

ERIKA LOURENÇO POLLICE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FENILCETONÚRIA
EM PACIENTES DA REGIÃO DE CAMPINAS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ERIKA LOURENÇO POLLICE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FENILCETONÚRIA
EM PACIENTES DA REGIÃO DE CAMPINAS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas

Orientação: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P764c Pollice, Erika Lourenço
“Caracterização molecular da fenilcetonúria em pacientes da região de Campinas” / Érika Lourenço Pollice. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Carmen Silvia Bertuzzo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fenilcetonúria. 2. Genótipo. 3. Biologia Molecular. 4. Triagem neonatal. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Molecular characterization of phenylketonuria in patients of Campinas region

Keywords: • Phenylketonuria
• Genotype
• Molecular Biology
• Neonatal screening
• Polymerase Chain Reaction

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Prof. Dr. Rui Fernando Piloto

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

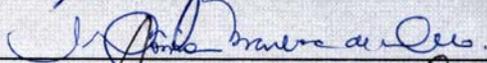
Data da defesa: 15 - 08 - 2008

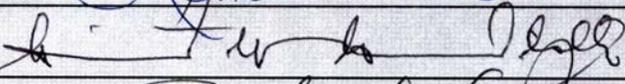
Banca examinadora da Tese de Doutorado
Aluna: Erika Lourenço Pollice

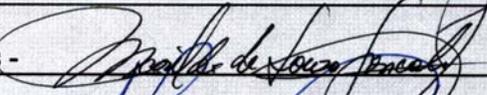
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Sílvia Bertuzzo

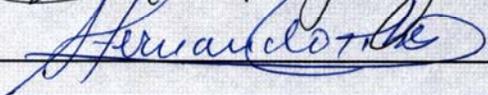
Membros:

1. Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo - 

2. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo - 

3. Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto - 

4. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves - 

5. Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/08/2008

**Trabalho realizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento
de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas**

Dedicatória

A

meus pais

Adelina e Wanderley

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado às pessoas especiais que me acompanharam ao longo dos anos no Departamento de Genética Médica, a todos, que de alguma forma colaboraram pra esse projeto se realizar.

À Marilza amiga que me auxiliou na execução do trabalho, fez o impossível pra fazer tudo funcionar e ainda trabalhou por horas incansáveis pra dar tempo de deixar tudo certo, que por várias vezes sofreu e estressou junto comigo e por tudo que fez, pois sem ela eu não teria conseguido.

Ao Fábio, por sua super disposição em ajudar, sempre fazendo correria com meus documentos e tese pra todo lado, com sua calma absurda, sua paciência imensa em ensinar e, sobretudo por sua grande amizade.

À Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo por aceitar o desafio de me orientar trabalhando, o que foi muito difícil, pela paciência de ficar conversando por e-mail e me atender em horários alternativos, devido eu estar trabalhando e ter pouco tempo disponível e por sua extrema tranqüilidade nos momentos difíceis dizendo pra ter calma que tudo iria dar certo.

Ao Prof. Dr. Carlos Steiner por sua grande ajuda e disponibilidade em levar meu pôster no congresso, pois sem esse imenso favor eu não chegaria até aqui.

Aos amigos e companheiros de moradia, Emiliane, Anderson, Fábio, Alessandro, Amarylis e Elisa pela convivência agradável, momentos de descontração, apoio e grande paciência e por muitas vezes terem suportado o meu mau humor e nervosismo nas fases difíceis.

Ao Junior, colega de trabalho, pela amizade, paciência, auxílio nas horas difíceis, ajuda e cumplicidade nas necessidades de me ausentar do trabalho, por agüentar muitas reclamações e por dar apoio em todas as horas.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, ajuda durante esses anos.

Aos meus pais Adelina e Wanderley e ao meu irmão Emerson, pela paciência, amor, compreensão, que por tantas vezes agüentaram minhas lamentações sobre as dificuldades na pesquisa, por não terem me deixado desistir e por cuidarem de mim.

À Deus que me deu forças e que tornou tudo possível.

***"Que os esforços
desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos de que
as grandes proezas da história
foram conquistadas do que
parecia impossível"***

Charles Chaplin

	Pág.
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	20
Antecedentes na literatura.....	21
Diagnóstico.....	25
Tratamento.....	26
Aspectos Moleculares.....	27
OBJETIVOS	32
CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	36
2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
3- Digestão enzimática.....	38
4- DHPLC.....	40
5- Seqüenciamento.....	44
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	65
BIBLIOGRAFIA	67
ANEXOS	74
I- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
II- Parecer do comitê de ética em pesquisas em seres humanos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

BH₄	Tetraidrobiopterina
DHPLC	Denaturing High Performace Liquid Chrmatography
DMH	Doenças Metabólicas Hereditárias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
dL	Decilitro
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EIM	Erro Inato do Metabolismo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HCl	Ácido clorídrico
HPA	Hiperfenilalaninemias
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
LiCl	Cloreto de Lítio
MgCl	Cloreto de Magnésio
mg	Miligrama

Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (reduzida)
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
PAHdb	<i>Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase</i>
Pb	Pares de bases
pH	Potencial Hidrogeniônico'
Primers	Oligonucleotídeos iniciadores
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RNA_m	Acido Ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SSCP	Análise de Conformação de Polimorfismo de Fita Simples
STR	Pequenas repetições em tandem
Taq[®]	DNA polimerase <i>Termus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borato-EDTA
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
VNTR	Variação do número de repetições em tandem
μL	Microlitro
μg	Micrograma

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I- Perfil genotípico.....	57
Tabela II- Proporção alélica das mutações.....	58

	Pág.
Figura 1- Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina-hidroxilase e BH ₄	23
Figura. 2- Mapa de todas mutações descritas no gene <i>PAH</i>	29
Figura 3- Exemplo de formação de heteroduplex e homoduplex.....	41
Figura 4- Gel de Acrilamida demonstrando a análise da mutação IVS12+1G→A.....	47
Figura 5- Gel de Agarose demonstrando a análise da mutação V388M.....	48
Figura 6- Gel de Acrilamida demonstrando a análise da mutação R408W.....	49
Figura 7- Gel de Acrilamida demonstrando a análise da mutação IVS10-11G→A.....	50
Figura 8- Gráfico do DHPLC mostrando alteração.....	52
Figura 9- Gráfico de seqüenciamento para a mutação IVS4+5C→G...	53
Figura 10- Gráfico de seqüenciamento para a mutação I65T.....	53
Figura 11- Gráfico de seqüenciamento para a mutação A309V.....	54
Figura 12- Gráfico de seqüenciamento para a mutação L348V.....	54
Figura 13- Gráfico de seqüenciamento para a mutação L48S.....	55
Figura 14- Mapa localizando as mutações encontradas.....	55

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro I- Seqüência de primers utilizados para a PCR.....	38
Quadro II- Demonstrativo das mutações investigadas do gene <i>PAH</i> , contendo as enzimas de restrições e tamanho dos fragmentos obtidos.....	40
Quadro III- Seqüência de <i>primers</i> do DHPLC.....	43
Quadro IV- Distribuição de pacientes fenilcetonúricos quanto ao genótipo.....	46
Quadro V- Resultados DHPLC.....	51
Quadro VI- Resultados do sequenciamento e genótipos encontrados.....	56

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva que na sua forma clássica é causada pela deficiência da enzima hidroxilase da fenilalanina (PAH), cuja função é catalisar a reação de hidroxilação da fenilalanina em tirosina. Uma alteração no gene da *PAH* leva a deficiência de hidroxilase da fenilalanina. O diagnóstico precoce é de suma importância, uma vez, que se não tratada, pode ocasionar retardo mental. A dieta pobre em fenilalanina previne esse retardo, tornando o diagnóstico precoce fundamental. Mais de 500 mutações que causam algum grau de hiperfenilalaninemia foram descritas no gene *PAH*. O conjunto e frequências das mutações variam conforme a população. A população brasileira apresenta mistura étnica complexa, a frequência das mutações varia muito conforme a região estudada. No Brasil, foram estudadas amostras de São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS) e Minas Gerais (MG). A grande variação observada nos níveis de fenilalanina nos primeiros meses de vida e sua correlação diminuída com o diagnóstico aponta para o seu valor prognóstico baixo, reforçando a necessidade da triagem de mutações. Este estudo teve como objetivo investigar as mutações mais frequentes e estabelecer o perfil gênico de pacientes com PKU diagnosticados em serviços de triagem neonatal e que estejam em acompanhamento no Serviço Regional de Triagem Neonatal da UNICAMP. Foram analisadas as mutações V388M, IVS10nt11, IVS12nt1, R408W, através da técnica de PCR e digestão com enzima de restrição específica. Nos casos onde não foi detectada nenhuma dessas mutações, foi realizada a técnica de DHPLC com posterior sequenciamento dos pacientes com padrão de eluição alterado. As mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M, não foram encontradas com grande frequência em nossa amostra de fenilcetonúricos da região de Campinas. As demais mutações identificadas foram bem variadas. Os pacientes analisados neste trabalho possuem um perfil gênico distinto de indivíduos pertencentes a outras regiões do Brasil e relatados na literatura, refletindo na grande miscigenação existente na população brasileira.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive genetic disorder caused by deficiency of the hepatic phenylalanine-4-hydroxylase (PAH), which catalyzes hydroxylation of phenylalanine to tyrosine. Deficiency of PAH is caused by mutations in the *PAH* gene, resulting in high serum levels of phenylalanine and mental retardation. Restriction of phenylalanine intake prevents neurological impairments of PKU. Mutation screening of PAH gene is a very useful strategy for accurate diagnosis, newborn phenotype prediction and to implement a dietary without phenylalanine. To date, almost 500 mutations have been identified in the *PAH* gene. The PAH mutation frequency could change with the studied population. The Brazilian population is compound by a great ethnic variation and the PAH mutation frequency could be very different depending on witch Brazilian region was studied. Previous studies in Brazilian patients were performed at São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS) and Minas Gerais (MG) and the mutation frequency can be changed according to the population studied. The aim of this work was to analyze the most frequent PAH mutations previously described in other populations and determine the PKU molecular characterization in patients identified in the neonatal service of the Regional Newborn Screening Service/Campinas. The V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 and R408W mutations were analyzed by PCR and RFLP. In addition, DHPLC and automatic sequencing were performed for patients whose initial screening was negative. Any of the R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A and V388M mutations was found in great frequency in our sample from Campinas region. The other mutations that could be detected in this sample were diversified. The genetic characteristics in these patients were different than others Brazilian populations.

INTRODUÇÃO

Antecedentes na literatura

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) são causadas por erros inatos do metabolismo (EIM) e resultam da falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas ou defeitos no transporte de proteínas. As conseqüências podem ser o acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade, a deficiência de produtos intermediários críticos e de produtos finais específicos ou ainda o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias (POLLITT, RJ et al., 1997; WABER, L et.al, 1990).

As DMH são na sua grande maioria, de herança autossômica recessiva, ou seja, têm um risco de recorrência de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Algumas doenças são transmitidas sob padrão de herança ligada ao cromossomo X, isto é, a mãe é portadora da mutação, sendo o risco de recorrência nestes casos de 50% a cada gestação para o sexo masculino e de 50% das filhas serem portadoras e transmitirem o alelo mutante aos seus filhos. Há ainda as chamadas doenças de herança mitocondrial, determinadas por mutações no ácido desoxirribonucléico (DNA) mitocondrial, nas quais o risco de recorrência é de praticamente 100% nos filhos de ambos os sexos, quando a mãe é portadora da mutação. (WABER, L et al., 1990; WAPPER, RS et al., 1993).

As DMH individualmente são consideradas raras, porém a incidência cumulativa, ou seja, quando consideramos todos os EIM juntos é de 1:5.000 dos recém-nascidos vivos (POLLITT, RJ et al., 1997).

O panorama que a comunidade médica possuía dos EIM foi modificado pelo relato de Bickel e colaboradores em 1954, sobre os resultados surpreendentes do tratamento de uma criança de 2 anos de idade, portadora de fenilcetonúria, com dieta pobre em fenilalanina. A partir desta publicação a comunidade científica empenhou-se para encontrar um teste de triagem neonatal que permitisse o diagnóstico da fenilcetonúria antes do quadro clínico instalar-se e Guthrie & Susi em 1963 desenvolveram o teste de inibição do crescimento bacteriano pela presença de fenilalanina (BICKEL H, et al., 1953; GUTHRIE, R & SUSI, 1963).

As hiperfenilalaninemias (HPA), ou elevação dos níveis de fenilalanina (Phe) no sangue, são as desordens mais comuns do metabolismo de aminoácidos (TRAHMS, 1998). As HPAs têm caráter autossômico recessivo e podem resultar de defeitos nos genes que codificam uma de duas enzimas: fenilalanina hidroxilase ou diidrobioterina redutase. Assim, a conversão da Phe em tirosina (Tyr) se torna ineficiente, levando ao acúmulo de Phe no organismo (MIRA & MARQUEZ, 2000; MARCO & WAITZBERG, 2000).

A conversão da Phe em Tyr ocorre por meio de um sistema de hidroxilação complexo, envolvendo várias enzimas e coenzimas. O papel da fenilalanina hidroxilase é o de inserir um átomo de oxigênio na Phe para formar o grupo hidroxila da Tyr. A fenilalanina hidroxilase requer um co-fator, a tetraidrobioterina (BH_4), que transporta elétrons do NADH para o O_2 na hidroxilação da Phe. Durante a reação de hidroxilação, a coenzima é oxidada a diidrobioterina e, subsequentemente, é reduzida novamente pela ação da enzima diidrobioterina redutase. A tetraidrobioterina é um cofator essencial para a hidroxilação da Phe, da Tyr e do triptofano (Trp) (STRYER et al., 1988; MARCO & WAITZBERG, 2000). A deficiência de BH_4 produz distúrbios no metabolismo destes aminoácidos, diminuindo a formação de catecolaminas, melanina e serotonina (Figura 1) (STRYER et al., 1988; MIRA & MARQUEZ, 2000).

O aumento da concentração de Phe no sangue ativa a via de transaminação da Phe, levando à formação de fenilpiruvato e outros metabólitos, que são rapidamente excretados na urina. Além disso, ocorre elevação na concentração de Phe no líquido, provavelmente por mecanismo de competição do aminoácido com a glicose para ultrapassar a barreira hematoencefálica, favorecendo lesão neuronal (BURTS & ASHWOOD, 1996). A incapacidade de metabolizar a Phe leva a diminuição nos níveis plasmáticos de tirosina e consequentemente, à redução dos neurotransmissores formados a partir deste aminoácido, como dopamina, epinefrina e norepinefrina, além de favorecer a deficiência de tirosina. A produção de melanina também é afetada, podendo ocorrer clareamento da pigmentação da pele, cabelo e olhos (BURTS & ASHWOOD, 1996; MIRA & MARQUEZ, 2000).

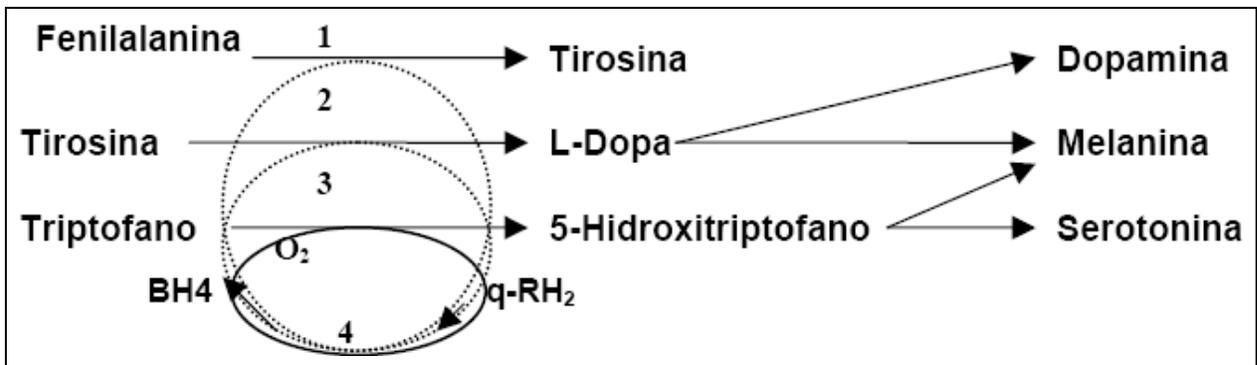


Figura 1- Vias metabólicas da Phe dependentes da fenilalanina-hidroxilase e BH_4 .

A tetrahydrobiopterina (BH_4) é uma coenzima da hidroxilação de aminoácidos aromáticos, via fenilalanina-4-hidroxilase (1), tirosina-3-hidroxilase (2) e triptofano-5-hidroxilase (3). A diidrobiopterina quinoide ($q-BH_2$) formada é regenerada para BH_4 por NADH- BH_2 redutase dependente (4). Na PKU clássica, a enzima 1 é deficiente. O acúmulo de Phe inibe as enzimas 2 e 3. Essa inibição e a deficiência de dopamina e serotonina resultantes podem ser evitadas pela dieta pobre em Phe. Na deficiência congênita da BH_4 , a enzima 4 ou uma das enzimas da biossíntese da biopterina é defeituosa. Então, nenhuma das enzimas 1-3 é ativada e a dieta pobre em Phe é terapeuticamente inefetiva. Fonte: adaptado de MIRA & MARQUEZ (2000).

As HPAs têm apresentação polimórfica e se classificam em fenilcetonúria (PKU) clássica, PKU leve, HPA permanente, HPA transitória, HPA materna e deficiências de BH_4 (MIRA & MARQUEZ, 2000; SANTOS et al., 2003).

A PKU clássica é a mais comum das HPAs. É descrita uma grande variabilidade na incidência da fenilcetonúria entre os diversos países e etnias (HOFMAN et al., 1991), variando, desde 1/300 na Turquia até 1: 60.000 no Japão (TYFIELD et al., 1997). Em populações caucasóides, a frequência média é de 1:12.500. No Brasil, a incidência aproximada é de 1:12.000 a 1:15.000 nascimentos (SCRIVER et al., 2001).

Caracteriza-se por níveis sanguíneos de Phe acima de 200 $\mu\text{g/mL}$, e atividade da fenilalanina hidroxilase abaixo de 1%. Em pacientes não tratados, encontram-se concentrações elevadas de fenilcetonas na urina. Estes pacientes

podem desenvolver atraso grave, progressivo e irreversível no desenvolvimento neuropsicomotor (MARCO & WAITZBERG, 2000; TRAHMS et al., 1998).

A PKU leve, branda ou atípica se assemelha à PKU clássica, porém os níveis de Phe no sangue são mais baixos (entre 100 e 200 µg/mL) (TRAHMS et al., 1998). A atividade da fenilalanina hidroxilase se situa entre 1 e 3% (MARTINS et al., 1993).

A HPA permanente ou benigna é encontrada em pacientes com atividade da fenilalanina hidroxilase diminuída, mas superior a 3%. Não há alterações clínicas aparentes e, geralmente, não exige tratamento dietético. A concentração de Phe no sangue é menor que 100 µg/mL (TRAHMS et al., 1998).

A HPA transitória ou neonatal pode ocorrer eventualmente em consequência de prematuridade, de fornecimento de formulações com elevada concentração protéica ao recém-nascido, de diluições inadequadas das formulações lácteas ou da fervura intensa do leite (STARLING et al., 1999). Não exige tratamento, uma vez que é aparentemente benigna (TRAHMS et al., 1998).

A HPA materna acomete fetos de mães com concentração sanguínea de Phe acima de 65 µg/mL. Devido ao gradiente positivo transplacentar, ocorre o aumento de cerca de duas vezes no nível de Phe no feto, causando dano cerebral antes do nascimento. O quadro clínico é irreversível e se caracteriza por retardo mental, microcefalia e risco de doenças cardíacas congênitas (MIRA & MARQUEZ, 2000).

A deficiência da enzima diidrobiopterina redutase leva a diminuição no cofator BH₄, essencial na hidroxilação da Phe, levando ao acúmulo deste aminoácido. Uma vez que este cofator também é requerido pelas enzimas tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, necessárias à síntese de neurotransmissores, este tipo de HPA não responde ao tratamento estritamente dietético. O prognóstico é pior que o de outras formas de HPA, e o tratamento inclui a utilização de BH₄, L-DOPA e 5-OH-triptofano (BURTS & ASHWOOD, 1996; SCRIVER et al., 1997).

Dentre os erros congênitos do metabolismo de aminoácidos, a fenilcetonúria clássica é a doença clinicamente mais encontrada (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Diagnóstico

O diagnóstico ideal é aquele realizado através de programa de triagem neonatal, pois permite tratamento precoce e prevenção do desenvolvimento do quadro clínico. A triagem neonatal é realizada através da dosagem quantitativa da Phe sangüínea, obtida a partir de amostras colhidas em papel filtro (teste do pezinho). Para que o aumento da Phe possa ser detectado, é fundamental que a criança tenha tido ingestão protéica, portanto é recomendado que a coleta seja feita após 48 horas do nascimento da criança. Neste momento, mesmo crianças com risco, que ainda não tiveram contato com leite materno, podem colher material desde que estejam sob dieta parenteral (rica em aminoácidos essenciais) (LEVY et al., 1999, SCRIVER et al., 1998).

Idealmente o diagnóstico não deve aguardar até a fase de manifestações clínicas para que seja realizado, uma vez que lesões irreversíveis podem ocorrer. Para casos que não forem diagnosticados durante a triagem neonatal ou em crianças que não tenham realizado a mesma, os seguintes sintomas devem ser indicativos para que se pesquise o diagnóstico de fenilcetonúria: atraso do desenvolvimento neuro-psicomotor (de qualquer intensidade); deficiência mental; comportamento agitado, agressivo ou padrão autista; quadro convulsivo sem etiologia definida (PIETZ et al., 1998, WILLIAM et al., 1998).

Durante a gestação de uma paciente portadora de hiperfenilalaninemia permanente (níveis de fenilalanina com resultados entre 4 e 10mg/dL), as quantidades aumentadas da Phe materna levam a incidência elevada de complicações fetais. Desta forma, meninas em idade fértil que planejem

engravadar devem ser orientadas a iniciar a dieta para pacientes fenilcetonúricos e manter níveis menores ou iguais a 4mg% antes da concepção e durante toda a gestação (KOCH et al., 1996, JARDIM et al., 1996).

Tratamento

O tratamento consiste basicamente de dieta com baixo teor de Phe, porém com níveis suficientes deste aminoácido para promover crescimento e desenvolvimento adequados. Se instituída a dieta isenta de Phe, esta poderia levar à "Síndrome da Deficiência", caracterizada por eczema grave, prostração, ganho de peso insuficiente levando à desnutrição, além de deficiência mental e crises convulsivas (SCRIVER et al., 2001).

Além da fórmula de aminoácidos, os pacientes recebem as seguintes orientações: os lactentes recebem as fórmulas especiais e a elas pode ser adicionado leite integral modificado com a menor quantidade de Phe possível; a amamentação materna pode ocorrer desde que exista controle diário da Phe sangüínea; a introdução de outros alimentos deve ocorrer aos quatro meses de idade, utilizando-se alimentos que contenham baixos teores de Phe, tais como vegetais e frutas, sempre com controle diário da quantidade diária permitida de ingestão de Phe (SCRIVER et al., 2001).

O acompanhamento da dieta dos pacientes portadores de fenilcetonúria deve ser feito por equipe multidisciplinar formada minimamente por pediatra e nutricionista.

Logo após o diagnóstico, o acompanhamento clínico deve ser mensal até o primeiro ano de vida para que a mãe seja orientada sobre a dieta e os riscos das transgressões para o desenvolvimento de seu filho. Após este período, o acompanhamento pode ser bimestral ou trimestral, dependendo da evolução da criança e das dificuldades da família. O acompanhamento laboratorial, com análise quantitativa de fenilalanina, deve ser mensal nos primeiros

seis meses de tratamento e após este período dosagens a cada 3-4 meses são recomendadas (ACOSTA & YANNICELLI, 1997).

Mantida a normalização dos parâmetros neuro-psicomotores nos pacientes com diagnóstico precoce (através da Triagem Neonatal) e instituição do tratamento adequado antes dos três meses de vida pode-se atingir o desenvolvimento pômbero-estatural adequado para a idade do paciente apesar da restrição dietética imposta e a melhoria gradual das alterações neuro-psicológicas observadas nos pacientes cujo tratamento inicia-se a partir de três meses de idade (pacientes não submetidos à triagem neonatal) (MIRA & MARQUEZ, 2000).

Aspectos Moleculares

O gene que codifica a enzima hidroxilase da fenilalanina (PAH) foi clonado e seqüenciado em 1980 (WOO et al., 1983), e está localizado no cromossomo 12, na região 12q22-24.1, sendo composto por 13 exons, distribuídos em um segmento genômico de 90 Kb (DILELLA et al., 1986; WOO et al., 1988).

A enzima PAH é constituída por duas cadeias de polipeptídeos, cada uma com peso molecular de aproximadamente 54.000 kDa. Formas multiméricas de PAH já foram identificadas, sugerindo a existência da forma tetramérica da enzima (BARRANGER et al., 1972). A estrutura tridimensional foi determinada em 1997 e revela a presença de dobra similar à da tirosina hidroxilase, fornecendo uma visão estrutural das regiões onde as mutações poderiam estar localizadas e a base racional para explicar os mecanismos moleculares dos fenótipos enzimáticos da fenilcetonúria (ERLANDSEN et al., 1997).

Segundo a base de dados Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase (PAHdb) em 2007, mais de 500 mutações no gene da PAH foram identificadas (Fig. 2), sendo estas mutações 61,58% de sentido trocado, 13,37% deleções, 11,49% *splicing*, 6,03% silenciosas, 4,90% sem sentido, 1,88% inserções, 0,56% *sil/splicing* e 0,19% desconhecidas. Em muitos casos

foram encontradas fortes associações entre as mutações e haplótipos de RFLP (polimorfismos do tamanho dos fragmentos de restrição), definidos por sete polimorfismos dialélicos, e um sistema de VNTR (Variação do número de repetições em tandem), no gene da PAH (EISENSMITH et al., 1992). Os haplótipos STR (polimorfismos de pequenas repetições em tandem) foram encontrados no intron 3 do gene da PAH (GOLTSOV et al., 1992). As mutações no gene que codifica a enzima PAH, ou causam ausência total da função da enzima PAH, ou estão associadas com a atividade residual "in vitro" que varia de 2% a 7% do total (GULDBERG et al., 1998).

Evidências sugerem que as mutações que causam fenilcetonúria se originaram após a miscigenação das raças (EISENSMITH et al., 1992).

Scriver e colaboradores (2001) descreveram as alterações intragênicas identificadas como: mutação de *splicing* no intron 12; mutações de sentido trocado nos exons 7, 9 e 12; deleções nos exons 1 e 2. Cotton (1990) descreveu 18 mutações e observou que 1/3 das mutações são localizadas no exon 7.

Eisensmith e Woo (1992) revisaram as mutações e polimorfismos conhecidos no gene da PAH, e em média 50% das mutações são substituições de uma única base, incluindo seis mutações sem sentido e oito mutações de *splicing*, as restantes são de sentido trocado.

Silva e colaboradores (2003) em estudo realizado no sul do Brasil demonstraram que no exon 7, encontram-se o maior número de alterações (28,5%). As mutações mais freqüentes representam 68,5% dos alelos mutantes, sendo a I65T (19,5%), R261X (9,8%), R408W (9,8%), IVS2nt5G→C (9,8%), R261Q (9,8%), V388M (9,8%) e outras mutações (32,5%).

As mutações I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10nt11G→A, V388M, R408W e IVS12nt1G, são comuns na Alemanha (DWORNICKZAK et al., 1992). Na Itália as mutações mais freqüentemente encontradas são: I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10nt11G→A e V388M (DIANZANI et al., 1995). A mutação IVS2nt5G→C foi à mutação mais freqüentemente encontrada em pacientes na Bulgária (KALAYDJIEVA et al., 1993), Romênia (POPESCU et al., 1994), Egito (AT et al., 1999), Brasil (ACOSTA et al., 2001), Alemanha, Bélgica e Turquia (SCRIVER et al., 2000).

As mutações mais freqüentes observadas para a PKU em pacientes do estado de SP foram: IVS10nt11G→A (17,4%), R261X (12,2%), V388M (9,1%), R252W (6,5%) e R270K (4,8%) (PEREZ et al., 1996, ACOSTA et al., 2001).

Em um estudo realizado em 2006 no estado de Minas Gerais avaliou-se a freqüência das mutações I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, e IVS12nt1 no gene PAH e as mutações mais comuns encontradas foram V388M (21%), R261Q (16%), IVS10nt11 (13,4%), I65T (5,7%),

e R252W (5%). As outras 4 mutações (R261X, R408W, Y414C, e IVS12nt1) tiveram frequência menor que 2% (SANTOS et al., 2006).

A evidente heterogeneidade molecular da fenilcetonúria e os poucos estudos de caracterização genotípica desta doença na população brasileira, deixa claro a necessidade de mais estudos desse gênero em nossa população.

OBJETIVOS

- Investigar as mutações IVS12+1 G→A, IVS10-11G→A, V388M e R408W, descritas como freqüentes na literatura.
- Observar a freqüência destas quatro mutações em nossa amostra.
- Caracterizar um perfil genotípico da fenilcetonúria em pacientes tratados na UNICAMP.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (Parecer n°. 573/2003 – Anexo II) e foi classificado como de risco mínimo para os pacientes participantes, a não ser o desconforto da punção venosa para a coleta de sangue periférico. Os pacientes foram selecionados no Serviço de Triagem Neonatal (CIPOI) da UNICAMP durante o período de 2004 a 2006, totalizando 20 pacientes portadores de fenilcetonúria com idade variada. Após o consentimento dos pacientes selecionados (Anexo I), foram coletados 7 mL de sangue periférico para extração de DNA e subsequente análise molecular.

Os critérios de inclusão foram: paciente portador de fenilcetonúria em acompanhamento no CIPOI – UNICAMP.

Os critérios de exclusão foram: não consentimento dos responsáveis para a participação na pesquisa.

Para a análise molecular, seguimos os seguintes passos:

- 1- Extração de DNA pelo método de Cloreto de Lítio e proteinase K;
- 2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- 3- Digestão enzimática do produto da PCR, visando investigar as mutações mais freqüentemente encontradas;
- 4- Eletroforese em gel de Poliacrilamida 12%;
- 5- Triagem de mutações pela técnica de DHPLC, nas amostras onde não foi detectada nenhuma das mutações analisadas;
- 6- Seqüenciamento, quando encontrada alteração no DHPLC.

1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

A extração de DNA foi procedida conforme o método descrito por Woodhead e colaboradores (1986), com algumas modificações.

Coletou-se, em dois tubos vacutainer, cerca de 7 mL de sangue periférico de cada paciente (3,5 mL em cada frasco), contendo, em cada um deles, 54 μ L de EDTA 15% para impedir a coagulação sangüínea. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente para a separação do plasma. Em seguida, aliquotou-se 500 μ L do sedimento, em tubos eppendorf de 2,0 mL. Adicionou-se 1 mL de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH8,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM), e agitou-se de 10 a 15 segundos em vórtex. O sedimento contendo as células nucleadas foi obtido por centrifugação a 6000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos.

O precipitado de leucócitos obtido foi ressuspendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 1 mL do tampão de lise I e nova centrifugação foi efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de precipitado de leucócitos sem impurezas.

A seguir, preparou-se a mistura constituída de 395 μ L de tampão de digestão e 5 μ L de proteinase K para cada amostra. Adicionou-se 400 μ L dessa mistura por amostra. Homogeneizou-se o precipitado de leucócitos com auxílio de pipeta Pasteur e agitou-se em vórtex por 15 segundos. A reação foi Incubada em banho-maria a 55 °C por duas horas. Após a incubação, adicionou-se 200 μ L de LiCl 7,5N a cada amostra, agitando-se em vórtex e a seguir a amostra foi acondicionada no freezer -20°C por no mínimo 15 minutos. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm e transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para novos tubos eppendorfes, evitando transferir qualquer precipitado. Após a transferência, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se, invertendo lentamente o tubo, por aproximadamente 50 vezes ou até o DNA precipitar visivelmente. A amostra foi centrifugada por 5 min a

13000 rpm. Após centrifugação, verteu-se lentamente o álcool para não perder o precipitado de DNA. Finalmente, o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 70%. Depois de retirado o etanol 70%, o DNA foi deixado à temperatura ambiente para secar completamente.

Uma vez seco, o DNA foi ressuspendido em água deionizada estéril. Este DNA foi colocado em banho-maria a 37°C, para ser solubilizado completamente. A seguir, o DNA foi analisado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x para subsequente visualização sob luz ultravioleta.

2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A análise das mutações no gene da PAH foi baseada na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1989). Foram realizadas PCR para as mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M e foram utilizados os “primers” descritos no Quadro I. As amostras de DNA foram amplificadas para o gene PAH, utilizando 2µL de DNA; 11,34µL de H₂O; 7,50µL de *Taq Buffer* 10X (Fermentas, USA); 4,44µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas, USA); 13,5µL de dNTP 2mM (Fermentas, USA); 1,00µL de cada oligonucleotídeo 1ng/µL; 0,90µL de *Taq DNA Polymerase* (Fermentas, USA), em um volume final de 50µL. A amplificação foi efetuada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 94 °C por 1 minuto, seguida de 30 ciclos de: 58°C por 1 minuto, temperatura ideal e variável para cada *primer* por 2 minutos , 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos (GIUSTI B, et al. 1999).

Quadro I- Seqüência de primers utilizados para a PCR

Primers	Seqüência	Mutação	Tamanho (pb)
11A e 11B	5'TGAGAGAAGGGGCACAAATG3' 5'GTAGACATTGAGTCCACTCT3'	V388M	323
11A e 11B	5'TGAGAGAAGGGGCACAAATG3' 5'GTAGACATTGAGTCCACTCT3'	IVS10-11	323
12A e 12B	5'CCACTGAGAACTCTCTTAAAG3' 5'CTTCGATTACTGAGAAACCG3'	R408W	240
12CA e 12012A	5'CCACTGAGAACTCTCTTAA3' 5'CGTAAGGTGTAAATTACGTA3'	IVS12+1	215

3- Digestão enzimática

Após a PCR foi realizada a digestão enzimática do produto com a enzima de restrição específica (Quadro II).

A) Mutação V388M

Uma alíquota do produto da PCR (15µl) foi incubada na reação de digestão com 0,5 unidade da enzima *BsaI*, mantida a 37°C durante a noite. A análise do produto da digestão foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, corado com brometo de etídio para possibilitar a visualização dos fragmentos. O alelo mutante é caracterizado pela presença do fragmento de 323 pb, não havendo clivagem pela enzima *BsaI* e quando o alelo normal estiver presente será clivado em 2 fragmentos, 188 e 136 pb.

B) Mutação IVS10-11G→A

Uma alíquota do produto da PCR (15µl) foi incubada na reação de digestão com 0,5 unidades da enzima *Ddel*, mantida a 37°C durante à noite. A análise do produto da digestão foi feita através de eletroforese, em gel de poliacrilamida a 12%, corado com brometo de etídio para possibilitar a visualização dos fragmentos. Se houver a presença da mutação, o fragmento será clivado em 2 fragmentos menores de 244 e 79 pb e quando o alelo normal estiver presente, permanecerá com 323 pb, não havendo clivagem pela enzima *Ddel*.

C) Mutação R408W

Uma alíquota do produto da PCR (15µl) foi incubada na reação de digestão com 0,5 unidade da enzima *Eco130I* (*StyI*) e mantida a 37°C durante a noite. A análise do produto da digestão foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, corado com brometo de etídio para possibilitar a visualização dos fragmentos. Se houver a presença da mutação, o fragmento será clivado em 2 fragmentos menores de 148 e 92 pb e quando o alelo normal estiver presente, permanecerá com 240 pb, não havendo clivagem pela enzima *Eco130I*.

D) Mutação IVS12+1G→A

Uma alíquota do produto da PCR (15µl) foi incubada na reação de digestão com 0,5 unidade da enzima *Rsal*, mantida a 37°C durante a noite. A análise do produto da digestão foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, corado com brometo de etídio para possibilitar a visualização dos fragmentos. O alelo mutante é caracterizado pela presença do fragmento de 215 pb, não havendo clivagem pela enzima *Rsal* e o alelo normal pelos 2 fragmentos, 195 e 20 pb.

Quadro II- Mutações investigadas no gene *PAH*, as enzimas de restrições utilizadas nas análises e tamanhos dos fragmentos mutados.

Mutação	Primers	Enzima de restrição	Tamanho (pb)
R408W	12A e 12B	<i>Eco130I (Styl)</i>	148 e 92 pb
IVS12+1 G→A	12012A e 12CA	<i>RsaI</i>	215pb
V388M	11A e 11B	<i>BsaAI</i>	323pb
IVS10-11G→A	11A e 11B	<i>Ddel</i>	244 e79pb

3- DHPLC

O seqüenciamento direto garante a sensibilidade elevada para a análise das seqüências de DNA e suas variações, embora tenha um custo elevado e consuma muito tempo. Na procura por procedimentos mais rápidos, efetivos e com custo mais baixo, um grande número de métodos de triagem de potenciais seqüências alteradas foi desenvolvido, tais como Análise de Conformação de Polimorfismo de Fita Simples (SSCA ou SSCP) e *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC) (XIAO & OEFNER, 2001; JORDE et al., 2007). A técnica de análise escolhida neste estudo foi a DHPLC.

A técnica de DHPLC se baseia no fato de que, após a desnaturação do DNA, as fitas podem se anelar aleatoriamente durante um resfriamento gradual, formando duplas-fitas onde há um pareamento perfeito (homoduplex) e duplas-fitas onde não há um pareamento perfeito (heteroduplex), resultante de uma alteração na seqüência de pares de bases. Como as fitas de heteroduplex são menos estáveis do que as fitas homoduplex, há uma retenção diferencial em uma coluna de cromatografia em determinadas temperaturas (XIAO & OEFNER, 2001).

Portanto, se um dos alelos apresenta uma mutação, a técnica de DHPLC detecta a presença desta mutação por meio da retenção diferencial de homoduplex e heteroduplex (figura 3) formados pelas moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em uma cromatografia líquida de fase reversa (XIAO & OEFNER, 2001).

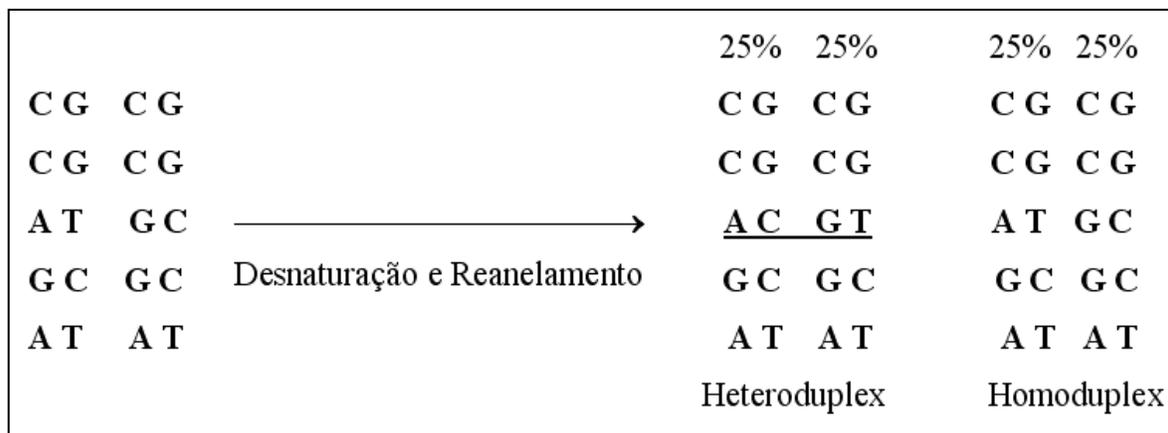


Figura 3- Exemplo de formação de heteroduplex (sublinhado) e homoduplex, com as respectivas probabilidades.

Embora esta técnica não especifique o tipo de alteração nas fitas de DNA, sendo necessário o seqüenciamento posterior, é uma ferramenta adequada para triagem de mutações, apresentando alta sensibilidade (>96%), especificidade e confiabilidade para produtos amplificados de até 700pb, tornando mais práticos os estudos de mutação (XIAO & OEFNER, 2001).

Desta forma, as amostras dos pacientes que não apresentaram as mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M, foram submetidos à análise por DHPLC (XIAO & OEFNER, 2001). A PCR foi realizada para todos os exons do gene *PAH* (Quadro III). Para a formação dos heteroduplexes, os produtos da PCR foram desnaturados à 95°C por 5 minutos e deixados em repouso por 45' em temperatura ambiente. Após este reanelamento por

resfriamento gradual, os produtos da PCR foram analisados pelo sistema WAVE[®] 4500 (Transgenomic). A triagem de mutações foi realizada em temperaturas específicas para cada fragmento e definidas pelo software WAVEMAKER[™]. Alíquotas de 5µL dos produtos da PCR foram injetadas em coluna DNASep[®] com fluxo de 0,9mL/min.

As análises foram realizadas através dos perfis cromatográficos gerados no software WAVEMAKER[™]. Cada pico observado no programa representa um tipo de fragmento de DNA presente na amostra. Portanto, em um indivíduo com alteração pode ocorrer a formação de quatro picos, representando dois homoduplex e dois heteroduplex presentes na amostra e os pacientes sem alteração apresentarão um pico.

Todos os produtos amplificados, que mostraram resultados diferentes dos controles normais ou aqueles que apresentaram resultados não muito claros na análise através do método DHPLC, foram purificados. Esse protocolo consistiu na adição de etanol 95% a 4°C na proporção de 20 para 80 em um tubo de 1000µL. Em seguida, o material foi mantido por duas horas a uma temperatura de -20°C. A centrifugação foi feita a 13000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, adicionado 250µL de etanol 70% (diluído no momento do uso), sendo centrifugado novamente a 13000 rpm por 15 minutos. Logo após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e o “*pelet*” ou precipitado posteriormente seco. Logo após a secagem o DNA foi ressuscitado em 10-30µL de água mili-Q (dependendo da intensidade da banda inicial).

Quadro III- Seqüências de *primers* do gene PAH utilizados para a triagem de mutação por DHPLC.

Exon	Primers	Seqüência	Tamanho (pb)
1	1A	5'GTTAAAACCTTCAGCCCCAC3'	210
	1B	5'GGATCTCTTTCTCTGGAGGC3'	
2	2A	5'GTCCATGGAGGTTTAACAGG3'	237
	2B	5'GAACATGGAAGTTTGCTACG3'	
3	3A	5'TTAGTTCCTGTGACTGTCTC3'	271
	3B	5'CATGTGAGTTACTTATGTTGC3'	
4	4A	5'GTACTIONCAGGACGTTGCCTTC3'	145
	4B	5'CTCATCTACGGGCCATGGAC3'	
5	5A	5'GCACTGTCATGGCTTTAGAG3'	266
	5B	5'CATGCTGGTATTTTCCATCC3'	
6	6A	5'CTGCCTTGAGCACCTATTTTG3'	270
	6B	5'CCAACCTTTCTCAGGGCATTG3'	
7	7A	5'GAGTGGTGATGAGCTTTGAG3'	274
	7B	5'ACCAGCCAGCAAATGAACC3'	
8	8A	5'GAGTCTGGCTTGGCTTAAAC3'	183
	8B	5'GAGAAATTCAGGTCACAGAC3'	
9	9A	5'GCCAAGTACTAGGTTGGTTC3'	179
	9B	5'GGCCATAGCCTATAGCACTC3'	
10	10A	5'CCATCATAGAGTGTGCTCTC3'	250
	10B	5'CAGGTTGCATATCAAAACGG3'	
11	11A	5'TGAGAGAAGGGGCACAAATG3'	324
	11B	5'GTAGACATTGAGTCCACTCT3'	
12	12A	5'CCACTGAGAACTCTCTTAAG3'	239
	12B	5'CTTCGATTACTGAGAAACCG3'	
13	13A	5'GTCTTTCAGTACTAGGACACTTG3'	170
	13B	5'GGATCTCCATCAACAGATTTC3'	

4- Seqüenciamento

Os fragmentos com perfis cromatográficos diferentes do padrão normal, após a purificação foram submetidos ao seqüenciamento automático no equipamento MegaBACE1000[®] (Amersham Biosciences). A reação de seqüenciamento consistiu de 4 μ L de solução pré-mix, 1 μ L do primer específico (5 pmol/ μ L) e 1 μ L do produto da PCR em volume final de 15 μ L. Esta reação foi submetida à 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 20 minutos, anelamento 50°C por 15 minutos e extensão à 60°C por 1 minuto, utilizando termociclador Mastercycler EP (Eppendorf). Os cromatogramas das seqüências resultantes foram analisados nos programas *Chromas*: www.technelysium.com.au/chromas.html.

RESULTADOS

Foram avaliados 20 pacientes inicialmente para as mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M (Quadro IV).

Apenas três pacientes apresentaram alteração para as mutações analisadas por enzima de restrição e todos em heterozigose. A única mutação identificada foi IVS12+1G→A (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 e Fig. 7).

Quadro IV- Resultado dos pacientes fenilcetonúricos quanto ao genótipo, referente às mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M.

Identificação	R408W	V388M	IVS10	IVS12
1701/04	SM	SM	SM	SM
2167/04	SM	SM	SM	SM
2168/04	SM	SM	SM	H
2184/04	SM	SM	SM	SM
2312/04	SM	SM	SM	SM
2384/04	SM	SM	SM	SM
680/05	SM	SM	SM	SM
836/05	SM	SM	SM	SM
897/05	SM	SM	SM	SM
1223/05	SM	SM	SM	SM
1224/05	SM	SM	SM	SM
1355/05	SM	SM	SM	SM
311/06	SM	SM	SM	H
312/06	SM	SM	SM	H
1250/06	SM	SM	SM	SM
1251/06	SM	SM	SM	SM
1252/06	SM	SM	SM	SM
1770/06	SM	SM	SM	SM
1771/06	SM	SM	SM	SM
1774/06	SM	SM	SM	SM

SM- Sem mutação / H - Heterozigoto

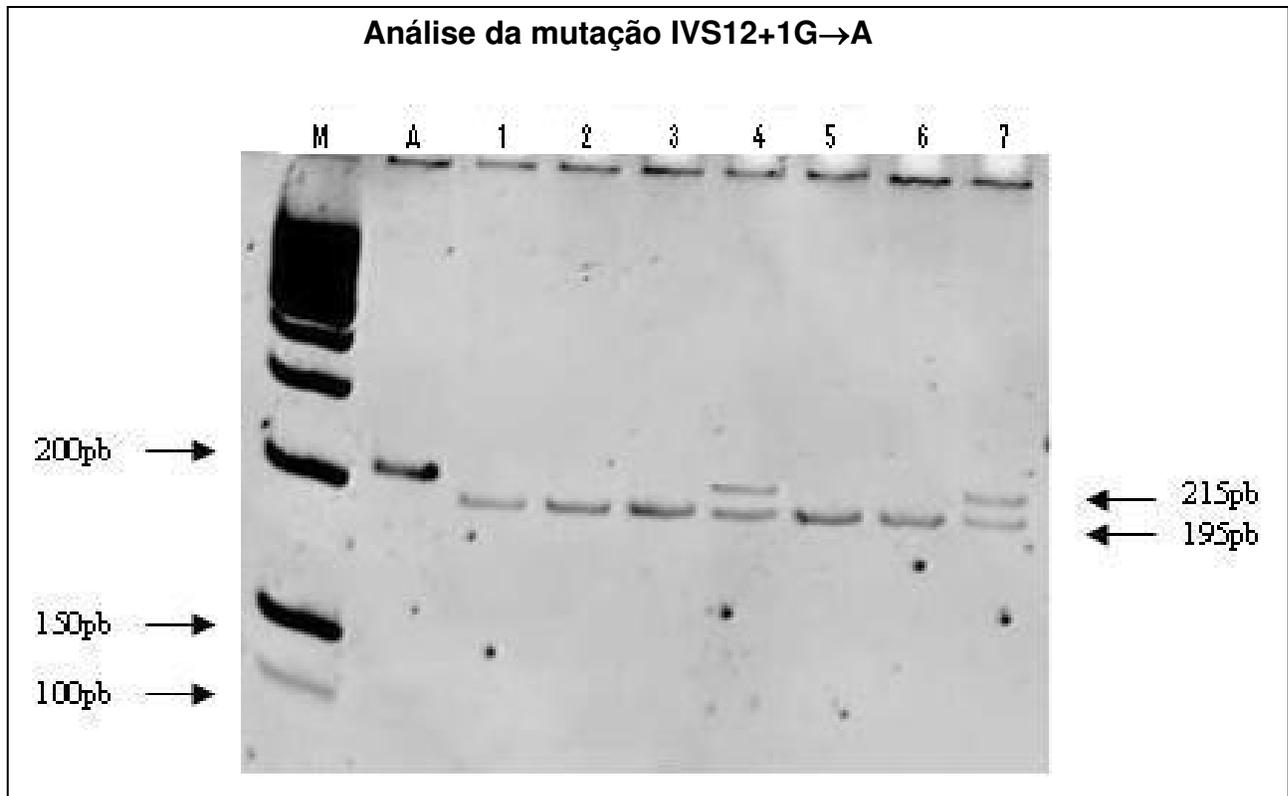


Figura 4- Gel de Acrilamida mostrando a análise da mutação IVS12+1G→A. Onde: M- marcador de peso molecular de 50 pb. A- produto da PCR não digerido. Colunas 1, 2, 3, 5 e 6 - pacientes com genótipo selvagem. Colunas 4 e 7 - pacientes heterozigotos para a mutação IVS12+1G→A.

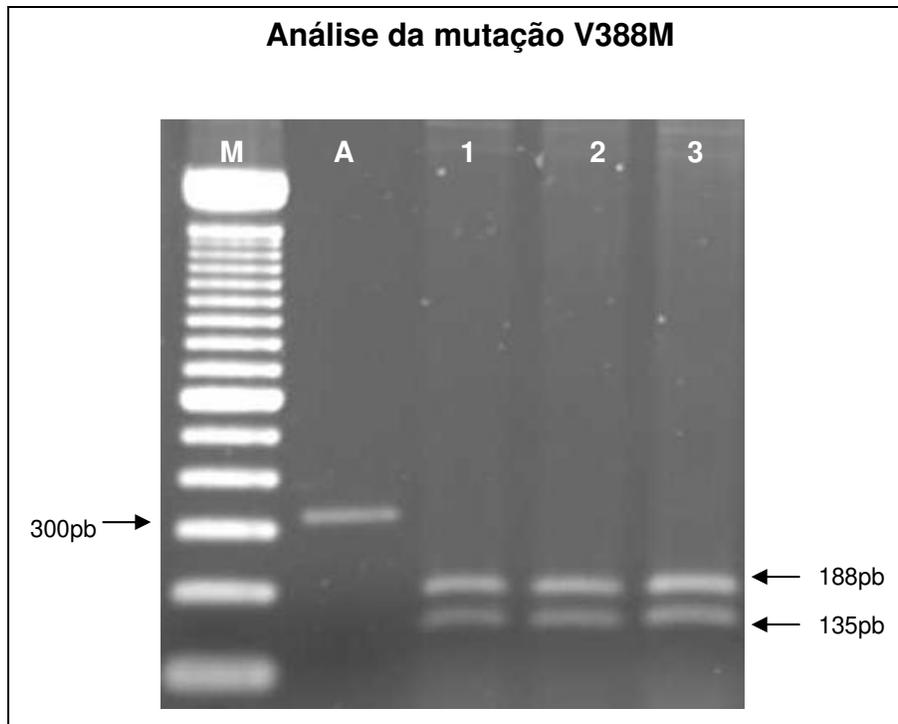


Figura 5- Gel de Agarose mostrando a análise da mutação V388M. Onde: M– marcador de pares de bases molecular de 100 pb. A– produto da PCR não digerido. Colunas 1, 2 e 3 – pacientes com genótipo selvagem.

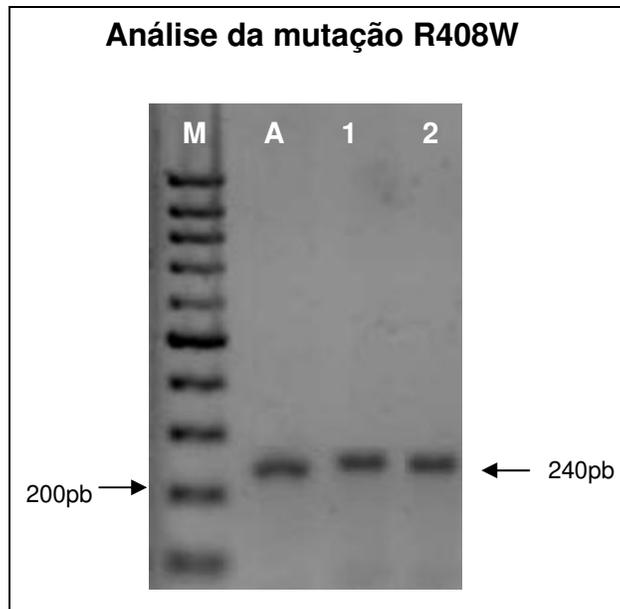


Figura 6- Gel de Acrilamida mostrando a análise da mutação R408W. Onde: M– marcador de pares de bases molecular de 100 pb. A– produto da PCR não digerido. Colunas 1 e 2 – pacientes com genótipo selvagem.

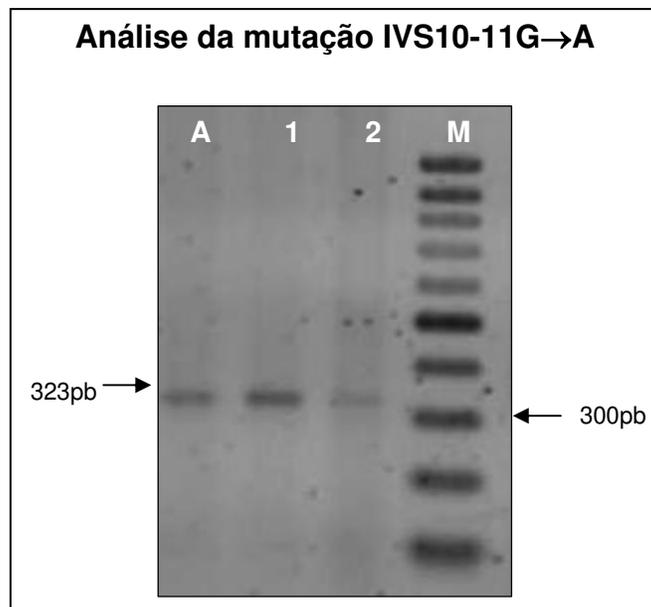


Figura 7- Gel de Acrilamida mostrando a análise da mutação IVS10-11G→A. Onde: M– marcador de pares de bases molecular de 100 pb. A– produto da PCR não digerido. Colunas 1 e 2 – pacientes com genótipo selvagem.

Devido a esses resultados iniciais foi realizada a análise por DHPLC para todos os pacientes (Fig. 8). Com os resultados da DHPLC foi possível eliminar várias regiões consideradas candidatas a conter mutações em um número considerável de pacientes, minimizando a necessidade de seqüenciamento.

Os resultados para o padrão de eluição alterados no DHPLC foram: exon 1, dez pacientes; exon 2, treze pacientes; exon 3, nove pacientes; exon 4, cinco pacientes; exon 5, oito pacientes; exon 6, sete pacientes; exon 7, treze pacientes; exon 8, onze pacientes; exon 9, quatorze pacientes; exon 10, três pacientes; exon 11, nove pacientes; exon 12, seis pacientes e exon 13, um paciente (Quadro V).

Quadro V- Resultados da triagem de mutação no gene PAH obtidos pela técnica de DHPLC.

Identif.	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 13
1701/04	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2167/04	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
2168/04	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
2184/04	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
2312/04	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
2384/04	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
680/05	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
836/05	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
897/05	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
1223/05	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
1224/05	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1355/05	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
311/06	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
312/06	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
1250/06	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1251/06	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1252/06	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1770/06	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
1771/06	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
1774/06	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0

0- Sem alteração / 1- Com alteração

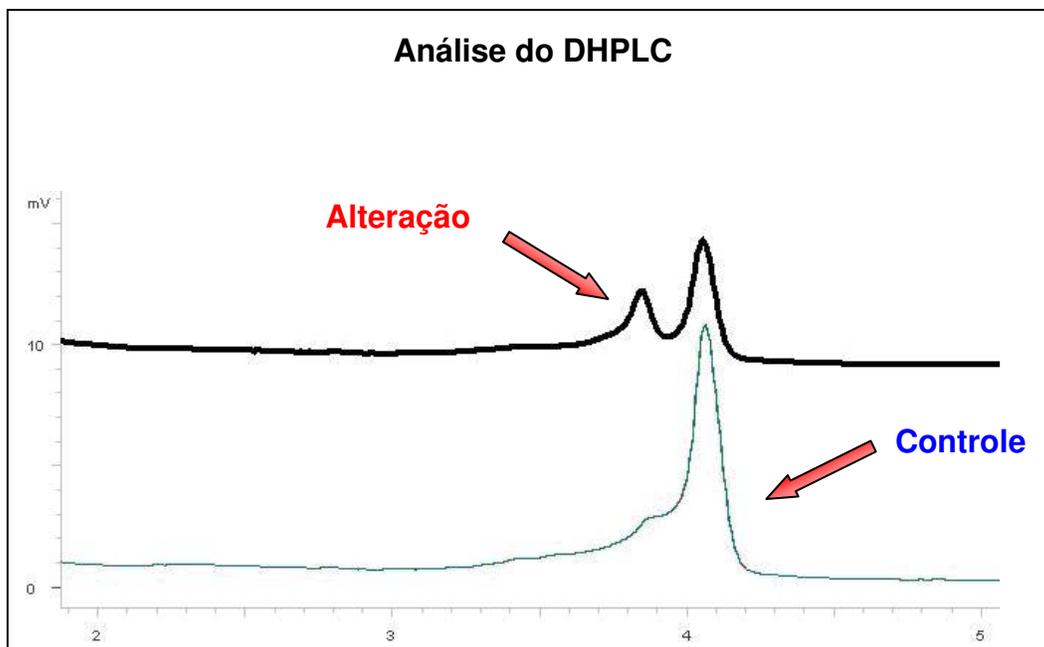


Figura 8- Exemplo de paciente com padrão de DHPLC alterado.

Foram seqüenciados todos os pacientes que mostraram alguma alteração.

Alguns pacientes, mesmo com o cromatograma apresentando alteração na DHPLC para alguns exons, não apresentaram mutação para aquele exon analisado.

Nenhum paciente apresentou mutação no exon 13.

Foram observados três pacientes heterozigotos para a mutação IVS12+1G→A, identificados pela técnica de PCR + RFLP (Fig.4). Através do sequenciamento foram identificados três pacientes heterozigotos para a mutação IVS4-5C→G (Fig.9), três pacientes homozigotos e um heterozigoto para a mutação I65T (Fig.10), dois pacientes heterozigotos e um homozigoto para a mutação A309V (Fig. 11), um paciente heterozigoto para L348V (Fig. 12) e um heterozigoto para L48S (Fig 13). Estas alterações estão indicadas nas respectivas posições no gene PAH na figura 14.

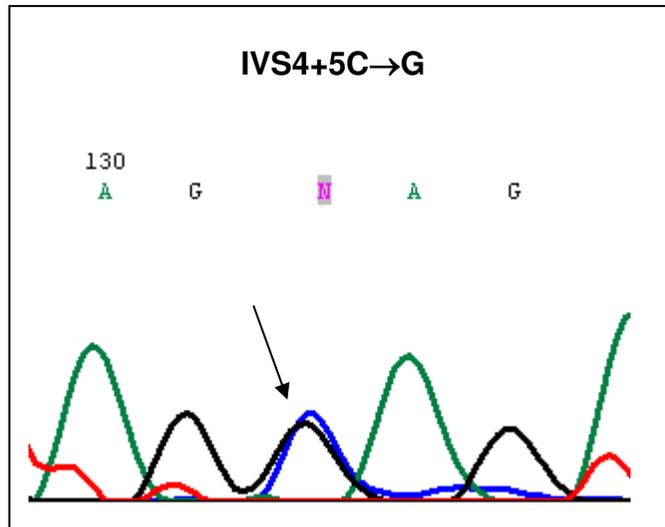


Figura 9- Gráfico de seqüenciamento mostrando a heterozigose para a mutação IVS4+5C→G.

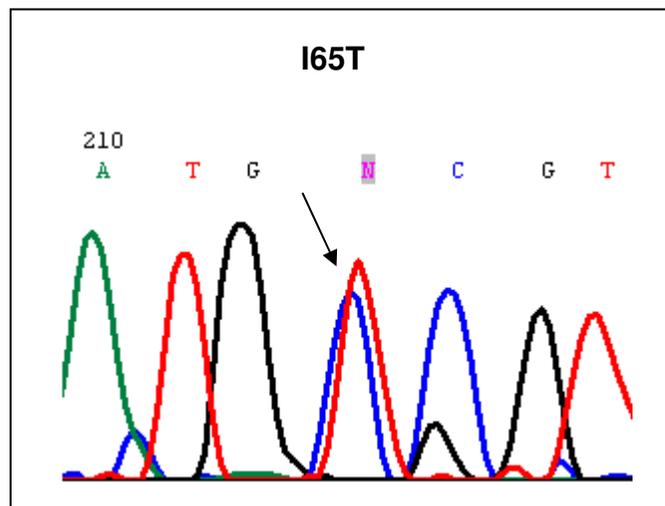


Figura 10- Gráfico de seqüenciamento mostrando a heterozigose para a mutação I65T.

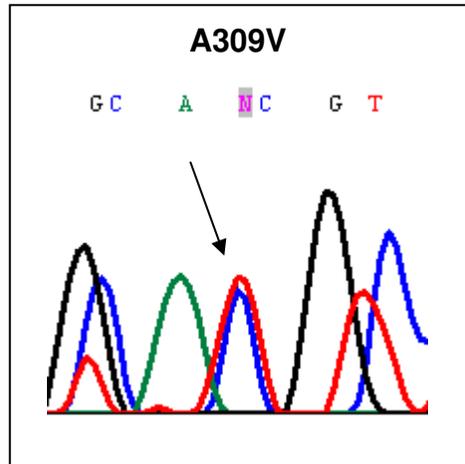


Figura 11- Gráfico de seqüenciamento mostrando a heterozigose para a mutação A309V.

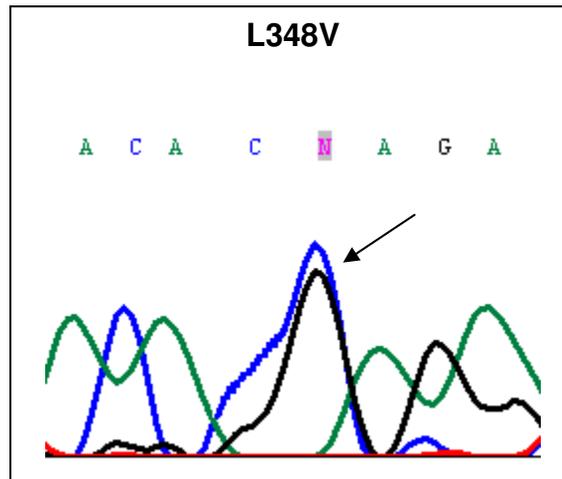


Figura 12- Gráfico de seqüenciamento mostrando a heterozigose para a mutação L348V.

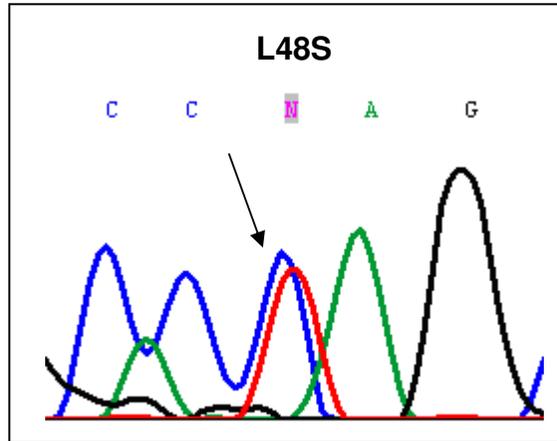


Figura 13- Gráfico de seqüenciamento mostrando a heterozigose para a mutação L48S.

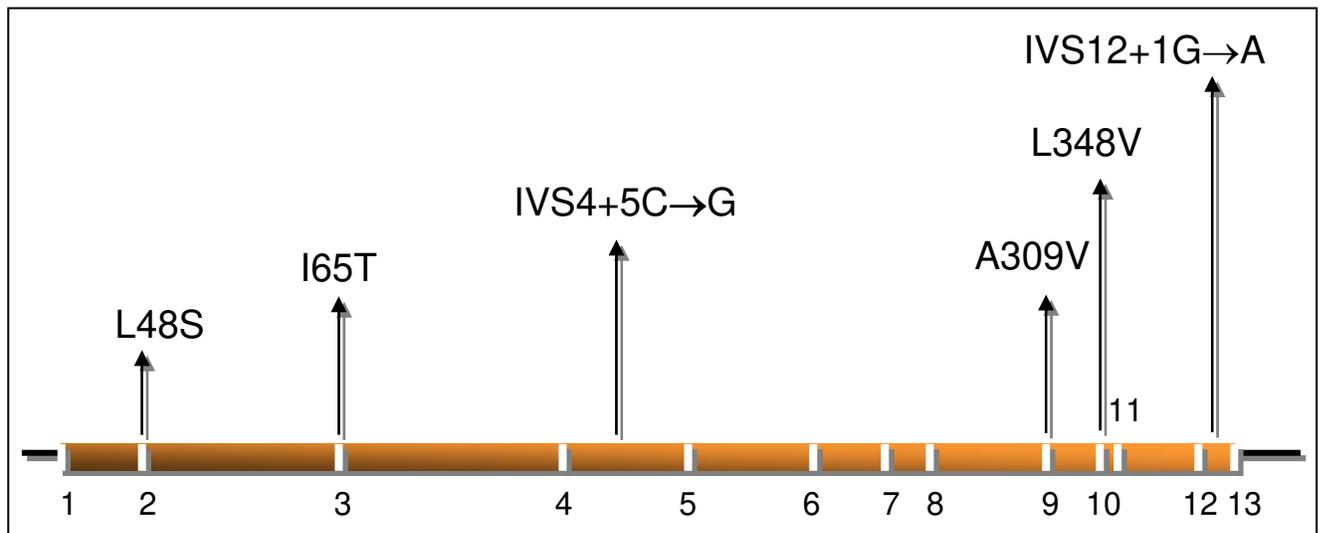


Figura 14- Mapa localizando as mutações encontradas.

Por inúmeros problemas com as técnicas, amostras e equipamento, alguns dos pacientes não tiveram todos os exons seqüenciados ou não puderam ser confirmados. No quadro a seguir observam-se os resultados encontrados (Quadro VI).

Quadro VI- Resultados do seqüenciamento e genótipos encontrados.

Identif.	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 13
1701/04	N	N	N	SI	N	SI	N	N	A309V/-	N	N	N	N
2167/04	SI	SI	N	N	N	N	SI	SI	N	N	SI	N	N
2168/04	SI	N	N	SI	N	N	SI	SI	N	SI	N	IVS12/-	N
2184/04	N	N	N	N	IVS4-5/ -	N	N	SI	N	N	N	SI	N
2312/04	N	SI	N	N	N	SI	N	SI	N	N	SI	N	N
2384/04	SI	N	I65T/ I65T	N	N	N	SI	N	SI	SI	N	N	N
680/05	N	N	I65T/ -	N	N	N	N	SI	SI	L348V/ -	N	N	N
836/05	N	SI	N	SI	IVS4-5/ -	N	SI	N	N	N	SI	N	N
897/05	N	N	N	N	N	SI	SI	N	A309V/ A309V	N	SI	N	N
1223/05	SI	SI	I65T/ I65T	N	SI	N	SI	N	N	N	N	N	N
1224/05	N	N	SI	N	N	SI	SI	SI	N	N	N	N	N
1355/05	N	N	N	SI	SI	N	SI	N	SI	N	SI	N	N
311/06	N	SI	N	SI	N	N	N	N	N	N	N	IVS12/-	N
312/06	N	N	N	N	IVS4-5/ -	N	N	SI	N	N	N	IVS12/-	N
1250/06	SI	L48S/ -	N	N	N	SI	SI	SI	SI	N	N	N	N
1251/06	SI	SI	N	N	N	SI	SI	SI	A309V/-	N	N	N	N
1252/06	N	N	I65T/ I65T	N	N	SI	SI	N	N	N	SI	N	N
1770/06	N	SI	N	N	N	SI	N	N	SI	N	SI	N	N
1771/06	N	N	N	N	SI	N	SI	SI	SI	N	N	N	N
1774/06	SI	SI	SI	N	IVS4-5/ -	N	SI	N	SI	N	SI	SI	N

SI- Seqüenciamento indefinido / N- Sem alteração / Em vermelho os genótipos

Pela observação da tabela pode-se constatar que foi identificada pelo menos uma mutação em 14 pacientes do total de amostras analisadas.

A caracterização molecular com a presença de duas mutações no gene PAH na nossa amostra foi possível em 6 pacientes (Tabela I). Destes, o único genótipo encontrado mais freqüente foi I65T/I65T (50%).

Foram encontradas mutações em 20 dos 40 alelos analisados. Em seis pacientes, as mutações foram indefinidas em ambos os alelos e em oito pacientes um alelo ficou com mutação indefinida.

Tabela I- Perfil genotípico da mutação do gene PAH.

IDENTIFICAÇÃO	GENÓTIPO
1701/04	A309V/ x
2167/04	x / x
2168/04	IVS12 / x
2184/04	IVS4-5/ x
2312/04	x / x
2384/04	I65T/ I65T
680/05	I65T/ L348V
836/05	IVS4-5/ x
897/05	A309V/ A309V
1223/05	I65T/ I65T
1224/05	x / x
1355/05	x / x
311/06	IVS12 / x
312/06	IVS12 / IVS4-5/
1250/06	L48S/ x
1251/06	A309V/ x
1252/06	I65T/ I65T
1770/06	x / x
1771/06	x / x
1774/06	IVS4-5/ x

X- Mutação indefinida

Em nossa amostra de pacientes fenilcetonúricos, foram observadas 6 diferentes mutações (I65T, IVS12+1G→A, IVS4+5C→G, A309V, L48S e L438V) distribuídas entre os 40 alelos analisados (Tabela II). A mais freqüente foi a mutação I65T encontrada em 7 dos 20 alelos identificados (17,5%), também foi encontrada proporção maior de duas mutações intrônicas, IVS12+1G→A e IVS4+5C→G, que juntas foram identificadas em 17,5% dos alelos. Todas as mutações encontradas já foram descritas previamente na literatura.

Tabela II- Proporção alélica das mutações no gene PAH em nossa amostra.

MUTAÇÃO	NÚMERO DE ALELOS	FREQUÊNCIA
I65T	07	17,5%
IVS12+1G→A	03	7,5%
IVS4+5C→G	04	10%
A309V	04	10%
L48S	01	2,5%
L348V	01	2,5%
Não identificada	20	50%

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou inicialmente a presença das mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M do gene da PAH em fenilcetonúricos através de RFLP para verificar se estas mutações poderiam ser consideradas as mais freqüentes em pacientes da região de Campinas, já que estudos anteriores realizados no Brasil, excluindo a região sul, relataram que as mutações mais freqüentemente encontradas foram IVS10-11G→A e V388M. No entanto, utilizando essa metodologia, apenas 15% dos alelos mutados foram detectados, discordando destes estudos.

Silva e colaboradores (2003) demonstraram em estudo realizado no sul do Brasil, que no exon 7, encontram-se o maior numero de alterações (28,5%). As mutações mais freqüentes representam 68,5% dos alelos mutantes, sendo estas: I65T (19,5%), R261X (9,8%), R408W (9,8%), IVS2nt5G→C (9,8%), R261Q (9,8%), V388M (9,8%) e IVS12nt1 (4,9%). Eles avaliaram 23 pacientes com PKU nascidos no sul do Brasil, sendo a maioria caucasiana (94,5%), descendente de portugueses (25,5%), alemães (25,5%), italianos (18,4%) e outros (9,9%). Também relataram que o perfil mutacional encontrado nesses pacientes foi diferente do encontrado em outros países da América Latina, o que reflete a miscigenação única da população do sul do Brasil e que com esses resultados puderam realizar a detecção precisa de heterozigotos dessas famílias, contribuindo para correlação futura genótipo fenótipo. Nossos resultados também indicaram um discreto aumento na proporção da mutação I65T (17,5%), nos alelos que puderam ser analisados.

Um estudo de mutações na população brasileira do sudeste de São Paulo analisou um total de 115 famílias com PKU (292 indivíduos, 126 pacientes com PKU e 166 parentes) e detectaram 50 mutações, sendo 38 causadoras da doença. As mutações mais freqüentes observadas foram: IVS10nt11G→A (17,4%), R261X (12,2%), V388M (9,1%), R252W (6,5%) e R270K (4,8%). Ainda identificaram 10 novas mutações, cinco delas provavelmente não causam a doença (IVS5nt-54A>G, IVS6nt17G>T, K274E, L321L, e IVS11nt17G>A), as outras que poderiam ser causadoras da doença foram

investigadas numa população controle sem PKU e os mesmos não apresentaram nenhuma dessas alterações. Muitos dos genótipos apresentaram-se em caráter heterozigoto, 62,6% resultando de duas mutações distintas (heterozigoto composto), 22,6% eram homozigotos, sendo que estes pertenciam a famílias com consangüinidade e 9,6% eram heterozigotos com o outro alelo indefinido (ACOSTA et al., 2001).

Com relação à heterogeneidade molecular, nosso estudo parece ser semelhante ao encontrado no estudo de ACOSTA, mas com alguns diferenciais. A taxa de heterozigosidade encontrada em nosso estudo foi de 50%, sendo que 20% apresentaram-se em heterozigose composta.

O estudo mais recente publicado sobre análise de mutações no gene *PAH* em população brasileira foi em 2006, realizado em Minas Gerais, o qual analisou 78 pacientes fenilcetonúricos para as mutações I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, e IVS12nt1. Este estudo relatou que a freqüência das mutações foram V388M (21%), R261Q (16%), IVS10nt11 (13.4%), I65T (5.7%), e R252W (5%). As outras 4 mutações (R261X, R408W, Y414C, e IVS12nt1) tiveram freqüência menor que 2%. A maioria das mutações foi encontrada em heterozigose (SANTOS et al., 2006).

Com relação às mutações consideradas mais freqüentes pela literatura e que foram selecionadas para análise inicial em nossa amostra por PCR e digestão enzimática, nossos resultados foram diferentes dos descritos como freqüentes na população Brasileira da região de MG e SP. Das quatro mutações avaliadas inicialmente, apenas a mutação IVS12+1G→A, foi encontrada. Esta foi identificada em 15% dos pacientes analisados com freqüência alélica de 7,5%, nos demais estudos brasileiros essa mutação foi encontrada em menor freqüência. Outras duas mutações encontradas em nossa amostra com 10% de freqüência foram A309V e IVS4+5C→A, estas não são citadas nos demais estudos no Brasil. A mutação mais freqüente em nossa amostra foi a I65T (17,5%), resultado semelhante ao estudo realizado no sul por Silva e colaboradores que relataram a freqüência de 19,5% desta mutação.

No Brasil existe grande miscigenação o que pode gerar um perfil gênico muito heterogêneo. Além dos Portugueses, o Brasil recebeu imigrantes de várias partes do mundo principalmente da Europa. Publicações anteriores relatam em um parâmetro geral, como freqüentes, as mutações I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10t-11G, V388M, R408W e IVS12-1G. Na Alemanha, por exemplo, as mutações freqüentes são R408W e IVS12-1G, enquanto que na Itália são I65T, R252W, R261X, R261Q, IVS10-11G e V388M e em Portugal são V388M, R261Q, IVS10-11G e I65T (HORST et al., 1993; DIANZANI et al., 1995; RIVERA et al., 1998).

O estudo multicêntrico europeu que abrangia pacientes fenilcetonúricos da França, Itália, Alemanha, Bélgica e Dinamarca avaliou a distribuição mutagênica em 686 pacientes e encontraram 133 mutações diferentes, sendo 87 de sentido trocado, 16 de *splicing*, 13 sem sentido, 10 deleções levando à mudança na matriz de leitura, 3 inserções levando a mudanças na matriz de leitura, 2 deleções e 2 mutações que afetam o RNA. As mutações mais freqüentes associadas à PKU clássica foram IVS10nt-11G>A, R158Q, R261Q, E280K, I65T e R243Q (GULDBERG et al., 1998). Uma publicação também europeia realizou revisão da literatura em 2003, visando avaliar o perfil genético da fenilcetonúria na Europa e identificaram 29 mutações que são prevalentes na população europeia, dessas as mais freqüentes foram: R408W, IVS10-11G, IVS12+1G, Y414 e I65T (ZSCHOCKE, 2003).

Devido à grande variedade de mutações relatadas na literatura e à evidente heterogeneidade da doença, aparentemente devido à miscigenação, é esperado encontrar em nossa população uma grande variedade de mutações. A maior parte da descendência da população brasileira é europeia, em geral italiana, espanhola e portuguesa. Com isso, é esperado que em nossa população o perfil gênico seja semelhante ao dessas populações.

Para elucidar o perfil molecular da fenilcetonúria em Portugal, um estudo foi realizado em 111 crianças fenilcetonúricas portuguesas, sendo identificadas 26 mutações. Este estudo acabou relatando que as mutações

mais freqüentes em Portugal são: IVS10nt11 (10,8%, a mais freqüente), R261Q, V388M e I65T. Os autores também concluem que o perfil mutacional da população portuguesa encontrado é bem semelhante ao da população espanhola, apesar de encontrarem algumas mutações freqüentes em Portugal e não na Espanha, concluem que existe uma considerável heterogeneidade genética na população de Portugal (RIVIERA et al., 1998).

Dianzani e colaboradores (1995) realizaram estudo de caracterização molecular da fenilcetonúria em 20 pacientes na população italiana e observaram 20 diferentes mutações. Destas, 11 mutações (IVS10nt5, L48S, R158Q, R261Q, P281L, R261X, R252W, delta T55, IVS7nt1, IVS12nt1, Y414C), representavam 55,4% dos alelos mutantes, sendo a mutação mais freqüente a IVS10nt5 (12,4%) e L48S (9%). As outras mutações foram encontradas em baixa freqüência, consideradas raras. Um estudo recente de 2007 que analisou mutações no gene PAH em italianos avaliou 126 pacientes e encontrou 60 mutações, sendo as mais freqüentes: R261Q (15,7%), A403V (11,6%) e 1066-11G > A (8,8%), também detectaram 10 novas mutações (DANIELE et al., 2007).

A análise do perfil mutagênico do gene *PAH* realizada na população espanhola avaliou 63 pacientes fenilcetonúricos e foi detectado um total de 40 diferentes mutações, aproximadamente 62% dessas mutações estão localizadas nos exons 7-12 e destas 44% no exon 7. O perfil gênico encontrado inclui 30 mutações missense, de sentido trocado, duas sem sentido, duas deleções, cinco de *splicing*, uma mutação intrônica (IVS10nt11G), sete novas mutações ainda não relatadas P122Q, D129G, P147S, D151G, A165T, S196fs e P407S. O perfil mutagênico encontrado foi semelhante à de outras localizações do mundo. As mutações mais freqüentes encontradas foram IVS10nt11G (14,7%), I65T (8,5%) e V388M (6,2%), 30 mutações aparecem com uma freqüência de 2 a 3% e as demais mutações foram raras (PEREZ et al. 1997).

Nossos resultados fortalecem e estão de acordo com os resultados encontrados nas diversas literaturas mundiais que indicam através dos diversos perfis gênicos encontrados que a fenilcetonúria é uma doença muito heterogênea

a nível molecular. Na Europa a mutação mais freqüentemente encontrada é a IVS10nt11G, acometendo em média 14% dos pacientes. Essa mutação não foi identificada em nossos pacientes. Já a mutação I65T, mais freqüente em nossa amostra (17,5%), também é freqüente em Portugal (5,4%) e Espanha (8,5%).

Neste estudo que analisa indivíduos da região de Campinas, os resultados sugerem que estipular um perfil gênico com poucas mutações é inviável. Nossos resultados geraram um perfil gênico muito variado, o que talvez possa ser melhorado aumentando o número de indivíduos analisados.

CONCLUSÕES

- As mutações R408W, IVS10-11G→A, IVS12+1G→A e V388M, não são as mais freqüentes encontradas em nossa amostra de fenilcetonúricos da região de Campinas.
- Estipular um perfil gênico com poucas mutações parece ser inviável.
- Parece haver uma tendência maior da freqüência da mutação I65T e de duas outras mutações (IVS4+5C→G e A309V), o que poderia ser evidenciado com um aumento no número de pacientes analisados.
- A caracterização molecular de pacientes fenilcetonúricos da região de Campinas confirma relatos anteriores de que a fenilcetonúria é uma doença heterogênea a nível molecular.

BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, P.B.; YANNICELLI S. Protocolo 1 – Phenylketonuria (PKU). In: Ross Products Division, Abbott Laboratories. The ross metabolic formula system - Nutricion support protocol. 3.ed. Columbia: Keziaz Strvat, 1997.

ACOSTA A, SILVA W JR, CARVALHO T, GOMES M, ZAGO M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. **Hum Mutat.** 2001, 17(2):122-30.

ACOSTA A, SILVA W JR, CARVALHO M, ZAGO M. Ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) observed in Brazilian patients with phenylketonuria. **Hum Mutat.** 2001; 17(1):77.

BARRANGER, J. A.; GEIGER, P. J.; AREZINO, A.; BESSMAN, S. P. Isozymes of phenylalanine hydroxylase. **Science**, 1972, 175: 903-905.

BURTS, C.A.; ASHWOOD, E.R. TIETZ - Fundamentos de química clínica. 4.ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1996.

BICKEL, H; GERRARD, J; HICKMANS, EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. **Lancet**, 1953, 17:812-813.

COTTON, R. G. H. Heterogeneity of phenylketonuria at the clinical, protein and DNA levels. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 1990, 13: 739-750.

DANIELE A, CARDILLO G, PENNINO C, CARBONE MT, SCOGNAMIGLIO D, CORRERA A, PIGNERO A, CASTALDO G, SALVATORE F. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. **Ann Hum Genet.** 2007; 71(Pt 2):185-93.

DIANZANI, I.; GIANNATTASIO, S.; SANCTIS De, L.; ALLIAUDI, C.;LATTANZIO, P.; VICI, C.D.; BURLINA, A.; BURRONI, M.; SEBASTIO, G.; CARNEVALE, F. Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. **Eur. J. Hum. Genet.**, 1995, 3: 294- 302.

DILELLA, A. G.; KWOK, S. C. M.; LEDLEY, F. D.; MARVIT, J.; WOO, S. L. C. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. **Biochemistry**, 1986, 25: 743-749.

DWORNICZAK, B.; KALAYDJIEVA, L.; PANKOKE, S.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; ALLEN, G.; HORST, J. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot? **Hum. Mutat.**, 1992, 1: 138-146.

EFFAT, L. E.; KUZMIN, A.; KASEM, N.; MEGUID, N.A.; KOTB, S.; EISENSMITH, R.C.; TEMTAMY, S.A.; RUSHDI, S.; WOO, S & EL-AWADY, M. Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with PKU. **Eur. J. Hum. Genet.**, 1999, 7 259- 262.

EISENSMITH, R. C.; WOO, S. L. C. Updated listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. **Am. J. Hum. Genet.**, 1992,51:1445-1448.

EIKEN, H. G.; KHALCHITSKII, S. E.; ANTOCHECHKIN, S. Distribution of some point mutations in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria patients from moscow region. **Hum. Hered.**, 1993, 43: 244- 49.

ERLANDSEN H, FUSETTI F, MARTINEZ A, HOUGH E, FLATMARK T, STEVENS RC. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. **Nat Struct Biol.** 1997, 4(12):995-1000.

ESTEBAN-CARDENOSA E, DURAN M, INFANTE M, VELASCO E, MINER C. High-Throughput mutation detection method to scan BRCA1 and BRCA2 based on heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis. **Clin Chem** 2004; 50(2):313-320.

GOLTSOV, A. A., EISENSMITH, R. C., KONECKI, D. S., KONECKI, U. L. AND WOO, S. L. C. Associations between Mutations and a VNRT in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. **Am. J. Hum. Genet.**, 1992, 51:627-636.

GULDBERG, P., REY, F., ZSCCHOCKE, J., ROMANO, V., FRANÇOIS, B., MICHIELS, L., ULLRICH, K., HOFFMANN, G. F., BUGARD, P., SCHMIDT, H., MELI, C., RIVA, E.,DIANZANI, I., PONZONE, A., REY, J. AND GÜTTLER, F.. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. **Am. J. Hum. Genet.**, 1998, 63:71-79.

- GUTHRIE, R & SUSI, A. A simple phenylalanine method for the detection of phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, 1963, 32: 338.
- HOFMAN, K. J.; STEEL, G.; KAZAZIAN, H. H.; VALLE, D. Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. **Am. J. Hum. Genet.**, 1991, 48: 791-798.
- HORST, J.; EIGEL, A.; KALAYDJEVA, L. & DWORNICZAK, B. Phenylketonuria in Germany: Molecular heterogeneity and diagnostic implications. **Dev. Brain Dys.**, 1993, 6: 32- 38.
- JARDIM LB, PALMA-DIAS R, SILVA LC, ASHTON-PROLLA P, GIUGLIANI R. Maternal hyperphenylalaninaemia as a cause of microcephaly and mental retardation. **Acta Paediatr**, 1996, 85:943-6.
- JORDE LB, CAREY JC, BAMSHAD MJ, WHITE RL. **Genética Médica**. 3ed. Elsevier: Rio de Janeiro, R J, Ed. Guanabara Koogan, 2004.
- KASNAUSKIEN, J.; GIANNATTASIO, S.; LATTANZIO, P.; CIMBALISTINE, L. & KUCINSKA, V. The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. **Hum. Mutat.**, 2003, 21(4):398.
- KALAYDJEVA, L.; DWORNICZAK, B.; KREMENSK, I.; KOPRIVAROVA, R.; RADEVA, R. & HORST, J. Population genetics of phenylketonuria in Bulgaria. **Dev. Brain Dys.**, 1993, 6: 39- 45.
- KOCH R, AZEN C, FRIEDMAN EG, FISHLER K, BAUMANN-FRISCHLING C, LIN T. Care of the adult with phenylketonuria. **Eur J Pediatr**, 1996, 155 (Suppl 1): S90-S92.
- LEVY HL Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1999, 96: 1811-3.
- LIDSKY, A. S.; LEDLEY, F.D.; DILELLA, A.G.; KWOK, S. C.; DAIGER, S. P.; ROBSON, K. J.; WOO S. L. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.**, 1985, 37: 619-634.

MARCO, D.; WAITZBERG, D.L. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: WAITZBERG, D.L.(Ed.) **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 499-464.

MARTINS, A.M.; FISBERG, R.M.; SCHMIDT, B.J. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. **Temas de pediatria NESTLÉ**, 1993; n. 54. p. 1-12.

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

NOWACKI, P.M., BYCK, S., PREVOST, L. AND SCRIVER, C.R. PAH Mutation analysis Consortium Database 1997: prototype for relational locus-specific mutation databases. **Nucleic Acids Rev.**, 1998, 26: 220-225.

PAINE, R.S. The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). **Pediatrics**, 1957, 20: 290-302.

PEREZ, B.; DESVIAT, L.R.; LUCCA DE, M.; SCHMIDT, B.; LOGHIN- GROSSO, N.; GIUGLIANI, R.; PIRES, R.F. & UGARTE, M. Mutation analysis of phenylketonuria in South Brazil, **Hum. Mutat.**, 1996, 8 : 262- 264.

PIETZ J, DUNCKELMANN R, RUPP A, RATING D, MEINCK HM, SCHMIDT H, BREMER HJ. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. **Eur J Pediatr**, 1998, 157: 824-30.

POLLITT RJ, GREEN A, MCCABE CJ, BOOTH A, COOPER NJ, LEONARD JV, NICHOLL J, NICHOLSON P, TUNALEY JR, VIRDI NK. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. **Health Technol Assess**, 1997, 1 (7): 1-202.

POPESCU, A.; ANDRIAN, T.; GUTTLER, F. & GULDBERG, P. Genotype–phenotype correlation in 11 Romanian PKU families. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 1994, 17: 374- 375.

RIESS, O.; MICHEL, A.; SPEER, A.; COBET, G.; COUTELLE, C. Introduction of genomic diagnosis of classical phenylketonuria to the health care system of the German Democratic Republic. **Clin. Genet.**, 1987, 32: 209-215.

RIVERA I, LEANDRO P, LICHTER-KONECKI U, TAVARES DE ALMEIDA. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. **J. Med. Genet**, 1998, 35: 301-304.

SANTOS LL, MAGALHÃES MDE C, REIS ADE O, STARLING AL, JANUÁRIO JN, FONSECA CG, AGUIAR MJ, CARVALHO MR. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. **Genet Mol Res**. 2006 Mar 31;5(1):16-23

SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. **Biotecnol. Ciên. Desenv.**, 2003, v. 29, p.152-157.

SCHMIDL, M.K.; TAYLOR, S.L.; NORDLEE, J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technol.**, 1994, v. 48, p. 77-85.

SCRIVER C.R., KAUFMAN S. Hyperphenylalaninaemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, K.E. Kinzler, B. Vogelstem (Eds.), **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1667-1724.

SCRIVER C. R. Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi. **Pediatrics**, 1998, 236-7.

SCRIVER, C.R.; WATERS, P.J.; SARKISSIAN, C.; RYAN, S.; PREVOST, L.; COTE, D.; NOVAK, J.; TEEBI, S. & NOWACKI, P.M. PAHdb: a locus-specific knowledgebase, **Hum. Mutat.**, 2000, 15: 99-104.

STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B.; KANUFRE, V.C.; SOARES, S.F. Fenilcetonúria. **Rev. Méd. Minas Gerais**, 1999, v.9, 106-110.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1988.

TYFIELD, L. A.; STEPHENSON, A.; COCKBURN, F.; HARVIE, A.; BIDWELL, J. L.; WOOD, N. A. P.; PILZ, D. T.; HARPER, P.; SMITH, I. Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. **Am. J. Hum. Genet.**, 1997, 60: 388-396.

WABER, L.- Inborn Errors of Metabolism. **Ped. Ann**, 1990, 19 (2): 105-117.

WAPPNER, RS. Biochemical Diagnosis of Genetic Diseases. **Ped. Ann**, 1993, 22(5): 282-297.

WILLIAMS K. Benefits of normalizing plasma phenylalanine: impact on behaviour and health. A case report. **J Inherit Metab Dis**, 1998, 21: 785-90.

WOODHEAD, J. L.; FALLON, R.; FIGUERED, H.; LONGDALE, J.; MALCOM, A. D. B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies, K.E. **Human genetic diseases – a practical approach**, Oxford, IRL Press limited, pp 51-64, 1986.

WOO, S.L.C., LIDSKY, A.S., GÜTLER, F., CHANDRA, T. AND ROBSON, J.H.. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature**, 1983, 306: 151-155.

WOO, S. L. C. Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. **Am. J. Hum. Genet.**, 1988, 43: 781-783.

XIAO W, OEFNER PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. **Hum Mutat** 2001;17(6):439-474.

ZSCHOCKE J. Phenylketonuria Mutations in Europe. **Hum Mutat.** 2003, 21:345-356.

ANEXOS

I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Título do projeto: Caracterização molecular da fenilcetonúria em pacientes da região de Campinas.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com Fenilcetonúria. O objetivo geral do estudo é o de procurar alterações no gene responsável pela fenilcetonúria.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será coletada uma amostra de sangue venoso (7 ml, o equivalente a 3 colheres de sopa).

RISCO E DESCONFORTO:

Os riscos associados a coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço

que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o conhecimento do erro que ocorreu no meu gene responsável pela fenilcetonúria. Caso meus parentes próximos, desejarem, poderão realizar o exame.

SIGILO:

O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Quando os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8907 (Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo).

Em caso de dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconforto advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Nome e RG do responsável legal

Assinatura do sujeito da pesquisa

Data

Assinatura do responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que
poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me
comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao
participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

II- Parecer do comitê de ética em pesquisas em seres humanos



2ª VIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 08/07/08.

(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 573/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FENILCETONURIA EM INDIVÍDUOS DA REGIÃO DE CAMPINAS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Erika Lourenço Pollice

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 25/11/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 16/06/04 e 16/12/04

II - OBJETIVOS

Investigar as mutações freqüentes em pacientes com fenilcetonúria (PKU) triados em serviços de triagem neonatal e que estejam em acompanhamento no ambulatório de PKU do Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP.

III - SUMÁRIO

Serão analisados 20 indivíduos portadores de PKU para extração de DNA, realização de PCR e digestão enzimática para diagnóstico das mutações genéticas mais freqüentes encontradas em pacientes da região de Campinas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é bem justificado. O estudo apresenta riscos mínimos para os pacientes, uma vez que será realizada em amostras de sangue (7 mL, uma só vez) e que o procedimento será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para esse procedimento. Conforme o autor do projeto, a informação das mutações trará benefícios para a comunidade uma vez que trará subsídios importantes para o conhecimento da doença e terapêuticas futuras. O termo de consentimento livre e esclarecido é claro e específica que caso seja detectada alguma alteração gênica, o paciente (ou seu responsável) será imediatamente comunicado, sendo que todas as conseqüências serão devidamente explicadas e que os parentes próximos poderão realizar do exame. O material biológico coletado durante o projeto será armazenado e qualquer outro estudo que venha a utiliza-lo deverá primeiramente ser aprovado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2003.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP