primeiro mundo à medida que o controle das doenças infecciosas e sociais torna-se cada vez mais efetivo. Dados recentes⁽²⁾ mostram que cerca de 50% das mortes perinatais ocorrem por causas genéticas. Além disso, 1/3 das internações de crianças em hospitais pediátricos e 10% das doenças crônicas de adultos também são atribuídas a fatores genéticos.

Estima-se que temos cerca de 50.000 a 100.000 genes, dispersos ao longo de 23 pares de cromossomos, responsáveis por nossas características hereditárias. Por outro lado, já são conhecidas cerca de 6000 doenças genéticas, a maioria ainda sem tratamento específico⁽¹⁾. O grande desafio dos geneticistas tem sido o de identificar os nossos genes, compreender quais são os mecanismos que causam patologias genéticas, e enquanto não houver tratamentos eficazes, prevenir o nascimento de novos afetados.

Aminoacidopatias e organopatias são os erros inatos do metabolismo, mais comuns, do período neonatal⁽³⁾. Na Alemanha, aproximadamente 1:15000 dos recém-nascidos são diagnosticados como portadores de aminoacidopatias e aproximadamente 1:9000 são diagnosticados como portadores de organoacidopatias⁽¹⁾. Especialmente no caso das organoacidopatias há evidências substanciais que este número deve estar subestimado.

UNITERMOS: Doenças genéticas - Aminoacidopatias - Hiperfenilalaninemia

INTRODUÇÃO

A maioria das aminoacidopatias são autossômicas recessivas e enquanto não houver tratamento para as doenças genéticas, a prevenção de novos casos, através da identificação de portadores de genes patológicos é de importância fundamental. Entretanto, existem duas situações bastante distintas: a) os portadores clinicamente normais, porém, com risco de virem a ter filhos ou descendentes afetados e; b) os portadores já afetados^(3,9,22).

As novas técnicas de biologia molecular têm permitido avanços na identificação de portadores assintomáticos, através da localização e caracterização de genes patológicos.

Muitos casos de amino e organoacidopatias não são comumente diagnosticados, e a incidência destes distúrbios, pela sua complexidade e investimentos são muitas vezes proibitivos. Investigadores especializados estudaram crianças que desenvolveram sintomas indicativos de um erro inato do metabolismo e este procedimento foi denominado "screening" (varredura) seletivo⁽²⁾.

Uma doença genética, relativamente comum, onde se tem heterogeneidade intragênica é a fibrose cística (FC)⁽¹⁰⁾ ou mucoviscidose. Embora seja a doença genética mais freqüente na população caucasóide dos Estados Unidos e Europa (incidência de 1 entre 1600-2000 nascimentos), é pouco conhecida entre nós. O quadro clínico caracteriza-se pela obstrução das vias

*Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar - SP - CEP 01246-902.

respiratórias por um muco espesso, infecções respiratórias (principalmente por pseudomonas) e pneumonias recorrentes. Ocorre também envolvimento do trato intestinal, em cerca de 85% dos casos, que leva à insuficiência pancreática. Se estes sintomas não forem tratados precocemente o óbito ocorre ainda na primeira infância. O gene responsável pela FC, localizado no cromossomo 7, foi clonado em 1989⁽¹⁰⁾ e descobriu-se que a mutação mais freqüente (cerca de 70% dos casos) era a deleção de um trinucleotídeo (F508) que leva à perda do aminoácido fenilalanina (no codon 508). A proteína codificada por este gene foi denominada CFTR ("cystic fibrosis transmembrane conductance regularor"). Apesar de sua função ainda ser discutida, uma das mais prováveis, embora não única, seria a de um canal endógeno de cloro⁽¹⁰⁾. Estudos realizados nos últimos dois anos, têm mostrado que existem mais de 200 mutações diferentes no gene da FC que podem causar desde um fenótipo grave até um quadro muito leve ou mesmo subclínico⁽¹¹⁾.

Os aminoácidos são excretados pelos glomérulos e facilmente reabsorvidos pelos túbulos renais. Os aminoácidos que normalmente são encontrados na urina em grandes quantidades (25-200 mg/24horas) são: glicina, taurina, histidina e glutamina. Outros aminoácidos que ocorrem em muito menor quantidade (0-25 mg/24 horas) são: serina, leucina, cistina, arginina e fenilalanina^(12,13).

A fenilcetonúria (PKU) é o modelo mais bem conhecido de um erro inato do metabolismo com oligofrenia. A herança é autossômica recessiva, e a freqüência na Europa é de 1:6000 - 1:15000. Os pacientes nascem normais, mas progridem rapidamente para um quadro de retardo mental grave, se não forem tratados desde a mais tenra infância, porque a fenilalanina não pode se converter em tirosina^(16,17,18).

L-Fenilalanina → L-Tirosina → L-DOPA-Adrenafina

↓

Tiroxina (3,5-3',5'-tetraiodotironina)

Uma grande população tem sido estudada, nos últimos 35 anos, através da gota de sangue e em alguns países todas as crianças são abrangidas pelo deste teste. Constatou-se que nem todos os recém-nascidos com hiperfenilalaninemia (H.P.A.) apresentam a PKU clássica, mas há diversas formas de HPA atípicas⁽¹³⁾ que precisam ser diferenciadas na forma de prognose e indicação do tratamento. Uma das formas mais interessantes de HPA é devida a deficiência de BH4 (tetrahydrobiopterina)⁽¹⁴⁾. O tratamento de PKU foi primeiro publicado em 1954⁽⁵⁾ se res-

tringindo a uma dieta sem fenilalanina, para reduzir os níveis sanguíneos e então evitar danos cerebrais. Isto só pode ser sucesso se a terapia se iniciar nos dois primeiros meses de vida e se for cuidadosamente monitorada.

Além disso, a importância da tecnologia com DNA deverá ser empregada, no futuro, para diagnóstico diferencial, pré-natal e detecção heterozigota do PKU⁽⁹⁾. O local dos fragmentos de restrição de 68 alelos normais e 74 mutantes para fenilalanina hidroxilase (P.A.H.) foram determinados em 37 crianças francesas. Um total de 23 haplotipos, incluindo 18 alelos normais e 16 alelos mutantes foram observados; 2/3 de todos os alelos mutantes foram confinados dentro de somente 4 haplotipos, enquanto o restante 1/3 foi encontrado em 12 haplotipos, incluindo 8 haplotipos que até hoje se pensava estarem ausentes nos Caucásianos. Diversos haplotipos mutantes estavam presentes somente em variantes típicas, outros estavam só nas variantes mais fracas e alguns estavam presentes em ambas as variantes. Um haplotipo mutante (haplotipo 2) foi encontrado em diferentes mutações em outras séries, resultando ou em PKU típica ou hiperfenilalaninemia fraca. A combinação diplóide encontrada em alguns pacientes está associada com a composição heterozigota das mutações no local do PAH, principalmente no sul da Europa^(11,11).

Iniciadores específicos para doenças infecciosas mais comuns já foram descritos e testes diagnósticos desenvolvidos através de PCR. O grande valor da PCR é que ela detecta a presença da substância pesquisada e não as mudanças causadas pelo organismo, como no caso do imunodiagnóstico.

Podemos considerar cinco problemas metabólicos principais como responsáveis por causar hiperfenilalaninemia. A forma clássica é causada por um defeito na apoenzima fenilalanina-4-hidroxilase⁽³⁾. As outras 4 formas variantes são causadas pela deficiência do cofator tetrahydrobiopterina⁽⁴⁾. Os pacientes sofrem de uma deficiência de GPT ciclohidrolase I ou 6-pirovoil tetrahydropterina sintase, enzimas envolvidas na biossíntese do cofator tetrabiopterina (BH4), ou de uma deficiência de dihydropterina reductase, uma enzima envolvida na regeneração do cofator. Recentemente, uma nova variante com excreção de 7-iso-biopterina foi detectada^(14,15).

Pterinas são compostos obtidos das purinas. O primeiro estudo foi realizado por Hopkins, em 1889, na determinação da natureza dos pigmentos das asas das borboletas tendo sido encaixada como derivado do ácido úrico. Quarenta anos mais tarde, Wieland e Purmann demonstraram que os pigmentos amarelos não eram derivados da purina, mas de um novo grupo de substância, as pterinas, denominadas agora de xanto-pterinas.

Em 1945, Gates e Albert descobriram que o ácido

fólico continha um composto da mesma estrutura básica, conhecido como ácido pteroil L-glutâmico^(3,4).

MATERIAL E MÉTODOS

1) *Experiência Brasileira*

A fenilcetonúria foi descrita pela primeira vez por Folling, em 1934. No Brasil, especificamente em São Paulo, a triagem para PKU é realizada pela APAE desde 1975, que utiliza o método espectrofluorimétrico em "auto-analyzer" para sua detecção⁽¹⁶⁾.

Entre junho de 1976 e julho de 1988 foram analisados sangues de 1.888.799 recém-nascidos e foram detectados 144 casos de fenilcetonúria. Destes, 69 casos eram de PKU clássica e 66 casos de PKU transitória. Oitenta destas crianças (39 meninos e 41 meninas) pertencentes a 63 famílias diferentes foram selecionadas para uma avaliação regular. Os problemas operacionais foram muito grandes, necessitando de pessoal altamente treinado, pois a coleta que aparentemente parece ser simples é a base de toda a análise. O método é o clássico utilizado pelo Dr. Horst Bickel⁽⁵⁾ da Univ. Children's Hospital 6900, Heidelberg, Alemanha, possuindo uma triagem que envolve a recepção das amostras com numeração em código por computadores, separação em duplicatas através de cortes na mancha de sangue com aparelho de perfuração⁽¹⁸⁾, adaptado ao próprio laboratório, arquivos especiais para guardar as duplicatas das amostras e finalmente o envio dessas amostras, com códigos diferentes, em dias alternados para os laboratórios.

Dezessete crianças foram diagnosticadas precocemente (0 a 3 meses) e 58 crianças só tardiamente. Em 3 casos dos diagnosticados precocemente a dieta não foi adequada (17,6%) e junto com os 58 tardiamente diagnosticados, causaram um retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.

A média do quociente de desenvolvimento (DQ) foi 85 para as crianças precocemente diagnosticadas e 46 naquelas tardiamente diagnosticadas. A média do quociente de inteligência (IQ) foi 91,5 nos precocemente diagnosticados e 63,5 naqueles tardiamente diagnosticados. De acordo com a idade do diagnóstico do PKU, o retardo mental foi observado em:

1:5 das crianças diagnosticadas entre 3 e 6 meses;

5:8 das crianças diagnosticadas entre 6 e 12 meses;

7:10 das crianças diagnosticadas após os 18 meses;

38:40 das crianças diagnosticadas após os 18 meses de idade.

Apesar de todas as 63 famílias terem participado de aconselhamento genético, 9(14%) tiveram outras crianças, das quais: 4 normais, 4 com PKU grave e 1 com PKU transitória. Estes resultados reforçam a importância de um seguimento multidisciplinar nos pacientes com PKU e o valor da introdução de uma dieta pobre em fenilalanina na idade do diagnóstico.

Um estudo semelhante foi efetuado na Índia, com 1314 crianças com retardo mental (MR), precisamente em Bangalore, Bombay, Delhi e Lucknow para determinar a extensão e os padrões genéticos causadores do retardo mental. De todos, 42,3% dos pacientes apresentaram retardo mental fraco; 25,3% moderado; 19,2% grave e 13,1% profundo. Entre os 1314 pacientes foram detectados 23,7% de anomalias cromossômicas; 5% tinham defeitos metabólicos e 11,6% apresentaram uma síndrome genética identificável. No restante 59,7% dos pacientes nenhuma causa genética conhecida foi identificada. Contudo, 66,5% destes pacientes tinham uma ou mais das seguintes condições:

a) má formação congênita com ou sem "deficit" neurológico;

b) história de consaguinidade;

c) história familiar positiva;

d) um teste positivo, mas sem um diagnóstico confirmado de defeito metabólico (sugerindo que não poderia ser identificada a causa genética).

2) *Coleta das amostras de sangue*

Desde 1960, os programas de seleção de neonatos utilizam o sangue seco colhido em papel de filtro^(13,17,18). Estas amostras de sangue devem ser colhidas por punção do calcanhar de todos os recém-nascidos após o segundo dia do nascimento, em papel de filtro especial (tipo Mohry & Nagel, n. 818) e enviados pela maternidade e de bebês maiores até cerca de 1 mês de vida enviadas pelas unidades de saúde.

3) *Ensaios*

3.1) *Teste de Guthrie*⁽¹⁸⁾. A germinação de esporos do *Bacillus subtilis* é acentuada na presença de fenilalanina, mesmo num meio contendo um inibidor para germinação de esporos. Uma gota de sangue colhida de punção do calcanhar de crianças é coletada em papel de filtro e colocada em meio especial. A área de crescimento bacteriano ao redor do disco de sangue é comparada com áreas de crescimento de discos contendo quantidades conhecidas de fenilalanina.

3.2) *Ensaio espectrofluorimétrico*⁽¹⁹⁾. O ensaio se baseia no método de McCaman e Robins de 1962⁽⁹⁾, modificado por Hill et alii em 1965⁽²⁰⁾, utilizando a pro-

priedade do aumento da fluorescência do complexo fenilalanina-ninhidrina-cobre em presença de um peptídeo como a leucilalanina. Atualmente este método substitui o teste de Guthrie que pode produzir falsos positivos.

3.3) *Ensaio imonofluorimétrico (IFMA)*⁽⁶⁾. O princípio da técnica por IFMA foi publicado para o ensaio da gonadotrofina coriônica^(7,8). O fluorômetro usado foi o Arais 1230 (LKB-Wallac). A fonte de luz é uma lâmpada de Xenônio e dá 1000 flashes por segundo. A fluorescência é medida em ciclos de excitação, com um tempo de decaimento de 400 us e um período de contagem de 400 us. O número de fótons registrados durante 1000 ciclos é expresso como contagem por segundo. A medida por IFMA discrimina a radiação de fundo fluorescente (1-20ns) produzida pelo quelato de Europeum⁽⁹⁾.

4) Resultados

Tanto o método espectrofluorimétrico como o fluorimétrico devem ser ligados a um terminal de computador para ser possível o fornecimento dos resultados, bem como o arquivamento. Tudo deve ser feito em absoluto sigilo e os resultados negativos devem ser encaminhados aos lugares de origem e os positivos devem ser novamente processados. Agora são necessárias as amostras arquivadas que deverão ser ensaiadas em duplicata. Caso haja a confirmação do resultado positivo estes devem ser entregues às assistentes sociais para que se localize a criança e sua família. Entra agora uma equipe multidisciplinar que deverá acompanhar o tratamento (dieta)⁽¹³⁾.

5) Tratamento

O primeiro trabalho foi publicado em 1954⁽⁵⁾ e dava ênfase a uma dieta restrita em fenilalanina (phe) para reduzir os níveis séricos e evitar o retardo mental. Este tratamento tem sucesso se iniciado nos dois primeiros meses de vida.

Atualmente, a tecnologia com DNA^(11,12,15) vem sendo apontada como diagnóstico diferencial, diagnóstico pré-natal e detecção heterozigota do PKU.

6) Problemas Operacionais

6.1) *Coleta das amostras*. As amostras devem ser colhidas em papel de filtro especial, secas, numeradas em código, acondicionadas e enviadas rapidamente ao centro de triagem^(1,2).

6.2) *Triagem Laboratorial*. Ao receber as amostras de sangue seco em papel de filtro, o laboratório deverá efetuar os cortes em duplicatas de discos de 3mm de diâmetro, contendo cerca de 2,9 ul de sangue; numerá-las em código fornecido pelo compu-

tador, armazenar ou arquivar uma das duplicatas rapidamente e outra, com a amostra, enviada para o laboratório^(1,2).

6.3) *Eluição das amostras*. A eluição deve ser total e geralmente é feita com incubação com o tampão de ensaio, "overnight" (8 a 12 horas)^(18,19,22).

7) Equipamentos

Existem vários métodos e assim diversos aparelhos podem ser usados:

- teste de Guthrie, em placas⁽¹⁸⁾
- espectrofluorimetria em auto-analyzer⁽¹⁹⁾
- cromatografia em HPLC
- fluorimetria em "Delfia" da Pharmacia (LKB)⁽⁸⁾
- radioimunoensaio com ¹²⁵I, em contador de radiação gama⁽²³⁾
- SUMA, através de ELISA

8) Seleção da população de risco

Em 1987, houve em Maryland (USA), precisamente no N.I.H.⁽¹³⁾, uma conferência em erros inatos do metabolismo e várias questões foram levantadas e pela primeira vez elaborou-se um programa:

- amostragem deve ser universal
- educação da população de risco (aconselhamento genético)
- a herança é autossômica recessiva
- seleção pré-natal: difícil nos países pobres
- trabalhar direto com as Secretarias da Saúde, para melhor controle populacional
- obrigatoriedade; as leis devem prever a seleção

CONCLUSÃO

Cerca de 1 a 2% dos recém-nascidos com hiperfenilalaninemia são deficientes em BH4. Deve-se avaliar os níveis de pterinas nos pacientes com deficiência de tetrahydropterina (BH4). Geralmente devemos avaliar a atividade da dihidropterina redutase (DHPR) nos glóbulos vermelhos (RBC). Recomenda-se o uso de altas doses de BH4, mais ou menos 20mg/Kg de peso corporal, para a realização do teste^(13,14).

RIALA6/794

MARTINS, H.P. - Phenylketonuria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):47-52, 1996.

ABSTRACT: The interest of genetics diseases is increasing in the developed countries while the control of infectious and sociables diseases carried out more effective. Recent date²¹ prove about 50% of the perinatal dies occur by genetics causes. Furthermore, one third of the adults cronic diseases are attribute to genetics factors.

Are esteem in about 50.000 to 100.000 the ours genes, disperse as 23 pairs of chromosomes which are responsible by the hereditaries attributes. By the other hand, its are already know about 6000 genetics diseases, the greateryet no treated¹¹. The great challenge of the genetecists are been identify our genes and to understand what are the mechanism which cause genetic pathology and while don't have effective treatment, to prevent the birth of new affected.

The amino and organic acid are the metabolic inborn errors more frequent in the neonatal period². In Germany, about 1:15000 of childhood are diagnosticated as organoacidpathies bearer¹. Mainly in the organoacidpathies there are more evidences that this number must be greater.

KEY WORDS: Metabolic disorders - Amino acido inborn errors - PKU

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOFFMANN, G.F.; TREFZ, F.K. & BREMER, H.J. - "Selective screening for amino and organic inborn errors". *Wien. Klin. Wochenschr.* **104** (21) : 651-7,1992.
2. IRONS, M. - "Screening for metabolic disorders. How are you doing?" *Pediatric Clin. North Am.* **40**(5): 1073-85, 1993.
3. UDENFRIEND, S. & COOPER, J.R.: - "Assay of L-phenylalanine as phenylalanine after enzymatic decarboxylation: Application to isotopic studies". *J.Biol. Chem.* **203**: 953-958, 1953.
4. ALBERT, A. - "The pteridines". *Quarterly Revs.* **6**: 197-210, 1952.
5. BICKEL, H.; GERRARD, J. & HICKMANS, E.M. - "The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr.* **43**:64-69, 1954.
6. HEMMILÄ, I.2 - "Europium as a label in time resolved immunofluorometric assay". *Anal. Biochem.* **137**:335-43, 1984.
7. PETTERSON, K. - Time resolved fluoroimmunoassay of human choriogonadotrophin". *Clin. Chem.* **29**:60-4, 1983.
8. SOINI, E. & KOGOLA, H.: "Time resolved fluorometer for lanthanide chelates a new generation of non-isotopic immunoassays". *Clin. Chem.* **229**:65-68, 1983.
9. KRISTIANSOON, B.; STIBLER, H. & WIDE, L. - "Gonadal function and glycoprotein hormones in the carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) syndrome". *Acta Paediatr.* **84**(6): 655-60, 1995.
10. COLLINS, F.S. - "Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications". *Science.* **256**: 774-9,1992.
11. MCKUSICK, V& AMBERGER, J.S. - "The morbid anatomy of the human genome: chromosomal location of mutations causing diseases". *J. Med. Genet.* **26**:265-9, 1994.
12. CASHEY, C.T. - "Molecular medicine: a spin off from the helix". *J.Am. Med. Ass.* **269**: 1986-1992,1993.
13. PONZONE, A.; GUARDAMAGNA, O. & COTTON, R.G.H. - "Screening for malignant phenylketonuria". *Lancet I*: 512-7, 1987.
14. ENDRES, W.; IBEL,H. & CURTIUS, H.- CH. - "Tetrahydrobiopterina and "non-responsive" dihydropterine redutase deficiency". *Lancet II*: 223-5,1987.
15. AZIBI, K.;BACHNER, L. & CHAOUCH, A.- "Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of 50 kDa dystrophin associated glycoprotein maps to chromoson 13q 12". *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1423-28,1993.
16. SCHMIDT, B.J.; MARTINS, A.M.M.; FISBERG, R.; ADELL, A.C.C. & DIAMENT, A. J.- "Phenylketonuria (PKU) - The Brazilian Experience". *Anal. of International Screening Symposium of Inborn Errors of Metabolism.* November: 6-9, 1988.

17. CARPENTER, G.C.; AWERBACK, V.H. & DIGEORGE, A.M. - "Phenylketonuria". *Pediatric Clin. North. Am.* **15**:313, 1968.
18. GUTHRIE, R. - "Blood screening for phenylketonuria". *J.Am. Med. Assoc.* **178**:863-864, 1961.
19. MCCAMAN, M.W. & ROBINS, E. - "Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum". *J. Lab. Clin. Med.* **59**:885,1962.
20. WONG, P.; O'FLYNN, M. & INOUE, T. - "Micromethods for measuring phenylalanine and tyrosine in serum". *Clin. Chem.* **10**: 1098-1104,1964.
21. FELICE, K.J.; ALESSI, A.G. & GRUNNET, M.L. - "Clinical variability in adult-onset acid maltase deficiency: Report of affected sibs and review of literature". *Medicine* **74**(3): 131-5, 1995.
22. CHOPRA, I.J.; WU-SING-YUNG & SANTINI, F. - "A radioimmunoassay for measurement of 3,5,3'- triiodothyronine sulfate: Studies in thyroidal diseases, pregnancy and neonatal life". *J.Clin. Endocrinol Metab.* **75**(1); 189-194, 1992.

Recebido para publicação em 11/7/95