

Luciana Lara dos Santos

Dissertação de Mestrado

**FREQÜÊNCIA DAS MUTAÇÕES I65T, R261Q, R252W
E Y414C EM INDIVÍDUOS COM FENILCETONÚRIA
DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2004

703

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação defendida e aprovada, em 05 de março de 2004, pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Assinatura manuscrita de Maria Raquel Santos Carvalho.

Profa. Maria Raquel Santos Carvalho

Assinatura manuscrita de Maria Luiza Saraiva Pereira.

Profa. Maria Luiza Saraiva Pereira

Assinatura manuscrita de Evanguedes Kalapothakis.

Prof. Evanguedes Kalapothakis

Luciana Lara dos Santos

**FREQÜÊNCIA DAS MUTAÇÕES I65T, R261Q, R252W E
Y414C EM INDIVÍDUOS COM FENILCETONÚRIA DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Raquel S. Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Cleusa Graça da Fonseca

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2004

043
S237f

Santos, Luciana Lara dos
Frequência das mutações I65T, R261Q, R252W eY414C em indivíduos
com fenilcetonúria do estado de Minas Gerais. / Luciana Lara dos Santos,
2004.

101f.: il., tab.

Orientadora: Maria Raquel S. Carvalho
Co-Orientadora: Cleusa Graça da Fonseca

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Biologia Geral.

I. Mutação (Biologia) - Teses. 2. Fenilcetonúria - Minas Gerais -
Teses. I. Carvalho, Maria Raquel S. II. Fonseca, Cleusa Graça da. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral.
IV. Título.

**Dedico este trabalho aos meus pais,
que apesar das dificuldades,
sempre me apoiaram e lutaram junto
comigo para que eu pudesse realizar este
sonho.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho, pela orientação, por tudo que aprendi ao seu lado. À ela que com toda paciência e sabedoria me orientou durante estes anos, e com todo seu profissionalismo teve um papel importantíssimo no meu crescimento profissional e científico.

À Profa. Dra. Cleusa Graça da Fonseca pela orientação, oportunidade e credibilidade oferecida.

Aos amigos de laboratório, Ana Lúiza, Paula, Daiane, Joana, Liane pela agradável convivência que sempre contribuiu no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento pela dedicação e ajuda.

Aos colegas de Mestrado, Camilli, Chico, Fred e Simone, pela amizade, ajuda e convivência.

Aos professores Dr. Edmar Chartone de Souza, Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos, Dr. Kenneth J. Gollob, Dr. Wilham Jorge, Dr. José Miguel Ortega, pela disponibilização de equipamentos.

À equipe do Ambulatório São Vicente, do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela atenção e ajuda, em particular ao Prof. Dr. Marcos José Burle de Aguiar.

Ao NUPAD pela parceria e colaboração na realização deste projeto, em particular ao Prof. José Nelio Januario.

À Myrian de Castro Xavier, pela ajuda, parceria e pela grande amizade que se estabeleceu durante estes anos de convivência.

À amiga Isabel Soares, a minha imensa gratidão pelo incentivo na Iniciação Científica, paciência e atenção dispensada, em uma etapa fundamental da minha formação profissional.

Aos meus amigos e ao Fa, pela força e sorrisos recebidos nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais pelo carinho, amor, tolerância, presença, apoio e incentivo sempre.

Ao meu irmão César por sempre estar ao meu lado.

À todos os meus familiares pelo carinho e apoio.

Aos pacientes e seus familiares, por permitirem a realização desta pesquisa fazendo com que os conhecimentos sobre a PKU sejam ampliados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À Deus pela oportunidade, por me dar forças para ultrapassar todas as barreiras que surgiram no decorrer desta pesquisa, sem deixar que estas pudessem me impedir de tornar este sonho realidade. Obrigado Deus por guiar e iluminar meus caminhos, por sempre estar ao meu lado.

A todos, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DEFINIÇÃO	13
1.2. ASPECTOS CLÍNICOS	14
1.3. DIAGNÓSTICO	15
1.3.1. <i>Triagem neonatal</i>	15
1.3.2. <i>Classificação</i>	16
1.4. ASPECTOS BIOQUÍMICOS	17
1.5. NEUROQUÍMICA DA PKU	26
1.6. TRATAMENTO	28
1.7. A PKU MATERNA	30
1.8. ASPECTOS MOLECULARES	31
1.8.1. <i>O gene e a enzima</i>	31
1.8.2. <i>Haplótipos</i>	33
1.8.3. <i>Complexidade da doença</i>	33
1.9. CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	35
1.10. ASPECTOS POPULACIONAIS	36
1.10.1. <i>Efeito de fundador e deriva genética em PKU</i>	37
1.10.2. <i>Heterose</i>	38
1.10.3. <i>Intervenção terapêutica</i>	38
1.10.4. <i>A PKU no Brasil</i>	39
1.11. ESCOLHA DAS MUTAÇÕES	39
1.12. PRINCÍPIO TEÓRICO DA DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES ESTUDADAS	41
1.12.1. <i>A mutação Y414C</i>	41
1.12.2. <i>A mutação I65T</i>	43
1.12.3. <i>A mutação R252W</i>	45
1.12.4. <i>A mutação R261Q</i>	47
1.13. OBJETIVOS	49

2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1. A AMOSTRA	50
2.2. COLETA DA AMOSTRA	51
2.3. EXTRAÇÃO DO DNA	51
2.4. AMPLIFICAÇÃO POR PCR	53
2.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	54
2.6. DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO	55
2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	56
2.8. ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS ENCONTRADAS	56
2.9. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MUTAÇÕES	56
3. RESULTADOS	57
3.1. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES	57
3.1.1. <i>Detecção da mutação I65T</i>	57
3.1.2. <i>Detecção da mutação Y414C</i>	61
3.1.3. <i>Detecção da mutação R252W</i>	61
3.1.4. <i>Detecção da mutação R261Q</i>	64
3.2. FREQUÊNCIAS RELATIVAS DOS ALELOS TESTADOS NO PRESENTE TRABALHO	66
3.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA PKU E DOS ALELOS I65T, Y414C, R252W E R261Q EM MINAS GERAIS	67
3.4. FREQUÊNCIA DE CONSANGÜINIDADE NA AMOSTRA	70
3.5. ESTABELECIMENTO DE UMA PROPOSTA PARA A PRIMEIRA ETAPA DA TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE PAH EM MINAS GERAIS	71
3.5.1. <i>Frequências das nove mutações testadas até o momento</i>	71
3.5.2. <i>Proposta para uma estratégia custo-eficiente de triagem de mutações para o Estado de Minas Gerais</i>	73
4. DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÕES	82
6. BIBLIOGRAFIA	84
ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
ANEXO 2 - REAGENTES E FORNECEDORES	101

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Reação de hidroxilação da fenilalanina	19
2	Reação de regeneração do BH ₄	20
3	Reação de hidroxilação da tirosina e do triptofano, e síntese do óxido nítrico	22
4	Degradação da tirosina em fumarato e acetoacetato	24
5	Reação de transaminação da fenilalanina	25
6	Gene PAH	32
7	Estrutura tridimensional da enzima PAH	32
8	Princípio teórico da detecção da mutação Y414C	42
9	Princípio teórico da detecção da mutação I65T	44
10	Princípio teórico da detecção da mutação R252W	46
11	Princípio teórico da detecção da mutação R261Q	48
12	Amplificação por PCR do fragmento onde se encontra a mutação I65T	58
13	Detecção da mutação I65T	60
14	Detecção da mutação Y414C	62
15	Detecção da mutação R252W	63
16	Detecção da mutação R261Q	65
17	Distribuição do número de crianças com PKU em Minas Gerais	68
18	Distribuição do alelo I65T por município – 13 casos	68
19	Distribuição do alelo R252W por município – 11 casos	69
20	Distribuição do alelo R261Q por município – 30 casos	69

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Classificação das hiperfenilalaninemias de acordo com os níveis séricos e com a tolerância à fenilalanina	17
2	Mutações no gene PAH triadas nos pacientes com PKU de MG	41
3	Estrutura da amostra analisada	51
4	Seqüências de iniciadores para análise das mutações	53
5	Freqüência relativa das mutações Y414C, I65T, R252W e R261Q em 111 indivíduos com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais	66
6	Alelos encontrados em homozigose ou heterozigose	67
7	Distribuição dos genótipos homozigotos e heterozigotos, conforme a presença ou não de endogamia	71
8	Freqüências relativas das nove mutações testadas em uma amostra de neonatos do Estado de MG	72
9	Freqüência dos alelos testados em toda a amostra analisada até o momento	73
10	Freqüência da mutação R261Q em algumas populações estudadas	77
11	Freqüência da mutação I65T em algumas populações estudadas	78
12	Freqüência da mutação R252W em algumas populações estudadas	79
13	Freqüência da mutação Y414C em algumas populações estudadas	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µL	microlitros
5-HT	5-hidroxitriptofano
6-PTS	6-piruvoltetrahydropterina sintase
ACRS	<i>amplification created restriction sites</i>
BIG	Departamento de Biologia Geral
BH ₄	tetrahidrobiopterina
DGGE	<i>Denaturing gradient gel eletrophoresis</i>
DHPLC	<i>Denaturing high-performance liquid chromatography</i>
DHPR	diidropterina redutase
DNA	ácido desoxirribonucléico
EEG	eletroencefalograma
g/kg	gramas por quilo
GTP-CH	guanosina trifosfato-ciclohidrolase
HPA	hiperfenilalaninemia
I65T	mutação no gene PAH, que leva à substituição do aminoácido isoleucina pelo aminoácido tirosina, na posição 65
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kb	quilobases
L-DOPA	L-dopamina
LNAAs	aminoácidos grandes e neutros (tirosina, triptofano, fenilalanina, valina, isoleucina, leucina)
M	molar
mg/dL	miligramas por decilitros
mg/mL	miligramas por mililitros
mL	mililitros
mM	milimoles
ng/µL	nanograma por microlitro
nM	nanomoles
NUPAD	Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

OMIM	<i>Online mendelian inheritance man</i>
PAL	Phenilalanine amonialiase
PAH	fenilalanina hidroxilase
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
PHS	4 α -carbinolamina desidratase
PKU	fenilcetonúria
QI	quociente de inteligência
R252W	mutação na posição 252 do gene PAH, que leva à substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano
R261Q	mutação na posição 261 do gene PAH, que leva à substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido glutamina
RFLP	polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição
rpm	rotações por minuto
STR	repetições <i>in tandem</i> curtas
SR	sepiapterina redutase
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TRH	triptofano hidroxilase
Trp	triptofano
TYH	tirosina hidroxilase
Tir	tirosina
VNTR	número variável de repetições em <i>tandem</i>
Y414C	mutação no codon 414 do gene PAH, que leva à substituição do aminoácido tirosina pelo aminoácido cisteína

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva, causada por mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH), a enzima que converte fenilalanina em tirosina. Mais de 440 mutações já foram descritas no gene PAH e suas freqüências variam conforme a população estudada. O tratamento da PKU consiste em dieta pobre em fenilalanina e, se iniciado logo após o nascimento, previne o retardo mental. O diagnóstico precoce é portanto fundamental. Em Minas Gerais, uma amostra de 100 indivíduos com PKU já havia sido triada para as mutações V388M, IVS10nt11, R408W, IVS12nt1 e R261X. No presente estudo, foram analisadas as mutações R261Q, R252W, I65T e Y414C na mesma amostra, acrescida de 11 indivíduos. Foram determinados 54/222 alelos (24,3 %), sendo 36 alelos em heterozigose e 18 em homozigose. A mutação mais freqüente, foi a R261Q, com 30 alelos identificados (13,5%). Seguem-se as mutações I65T com 13 alelos (5,8%), 11 alelos R252W (4,9%) e nenhum alelo Y414C. Quando se analisa apenas os 78 indivíduos triados pelo Programa de Triagem Neonatal, a freqüência relativa das mutações é: R261Q (16%), I65T (5,7%), R252W (5%) e Y414C (0%). A mutação R261Q é a segunda mais freqüente em Portugal (10,4%), e em SP (12,2%). No estudo do Sul do Brasil ela também se encontra com uma freqüência bastante elevada (9,8%). Já a I65T possui uma freqüência na Espanha de 9% e em Portugal, de 5%. Em SP (3,5%) e RS (20%), os valores das freqüências encontradas contrastam bastante com os valores de MG. A mutação R252W é a sexta mutação mais freqüente em Portugal (4%), e corresponde a 0,8% dos alelos PKU da Espanha. No estudo realizado em SP, a freqüência encontrada para esta mutação foi 6,5%. Os valores de freqüência encontrados para a mutação Y414C em SP (1,3%) e em Portugal (1,8%), também são relativamente baixos, entretanto a mutação Y414C corresponde a 5% dos alelos PKU na Europa. Não observamos agregação regional de nenhum dos alelos averiguados em MG. Foi observado maior freqüência de consangüinidade entre os pais dos indivíduos homozigotos (53,8 %), do que nas famílias dos heterozigotos compostos (3 %), $\chi^2 = 13,84$ ($P < 0,005$). A ordem, por freqüência, das mutações testadas em MG é: V388M (21%), R261Q (16%), IVS10nt11 (13,4%), I65T (5,7%), R252W (5%), R261X (1,4%), R408W (0,98%), IVS12nt1 (0,7%) e Y414C (0%). Com a triagem das nove mutações nos 78 indivíduos triados pelo Programa de Triagem Neonatal, foi possível detectar 64% (100/156 alelos) das mutações causadoras de PKU em MG. Quando se analisa todos os indivíduos da amostra, 52 foram completamente genotipados (46,8%) e 33 (30%) tiveram um dos alelos determinados. Com base na análise das freqüências das mutações testadas, foi possível estabelecer-se uma proposta custo-eficiente para a triagem de mutações no Estado. A primeira etapa deste programa envolveria a triagem das mutações V388M, R261Q, IVS10nt11, I65T e R252W. Com esta abordagem, estima-se poder determinar, na primeira etapa, 61 % dos alelos, atingindo-se a genotipagem completa em 44 % dos casos.

ABSTRACT

The Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease caused by mutations in phenylalanine hydroxylase gene. This enzyme converts phenylalanine to tyrosine. More than 440 mutations have already been described in the PAH gene and their frequencies vary importantly among populations. PKU treatment consists in a poor phenylalanine diet, which must be started by the very first days of life, in order to prevent mental retardation. Therefore, neonatal diagnosis is fundamental. In Southeastern Brazilian State Minas Gerais (MG), the PKU neonatal screening is accomplished by an efficient, high coverage (94%), 20,000 births pro month program. Here we report the procedures adopted for determining a cost-efficient strategy for PAH mutations screening. Firstly, we selected a set of 9 mutations to test in this population. These mutations were those highly prevalent in Portugal, historically known to be the most important component of the Caucasian contingent of Brazilian population, and also some mutations found to be frequent in the two other Brazilian populations tested up to now, those from São Paulo (SP) and Rio Grande do Sul (RS) States. A sample of 100 PKU patients from MG State had already been screened for V388M, IVS10nt11, R408W, IVS12nt1 and R261X mutations. In the present study, we have screened for the mutations R261Q, R252W, I65T and Y414C in the same sample added by 11 patients. With these 4 mutations we have been able to characterize 54/222 alleles (24,3 %), 36 of them in heterozygosis and 18 in homozygosis. Among these four mutations, the most common was R261Q (13,5%), followed by I65T mutation (5,8%), R252W (4,9%), and Y414C mutation, for which no allele was found. Considering only the 78 patients ascertained by newborn screening program the frequencies observed were: R261Q (16%), I65T (5,7%), R252W (5%) and Y414C (0%). The R261Q mutation is the second most common in Portugal (10,4%) and SP (12,2%). This mutation is also frequent in RS State (9,8%). The I65T mutation has a frequency in Spain of 9% and in Portugal 5%. In SP (3,5%) and RS (20%), the estimated frequencies contrast with values of MG. The R252W mutation, the sixth most common in Portugal (4%), corresponds to 0,8% of PKU alleles in Spain, and 6,5% in SP. The frequency of Y414C mutation (0%) is similar to those described in SP (1,3%) and in Portugal (1,8%). However, this mutation corresponds to 5% of PKU alleles in Europe. Geographical distribution of all the mutations tested throughout MG State seemed to be evenly. Comparing the frequency of consanguineous marriages among parents of homozygous (53,8 %) vs. parents of compound heterozygous patients (3 %) significantly higher frequencies were reported in the former group ($\chi^2 = 13,84$; $P < 0,005$). Frequencies of the 9 mutations screened in MG were V388M (21%), R261Q (16%), IVS10nt11 (13,4%), I65T (5,7%), R252W (5%), R261X (1,4%), R408W (0,98%), IVS12nt1 (0,7%), and Y414C (0%). The screening of these 9 mutations allowed the detection of 100/156 (64%) the PKU alleles in MG. By the analysis of the whole sample, 52 (46,8%) of the patients were completely characterized and 33 (30%) of them had one of alleles determined. Based on these results we have been able to propose that the first steps of the mutation screening for the population of the MG State should include the mutations V388M, R261Q, IVS10nt11, I65T, and R252W. This approach would allow for the detection of 61 % of the alleles and complete genotyping of 44 % of the patients, with five PCR and restriction digest reactions/patient only.

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo faz parte de um projeto maior que visa estabelecer as bases moleculares da PKU em Minas Gerais. Na primeira fase do projeto, escolhemos triar nove mutações causadoras de fenilcetonúria, detectadas por PCR-RFLP. As mutações escolhidas foram aquelas encontradas com alta frequência, em populações que contribuíram na formação da população brasileira ou nos estudos que já haviam sido realizados em Porto Alegre e São Paulo. As análises em Minas Gerais começaram pela triagem de cinco destas mutações (R408W, V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e R261X) em 100 indivíduos com fenilcetonúria do Estado. Este primeiro trabalho foi realizado pela aluna do Mestrado em Genética, da UFMG, Myrian de Castro Magalhães, que realizou a triagem de quatro mutações, e pela aluna do Bacharelado em Genética, da UFMG, Adriana Reis, que analisou uma mutação. Dando seguimento ao estudo, no presente trabalho desenvolveu-se a triagem das outras quatro mutações (I65T, R261Q, R252W e Y414C) na mesma amostra, acrescida de 11 novos pacientes.

1.1. Definição

A fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600) é uma doença genética, autossômica recessiva e um dos mais comuns erros inatos do metabolismo de aminoácidos. A doença resulta de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH; EC1.14.16.1). Esta enzima catalisa a reação de hidroxilação da

fenilalanina em tirosina, e uma alteração neste gene leva a uma PAH deficiente. Como consequência, observa-se um aumento nos níveis séricos de fenilalanina e seus metabólitos secundários, assim como excreção de ácido fenilpirúvico na urina, de onde vem o nome da doença (revisto por Pérez e cols., 1997; Acosta e cols., 2001; Scriver e cols., 2001; Christ, 2003).

A PKU apresenta uma frequência aproximada de 1:10.000 em populações caucasianas (variando de 1:2.600 na Turquia a 1:200.000 na Finlândia), 1:16.500 em orientais (mas 1:143.000 no Japão), e 1:50.000 em negros norte-americanos (Ozalp e cols., 1986; Oaki & Wada, 1988; Holfman e cols., 1991; Desviat e cols., 1995; Guldberg e cols., 1998; Perez e cols., 1999).

1.2. Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da fenilcetonúria não estão presentes ao nascimento. Entre os três e seis meses de vida, se não tratadas, as crianças com PKU começam a apresentar atraso no desenvolvimento psicomotor e microcefalia. Isto indica que danos irreversíveis no sistema nervoso central já ocorreram. Como consequência, o paciente pode apresentar graus variáveis de retardo mental, irritabilidade, epilepsia, alterações na marcha e na postura. Além disto, apresentam hipopigmentação cutânea e eczema, e urina com odor característico. Catarata e calcificações cerebrais também podem ser encontradas na PKU clássica não-tratada (Woo e cols., 1983; Surtees & Blau, 2000; Scriver e cols., 2001; OMIM).

O tratamento consiste em uma dieta pobre em fenilalanina instituída preferencialmente até a terceira semana de vida. A resposta é usualmente boa, levando em geral à prevenção do retardo mental. Entretanto, tem sido descrito que, apesar do tratamento precoce, a maioria das crianças com PKU apresentam valores de quociente de inteligência (QI) geralmente um desvio-padrão abaixo dos de seus familiares. Também são observadas dificuldades de

aprendizado, além de distúrbios emocionais na adolescência e juventude (Waisbren e cols., 1987; Levy, 1989; Beasley e cols., 1994; Smith e cols., 2000; Scriver e cols., 2001).

Estas alterações podem ser devidas ao relaxamento da dieta, mas existe também a hipótese de que a dieta seja excessivamente pobre. Entretanto esta hipótese é pouco discutida na literatura (Acosta e cols., 1999 e 2003; Arnold e cols., 2002).

1.3. Diagnóstico

1.3.1. Triagem neonatal

As HPAs são uma causa freqüente de retardo mental, que pode ser prevenido, se a doença for tratada precocemente. Em função disto, a triagem neonatal para as HPAs tem sido rotineira nos Estados Unidos da América, desde a década de 60, e em outros países desenvolvidos, desde a década de 70 (revisto por Carreiro-Lewandowski, 2002).

Em Minas Gerais, a triagem neonatal para fenilcetonúria foi implantada em 1993 e é realizada pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG. Atualmente, este programa tem uma cobertura média de 94% dos nascimentos do Estado, onde a freqüência da doença é de 1:20.000 (Januário, 2002; Aguiar, 2002).

A triagem consiste em dosagem sérica de fenilalanina, que é realizada como parte do "teste do pezinho". A coleta de material é feita a partir do 5º dia de vida, e a criança deve ter ingerido quantidades adequadas de proteínas antes do exame (revisto por Scriver, 1998; Clague & Thomas, 2002).

Os neonatos, que apresentem níveis séricos de fenilalanina acima de 240 $\mu\text{mol/L}$, são encaminhados ao Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG, onde são atendidos por uma equipe multidisciplinar. Outros testes são então realizados para classificação precisa da doença e para distinguir aqueles com HPA por deficiência de PAH daqueles, cerca de 2%, que apresentam HPA por defeitos na síntese e reciclagem do cofator (ver abaixo). Atualmente, estão em atendimento neste ambulatório cerca de 200 crianças com fenilcetonúria.

1.3.2. Classificação

Elevações nos níveis séricos de fenilalanina recebem o nome de hiperfenilalaninemias (HPAs). As hiperfenilalaninemias podem se associar a fenótipos muito heterogêneos, variando desde HPA não-PKU até PKU severa. Estas variantes da doença são caracterizadas pelos níveis de atividade residual da enzima, inferidos a partir dos níveis séricos de fenilalanina (Okano e cols., 1991; Eiken e cols., 1996; Scriver e cols., 2001; Christ, 2003).

Dentre as HPAs, 98% são decorrentes de defeitos no gene PAH e cerca de 2% correspondem a defeitos em outros genes, relacionados à biossíntese e regeneração da tetraidrobiopterina (BH_4), cofator essencial para a ação da PAH (revisto por Scriver e cols., 2001).

As HPAs são classificadas em HPA não-PKU, PKU variante (moderada ou leve) e PKU clássica, de acordo com os níveis séricos de fenilalanina, em função dos níveis de fenilalanina tolerados na dieta e em função da resposta ao teste de sobrecarga de fenilalanina, conforme mostrado na TAB. 1.

Além disto, alguns recém-nascidos apresentam hiperfenilalaninemia transitória (Güttler, 1980). As HPAs transitórias podem ser semelhantes à PKU no período neonatal, entretanto, com o passar do tempo, estes pacientes

apresentam aumento da tolerância à fenilalanina e os níveis séricos voltam ao normal (Güttler, 1980; Avigad e cols., 1991; Eiken e cols., 1996).

TABELA 1

Classificação das hiperfenilalaninemias de acordo com os níveis séricos e com a tolerância à fenilalanina

Tipos	Níveis séricos (mM)	Quantidade de fenilalanina
		tolerada na dieta (mg/Kg/dia)
PKU clássica (persistente)	> 1,2	< 20
PKU moderada (persistente)	0,9 - 1,2	20 -25
PKU leve (persistente)	0,6 – 0,9	25- 50
HPA não-PKU (persistente)	< 0,6	>50
HPA transitória	variável	variável

Em Minas Gerais, a classificação em PKU moderada não é usada. Todos os pacientes que apresentam níveis séricos entre 0,6 e 1,2 mM são classificados como tendo PKU leve.

1.4. Aspectos bioquímicos

Os níveis de fenilalanina no sangue ou em outros fluidos corporais são uma variável métrica, que necessita estar em homeostasia. Para que se atinja o estado normal de equilíbrio dinâmico, é necessário que as concentrações dos diversos componentes se mantenham dentro de intervalos específicos, apesar da dinâmica de fluxo do sistema. Para isto, existem mecanismos regulatórios, que mantêm o sistema em equilíbrio, permitindo somente variações pequenas e transitórias (Scriver e cols., 2001).

A fenilalanina é um aminoácido essencial e portanto sua entrada no sistema ocorre pela dieta. O metabolismo da fenilalanina, assim que transportada para o interior das células, pode se dar por incorporação protéica, conversão metabólica e hidroxilação pela PAH. Normalmente, cerca de 75% da fenilalanina é convertida em tirosina (hidroxilação), sendo este o mais importante determinante do estado de equilíbrio para a fenilalanina em mamíferos (revisto por Scriver e cols., 2001).

1.4.1. Hidroxilação da fenilalanina

A hidroxilação da fenilalanina é uma reação catalizada pela fenilalanina hidroxilase (PAH), também chamada monooxigenase, já que um átomo de oxigênio aparece no produto e outro na água. Esta reação acontece nos hepatócitos e depende da síntese e regeneração de um cofator, a tetra-hidrobiopterina (BH₄), que é um carreador de elétrons (FIG. 1; Thony e cols., 2000; Spaapen & Rubio-Gozalbo, 2003).

A via de biossíntese e reciclagem do BH₄ (FIG. 1) tem como precursor a guanosina trifosfato e envolve seis enzimas: a fenilalanina hidroxilase (PAH), a GTP-ciclohidrolase (GTP-CH), a 6-piruvoltetraidropterina sintase (6-PTS), a sepiapterina redutase (SR), a 4 α -carbinolamina desidratase (PCD), e a dihidrobiopterina redutase (DHPR). Deficiência de qualquer uma destas enzimas leva a HPA (Güttler, 1980; revisto por Scriver e cols., 2001).

A PAH utiliza um átomo de oxigênio da molécula de O₂ para a reação de hidroxilação. Durante o evento catalítico, este oxigênio molecular é transferido para o aminoácido e a tetraidrobiopterina (BH₄) é oxidada à 4 α -carbinolamina. A 4 α -carbinolamina por sua vez, é convertida em quinonóide dihidrobiopterina e o outro átomo de oxigênio passará a fazer parte de uma molécula de água, que é então liberada. Esta reação (FIG. 2) é catalisada pela PCD (Thony e cols. 2000; Scriver e cols., 2001).

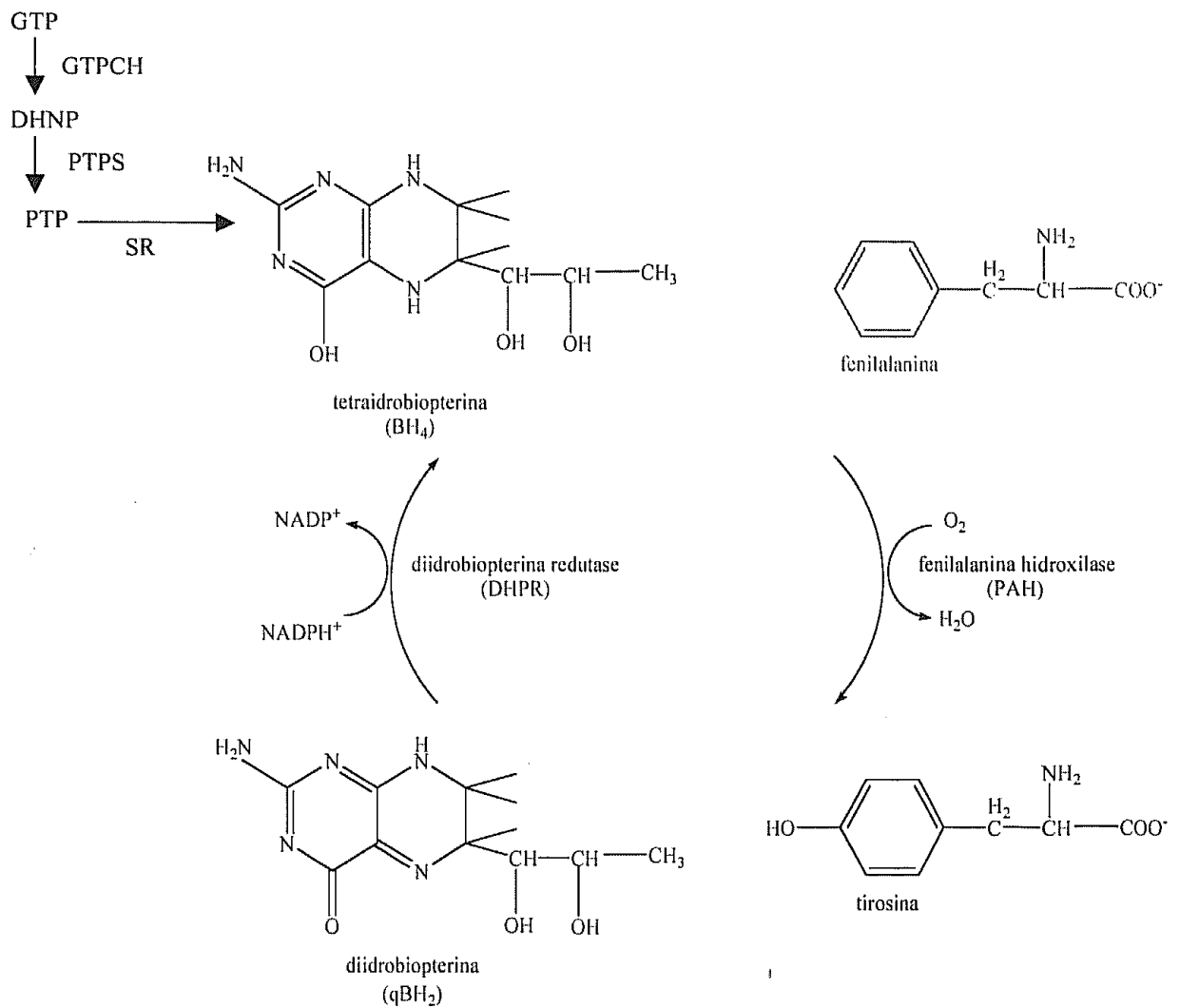


Figura 1 - Reação de hidroxilação da fenilalanina

Hidroxilação da fenilalanina em tirosina, assim como a síntese e regeneração do cofator tetraidrobiopterina (BH₄). GTP – Guanosina trifosfato; GTPCH – GTP ciclohidrolase; DHNP – d-eritro-diidroneopterina trifosfato; PTPS – 6-piruvol-tetraidrobiopterina; SR – sepiapterina redutase.

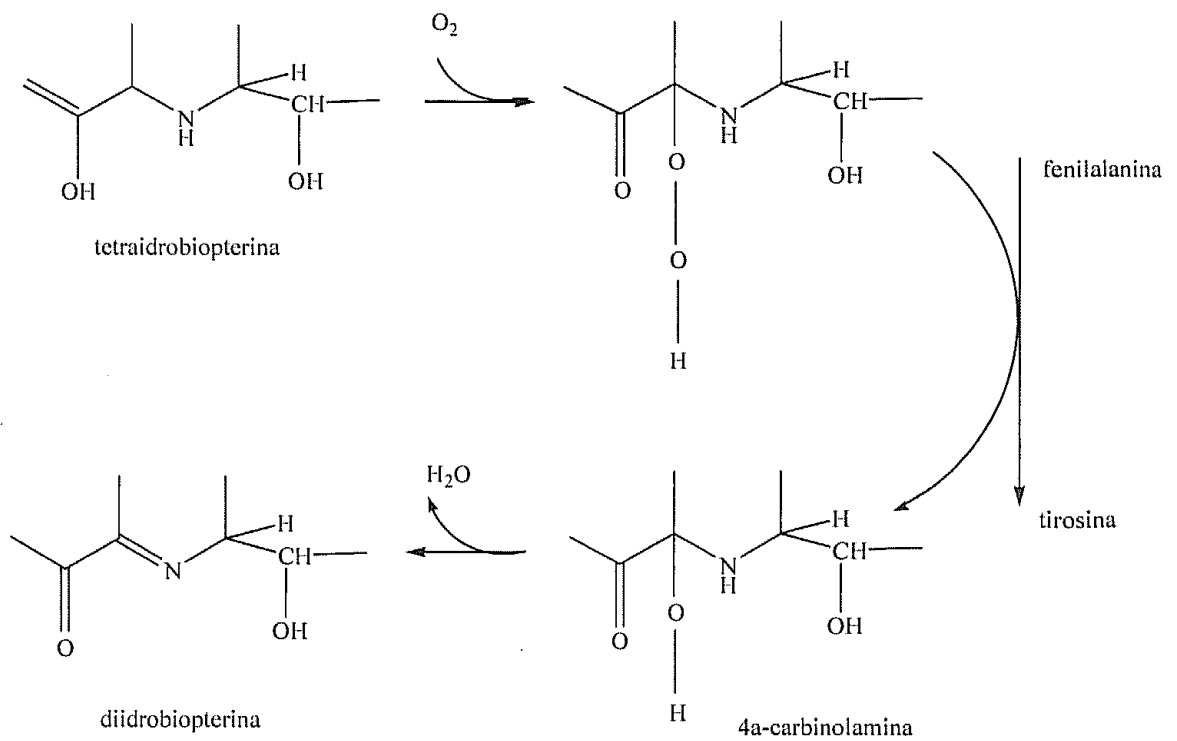


Figura 2 - Reação de regeneração do BH₄

A figura mostra de forma detalhada a reação de regeneração do cofator BH₄ destacando a utilização da molécula O₂ e liberação da molécula de H₂O.

A forma quinonóide da diidrobiopterina produzida da hidroxilação da fenilalanina é reduzida de volta a tetraidrobiopterina (BH_4) pela enzima diidrobiopterina redutase (FIG. 1, acima), em uma reação que requer NADH (Teigen e cols., 1999; Scriver e cols., 2001).

Este cofator é também requerido por três outras enzimas, a tirosina hidroxilase, triptofano hidroxilase e a óxido nítrico sintase. Estas enzimas realizam a hidroxilação da tirosina e do triptofano em precursores dos neurotransmissores dopamina e serotonina, respectivamente, e síntese do óxido nítrico, usando a L-arginina como precursor (FIG. 3). Em função disto, os pacientes com deficiência de BH_4 apresentam um quadro neurológico mais severo do que os pacientes que têm HPA por deficiência de PAH. (revisado por Teigen e cols., 1999; Thony e cols., 2000; Scriver e cols., 2001, Zorzi e cols., 2002; Spaapen & Rubio-Gozalbo, 2003).

1.4.2. A fenilalanina e o BH_4 como reguladores da PAH

A fenilalanina e o BH_4 são os principais reguladores da PAH. Enquanto a fenilalanina tem um papel de efetor positivo, pois ativa cataliticamente a enzima, o BH_4 exerce um efeito negativo, pois compete com a fenilalanina pela PAH. O complexo PAH- BH_4 formado levará à diminuição na quantidade de enzima livre e nas concentrações de BH_4 livre (Shiman e cols., 1994; Mitnaul & Shiman, 1995; revisado por Thony e cols., 2000; Surtees & Blau, 2000).

A fenilalanina, por ativar a PAH, controlará tanto a disponibilidade de BH_4 quanto a quantidade de PAH ativa na célula.

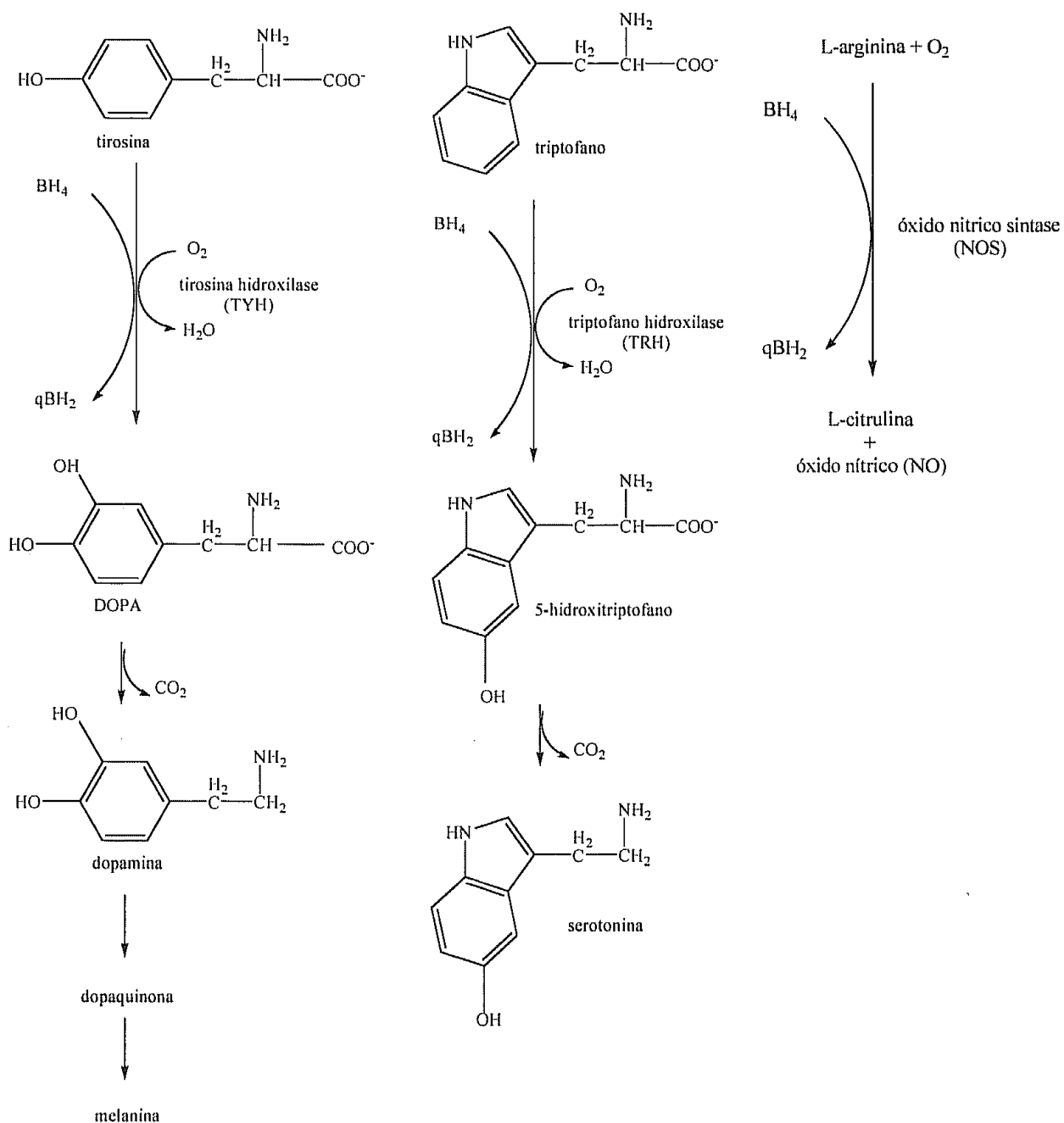


Figura 3 - Reação de hidroxilação da tirosina e do triptofano e síntese do óxido nítrico

A figura apresenta a formação de dopamina, serotonina e melanina a partir da hidroxilação da tirosina e triptofano. À direita está representada a síntese do óxido nítrico, tendo a L-arginina como precursor.

A ativação da enzima por sua vez, estimula a produção de BH_4 , pela ativação da GTP-CH via proteína estimuladora de GTP cicloidrolase (GFRP). Sendo assim, o cofator BH_4 controla sua própria biossíntese por um mecanismo regulatório de *feed-back* negativo, inibindo a ação da GFRP (Shiman e cols., 1994; Mitnaul & Shiman, 1995; revisto por Thony e cols., 2000; Surtees & Blau, 2000).

1.4.3. Conversão metabólica da fenilalanina

O próximo passo, assim que a fenilalanina é convertida à tirosina, é a conversão da tirosina em p-hidroxifenilpiruvato. Este então reage com O_2 para formar homogentisato. A enzima, que cataliza esta reação, é a p-hidroxifenilpiruvato hidroxilase. O anel aromático do homogentisato é então quebrado produzindo fumarilacetoacetato. Finalmente o fumarilacetoacetato é hidrolizado em fumarato e acetoacetato. A tirosina também participa da formação da melanina (FIG. 3, acima), e dos hormônios tiroidianos T3 e T4 (FIG. 4; Thony e cols., 2000).

Uma segunda via do metabolismo da fenilalanina, normalmente pouco usada, é a transaminação da fenilalanina na presença de piruvato, produzindo fenilpiruvato. A fenilalanina e o fenilpiruvato se acumulam no sangue e tecidos dos pacientes com PKU e são excretados na urina. Muito do fenilpiruvato antes de ser excretado na urina é decarboxilado em fenilacetato ou reduzido a fenilactato (FIG. 5). O fenilacetato é o metabólito que causa o odor característico na urina dos indivíduos com PKU (Nelson & Cox, 2000; Scriver, 2001).

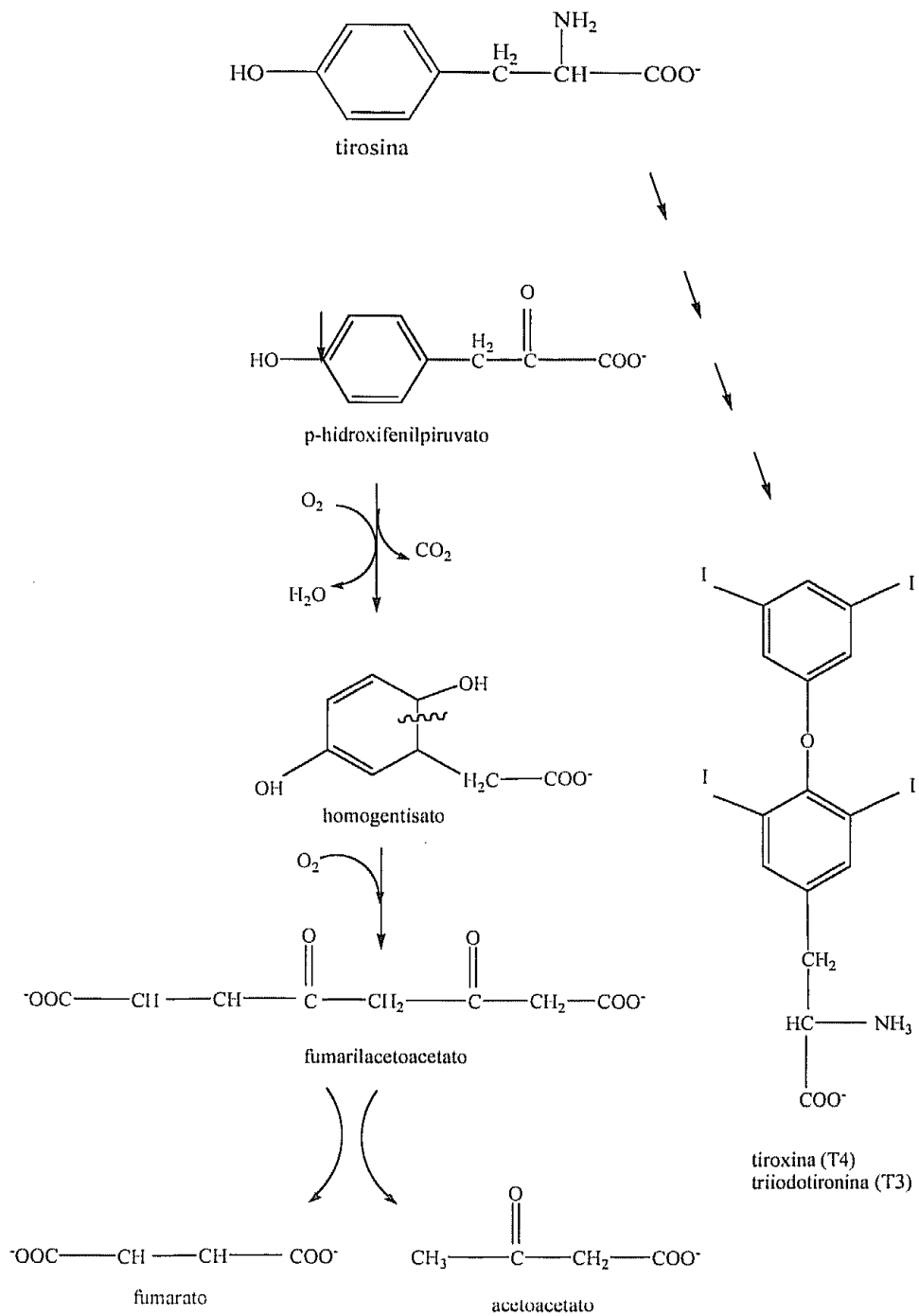


Figura 4 - Degradação da tirosina em fumarato e acetoacetato

A figura também representa a participação da tirosina na formação dos hormônios tireoideanos T3 e T4.

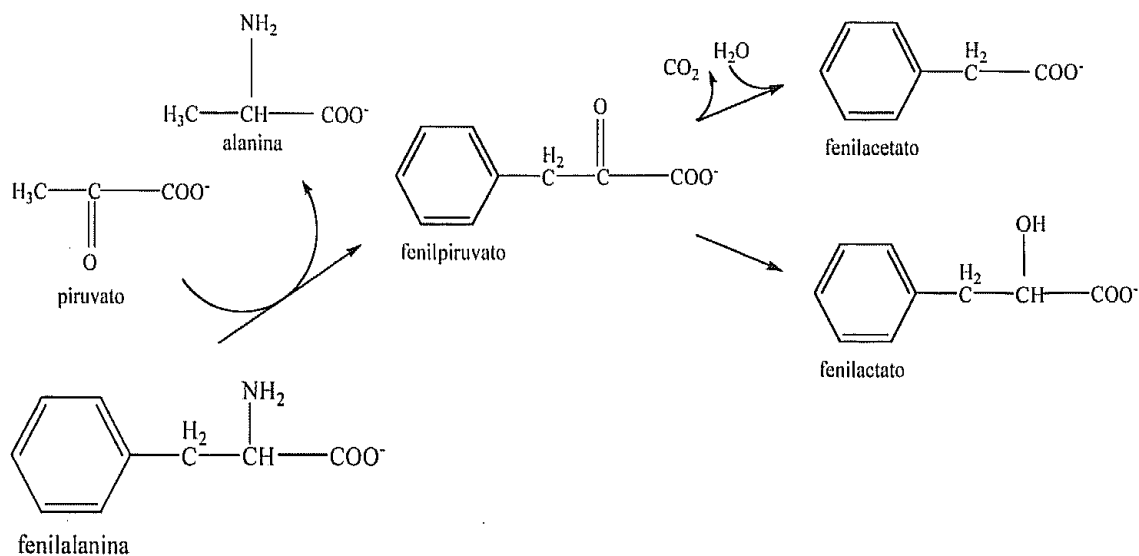


Figura 5 - Reação de transaminação da fenilalanina

Reação de transaminação da fenilalanina para produção de fenilpiruvato, seguida da sua decarboxilação em fenilacetato, e redução a fenillactato.

1.5. Neuroquímica da PKU

O mecanismo pelo qual a PKU causa um dano irreversível para o cérebro não é muito claro, e tem sido muito discutido. Duas teorias são consideradas:

- a *teoria dos metabólitos tóxicos*, onde se propõe que a fenilalanina ou os seus metabólitos, encontrados em níveis altos nos pacientes com PKU, causem o dano (revisto por Kaufman, 1998);

- a *teoria do transporte*, onde se propõe que os altos níveis de fenilalanina causem o dano indiretamente. A fenilalanina usa, para cruzar a barreira hemato-encefálica, o mesmo receptor de membrana que os demais aminoácidos grandes e neutros (LNAAs). Portanto, o aumento de fenilalanina levaria a uma saturação dos receptores, reduzindo o aporte cerebral dos demais LNAAs (Knudsen e cols., 1995; Kaufman, 1998; Pietz e cols., 1999; Surtees e cols., 2000; Matalon e cols., 2003).

O cérebro de pacientes com PKU, portanto, contém uma concentração aumentada de fenilalanina livre e o conteúdo dos aminoácidos tirosina e triptofano, assim como outros aminoácidos grandes e neutros, é diminuído. Isto tem sido confirmado por uma série de investigadores usando uma variedade de modelos animais (Pardridge, 1998; Surtees & Blau, 2000; Pietz e cols., 2003).

A baixa concentração dos aminoácidos grandes e neutros dentro do SNC causa deficiência de neurotransmissores, reduz síntese de proteínas e induz desmielinização (Surtees & Blau, 2000).

A deficiência intracelular de tirosina e triptofano no cérebro prejudica a síntese de L-dopamina, serotonina, acetilcolina, adrenalina, que são de fundamentais para o desenvolvimento cognitivo normal (Knudsen e cols., 1995;

Andresen e cols., 2001). Além disto, a deficiência na síntese destes neurotransmissores pode levar ao desenvolvimento de sintomas psiquiátricos nos adolescentes e adultos, após a suspensão da dieta (Surtees e cols., 2000; Andresen e cols., 2001).

A alteração anátomo-patológica mais comum em pacientes com PKU clássica não-tratada é uma redução no tamanho do cérebro. O tamanho médio do cérebro de pacientes não-tratados é aproximadamente 80% do normal (Huttenlocher, 2000, Brenton, 2000). Não se sabe ao certo se esta redução no tamanho do cérebro reflete perda de neurônios, de células da glia ou de processos dendríticos e contatos celulares (Brenton, 2000).

Os achados sobre a mielinização na fenilcetonúria geram algumas controvérsias, já que nem todos os cérebros de pacientes com PKU mostram anormalidades na mielina. Além disso, não existe uma correlação clara entre as lesões na substância branca e a severidade da doença. Por outro lado, as manifestações clínicas mais comuns dos pacientes com fenilcetonúria não são as mesmas das doenças que afetam primariamente a mielina central (Huttenlocher, 2000).

Em muitos casos, os indivíduos com PKU não-tratada apresentam uma diminuição da mielinização e alterações na composição da mielina, as vezes associada à gliose da substância branca. Estes pacientes apresentam uma mielina hipo-sulfatada, que é mais sensível a degradação proteolítica. Desta forma, além da diminuição da produção de mielina, a sua degradação é mais rápida (revisito por Surtees & Blau, 2000, Huttenlocher, 2000).

Por outro lado, a redução da síntese de mielina não parece ser um efeito isolado. Em modelos animais de HPA, ocorre redução da síntese de proteínas e de DNA (revisito por Surtees & Blau, 2000).

O efeito na síntese de proteínas parece ser devido em parte à competição entre a fenilalanina e outros LNAA's para o transporte através da

barreira hemato-encefálica. Além disto, foi descrito diminuição dos níveis do iniciador metionil-tRNA e alterações na fosforilação normal da proteína ribossomal S₆, que influencia na iniciação da síntese protéica (revisto por Surtees & Blau, 2000).

1.6. Tratamento

O tratamento convencional para fenilcetonúria é uma dieta pobre em proteínas. Para complementar o aporte protéico, os pacientes recebem uma mistura de aminoácidos livre de fenilalanina, acrescida de minerais, vitaminas e outros nutrientes.

A dieta deve ser iniciada o mais rápido possível, para que as concentrações de fenilalanina e tirosina no sangue se normalizem e os danos cognitivos causados pela doença possam ser evitados (revisto por MacDonald, 2000; Fisch, 2000; Przyrembel & Bremer, 2000; Scriver e cols., 2001; Walter e cols., 2002).

A dieta necessita ser rigorosamente monitorada, ajustada de acordo com a idade, crescimento, atividade física, etc., e é prescrita de acordo com os níveis de fenilalanina encontrados em cada consulta nutricional. Ela deve ser calibrada para cada paciente de modo que a fenilalanina e seus derivados não atinjam níveis tóxicos e que o aporte dos demais aminoácidos seja suficiente para suprir as necessidades metabólicas do paciente (Start, 1998; Starling e cols., 1999; Arnold e cols., 2002; Acosta e cols., 2003).

Existem muitas dificuldades quanto à manutenção da dieta devido ao grande número de alimentos proibidos. Além disto, o sabor e o odor da maioria das fórmulas para suplementação de aminoácidos são desagradáveis, e estas fórmulas devem ser ingeridas em altas quantidades. Tudo isto contribui para que muitos pacientes relaxem ou interrompam a dieta em algum momento da

vida. Não surpreende, que a taxa de adesão à dieta decresça com a idade (MacDonald, 2000; Fisch, 2000; Scriver e cols., 2001; Walter e cols., 2002; Koch e cols., 2003).

Diante desta situação, uma série de pesquisas estão em andamento na tentativa de oferecer outras alternativas de tratamento para os indivíduos com fenilcetonúria.

Uma delas consiste na administração oral da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), para degradar fenilalanina no trato gastrointestinal antes que seja absorvida. Estudos com a PAL já foram realizados em humanos com PKU e uma redução dos níveis séricos de fenilalanina foi observada (Sarkissian e cols., 1999).

Uma outra alternativa terapêutica é baseada na moderada restrição de proteínas e com a suplementação dos aminoácidos essenciais, menos a fenilalanina (*PreKUnil, Nilab, Dk*). A suplementação dos LNAAs faz com que haja uma saturação dos receptores da barreira hemato-encefálica e compensa a preferência que estes apresentam pela fenilalanina. Desta forma, níveis mais altos de fenilalanina são permitidos neste tipo de tratamento (Abring e cols., 1998; Abring e cols., 2000; Gizewska e cols., 2000; Andresen e cols., 2001; Koch e cols., 2003; Moats e cols., 2003; Matalon e cols., 2003).

Os resultados da utilização da terapia dos LNAAs em um período de 15 anos foi analisados e não foram observados efeitos adversos. A vantagem desta terapia é permitir uma dieta bem menos restritiva. Entretanto, é importante ressaltar, que as concentrações de fenilalanina no cérebro diminuem somente por volta de seis meses de tratamento, que a amostra analisada foi pequena (6 pacientes), e que há apenas este artigo na literatura relatando os resultados a longo prazo (Koch e cols., 2003).

As tentativas de terapia gênica para PKU esbarram no problema de imunidade aos vetores usados e atualmente vêm sendo exploradas em

modelos animais (Eisensmith & Woo, 1996; Nagasaki e cols., 1999; Jia e cols., 2000; Christensen e cols., 2000, 2002, Ding e cols., 2004).

A suplementação com BH₄ têm se mostrado uma terapia eficiente para alguns pacientes com deficiência de PAH. Aproximadamente 60% dos pacientes com concentrações plasmáticas de fenilalanina entre 400 e 800 µmol/L respondem ao BH₄. Algumas horas depois da administração do BH₄ as concentrações de fenilalanina no sangue diminuem consideravelmente (Kure e cols., 1999; Bardelli e cols., 2002, Bernegger & Blau, 2002; Blau, 2003; Cerone e cols., 2004).

Uma série de alelos que aparentemente conferem uma resposta a doses farmacológicas de BH₄, já foram publicados. Foi proposto que as mutações associadas a uma resposta ao BH₄ são as que conferem uma baixa afinidade de ligação do cofator. O tratamento das HPAs com BH₄ abre novas perspectivas no campo da fenilcetonúria, podendo diminuir as dificuldades do tratamento através da dieta. Entretanto, apesar da praticidade, não é um tratamento de baixo custo (Lindner e cols., 2001; Bardelli e cols. 2002, Lucke e cols. 2003; Steinfeld e cols., 2003; Lindner e cols., 2003).

1.7. A PKU materna

Outra manifestação importante é a condição chamada "PKU materna". É caracterizada por alterações do desenvolvimento fetal nos filhos de mulheres afetadas por PKU, sem restrição dietética durante a gestação. A sintomatologia inclui retardo mental, microcefalia, malformações congênitas múltiplas, e até morte intra-uterina. A freqüência de malformações congênitas se correlaciona com os níveis de fenilalanina no sangue materno. Estas alterações ocorrem independentemente do genótipo do feto. O controle rigoroso da dieta, desde antes da concepção, permite o desenvolvimento normal do feto (Woolf e cols., 1975). Entretanto, muitas vezes, quando a mulher com PKU percebe que está

grávida, o período crítico da embriogênese já passou (Antshel & Waisbren, 2003; Ng e cols., 2003; Koch e cols., 2003; e Matalon e cols., 2003).

Estudos têm mostrado que mulheres com HPA não-PKU que possuem concentrações plasmáticas de fenilalanina abaixo de $400\mu\text{mol/L}$ quando não tratadas podem ter filhos normais (Antshel & Waisbren, 2003; Ng e cols., 2003).

1.8. Aspectos moleculares

1.8.1. O gene e a enzima

A PAH humana é codificada por um gene localizado no cromossomo 12, região 12q22-q24.1, composto por 13 éxons (FIG. 6), distribuídos em um segmento genômico de ~ 90 kb (Lidksy e cols., 1984). O RNA mensageiro maduro possui aproximadamente 2,4 kb, a enzima é formada por 452 aminoácidos e se encontra organizada em um domínio regulatório N-terminal, um domínio catalítico e um domínio de oligomerização C-terminal (Teigen e cols., 1999).

A fenilalanina hidroxilase é uma enzima tetramérica (FIG. 7) e sua estrutura tridimensional pode ser visualizada no banco de dados do *PAH Mutation Analysis Consortium* (<http://www.mcgill.ca/pahdb>; Scriver e cols., 2000).

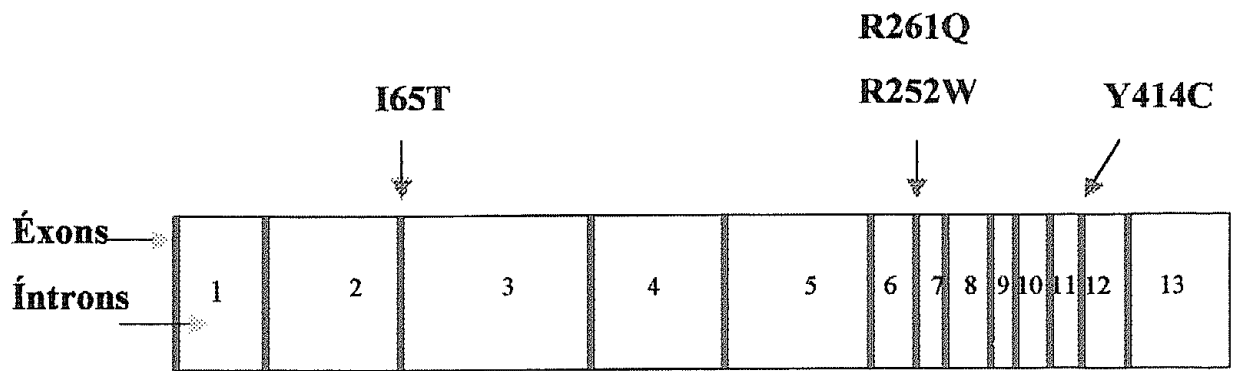


Figura 6 – Gene PAH

Representação esquemática do gene PAH, contendo 13 éxons distribuídos em um segmento genômico de aproximadamente 90Kb. Estão indicadas as mutações triadas no presente estudo.

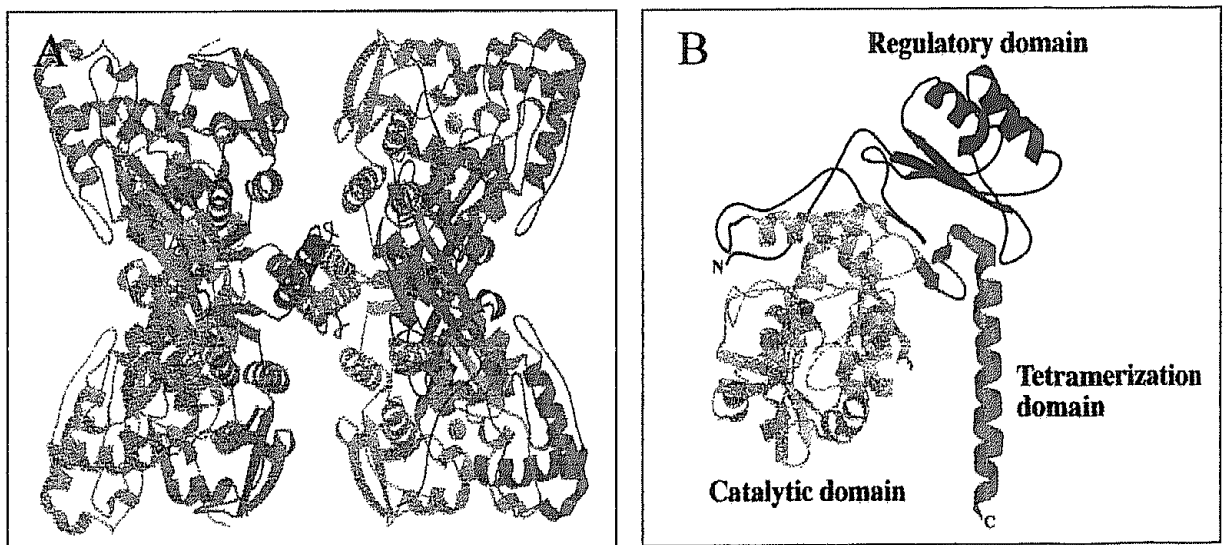


Figura 7 - Estrutura tridimensional da enzima PAH

A - Forma ativa tetramérica da enzima fenilalanina hidroxilase;

B - Monômero com os domínios de tetramerização, regulatório e catalítico.

1.8.2. Haplótipos

Um grande número de polimorfismos já foi identificado no gene PAH (Daiger e cols., 1989). Para os estudos evolutivos foi desenvolvido um sistema de haplotipagem baseado em:

- sete RFLPs (polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição), bialélicos, reconhecidos pelos nomes das enzimas de restrição que os identificam (*Bgl*III, *Pvu*IIa, *Pvu*IIb, *Eco*RI, *Msp*I, *Xmn*I e *Eco*RV);
- uma VNTR (repetições em tandem de número variável) com um monômero de 30 pb, com mais de 10 alelos diferentes;
- uma STR (repetição curta em tandem) do tetranucleotídeo TCTAn, com 9 alelos.

Este sistema permite o reconhecimento de pelo menos 87 haplótipos. As frequências destes haplótipos variam entre as populações e são poucos os prevalentes, sendo que a diversidade haplotípica é maior nas populações da África do que da Europa e da Ásia (Scriver e cols., 2000). O sistema se mostrou eficiente, permitindo a identificação da origem e distribuição das mutações que causam a doença.

Uma vez que o gene é grande, e que nem sempre se consegue identificar as mutações presentes nos pacientes, este sistema de haplotipagem também tem sido usado no diagnóstico indireto (Woo e cols., 1983; Lidsky e cols., 1985; Eisensmith & Woo, 1994; Scriver e cols., 2001).

1.8.3. Complexidade da doença

Apesar de ser considerada uma doença simples, diversos fatores agregam complexidade à PKU.

Até o momento mais de 440 mutações, foram descritas no gene PAH. Em função desta grande heterogeneidade alélica, a maioria dos indivíduos fenilcetonúricos apresentam duas mutações distintas, ou seja, são heterozigotos compostos (Avigad e cols.,1991; Rey e cols., 1992; Guldberg e cols., 1998; Nowacki, e cols.,1998; revisto por Scriver e cols., 2001; Zschocke, 2003).

O efeito de cada mutação na atividade da enzima é bastante variado. Além disto, a enzima é tetramérica, o que dá origem a uma gama de possibilidades em termos de interação. A interação entre subunidades com mutações diferentes pode levar tanto à perda de função como, em tese, à complementação, gerando uma fonte a mais de variação (Clark, 1998; Guldberg e cols., 1998; Dipple e cols., 2000; Rivera e cols., 2000; Scriver e cols., 2003, Pey e cols., 2003; Kasnauskiene e cols., 2003).

A frequência relativa das mutações, conforme o tipo, é (Nowacki e cols.,1998):

- 60% de mutações de sentido trocado, que podem causar ou não doença;
- 6% são mutações sem sentido;
- 13% são mutações em sítios de encadeamento dos éxons.
- As deleções (13%) são pequenas, menores que 20 pb, e a maioria mantém a fase de leitura, assim como as poucas inserções (1%).

Algumas mutações causam ausência total da função da enzima PAH, ao passo que outras estão associadas a uma atividade residual *in vitro* que varia de 2% a 70% (Jennings e cols., 2000).

Além da heterogeneidade alélica existente no gene PAH, encontramos também heterogeneidade de *locus*, na qual defeitos enzimáticos na síntese e

regeneração do BH₄ conduzem ao fenótipo HPA, conforme descrito acima (revisto por Scriver e cols., 1999).

Do ponto de vista clínico, a doença apresenta variabilidade em qualquer nível fenotípico investigado, seja metabólico, enzimático ou cognitivo. Além disso, para que a doença se expresse, também é necessário um fator ambiental, a dieta, que se constitui uma fonte adicional de variabilidade na doença (Scriver e cols., 1999).

1.9. Correlação genótipo-fenótipo

Estudos de correlação genótipo-fenótipo têm revelado que os genótipos de PAH não explicam completamente as manifestações fenotípicas, implicando que outros fatores estejam envolvidos na homeostase da fenilalanina (Eisensmith, 1996; Kayaalp e cols., 1997; Scriver e cols., 1999; Scriver e cols., 2002; Pey e cols., 2003).

Existem relatos de pacientes não-tratados, que possuem inteligência normal, mesmo com concentrações elevadas de fenilalanina e mutações que usualmente conferem PKU clássica. Assim como irmãos, com um mesmo genótipo e diferentes fenótipos clínicos e metabólicos. Também se encontra na literatura descrições de uma mesma mutação associada em alguns pacientes à PKU e em outros à HPA não-PKU (Avigad e cols., 1991; Guldborg e cols., 1996; Gjetting e cols., 2001).

Ainda não está claro o que causa as dissimilaridades na patogênese cerebral, sob concentrações de fenilalanina plasmáticas semelhantes. Isto provavelmente se deve as variações individuais da entrada de fenilalanina e sua distribuição na barreira hemato-encefálica (Moller e cols., 1998).

Além disto, outros fatores contribuem para explicar estas diferenças, como variação individual em nível de:

- absorção intestinal de fenilalanina;
- hidroxilação, transaminação e decarboxilação da fenilalanina;
- tolerância à fenilalanina;
- incorporação da fenilalanina em proteínas, degradação das proteínas, etc. (Avigad e cols., 1991; Guldberg e cols., 1996; Kayaalp e cols., 1997; Greeves e cols., 2000; Jennings e cols., 2000; Rivera e cols., 2000; Weglage e cols., 2002).

Mesmo com todos estes aspectos influenciando a expressão fenotípica, o genótipo PAH ainda é o principal determinante do fenótipo metabólico. Determinadas mutações estão correlacionadas a uma classe específica de PKU. Desta forma, é possível antecipar para alguns pacientes, a partir do conhecimento do genótipo, as necessidades dietéticas e a resposta à interrupção da dieta (Eisensmith e cols., 1995; Kayaalp e cols., 1997; Guldberg e cols., 1998; Bénit e cols., 1999; Rivera e cols., 2000; Guttler & Guldberg, 2000; Greeves e cols., 2000; Gjetting e cols., 2001; Pey e cols., 2003).

1.10. Aspectos populacionais

Muito se tem discutido sobre a origem e evolução dos alelos PKU no mundo. A freqüência da doença varia de acordo com a população estudada, sendo bastante elevada em caucasianos. Esta observação é particularmente intrigante porque, na fenilcetonúria não-tratada, o QI é freqüentemente tão baixo a ponto de impedir a reprodução dos homens afetados e tornar a reprodução das mulheres afetadas bastante improvável (Woolf e cols., 1975). Assim sendo, o valor adaptativo dos alelos causadores da PKU, em condições naturais, é presumivelmente muito baixo.

A freqüência de alelos tão deletérios, quando em homozigose, deveria diminuir a níveis muito baixos, a menos que fosse mantida por fatores como o envolvimento de múltiplos *loci* conferindo o mesmo fenótipo, elevadas taxas de mutação, efeito de fundador e deriva, ou heterose (Eisensmith & Woo, 1994).

Múltiplos *loci* devem ser desconsiderados na PKU, uma vez que a enzima PAH, responsável por cerca de 98-99% das hiperfenilalaninemias é codificada por um único *locus* (Woo e cols., 1989).

Também é pouco provável, que a alta freqüência populacional da doença seja mantida às custas de altas taxas de mutação. A maioria das mutações causadoras de fenilcetonúria apresenta forte associação com determinados haplótipos, o que sugere eventos mutacionais únicos. E como um todo, o *locus* PAH não é hipermutável (Eisensmith & Woo, 1994).

Entretanto, algumas mutações têm sido observadas associadas a haplótipos diferentes, o que poderia ser explicado por recombinação, conversão gênica ou eventos mutacionais recorrentes (Eisensmith & Woo, 1994; Desviat e cols., 1995; Giannattasio e cols., 1997).

1.10.1. Efeito de fundador e deriva genética em PKU

O efeito de fundador e a deriva genética podem aumentar a freqüência de mutações recessivas, particularmente em populações pequenas ou com crescimento rápido. Entretanto, parece improvável que isto tenha ocorrido na população da Europa, onde se observam as maiores freqüências de PKU. Isto porque as diferentes sub-populações européias apresentam alta freqüência de PKU às custas de mutações diferentes (Krawczak & Zschoche, 2003). Isto torna o efeito do fundador associado à deriva genética uma explicação insuficiente.

Entretanto, é possível que em algumas populações da Europa, a distribuição e a frequência dos alelos PAH possa ter sido influenciada, pelo menos em parte, pelo efeito de fundador e deriva genética (Okano e cols., 1990; Goltsov e cols., 1992; Eisensmith & Woo, 1994; Giannattasio e cols., 1997).

1.10.2. Heterose

Outros autores sugerem que heterose seja o mecanismo responsável pelo aumento da frequência de PKU em determinadas regiões. A desvantagem dos homozigotos seria contrabalançada por vantagens dos heterozigotos, isto é, poderiam haver fatores ambientais mais prejudiciais para os homozigotos normais do que para os heterozigotos.

Por exemplo, foi sugerido que as concentrações mais elevadas de fenilalanina, observadas no sangue dos heterozigotos, poderiam reduzir a toxicidade da micotoxina Ocratoxina A, produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, que podem contaminar os grãos, provocando nefropatia endêmica e aborto em humanos (Woolf e cols., 1975; Woolf, 1986).

Podemos encontrar na literatura informações contrastantes no que diz respeito a abortos em gestantes heterozigotas para mutações no *locus* PAH (Blyumina e cols., 1974). Uma frequência mais baixa de abortos espontâneos em mulheres heterozigotas, quando comparadas com a observada em controles normais, foi descrita (Woolf e cols., 1975). Entretanto, taxas de aborto mais elevadas em mulheres heterozigotas também já foi descrito (Krawczak & Zschoche, 2003).

1.10.3. Intervenção terapêutica

A terapia eficiente levará a longo prazo ao aumento da frequência populacional dos alelos causadores de PKU. Entretanto, o tratamento efetivo

da doença está disponível há apenas duas gerações, e conseqüentemente não pode ser a explicação para as altas freqüências alélicas observadas (Krawczak & Zschoche, 2003).

1.10.4. A PKU no Brasil

A população brasileira é bastante heterogênea e foi originada predominantemente por europeus do Sul e Oeste, africanos e ameríndios. A proporção destas três principais populações, assim como outras contribuições menores, variam entre as diferentes regiões do país. Por este motivo a frequência das mutações que causam PKU varia de acordo com a região estudada.

Até o presente momento, poucos estudos foram realizados sobre a PKU na população brasileira. Na literatura pudemos encontrar os dados referentes a amostras da região Sul e do Estado de São Paulo (Pérez e cols., 1996; Acosta e cols., 2000; Acosta e cols., 2001; Santana da Silva e cols., 2003). Recentemente, foi proposto o desenvolvimento do projeto "PKU Brasil", visando investigar as bases moleculares da fenilcetonúria em todo o país.

O estudo da fenilcetonúria no Estado de Minas Gerais é particularmente relevante, pois indivíduos negros fazem parte da amostra, e dados sobre as populações negras são raros no mundo. Além disso, não existem dados sobre PKU nas populações indígenas.

1.11. Escolha das mutações

Para a escolha das mutações foi realizada uma revisão crítica da literatura, onde computamos a origem e distribuição das mutações mais freqüentemente observadas nas populações, que contribuíram para a formação da população brasileira. Foram utilizadas informações do banco de dados *PAH*

Mutation Analyses Consortium Database (Scriver e cols., 2003), juntamente com fontes publicadas (Perez e cols., 1993, 1994, 1997; Eisensmith & Woo, 1994; Giannattasio e cols., 1997; Desviat e cols., 1997, 1999; Guldberg e cols., 1998; Rivera e cols., 1998), que continham dados sobre origem e evolução das mutações no gene PAH. Utilizamos também informações disponibilizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As mutações que provavelmente seriam encontradas em Minas Gerais, em função de sua freqüência na população européia, e em particular na portuguesa ou na da Península Ibérica, são: R408W, IVS12nt11g-a, IVS10nt11, V388M, I65T, Y414C (Leandro e cols., 1995; Perez e cols., 1994, 1997; Giannattasio e cols., 1997; Desviat e cols., 1999; Rivera e cols., 1998). Além disso, escolhemos três mutações (R261X, R261Q e R252W) com base nas freqüências observadas em São Paulo e Rio Grande do Sul (Pérez e cols., 1996; Acosta e cols., 2000, 2001; Santana da Silva e cols., 2003).

Na TAB. 2 são apresentados os dados referentes às mutações selecionadas para a triagem inicial no Estado de Minas Gerais: freqüência, população investigada, éxon onde a mutação se localiza e enzima de restrição usada na detecção da mutação. A triagem das mutações R408W, IVS12nt11g-a, IVS10nt11, V388M e R261X nos pacientes fenilcetonúricos do Estado de Minas Gerais, foi realizada anteriormente (Castro-Magalhães, 2003; Reis, 2003). As demais constituem o objeto do presente estudo.

TABELA 2
Mutações no gene PAH triadas nos pacientes com PKU de MG

Mutação	Frequência	População	Éxon	Alteração	Enzima
<u>I65T</u>	5%	Europeus	3	ATT→ACT	<i>TaqI</i>
R261X	-	Europeus	7	CGA→CAA	<i>Ddel</i>
<u>R261Q</u>	4%	Europeus	7	CGA→CAA	<i>HinfI</i>
<u>R252W</u>	4%	Portugueses	7	CGG→TGG	<i>AvaI</i>
IVS10nt11g-a	6%	Europeus	10	G→A	<i>Ddel</i>
V388M	19%	Portugueses	11	GTG→ATG	<i>BsaI</i>
<u>Y414C</u>	5%	Europeus	12	TAC→TGC	<i>RsaI</i>
IVS12nt1g-a	11%	Europeus	12	G→A	<i>RsaI</i>
R408W	31%	Europeus	12	CGG→TGG	<i>StyI</i> ou <i>MnlI</i>

Nota: em negrito estão as mutações que já haviam sido triadas em Minas Gerais e sublinhadas as que foram triadas no presente estudo.

1.12. Princípio teórico da detecção das mutações estudadas

1.12.1. A mutação Y414C

A mutação Y414C é encontrada no éxon 12 e pode ser detectada por ACRS (*amplification of created restriction sites*, Eiken e cols., 1991). Este método permite criar artificialmente um sítio de reconhecimento para uma enzima de restrição, o qual a mutação causadora da doença vai completar ou abolir. No caso da mutação Y414C, é criado um sítio de restrição para a enzima *RsaI*. Se o indivíduo possuir a mutação, o sítio da enzima será abolido (Eiken e cols., 1993).

Os iniciadores utilizados na PCR amplificam um fragmento de 148 pb. Após a digestão com a enzima de restrição *RsaI* o alelo normal, possuindo o sítio gera fragmentos com 127 pb e 21 pb, e o alelo mutado gera um único fragmento, com 148 pb (FIG. 8).

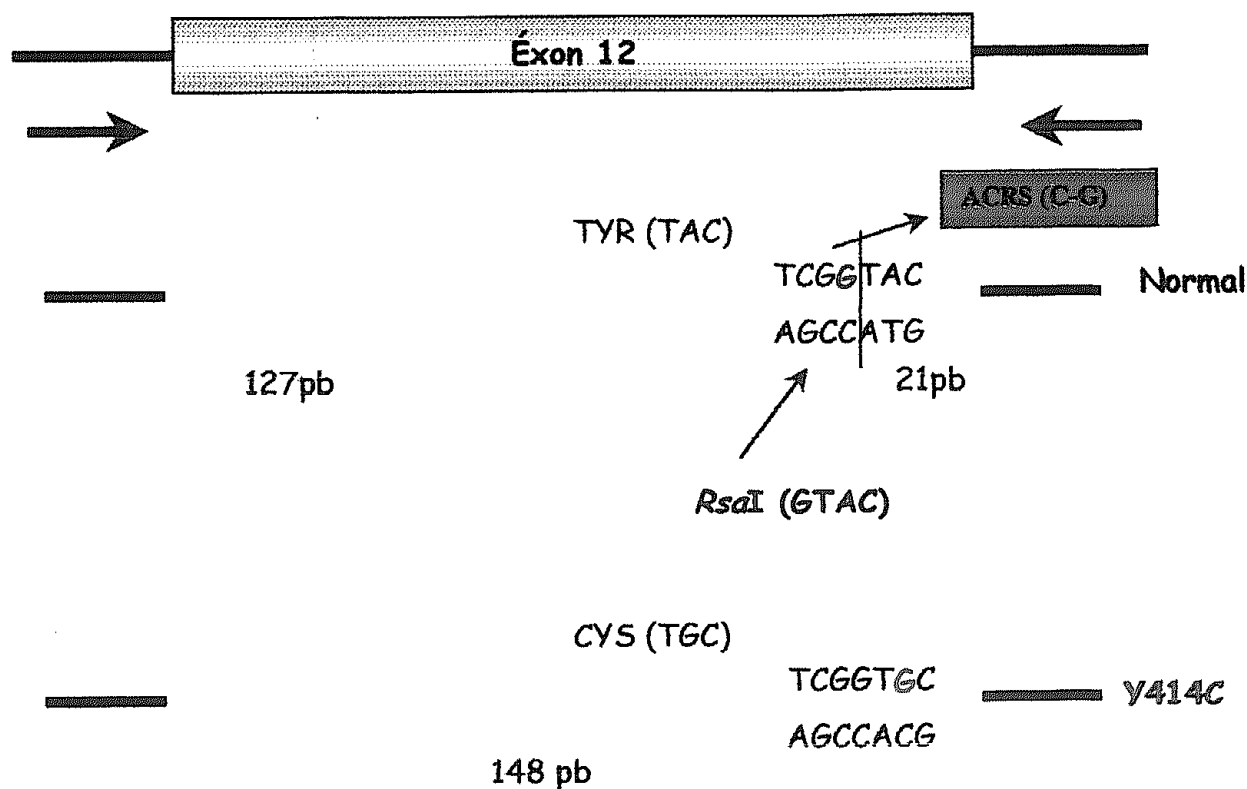


Figura 8 - Princípio teórico da detecção da mutação Y414C

A detecção desta mutação se baseia em uma reação de PCR-ACRS onde um dos iniciadores provoca uma substituição de C para G. Esta substituição (nucleotídeo em vermelho) cria o sítio de restrição para a enzima *RsaI*, e gera fragmentos de 127 pb e 21 pb. A mutação (nucleotídeo em verde) abole o sítio de restrição para a enzima.

A mutação Y414C provoca a substituição de uma tirosina (TAC) por uma cisteína (TGC). Esta mutação afeta o domínio de tetramerização da enzima e está associada a uma PKU leve, com 25% de atividade residual da enzima para cada alelo mutado (Rivera e cols., 2000; Bernegger & Blau, 2002; Pey e cols., 2003). Em homozigose esta mutação já foi encontrada, associada a PKU leve e à HPA não-PKU (Kayaalp e cols., 1997).

1.12.2. A mutação I65T

A mutação I65T ocorre no exon 3, e provoca a substituição do aminoácido isoleucina (ATT) por tirosina (ACT). Sua detecção também é feita por ACRS. A mutação abole um sítio de restrição da enzima *TaqI*. O alelo normal, possuindo o sítio, gera fragmentos com 112 pb e 20 pb, enquanto o alelo mutado gera um fragmento de 132 pb (Perez e cols., 1996; Eiken e cols., 1996). O princípio teórico do método de detecção adotado está mostrado na FIG. 9.

O fenótipo associado à mutação I65T depende do alelo contra-lateral. Quando combinada com mutações brandas, leva a uma PKU leve, e quando combinada com mutações mais deletérias, leva à PKU clássica. O alelo mutado, isoladamente, confere uma atividade enzimática residual de 13% (Desviat e cols., 1999; Rivera e cols., 2000). A mutação I65T afeta o domínio regulatório da enzima (Bénit e cols., 1999; Bernegger & Blau, 2002).

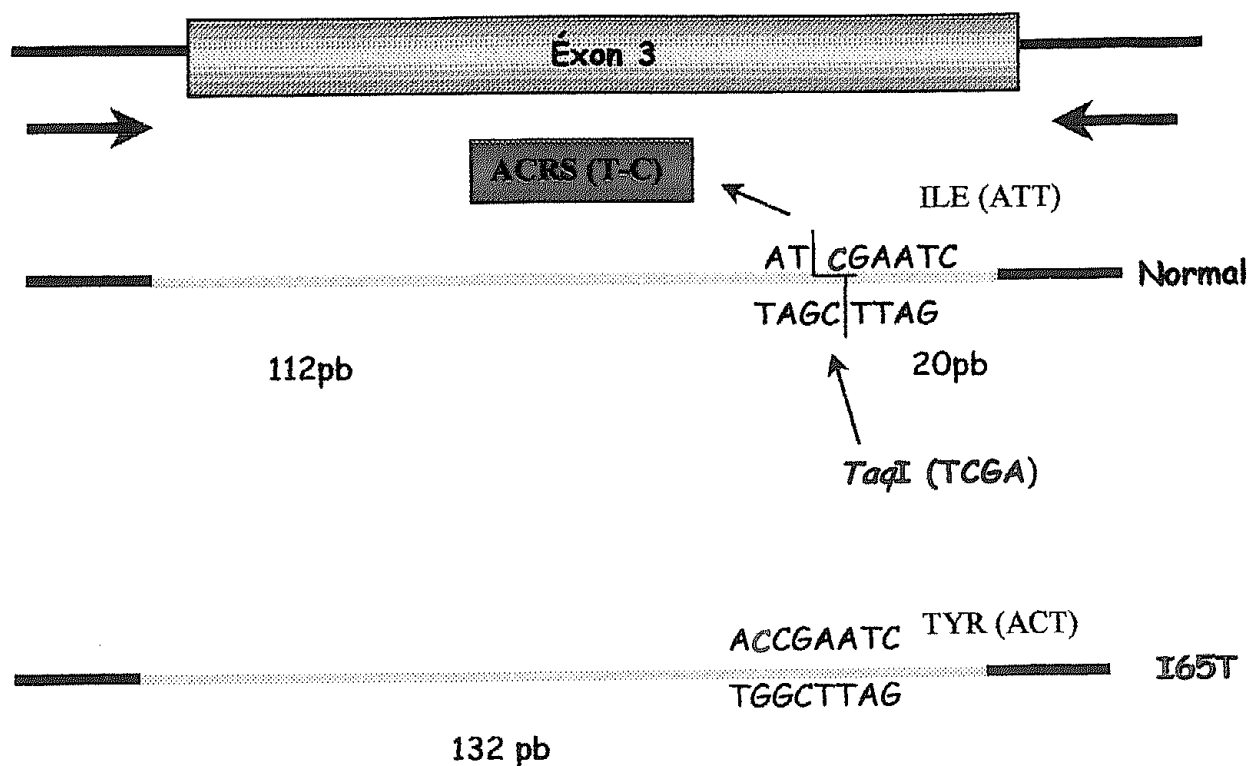


Figura 9 - Princípio teórico da detecção da mutação I65T

A detecção desta mutação se baseia em uma reação de PCR-ACRS, onde um dos iniciadores provoca uma substituição de T para C. Esta substituição (nucleotídeo em vermelho), cria o sítio de restrição para a enzima *TaqI* e gera fragmentos de 112 pb e 20 pb. A mutação (nucleotídeo em verde) abole o sítio de restrição para a enzima.

1.12.3. A mutação R252W

A mutação R252W ocorre no exon 7 e pode ser detectada por digestão com a enzima de restrição *Ava*I do produto amplificado por PCR de 278 pb. A mutação abole o sítio de reconhecimento da enzima, portanto os indivíduos normais terão fragmentos de 117 e 161 pb. A mutação R252W provoca a substituição do aminoácido arginina (CGG) por triptofano (TGG). O princípio teórico da metodologia adotada para detecção desta mutação está mostrado na FIG. 10.

A mutação R252W altera o domínio catalítico da enzima e está associada a PKU clássica. Pacientes, que têm esta mutação em homozigose, apresentam ausência de atividade enzimática (Gjetting e cols., 2001, Rivera e cols., 2000; Pey e cols., 2003).

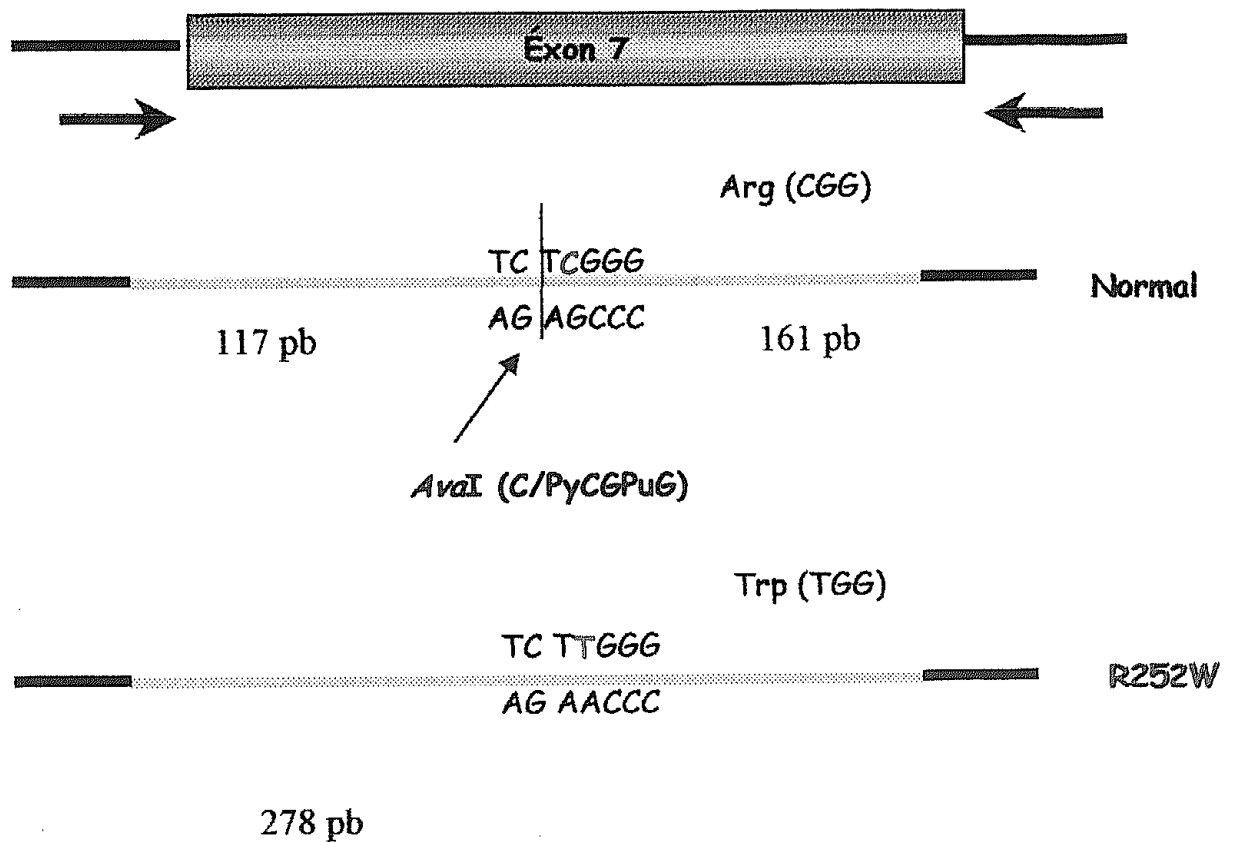


Figura 10 - Princípio teórico da detecção da mutação R252W

A detecção desta mutação se baseia em uma reação de PCR e digestão por enzima de restrição. O alelo normal possui o sítio de restrição para a enzima *AvaI* e gera fragmentos de 117 pb e 161 pb. A mutação (nucleotídeo em verde) abole o sítio de restrição para a enzima.

1.12.4. A mutação R261Q

A mutação R261Q ocorre no éxon 7 e sua detecção é feita por digestão com a enzima de restrição *Hinfl*, de um produto amplificado por PCR de 278 pb. Existem 2 sítios de reconhecimento para a enzima *Hinfl* dentro deste fragmento, fazendo com que os indivíduos normais tenham fragmentos de 131, 123 e 24 pb. A mutação abole um dos sítios de restrição fazendo com que apenas dois fragmentos sejam gerados, um de 254 pb e um de 24 pb. A mutação causa a substituição de uma arginina (CGA) por uma glicina (CAA).

O princípio teórico da metodologia adotada para a detecção da mutação R261Q está representado na FIG. 11.

A mutação R261Q afeta o domínio catalítico da enzima (Bernegger & Blau, 2002; Pey e cols., 2003). Cada alelo mutado confere uma atividade residual da enzima de aproximadamente 15%. O efeito desta mutação depende de quanta atividade enzimática é gerada pelo alelo contra-lateral. O fenótipo pode variar de PKU leve a PKU clássica (Okano e cols., 1991; Rivera e cols., 2000). Em diferentes probandos, o genótipo homoalélico da mutação R261Q já foi descrito associado com PKU variante e clássica (Kayaalp e cols., 1997).

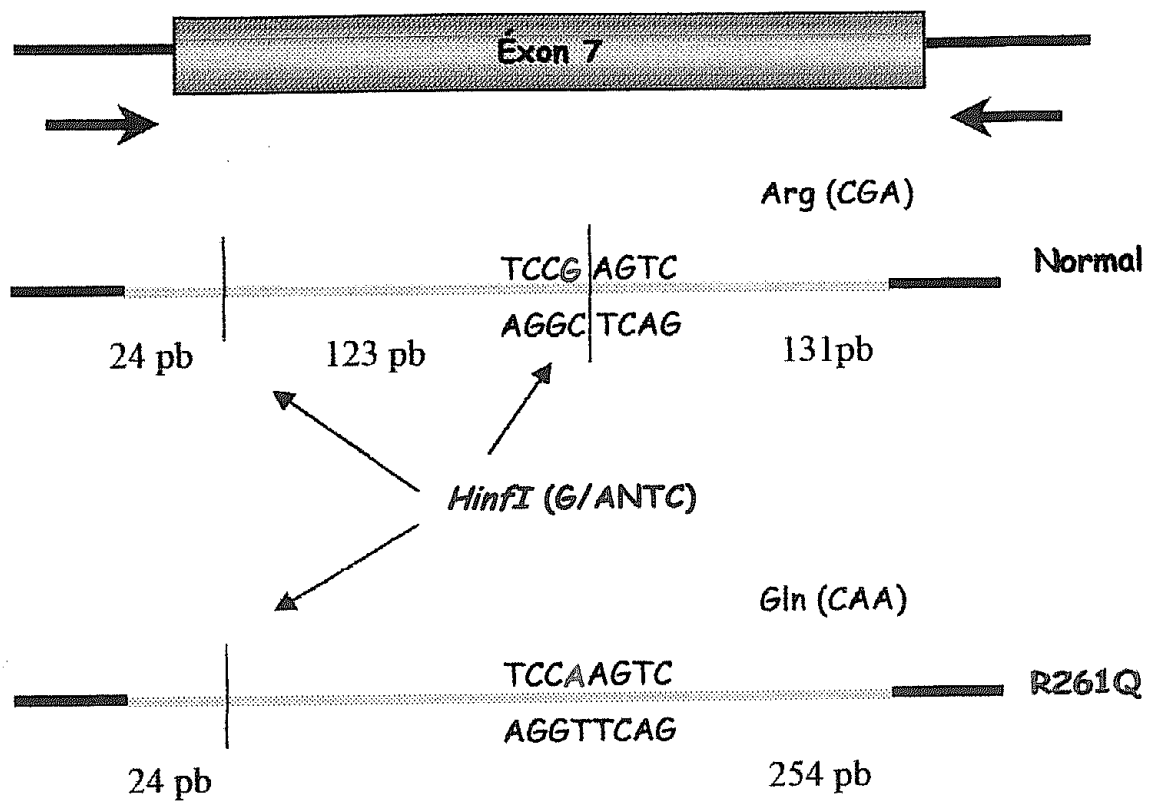


Figura 11 - Princípio teórico da detecção da mutação R261Q

A detecção desta mutação se baseia em uma reação de PCR e digestão por enzima de restrição. O alelo normal possui 2 sítios de restrição para a enzima *HinfI* e gera fragmentos de 24, 123 e 131pb. A mutação (nucleotídeo em verde) abole um sítio de restrição para a enzima.

1.13. Objetivos

1.13.1. Geral

Caracterizar o espectro e a frequência das mutações causadoras de fenilcetonúria no Estado de Minas Gerais.

1.13.2. Específicos

1. Averiguar a frequência das mutações I65T, Y414C, R252W e R261Q nos pacientes com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais;
2. Averiguar a distribuição regional destas mutações no Estado;
3. Delinear uma estratégia custo-eficiente para a primeira etapa do programa de detecção de mutações causadoras de PKU no Estado de Minas Gerais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. A amostra

A compreensão do sistema de atendimento aos pacientes com PKU no Estado de Minas Gerais, descrito no item 1.3.1., é bastante relevante para melhor entender a estrutura da amostra.

Foram analisados 111 indivíduos afetados pela PKU, dos quais 78 foram previamente diagnosticados através do Programa de Triagem Neonatal realizado no Estado. Os demais pacientes são aqueles que já estavam em acompanhamento pela equipe de Genética Médica do Ambulatório São Vicente do complexo do Hospital das Clínicas da UFMG, antes do início do programa, ou são casos de diagnóstico tardio ou imigrantes de outras regiões.

Além destes dois grupos, fizeram parte da amostra irmãos destes pacientes. Sendo assim, a amostra se encontra subdividida em 4 grupos que podem ser visualizados na TAB. 3:

TABELA 3
Estrutura da amostra analisada

A amostra	N
I – Pacientes averiguados pelo programa de triagem Neonatal	78
II - Irmãos dos indivíduos do grupo I	9
III - Pacientes que já estavam em atendimento antes do Programa de Triagem Neonatal, e aqueles com diagnóstico tardio	22
IV - Irmãos dos indivíduos do grupo III	2
Total	111

2.2. Coleta da amostra

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG. As amostras de sangue foram coletados mediante consentimento informado, assinado pelos pais ou responsáveis pelos pacientes. Foram coletados de 3 a 5 mL de sangue total de cada indivíduo e as coletas foram feitas com técnica asséptica, utilizando-se tubos tipo vacutainer com EDTA. O material foi congelado a -20°C até o momento da extração do DNA.

2.3. Extração do DNA

O protocolo de extração de DNA (Miller e cols., 1988) que foi utilizado, foi adaptado no Laboratório de Genética Humana e Médica, BIG, ICB, UFMG, e executado como descrito abaixo:

Protocolo para extração de DNA de sangue periférico

- 1 - Verter de 3 a 5 mL do sangue descongelado em tubo vacutainer de 15 mL;
- 2 - Completar o volume para 10 mL com tampão de lise de Ery;
- 3 - Misturar por inversão;
- 4 - Incubar por 15-20 min. em banho de gelo;
- 5 - Centrifugar por 10 min., a 2500 rpm, a 4°C;
- 6 - Desprezar o sobrenadante;
- 7 - Afrouxar o *pellet* até homogeneizar;
- 8 - Completar o volume para 10 mL novamente com tampão de lise de Ery e repetir os passos de 2 a 7;
- 9 - Desprezar todo o sobrenadante, invertendo o tubo em papel toalha;
- 10 - Acrescentar: 2,5 mL SE, 125 µL de SDS 20%, 25 µL de Proteinase K 20%;
- 11 - Incubar *over night* em banho-maria a 56° C ou deixar por 48 h em temperatura ambiente;
- 12 - Adicionar 0,75 mL de NaCl 5 M e agitar forte e rápido no vórtex;
- 13 - Centrifugar por 10 min, 5000 rpm, temperatura ambiente;
- 14 - Transferir o sobrenadante para outro tubo vacutainer;
- 15 - Precipitar o DNA, acrescentando 2 volumes de etanol 100% e misturando levemente por inversão;
- 16 - Desprezar o etanol 100% e lavar o *pellet* duas vezes com etanol 70 %;
- 17 - Transferir o *pellet* para um tubo Eppendorf de 1,5 mL;
- 18 - Ressuspender o DNA em 300 µL de TE;
- 19 - Armazenar a 4°C.

Depois da extração, a concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria e foram preparadas alíquotas de DNA com a concentração de 50 ng/ µL, para utilização nas reações de PCR.

2.4. Amplificação por PCR

Os fragmentos do gene PAH que incluem as mutações, foram amplificados por PCR, com os iniciadores mostrados na TAB. 4.

TABELA 4

Seqüências de iniciadores para análise das mutações

Mutação	Iniciadores (5' - 3')
I65T	3A (F): 5' GTTAGGTTTTCTGTTCTGG 3'
	3B (R): 5' AACGAGAAGGTCTAGATTCTG 3'
Y414C	12A414Ra (F): 5' CTCGGCCCTTCTCAGTTCGGT 3'
	12B (R): 5' AGTCTTCGATTACTGAGAAA 3'
R261Q e R252W	Exon 7 (F): 5' ACTACCAAAGGTCTCCTAGTGC 3'
	Exon 7 (R): 5' CAAACCTCATTCTTGCAGCAGG 3'

Fontes: Eiken e cols., 1993; Zschocke e cols., 1995; Perez e cols., 1996.

As reações de PCR foram realizadas em tubo de microcentrifugação tipo *Eppendorf* de 600 µL, num volume final de 50 µL, e foram padronizadas quanto à temperatura de anelamento, número de ciclos, quantidade de iniciadores, etc.

Em toda reação de PCR foi usado um controle negativo, no qual todos os reagentes estavam presentes e o DNA foi substituído por água bidestilada, deionizada, estéril. Nas reações feitas para a padronização dos métodos foi usado como controle positivo o DNA de um sujeito normal.

Para a realização das reações da PCR, foi utilizado o termociclador *Programmable Thermal Controller (PTC-100) MJ Research*, EUA, e os programas utilizados foram específicos para cada par de iniciadores.

O programa da reação de PCR para detecção da mutação I65T, consta de: desnaturação inicial de 95° C por 4 min, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72° C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

Cada reação de PCR contém 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,1 % Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂ – (*PhN*, *Phoneutria*), 200 μM de cada dNTP, 0,03 nM de cada iniciador, 0,2 U de Taq DNA polimerase (*PhN*, *Phoneutria*), 100 ng de DNA.

Para detecção da mutação Y414C, o programa consta de: desnaturação inicial de 95° C por 4 min, seguida por 25 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min e extensão a 72° C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os reagentes e concentrações utilizados na reação de PCR para a detecção da mutação Y414C foram os mesmos da PCR para detecção da mutação I65T, diferindo apenas a concentração dos iniciadores, que foi 0,07 nM de cada.

Para detecção das outras duas mutações, R261Q e R252W, somente uma reação de PCR foi realizada, já que elas se encontram dentro de um mesmo *amplicon*, o do éxon 7. O programa para detecção destas mutações foi o seguinte: desnaturação inicial de 94° C por 4 min, seguida por 25 ciclos com desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e extensão a 72° C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os reagentes e concentrações utilizados na reação de PCR do éxon 7 também foram os mesmos da PCR para detecção da mutação I65T, diferindo apenas a concentração dos iniciadores que foi 0,02 nM de cada.

2.5. Eletroforese em gel de agarose

Para verificação do rendimento da amplificação, 10 μL dos produtos obtidos por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, e corados com brometo de etídio (Sambrook & Russel, 2001).

2.6. Digestão com enzima de restrição

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos a digestão por endonucleases de restrição específicas, de acordo com a recomendação dos fabricantes. A digestão permitiu identificar se o sítio de restrição em questão estava presente ou foi abolido. As enzimas utilizadas para análise das mutações propostas foram:

TaqI (Invitrogen): usada para detecção da mutação I65T. Foi utilizado 5 UI da enzima para digestão completa de 10 μ L do produto da PCR. As amostras foram incubadas por 4 h à 65 °C.

RsaI (Invitrogen): usada para detecção da mutação Y414C. Foram submetidos à digestão, 15 μ L do produto da PCR. Foi utilizado 10 UI da enzima. As amostras foram incubadas por 16 h à 37 °C.

AvaI (Promega): usada para detecção da mutação R252W. Foram utilizadas 8 UI da enzima para digestão completa de 10 μ L do produto da PCR. Amostras incubadas por 16 h à 37°C.

HinfI (Promega): usada para detecção da mutação R261Q. Foi utilizado 10 UI da enzima para digestão completa de 10 μ L do produto da PCR. Amostras incubadas por 16 hs à 37°C.

Uma vez que a detecção das quatro mutações depende de não-digestão, todas as reações onde a digestão não foi total, foram repetidas. Todos os alelos que foram encontrados, foram confirmados, através da repetição da PCR e da digestão por uma quantidade maior da enzima.

2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As digestões dos produtos de PCR foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (I65T, Y414C) e 8% (R252W e R261Q), e os géis foram corados por brometo de etídio (Sambrook & Russel, 2001) ou com prata (Santos e cols., 1993).

Os resultados, quando corados por brometo de etídio, foram visualizados diretamente no transluminador da *Núcleo Vision (Nucleo Tek)* e as imagens foram capturadas com o *software Gel Expert (Nucleo Tek)*.

2.8. Análise das frequências encontradas

Com base nos resultados obtidos nos testes moleculares, foram determinadas, as frequências relativas das mutações presentes nos indivíduos afetados por PKU, no Estado de Minas Gerais.

2.9. Distribuição geográfica das mutações

A distribuição regional dentro do Estado de Minas Gerais, de cada uma das mutações testadas, foi analisada. Esta análise foi feita através de mapas que foram gerados pela Bel. em Estatística Erika Carvalho Pires, do NUPAD, usando o pacote de programas Tabwin (desenvolvido pelo SUS – Sistema Único de Saúde, disponível gratuitamente no site <http://www.datasus.gov.br>).

3. RESULTADOS

3.1. Análise das mutações

3.1.1. Detecção da mutação I65T

Na FIG. 12 pode ser visualizada a separação eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR I65T. Este gel foi feito com o objetivo de averiguar se o rendimento na PCR seria suficiente para permitir a digestão do produto com a enzima de restrição. Na canaleta 1 foi aplicado controle negativo de PCR, na canaleta 2, marcador de peso molecular *DNA 50 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech)*, e nas canaletas de 3 a 19, os produtos das reações de PCR da mutação I65T de diferentes pacientes. O rendimento obtido nesta PCR foi suficiente para permitir que se passasse à fase de digestão com enzima de restrição. Para todas as outras mutações, o mesmo procedimento foi repetido.

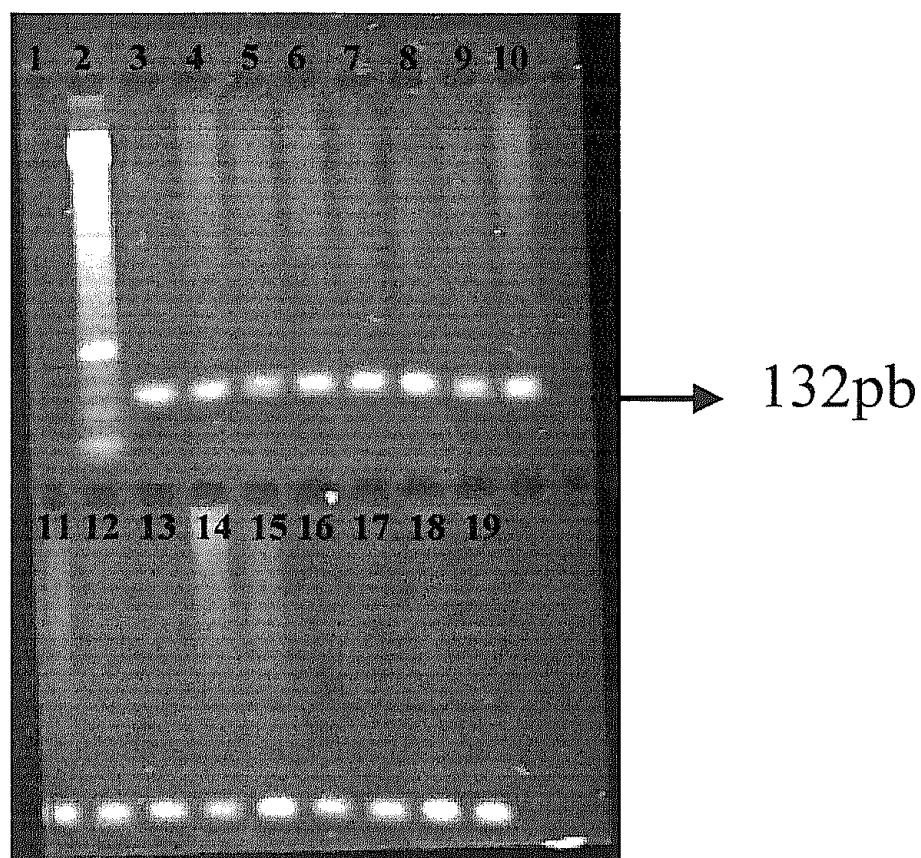


Figura 12 - Amplificação por PCR do fragmento onde se encontra a mutação I65T

Separação eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. A figura mostra a amplificação por PCR, para detecção da mutação I65T, de acordo com as condições e concentrações descritas no texto. Canaletas: 1 - controle negativo de PCR; 2 - marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*); 3 a 19 - produtos da PCR I65T.

Na FIG. 13 pode ser visualizada a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio, dos produtos de PCR para detecção da mutação I65T, digeridos pela enzima de restrição *TaqI*.

Nas canaletas de 1 a 15 da foto A (FIG. 13), foram aplicadas digestões dos produtos de PCR de pacientes. Na canaleta 16 foi aplicado o produto da PCR não digerido e na canaleta 17 marcador de peso molecular, DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*). Nas canaletas de 1 a 3, de 5 a 8 e de 10 a 15 todo o produto da PCR foi digerido, portanto, estes pacientes não contém a mutação I65T. Nas canaletas 4 e 9 surgem fragmentos correspondentes aos dois alelos: o fragmento de 132 pb correspondendo ao alelo mutado e o fragmento de 112 pb correspondendo ao alelo normal. Estes dois sujeitos são, portanto, heterozigotos para a mutação I65T.

Nas canaletas de 1 a 15 da foto B, foram aplicadas digestões de outros pacientes. Na canaleta 16 foi aplicado produto da PCR não digerido e na canaleta 17 marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*). Nas canaletas de 1 a 10, 12 e 14 todo o produto da PCR foi digerido, portanto, estes pacientes não contém a mutação. Nas canaletas 11 e 13 surgem fragmentos correspondentes aos dois alelos: o fragmento de 132 pb correspondendo ao alelo mutado e o fragmento de 112 pb correspondendo ao alelo normal. Estes dois sujeitos são, portanto, heterozigotos para a mutação I65T. Na canaleta 15 encontramos apenas o fragmento de 132 pb, correspondendo à mutação I65T, sendo este portanto, um indivíduo homozigoto para esta mutação.

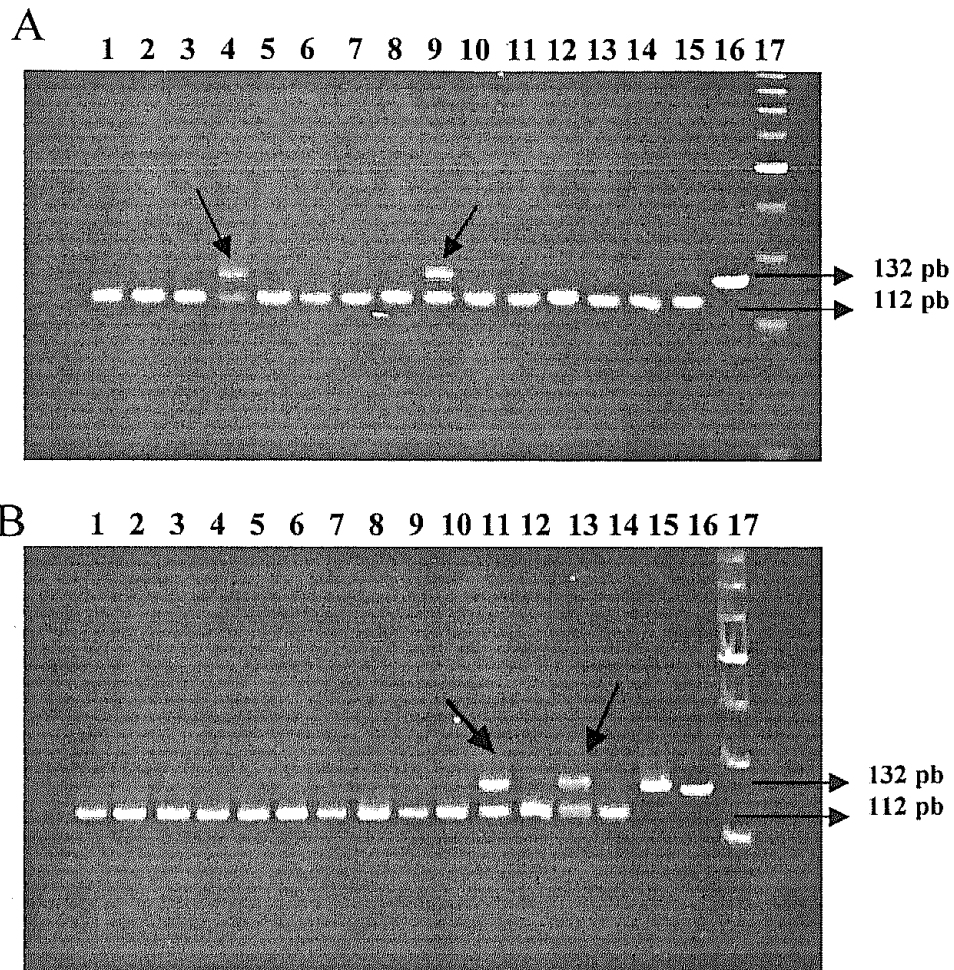


Figura 13 - Detecção da mutação I65T

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. A figura mostra a digestão do produto da PCR com enzima de restrição *TaqI*. As setas ao lado do gel apontam os fragmentos do alelo normal (112 pb), e do alelo mutado (132 pb). As setas dentro do gel indicam os indivíduos heterozigotos, com a presença de um alelo mutado I65T. Foto A: Canaletas: 16 - produto da PCR não digerido; 17 - marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*). Foto B: Canaletas: 15 - indivíduo homozigoto para a mutação I65T; 16 - produto da PCR não digerido; 17 - marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*).

3.1.2. Detecção da mutação Y414C

Na FIG. 14 pode ser visualizada a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, dos produtos da PCR para detecção da mutação Y414C, digeridos pela enzima de restrição *RsaI*. O gel foi corado com prata e a imagem capturada pelo *scanner HP scanjet 2200c*.

Nas canaletas de 1-9 e 12-17 podemos visualizar um único fragmento de 127 pb correspondendo ao fragmento do alelo normal que foi totalmente digerido. A digestão completa nos mostra os indivíduos sem a mutação Y414C. Na canaleta 10 foi aplicado produto da PCR não digerido e na canaleta 11, marcador de peso molecular, DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*).

3.1.3. Detecção da mutação R252W

Podemos observar na FIG. 15 a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, do produto do éxon 7 digerido com a enzima de restrição *AvaI*. Na foto A, fotografia convencional, e na foto B, recurso *Emboss* do pacote de programas *Gel Expert* (*Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation*). Na canaleta 1 foi aplicado o marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*) e na canaleta 2, produto da PCR não digerido. Os indivíduos representados nas canaletas 5 e 12 apresentaram 3 fragmentos no gel, correspondendo aos fragmentos do alelo normal (161 e 117 pb), e do alelo mutado (278 pb). Estes portanto são pacientes heterozigotos compostos com a presença de um alelo R252W. Na canaleta 14 podemos visualizar apenas o fragmento de 278 pb. Este paciente portanto é homozigoto para a mutação R252W, já que não houve digestão pela enzima *AvaI*.

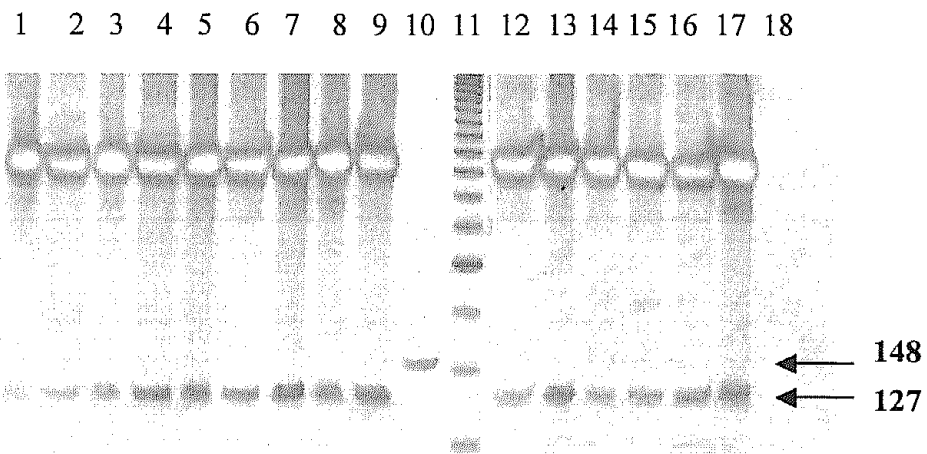


Figura 14 - Detecção da mutação Y414C

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com solução de prata. A figura mostra a digestão do produto da PCR com enzima de restrição *RsaI*. As setas fora do gel apontam os fragmentos do alelo normal (127 pb), e do alelo mutado (148 pb). Canaletas: 1-9 e 12-17 indivíduos sem a mutação Y414C; 10 - produto da PCR não digerido; 11 - marcador de peso molecular *DNA 50pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech)*.

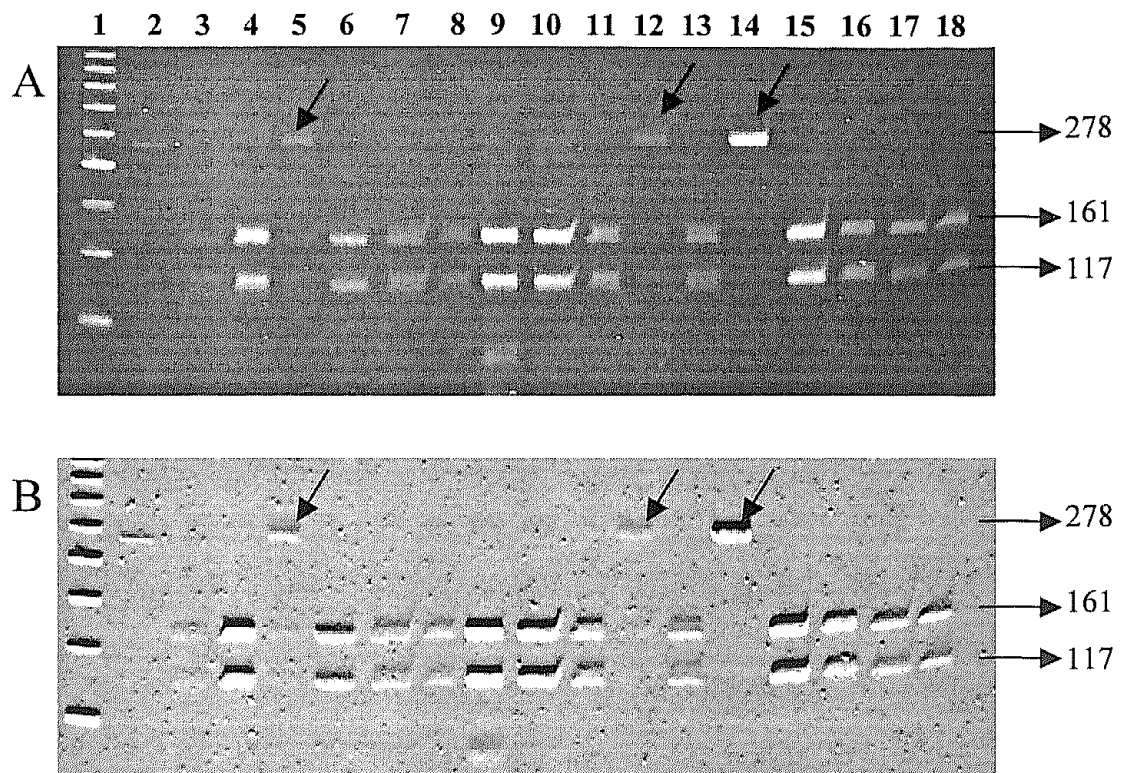


Figura 15 - Detecção da mutação R252W

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio. Na foto A, fotografia convencional, e na foto B, recurso *Emboss* do software *Gel Expert* (*Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation*). A figura mostra a digestão do produto da PCR com enzima de restrição *AvaI*. As setas ao lado do gel apontam os fragmentos do alelo normal (161 e 117 pb), e do alelo mutado (278 pb). As setas dentro do gel indicam os 2 indivíduos heterozigotos, com a presença de um alelo mutado R252W (canaletas 5 e 12), e 1 indivíduo homozigoto (canaleta 14). Canaletas: 2 - produto da PCR não digerido; 1- marcador de peso molecular *DNA 50pb Ladder* (*Amersham Pharmacia Biotech*).

3.1.4. Detecção da mutação R261Q

Os produtos do exon 7 digeridos com a enzima de restrição *Hinfl*, foram visualizados com a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio. Com esta concentração podemos ver o fragmento não digerido de 278 pb e o fragmento do alelo mutado de 254 pb. O fragmento do alelo mutado possui apenas um sítio de restrição que o deixa 24 pb menor que o fragmento não digerido. O segundo sítio de restrição da enzima *Hinfl* neste fragmento é alterado pela mutação R261Q. Os fragmentos do alelo normal de 131 e 123 pb aparecem no gel como apenas um fragmento, pois esta concentração de gel não é suficiente para a separação de 8 pb.

Na FIG. 16 são mostrados os resultados da digestão do produto da PCR com enzima de restrição *Hinfl*. Nas canaletas 5 e 6 foram aplicados marcador de peso molecular *DNA 50pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech)* e produto da PCR não digerido, respectivamente. Pode-se notar no gel a presença de 5 indivíduos heterozigotos compostos, com a presença de um alelo mutado R261Q, nas canaletas 2, 3, 4, 7, e 13. Estes indivíduos possuem além do fragmento de 254pb, os fragmentos de 131 e 123 pb. Também pode-se ver 2 indivíduos homozigotos para a mutação R261Q, nas canaletas 1 e 11, onde se observa um fragmento de 254 pb (o fragmento de 24 pb saiu do gel). Estes, sofreram digestão pela enzima *Hinfl* em apenas um dos sítios.

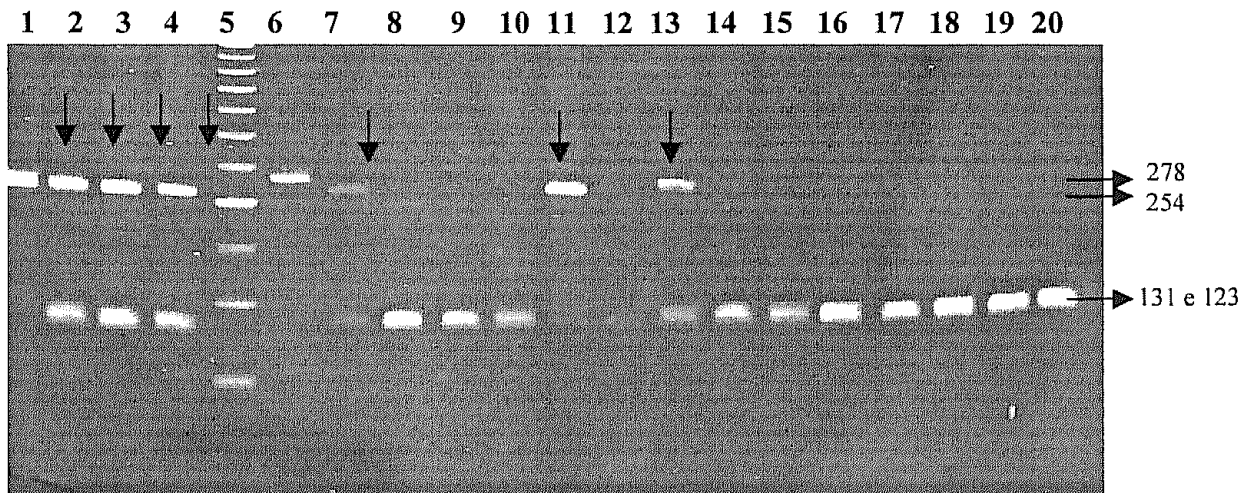


Figura 16 - Detecção da mutação R261Q

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio. A figura mostra a digestão do produto da PCR com enzima de restrição *HinfI*. As setas ao lado do gel apontam os fragmentos do alelo normal (131 e 123pb, que não se separam no gel 8%), e do alelo mutado (254 pb). As setas dentro do gel indicam 5 indivíduos heterozigotos, com a presença de um alelo mutado R261Q (canaletas 2,3,4,7,e 13), e 2 indivíduos homozigotos (canaletas 1 e 11). Canaletas: 6 - produto da PCR não digerido; 5- marcador de peso molecular *DNA 50pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech)*.

3.2. Frequências relativas dos alelos testados no presente trabalho

As frequências relativas das diferentes mutações encontradas nesta amostra, se encontra sumariada na TAB. 5. As frequências relativas foram determinadas separadamente, de acordo com fonte de averiguação utilizada.

TABELA 5
Frequência relativa das mutações Y414C, I65T, R252W e R261Q em 111 indivíduos com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais

Sub-grupos da amostra	N	Alelos	Alelos observados, número e frequência relativa							
			Y414C		I65T		R252W		R261Q	
			n	%	n	%	n	%	n	%
I - Averiguados pelo programa de triagem neonatal	78	156	0	0	9	5,7	8	5,1	25	16
II - Irmãos de I	9	18	0	0	1	5,5	0	0	0	0
III - Averiguados no Ambulatório São Vicente	22	44	0	0	3	6,8	3	6,8	4	9,1
IV - Irmãos de III	2	4	0	0	0	0	0	0	1	25
Total	111	222	0	0	13	5,8	11	4,9	30	13,5

Nota: N refere-se ao número de sujeitos testados, enquanto n refere-se ao número de alelos de um dado tipo observados.

Dos 222 alelos testados para estas quatro mutações, pudemos identificar 54 alelos, correspondendo a 24,3 % dos alelos da amostra. A maioria dos pacientes testados são heterozigotos compostos, em concordância com a

grande heterogeneidade alélica encontrada no locus PAH. Foram determinados 18 alelos em homozigose e 36 alelos em heterozigose (ver TAB. 6).

TABELA 6
Alelos encontrados em homozigose ou heterozigose

Mutação	Alelos em homozigose	Alelos em heterozigose	Total
Y414C	0	0	0
I65T	4	9	13
R252W	2	9	11
R261Q	12	18	30
Total	18	36	54

3.3. Distribuição geográfica da PKU e dos alelos I65T, Y414C, R252W e R261Q em Minas Gerais

Para avaliar a distribuição geográfica, no Estado de Minas Gerais, da PKU e dos alelos encontrados para as mutações I65T, R252W e R261Q foram construídos os mapas mostrados nas FIG. 17, 18, 19 e 20.

À análise dos mapas de distribuição, não se detectou agregação regional da doença ou de qualquer dos alelos pelo Estado de Minas Gerais. Existem alguns municípios nos quais o número de casos da doença, ou a frequência de um determinado alelo é maior. Isto, entretanto, retrata municípios de maior densidade populacional ou a presença de irmãos na amostra.

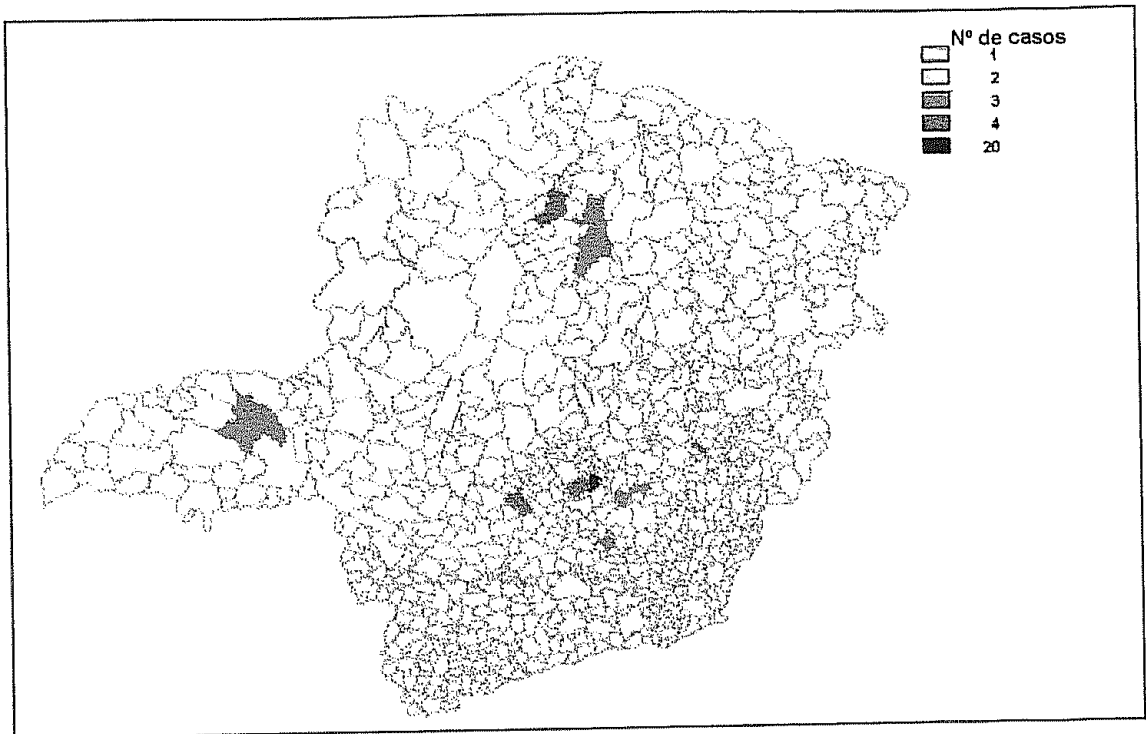


Figura 17 - Distribuição do número de crianças com PKU em Minas Gerais

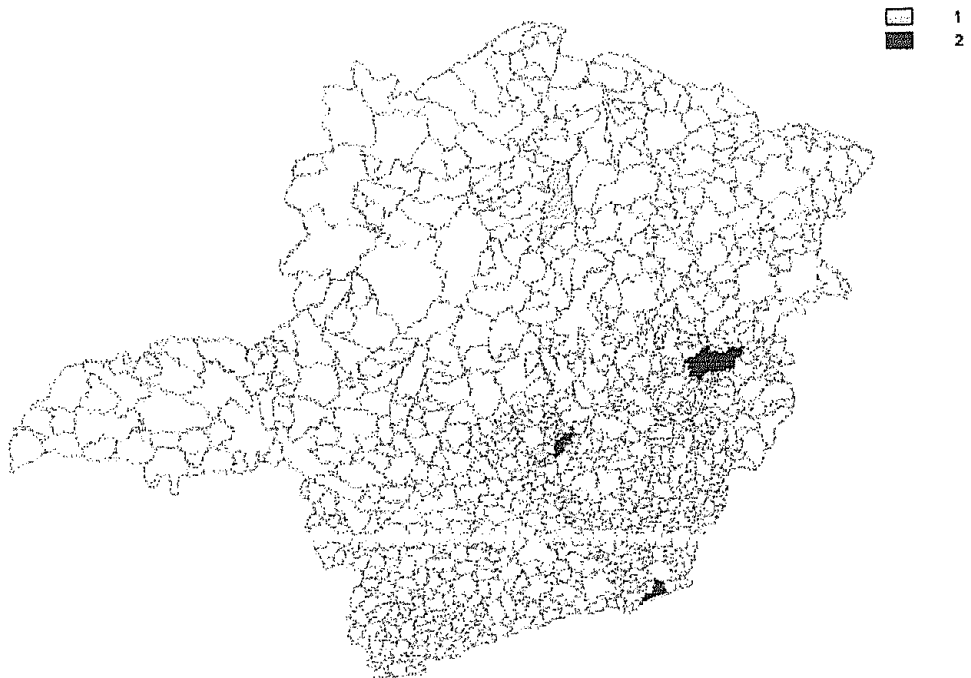


Figura 18 - Distribuição do alelo I65T por município – 13 casos

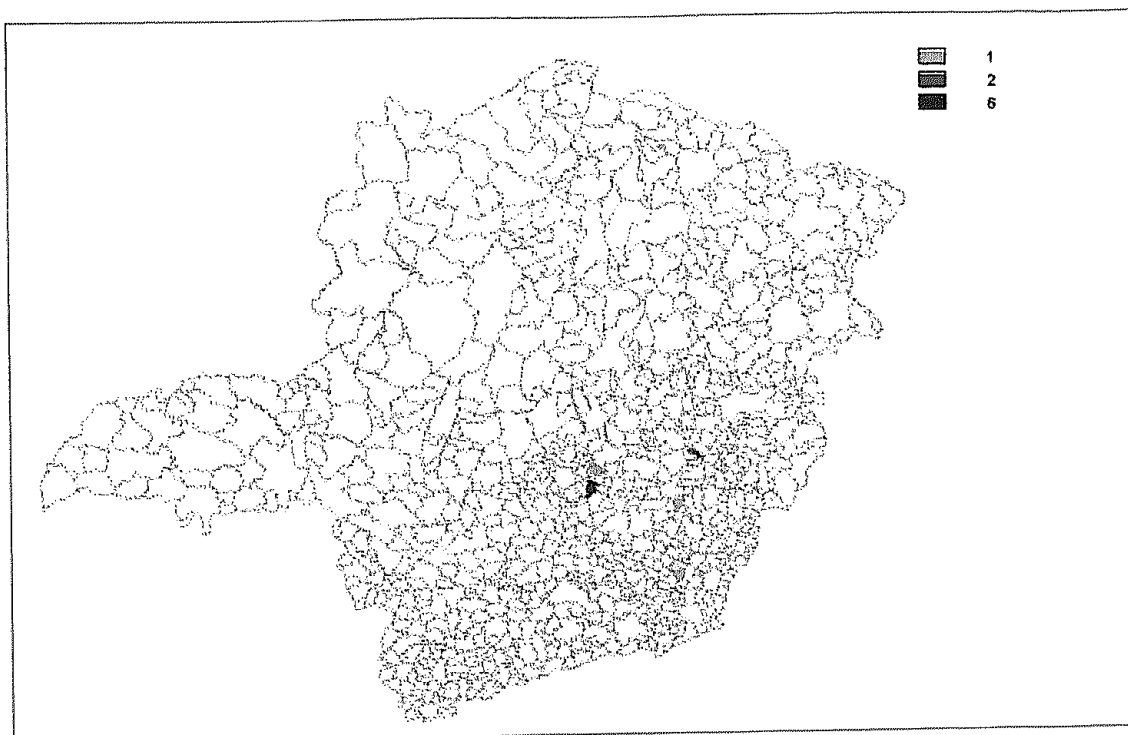


Figura 19 - Distribuição do alelo R252W por município – 11 casos

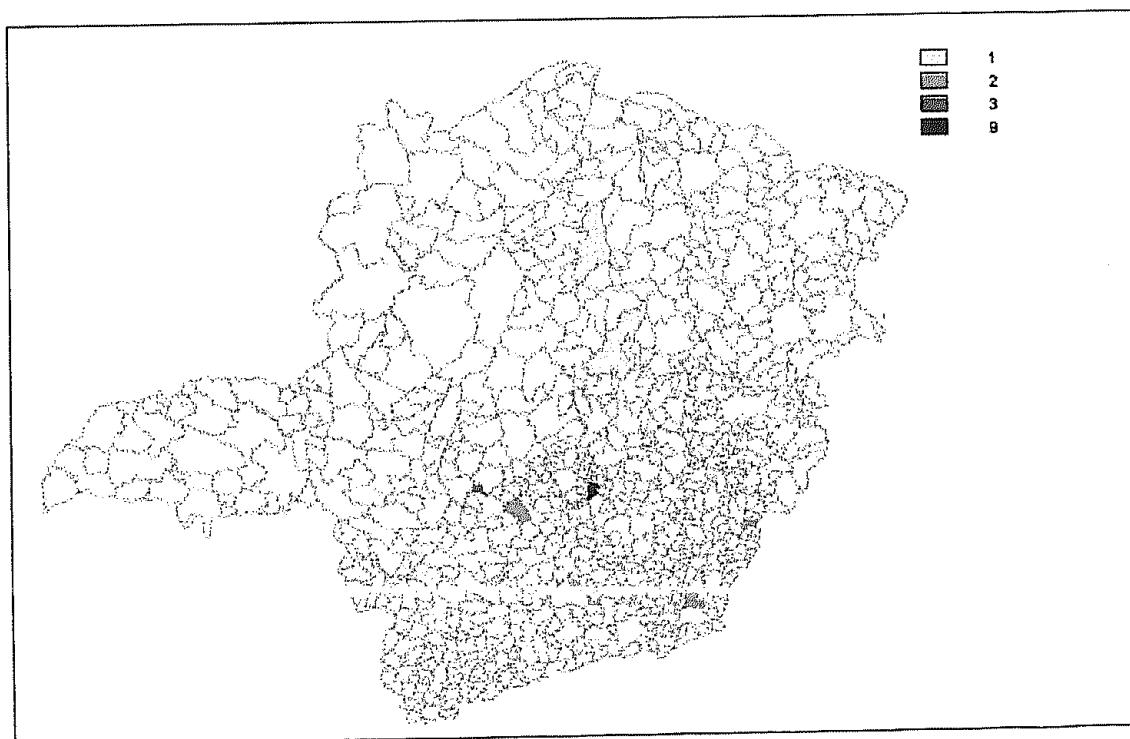


Figura 20 - Distribuição do alelo R261Q por município – 30 casos

3.4. Freqüência de consangüinidade na amostra

Não foi possível estimar-se o coeficiente de endogamia da amostra por falta de dados. Entretanto, para que fosse analisada a freqüência de endogamia entre os pais dos pacientes, os irmãos destes foram retirados da amostra. Com a retirada dos irmãos, a amostra que era de 111 indivíduos, passou para 100 indivíduos. Existe registro de informação sobre a existência ou não de parentesco entre os pais, em relação a 72 destes pacientes (TAB. 7). Em 16 famílias (22,2 %) houve relato positivo, mas as informações obtidas não permitiam calcular o grau de parentesco entre os pais.

Um teste de χ^2 para avaliar a independência entre a ocorrência de homozigose do gene PAH e a existência de endogamia foi aplicado aos dados da TAB. 7. O valor do χ^2 foi 13,84 ($P < 0,005$), indicando que a hipótese de independência deve ser rejeitada e que os heterozigotos tendem a se concentrar nas famílias em que não há endogamia.

A fórmula utilizada, para cálculo do χ^2 , com correção de Yates foi (Sokal & Rohlf, 1969):

$$\chi^2_{adj} = \frac{[(ad - bc) - n/2]^2 n}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

TABELA 7

Distribuição dos genótipos homozigotos e heterozigotos, conforme a presença ou não de endogamia

	Presença de endogamia	Ausência de endogamia	Total
Homozigotos	7	6	13
Heterozigotos compostos	1	33	34
Total	8	39	47

3.5. Estabelecimento de uma proposta para a primeira etapa da triagem de mutações no gene PAH em Minas Gerais

3.5.1. *Freqüências das nove mutações testadas até o momento*

Com a realização deste estudo, juntamente com aqueles realizados por Myrian de Castro-Magalhães e Adriana Helena de Oliveira Reis, pudemos estabelecer a contribuição de um conjunto de nove mutações, selecionadas conforme descrito acima, para a freqüência de PKU em MG.

Para evitar viéses de averiguação na estimativa da freqüência relativa destas nove mutações no Estado de Minas Gerais, foram considerados apenas os dados relativos aos indivíduos triados pelo Programa de Triagem Neonatal.

Sendo assim, com a triagem destas nove mutações nos 78 pacientes triados pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, conseguimos identificar 100 alelos dos 156 testados, correspondendo a 64% da amostra (ver TAB. 8).

TABELA 8
 Frequências relativas das nove mutações testadas em uma amostra
 de neonatos do Estado de MG

Mutação	Nº de alelos	
	detectados/ nº de alelos testados	%
V388M	33/156	21
R261Q	25/156	16
IVS10nt11	21/156	13,4
I65T	9/156	5,7
R252W	8/156	5
R261X	2/140	1,4
R408W	1/102	0,98
IVS12nt1	1/140	0,7
Y414C	0/156	0
Total	100/156	64

Nota: Alguns denominadores são diferentes devido aos 11 novos pacientes que foram incluídos na amostra. Estes pacientes não foram testados quanto a presença das mutações, IVS12nt1, R408W e R261X devido suas baixas frequências.

Quando se analisam todos os pacientes triados até o momento (111), incluindo os de diagnóstico tardio e irmãos, conseguimos identificar 137 alelos de 222 testados, sendo que 69 alelos se encontram em heterozigose e 68 em homozigose (TAB. 9).

TABELA 9
 Frequência dos alelos testados em toda a amostra
 analisada até o momento

Mutação	N	%	Alelos em heterozigose	Alelos em homozigose
V388M	50/222	22,5	24	26
R261Q	30 /222	13,5	18	12
IVS10nt11	28/222	12,6	18	10
I65T	13/222	5,8	4	9
R252W	11/222	4,9	2	9
IVS12nt1	2 /200	1	2	0
R261X	2/200	1	0	2
R408W	1/134	0,75	1	0
Y414C	0/222	0	0	0
Total	137	61,7	69	68

Com a testagem destas nove mutações foi possível determinar os dois alelos presentes em 52 dos 111 pacientes, ou seja, foi possível a averiguação completa do genótipo de 46,8 % da amostra. Para 33 sujeitos (30 %) um dos alelos foi determinado e para os restantes 26 pacientes nenhum dos alelos foi estabelecido.

3.5.2. Proposta para uma estratégia custo-eficiente de triagem de mutações para o Estado de Minas Gerais

A triagem de mutações em geral é realizada em três etapas (revisito por Acosta e cols., 2001).

1 - Triagem das mutações detectáveis por métodos simples e de baixo custo, por exemplo, amplificação por PCR e digestão com enzima de restrição;

2 - Triagem de mutações por métodos mais abrangentes, como SSCP, DGGE, DHPLC;

3 - Análise daqueles éxons onde foi verificada uma migração aberrante durante a segunda etapa por sequenciamento. Se nenhuma alteração tiver sido identificada nas etapas 1 e 2, a amostra do paciente é submetida a sequenciamento da região promotora e de todos os éxons.

Com base nas frequências observadas, sugerimos que a primeira etapa da triagem de mutações em MG deva incluir apenas a triagem das mutações V388M, R261Q, IVS10nt1, I65T e R252W. As outras quatro mutações, R408W, Y414C, IVS12nt11 e R261X, tiveram frequência menor que 1,5%, não justificando sua triagem individual. Estas mutações serão averiguadas nas etapas 2 e 3.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo faz parte de um projeto maior, que visa estabelecer as bases moleculares da PKU em Minas Gerais. Castro-Magalhães (2003) conduziu um trabalho com 100 indivíduos fenilcetonúricos do Estado, onde foram triadas as mutações V388M, IVS10nt11, R408W e IVS12nt1. A mutação R261X também foi averiguada nesta amostra como objeto de estudo de uma monografia do bacharelado em Genética da UFMG (Reis, 2003).

Com a mesma amostra, acrescida de 11 sujeitos, demos continuidade a investigação. No presente estudo, foram triados 222 alelos para as mutações I65T, Y414C, R252W e R261Q. Com a análise destas quatro mutações, pudemos identificar 54 alelos, ou seja, 24,3% dos alelos da amostra. Destes alelos 36 (66,6%) se encontram em heterozigose e 18 (33,3%) em homozigose.

Como a amostra foi subdividida em quatro grupos, a discussão que se segue foi feita com base nos dados de frequência relativa das mutações calculadas a partir dos neonatos averiguados pelo Programa de Triagem Neonatal do NUPAD (78 indivíduos).

Em função do número de nascimentos no Estado, a amostra de triagem neonatal de Minas Gerais já é maior do que a maioria das dos países europeus. É também a maior amostra colhida no Brasil, e em função da alta cobertura do programa, pouco sujeita a viéses de averiguação.

As estimativas de freqüência das mutações testadas não devem, entretanto, ser usadas como base para estimativas de freqüências alélicas para a população do Estado. Em primeiro lugar, porque a amostra se restringe a indivíduos com PKU. Segundo, porque devido ao mecanismo de herança, e ao fato de não se conhecerem as interações entre os diferentes alelos PKU, não se pode estimar corretamente as freqüências de heterozigotos.

Além disto, embora não seja possível estimar-se coeficiente de endogamia para esta amostra, observou-se que nas famílias dos indivíduos homozigotos a freqüência de endogamia entre os pais é maior do que nas famílias dos heterozigotos compostos. Isto sugere que pelo menos parte dos alelos encontrados em homozigose sejam idênticos por descendência, e que as freqüências dos heterozigotos sejam menores do que se estimaria com base no Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Embora o número de mutações no gene PAH causando alguma forma de HPA seja superior a 400, cada população se caracteriza por apresentar um número restrito de alelos. O tipo e a freqüência destes alelos nos contam sobre a evolução da doença, mas também da população em questão.

A mutação mais freqüentemente observada nos neonatos do Estado de Minas Gerais foi a R261Q, 25 alelos (16%). A freqüência desta mutação varia entre 32 % na Suíça, de onde se acredita que ela seja originária, e 1,2 % na Irlanda, com uma freqüência média na Europa de 4 % (Eisensmith e cols., 1992; Guldborg e cols., 1995; Zschocke e cols., 1995; Eiken e cols., 1996; Pérez e cols., 1997; Rivera e cols., 1998; Desviat e cols., 1999; Zschocke, 2003). A freqüência do alelo R261Q para algumas populações está apresentada na TAB. 10. Esta mutação é a segunda mais freqüente em Portugal (10,4%), e na Sicília (8,5%), mas não tem uma freqüência muito alta na Espanha (4%), exceto pela Galícia, onde corresponde a 10,3 % dos alelos PKU. Nas Américas, a freqüência encontrada em MG é bastante similar à observada em Cuba (15,8 %; Desviat e cols., 2001).

No Brasil, a mutação R261Q foi a segunda mutação mais freqüente (12,2%) em SP (Acosta e cols., 2001), e no Sul do Brasil ela também se encontra com uma freqüência bastante elevada (9,8 %; Acosta e cols., 2001; Santana da Silva e cols., 2003).

A mutação R261Q têm freqüência relativamente alta em diversas populações européias, algumas das quais não conectadas por fluxos migratórios importantes. Esta mutação apresenta-se ligada a vários haplótipos, e em função disto, e por estar situada em um dinucleotídeo CpG, foi proposto que tenha se originado mais de uma vez (Zschocke, 2003). Será necessário portanto desenvolver os estudos da haplotipagem para esclarecer a origem desta mutação na população de Minas Gerais.

TABELA 10
Freqüência da mutação R261Q em algumas populações estudadas

População	Freqüência (%)	Referência
Europa	4	Nowacki e cols., 1998
Espanha	4	Desviat e cols., 1999
Portugal	10,4	Rivera e cols., 1998
Brasil (Sul e Sudeste)	12,2	Acosta e cols., 2001
Brasil (Sul)	9,8	Santana e cols., 2003
<i>Minas Gerais</i>	16	<i>Presente estudo</i>

Já a mutação I65T corresponde a 5,7% dos alelos PKU nos neonatos de MG. Esta mutação se encontra entre as três mais prevalentes na Península Ibérica (Pérez e cols., 1994), com uma freqüência na Espanha de 9% e em Portugal 5%, conforme mostrado na TAB. 11. Além disso, sua freqüência em países da América Latina, onde já havia sido averiguada, é relativamente alta. Desta forma os resultados obtidos no presente estudo, situam-se entre os valores encontrados em outras populações (Perez e cols., 1997; Rivera e cols., 1998; Desviat e cols., 1999 e 2001).

Entretanto, as frequências encontradas em São Paulo e Rio Grande do Sul contrastam bastante com os valores de Minas Gerais. No RS a mutação I65T é a mais freqüente, correspondendo a 19,5% dos alelos, já em SP sua freqüência é de apenas 3,5% (Acosta e cols., 2001; Santana e cols., 2003).

TABELA 11

Freqüência da mutação I65T em algumas populações estudadas

População	Frequência (%)	Referência
Europa	5	Nowacki e cols., 1998
Espanha	9	Perez e cols., 1997
Portugal	5	Rivera e cols., 1998
Brasil Sul e Sudeste	3,5	Acosta e cols., 2001
Brasil Sul	19,5	Santana e cols., 2003
<i>Minas Gerais</i>	<i>5,7</i>	<i>presente estudo</i>

A mutação I65T aparece ligada a diversos haplótipos, o que poderia levar a suposição de que estivesse associada a eventos mutacionais recorrentes. Entretanto, esta mutação não se encontra em um ponto quente mutacional, do tipo dinucleotídeo CpG, e a região onde ela está inserida não sugere hipermutabilidade.

É possível que não se tratem de múltiplos eventos mutacionais, e que a mutação esteja associada a haplótipos diferentes, porque o tempo decorrido desde o seu aparecimento teria sido suficientemente longo para permitir a quebra do desequilíbrio de ligação (Ramus e cols., 1995; Pérez e cols., 1997; Tyfield e cols., 1997). Foi proposto um modelo pelo qual seria possível prever a seqüência de eventos recombinacionais que teria levado às associações da mutação I65T com os diversos haplótipos conforme observada atualmente (Ramus e cols., 1995).

A freqüência da mutação R252W varia entre 0,8% na Espanha e 15 % na Itália (Zschocke e cols., 1995 e 2003; Eisensmith e cols., 1996; Desviat e cols., 2001).

Da mutação R252W foram identificados 8 alelos dos 78 testados, correspondendo a 5% da amostra. Esta é a sexta mutação mais freqüente em Portugal (4%), e corresponde a 0,8% dos alelos PKU da Espanha. No estudo realizado em SP com uma amostra do Sul e Sudeste a freqüência encontrada para esta mutação foi 6,5%. A freqüência da mutação R252W em algumas populações já estudadas está descrita na TAB. 12.

TABELA 12
Freqüência da mutação R252W em algumas populações estudadas

População	Frequência (%)	Referência
Espanha	0,8	Desviat e cols., 2001
Portugal	4	Rivera e cols., 1998
Brasil (Sul e Sudeste)	6,5	Acosta e cols., 2001
<i>Minas Gerais</i>	5	<i>presente estudo</i>

Nenhum alelo da mutação Y414C foi encontrado nos neonatos com PKU de Minas Gerais. Os valores encontrados em SP (1,3%), na Península Ibérica e Itália também são relativamente baixos. Entretanto, a mutação Y414C corresponde a 5% dos alelos PKU na Europa (TAB. 13), o que justificou sua inclusão no presente estudo (Eiken e cols., 1996; Eisensmith e cols., 1996; Zschocke, 2003). O valor observado na Europa reflete uma freqüência mais alta deste alelo no Centro e Norte europeu.

TABELA 13
 Frequência da mutação Y414C em algumas populações estudadas

População	Frequência (%)	Referência
Europa	5	Nowacki e cols., 1998
Espanha	2,3	Perez e cols., 1997
Portugal	1,8	Rivera e cols., 1998
Brasil (Sul e Sudeste)	1,3	Acosta e cols., 2001
<i>Minas Gerais</i>	<i>zero</i>	<i>presente estudo</i>

A população do Estado de Minas Gerais é formada por indivíduos descendentes de diversas populações: ameríndios, negróides e caucasóides. O componente caucasóide veio principalmente de Portugal. Entretanto, o Estado foi alvo de migração das mais variadas populações.

Com base nas frequências encontradas em MG, SP e RS, podemos fazer inferências sobre a distribuição do contingente caucasóide dentro do nosso país. Em relação aos alelos PKU, a população mineira é mais semelhante à portuguesa do que o são as populações de São Paulo e do Rio Grande do Sul, que refletem um maior contingente de migrações do Norte e Leste Europeu.

A haplotipagem das amostras destes pacientes, que será realizada em um próximo estudo, deverá ajudar a esclarecer as origens das mutações identificadas em MG, assim como aspectos do povoamento do Estado.

À análise da distribuição geográfica de todas as nove mutações testadas em Minas Gerais não se observou agregação regional. A PKU, assim como os alelos estudados, parecem ter uma distribuição aleatória no Estado, ficando o maior número de alelos nas regiões mais populosas ou onde há presença de irmãos.

Um trabalho rotineiro de detecção das mutações causadoras de fenilcetonúria será implantado em MG. Isto é importante, porque embora haja variações, muitas mutações se associam a um fenótipo específico. Portanto, o conhecimento das mutações presentes permitirá, em muitos casos a confirmação do diagnóstico e auxiliará na decisão da conduta terapêutica, permitindo um acompanhamento mais específico e individualizado.

De posse das frequências das nove mutações testadas até o momento, é possível estabelecer-se uma proposta para a primeira etapa da triagem das mutações em Minas Gerais.

Com os três estudos realizados foi possível determinar 100/156 (64%) dos alelos da amostra. Quando se analisa todos os indivíduos da amostra, o genótipo completo do *locus* PAH pôde ser determinado para 52 destes (46,8 %) e 33 indivíduos (30 %) tiveram um dos alelos determinados.

Com a análise apenas das cinco mutações mais frequentes em MG, V388M, R261Q, IVS10nt11, I65T e R252W, por PCR-restrição, estima-se poder determinar 61 % dos alelos PKU do Estado. Além disso, será possível genotipar completamente cerca de 44 % dos pacientes na primeira etapa da triagem de mutações. Isto implica em uma redução significativa dos custos e do trabalho envolvido no programa.

5. CONCLUSÕES

1. Através da triagem das mutações R261Q, R252W, I65T e Y414C, em uma amostra de 111 pacientes com PKU do Estado de Minas Gerais, foi possível determinar 54 de 222 alelos (24,32%), 36 deles em heterozigose e 18 em homozigose.
2. A mutação mais freqüente, encontrada neste estudo foi a R261Q, com 30 alelos identificados e uma freqüência de 13,5%. Seguem-se as mutações I65T com 13 alelos (5,8%), 11 alelos R252W (4,9%) e nenhum alelo Y414C.
3. Quando se analisaram apenas os 78 indivíduos triados pelo Programa de Triagem Neonatal, a freqüência relativa das mutações foi de: R261Q: 16 %; I65T: 5,7 %; R252W: 5 % e Y414C: 0 %.
4. As freqüências das mutações encontradas no presente estudo refletem a origem predominantemente portuguesa do contingente caucasiano da população mineira. Entretanto, a haplotipagem, que permitiria confirmar este achado, não foi realizada neste trabalho.
5. As mutações estudadas não apresentaram nenhum tipo de agregação regional, quando analisada a distribuição geográfica dos pacientes portando os diferentes alelos.

6. Os genótipos heterozigotos compostos foram a maioria dos determinados neste trabalho, de acordo com a grande heterogeneidade alélica encontrada no gene.

7. A frequência de casamentos consangüíneos foi significativamente maior nas famílias dos indivíduos homozigotos (53,8%) quando comparadas às dos heterozigotos compostos (3%). O valor do χ^2 foi de 13,84 ($P < 0,005$). Isto sugere que as frequências alélicas sejam bem menores do que as estimadas sob o pressuposto de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

8. Este estudo, em conjunto com os dois primeiros realizados em MG (Castro Magalhães, 2003, Reis, 2003), permitiu detectar 64% (100/156 alelos) das mutações causadoras de fenilcetonúria no Estado de Minas Gerais.

9. Com a análise de toda a amostra, foram completamente genotipados 52 indivíduos (46,8%) e 33 (30%) tiveram um dos alelos determinados.

10. A ordem das mutações mais freqüentemente encontradas em MG é: V388M (21%), R261Q (16%), IVS10nt11 (13,4%), I65T (5,7%), R252W (5%), R261X (1,4%), R408W (0,98%); IVS12nt1 (0,7%) e Y414C (0 %).

11. Com base nas frequências acima, foi possível estabelecer-se uma proposta custo-eficiente para a primeira etapa da triagem de mutações nos pacientes com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais. Através da triagem por PCR-restrição apenas das mutações V388M, R261Q, IVS10nt11, I65T, R252W, estima-se ser possível a genotipagem completa em 44 % dos pacientes do Estado.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abring, K.K., Andresen, J., Mikkelsen, I., Lou, H.** (2000). Experiences with amino acid tablets in the treatment of PKU. In: *7th Asian European workshop on Inborn Errors of Metabolism*, 18-22 September, Department of Neuropaediatrics, J.F. Kennedy Institute, Glostrup, Denmark.
- Abring, K. K., Andresen, J., Mikkelsen, I., Olsen, B. P., Petersen, B. H. and Lou, H.** (1998). Benefits of using PreKunil tablets as treatment for adults with phenylketonuria (PKU) in Denmark. Department of Neuropaediatrics, J. F. Kennedy Institute, Glostrup, Denmark.
- Acosta, A. X., Silva, W. A., Jr., Carvalho, T. M. Zago, M. A.** (2000). Ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) observed in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat.* 17: (1) 77
- Acosta, A. X., Silva, W. A., Jr., Carvalho, T. M., Gomes, M., Zago, M. A.** (2001). Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat.* 17: 122
- Acosta P.B., Yannicelli S., Marriage B., Steiner R., Gaffield B., Arnold G., Lewis V., Cho S., Berstein L., Parton P., Leslie N., Korson M.** (1999). Protein status of infants with phenylketonuria undergoing nutrition management. *J Am Coll Nutr.* Apr;18(2):102-7
- Acosta, P. B., Yannicelli, S., Singh, R., Mofidi, S., Steiner, R., DeVincentis, E., Jurecki, E., Bernstein, L., Gleason, S., Chetty, M. and Rouse, B.** (2003). Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc.* 103:1167-73.

- Aguiar M.J.B.** (2002). Experiências dos programas de triagem neonatal. In: *Anais do 14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica*. Ribeirão Preto, São Paulo, p. 16.
- Andresen, J., Miranda, M. and Lou, H.** (2001). The effect of neurotransmitter precursors as a substitute for a strict diet in adolescent PKU patients. Department of Neuropaediatrics, J.F. Kennedy Institute, Glostrup, Denmark.
- Antshel, K. M. Waisbren, S. E.** (2003). Timing is everything: executive functions in children exposed to elevated levels of phenylalanine. *Neuropsychology*. 17: (3) 458-68
- Arnold, G. L., Vladutiu, C. J., Kirby, R. S., Blakely, E. M. and Deluca, J. M.** (2002). Protein insufficiency and linear growth restriction in phenylketonuria. *J Pediatr*. 141: 243-6
- Avigad, S., Kleiman, S., Weinstein, M., Cohen, B. E., Schwartz, G., Woo, S. L. Shiloh, Y.** (1991). Compound heterozygosity in nonphenylketonuria hyperphenylalanemia: the contribution of mutations for classical phenylketonuria. *Am J Hum Genet*. 49: (2) 393-9
- Aoki, K. and Wada, Y.** (1988). Outcome of the patients detected by newborn screening in Japan. *Acta Paediatr Jpn*. 30: 429-34
- Bardelli, T., Donati, M. A., Gasperini, S., Ciani, F., Belli, F., Blau, N., Morrone, A. Zammarchi, E.** (2002). Two novel genetic lesions and a common BH(4)-responsive mutation of the PAH gene in Italian patients with hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab*. 77: (3) 260-6
- Benit, P., Rey, F., Blandin-Savoja, F., Munnich, A., Abadie, V. Rey, J.** (1999). The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 68: (1) 43-7
- Bernegger, C. Blau, N.** (2002). High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab*. 77: (4) 304-13
- Blau, N.** (2003). Tetrahydrobiopterin control in phenylketonuria. *Genet Med*. 5: (1) 57-8

- Blyumina, M. G.** (1974). The role of heterozygosity of women with respect to the phenylketonuria gene in the origin of spontaneous abortions and disturbances of intrauterine fetal development. *Sov Genet.* 8: (3) 385-90
- Brenton, D. P. and Pietz, J.** (2000). Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S114-20
- Clague, A. Thomas, A.** (2002). Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta.* 315: (1-2) 99-110
- Carreiro-Lewandowski, E.** (2002). Newborn screening: an overview. *Clin Lab Sci.* 15(4): 229-38.
- Castro-Magalhães, M.** (2003). *Freqüência das mutações V388M, R408W, IVS10nt1 e IVS12nt1 e em indivíduos com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais.* Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre ao Departamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte.
- Cerone, R., Schiaffino, M. C., Fantasia, A. R., Perfumo, M., Birk Moller, L., Blau, N.** (2004). Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 81(2): 137-9.
- Clark, A. G.** (1998). Mutation-selection balance with multiple alleles. *Genetica.* 102-103: (1-6) 41-7.
- Christ, S. E.** (2003). Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci.* 12: 44-54
- Christensen, R., Guttler, F. Jensen, T. G.** (2002). Comparison of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts as potential target cells for somatic gene therapy of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 76: (4) 313-8
- Christensen, R., Kolvraa, S., Blaese, R. M. Jensen, T. G.** (2000). Development of a skin-based metabolic sink for phenylalanine by overexpression of phenylalanine hydroxylase and GTP cyclohydrolase in primary human keratinocytes. *Gene Ther.* 7: (23) 1971-8
- Daiger, S. P., Chakraborty, R., Reed, L., Fekete, G., Schuler, D., Berenssi, G., Nasz, I., Brdicka, R., Kamaryt, J., Pijackova, A. et al.** (1989). Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus

- Desviat, L. R., Perez, B., De Lucca, M., Cornejo, V., Schmidt, B. Ugarte, M.** (1995). Evidence in Latin America of recurrence of V388M, a phenylketonuria mutation with high in vitro residual activity. *Am J Hum Genet.* 57: (2) 337-42
- Desviat, L. R., Perez, B., Garcia, M. J., Martinez-Pardo, M., Baldellou, A., Arena, J., Sanjurjo, P., Campistol, J., Couce, M. L., Fernandez, A., Cardesa, J. Ugarte, M.** (1997). Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur J Hum Genet.* 5: (4) 196-202
- Desviat, L. R., Perez, B., Gamez, A., Sanchez, A., Garcia, M. J., Martinez-Pardo, M., Marchante, C., Boveda, D., Baldellou, A., Arena, J., Sanjurjo, P., Fernandez, A., Cabello, M. L. and Ugarte, M.** (1999). Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet.* 7: 386-92.
- Desviat, L. R., Perez, B., Gutierrez, E., Sanchez, A., Barrios, B. and Ugarte, M.** (2001). Molecular basis of phenylketonuria in Cuba. *Hum Mutat.* 18: 252.
- Dipple, K. M. and McCabe, E. R.** (2000). Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet.* 66: 1729-35
- Ding, Z., Harding, C. O., Thony, B.** (2004). State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab.* 81(1): 3-8
- Eiken, H. G., Knappskog, P. M. and Apold, J.** (1993). Restriction enzyme-based assays for complete genotyping of Phenylketonuria patients. *Developmental Brain Dysfunction* 6:53-59
- Eiken, H. G., Knappskog, P. M., Motzfeldt, K., Boman, H. Apold, J.** (1996). Phenylketonuria genotypes correlated to metabolic phenotype groups in Norway. *Eur J Pediatr.* 155: (7) 554-60
- Eiken, H. G., Knappskog, P. M., Boman, H., Thune, K. S., Kaada, G., Motzfeldt, K. and Apold, J.** (1996). Relative frequency, heterogeneity and geographic clustering of PKU mutations in Norway. *Eur J Hum Genet.* 4: 205-13.
- Eiken, H. G., Odland, E., Boman, H., Skjelkvale, L., Engebretsen, L. F. Apold, J.** (1991). Application of natural and amplification created restriction

- sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res.* 19: (7) 1427-30
- Eisensmith, R. C., Okano, Y., Dasovich, M., Wang, T., Guttler, F., Lou, H., Guldberg, P., Lichter-Konecki, U., Konecki, D. S., Svensson, E. et al.** (1992). Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet.* 51: (6) 1355-65
- Eisensmith, R. C., Goltsov, A. A., O'Neill, C., Tyfield, L. A., Schwartz, E. I., Kuzmin, A. I., Baranovskaya, S. S., Tsukerman, G. L., Treacy, E., Scriver, C. R. et al.** (1995). Recurrence of the R408W mutation in the phenylalanine hydroxylase locus in Europeans. *Am J Hum Genet.* 56: (1) 278-86
- Eisensmith, R. C., Martinez, D. R., Kuzmin, A. I., Goltsov, A. A., Brown, A., Singh, R., Elsas, L. J., II Woo, S. L.** (1996). Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous southeastern US population. *Pediatrics.* 97: (4) 512-6
- Eisensmith, R. C. Woo, S. L.** (1992). Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninurias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum Mutat.* 1: (1) 13-23
- Eisensmith, R. C., Woo, S. L.** (1994). Gene therapy for phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl.* 407: 124-9
- Eisensmith, R. C., Woo, S. L.** (1996). Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 155 Suppl 1: S16-9
- Fisch, R. O.** (2000). Comments on diet and compliance in phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S142-4
- Giannattasio, S., Jurgelevicius, V., Lattanzio, P., Cimbalistiene, L., Marra, E. Kucinkas, V.** (1997). Phenylketonuria mutations and linked haplotypes in the Lithuanian population: origin of the most common R408W mutation. *Hum Hered.* 47: (3) 155-60
- Gizewska, M., Cyrylowski, L., Józwiak, I., Bich, W., Romanowska, H., Remigolska, M., Bilar, A., Bartkowiak, E., Walczak, M.** (2000). A diet with large neutral amino acids supplementation as a combined treatment for difficult to control or late diagnosed patients with PKU - preliminary data.

- Gjetting, T., Romstad, A., Haavik, J., Knappskog, P. M., Acosta, A. X., Silva, W. A., Jr., Zago, M. A., Guldberg, P. Guttler, F. (2001).** A phenylalanine hydroxylase amino acid polymorphism with implications for molecular diagnostics. *Mol Genet Metab.* 73: (3) 280-4
- Goltsov, A. A., Eisensmith, R. C., Konecki, D. S., Lichter-Konecki, U. Woo, S. L. (1992).** Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet.* 51: (3) 627-36
- Greeves, L. G., Patterson, C. C., Carson, D. J., Thom, R., Wolfenden, M. C., Zschocke, J., Graham, C. A., Nevin, N. C. Trimble, E. R. (2000).** Effect of genotype on changes in intelligence quotient after dietary relaxation in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia. *Arch Dis Child.* 82: (3) 216-21
- Guldberg, P., Mikkelsen, I., Henriksen, K. F., Lou, H. C. and Guttler, F. (1995).** In vivo assessment of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene by phenylalanine loading: characterization of seven common mutations. *Eur J Pediatr.* 154: 551-6.
- Guldberg, P., Levy, H. L., Henriksen, K. F. Guttler, F. (1996).** Three prevalent mutations in a patient with phenylalanine hydroxylase deficiency: implications for diagnosis and genetic counselling. *J Med Genet.* 33: (2) 161-4
- Guldberg, P., Rey, F., Zschocke, J., Romano, V., Francois, B., Michiels, L., Ullrich, K., Hoffmann, G. F., Burgard, P., Schmidt, H., Meli, C., Riva, E., Dianzani, I., Ponzzone, A., Rey, J. Guttler, F. (1998).** A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 63: (1) 71-9
- Guttler, F. (1980).** Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 280: 1-80
- Guttler, F., Guldberg, P. (2000).** Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S150-3

- Hofman, K. J., Steel, G., Kazazian, H. H. Valle, D.** (1991). Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet.* 48: (4) 791-8
- Huttenlocher, P. R.** (2000). The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S102-6
- Januario, J. N.** (2002). *Incidência da doença falciforme em 1.000.000 de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001)*. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre à Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte
- Jennings, I. G., Cotton, R. G. Kobe, B.** (2000). Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet.* 8: (9) 683-96
- Jia, X., Liu, J. Xiang, H.** (2000). [A new strategeutics of gene therapy for hyperphenylalaninemia rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 80: (6) 464-7
- Kaufman, S.** (1998). Genetic disorders involving recycling and formation of tetrahydrobiopterin. *Adv Pharmacol.* 42: 41-3
- Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P. J., Byck, S., Nowacki, P. Scriver, C. R.** (1997). Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 61: (6) 1309-17
- Kasnauskiene, J., Cimbalistiene, L. Kucinskas, V.** (2003). Validation of PAH genotype-based predictions of metabolic phenylalanine hydroxylase deficiency phenotype: investigation of PKU/MHP patients from Lithuania. *Med Sci Monit.* 9: (3) CR142-6
- Knudsen, G. M., Hasselbalch, S., Toft, P. B., Christensen, E., Paulson, O. B. Lou, H.** (1995). Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 18: (6) 653-64
- Koch, R., Hanley, W., Levy, H., Matalon, K., Matalon, R., Rouse, B., Trefz, F., Guttler, F., Azen, C., Platt, L., Waisbren, S., Widaman, K., Ning, J., Friedman, E. G. and de la Cruz, F.** (2003). The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002. *Pediatrics.* 112: 1523-9

- Koch, R., Moseley, K. D., Yano, S., Nelson, M., Jr. Moats, R. A.** (2003). Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol Genet Metab.* 79: (2) 110-3
- Krawczak, M. Zschocke, J.** (2003). A role for overdominant selection in phenylketonuria? Evidence from molecular data. *Hum Mutat.* 21: (4) 394-7
- Kure, S., Hou, D. C., Ohura, T., Iwamoto, H., Suzuki, S., Sugiyama, N., Sakamoto, O., Fujii, K., Matsubara, Y. Narisawa, K.** (1999). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr.* 135: (3) 375-8
- Leandro, P., Rivera, I., Ribeiro, V., de Almeida, I. T., da Silveira, C. Lechner, M. C.** (1995). Mutation analysis of phenylketonuria in south and central Portugal: prevalence of V388M mutation. *Hum Mutat.* 6: (2) 192-4
- Levy, H. L.** (1989). Molecular genetics of phenylketonuria and its implications. *Am J Hum Genet.* 45: (5) 667-70
- Lidsky, A. S., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Kwok, S. C., Daiger, S. P., Robson, K. J. Woo, S. L.** (1985). Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am J Hum Genet.* 37: (4) 619-34
- Lidsky, A. S., Robson, K. J., Thirumalachary, C., Barker, P. E., Ruddle, F. H. and Woo, S. L.** (1984). The PKU locus in man is on chromosome 12. *Am J Hum Genet.* 36: 527-33.
- Lindner, M., Haas, D., Mayatepek, E., Zschocke, J. Burgard, P.** (2001). Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Mol Genet Metab.* 73: (1) 104-6
- Lindner, M., Steinfeld, R., Burgard, P., Schulze, A., Mayatepek, E. and Zschocke, J.** (2003). Tetrahydrobiopterin sensitivity in German patients with mild phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat.* 21: 400.
- Lucke, T., Illsinger, S., Aulehla-Scholz, C., Sander, J. Das, A. M.** (2003). BH₄-sensitive hyperphenylalaninemia: new case and review of literature. *Pediatr Neurol.* 28: (3) 228-30
- MacDonald, A.** (2000). Diet and compliance in phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S136-41

- Matalon, K. M., Acosta, P. B. and Azen, C.** (2003). Role of nutrition in pregnancy with phenylketonuria and birth defects. *Pediatrics*. 112: 1534-6
- Miller, S. A., Dykes, D. D. Polesky, H. F.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: (3) 1215
- Mitnaul, L. J. and Shiman, R.** (1995). Coordinate regulation of tetrahydrobiopterin turnover and phenylalanine hydroxylase activity in rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 885-9
- Moats, R. A., Moseley, K. D., Koch, R. and Nelson, M., Jr.** (2003). Brain phenylalanine concentrations in phenylketonuria: research and treatment of adults. *Pediatrics*. 112: 1575-9
- Nagasaki, Y., Matsubara, Y., Takano, H., Fujii, K., Senoo, M., Akanuma, J., Takahashi, K., Kure, S., Hara, M., Kanegae, Y., Saito, I. Narisawa, K.** (1999). Reversal of hypopigmentation in phenylketonuria mice by adenovirus-mediated gene transfer. *Pediatr Res.* 45: (4 Pt 1) 465-73
- Nelson, D. L., Cox, M. M.** (2000). Bioenergetics and metabolism. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, New York, pp. 485-903
- Ng, T. W., Rae, A., Wright, H., Gurry, D. Wray, J.** (2003). Maternal phenylketonuria in Western Australia: pregnancy outcomes and developmental outcomes in offspring. *J Paediatr Child Health.* 39: (5) 358-63
- Nowacki, P. M., Byck, S., Prevost, L. Scriver, C. R.** (1998). PAH Mutation Analysis Consortium Database: 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. *Nucleic Acids Res.* 26: (1) 220-5
- Okano, Y., Eisensmith, R. C., Guttler, F., Lichter-Konecki, U., Konecki, D. S., Trefz, F. K., Dasovich, M., Wang, T., Henriksen, K., Lou, H. et al.** (1991). Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med.* 324: (18) 1232-8
- Ozalp, I., Coskun, T., Ceyhan, M., Tokol, S., Oran, O., Erdem, G., Tekinalp, G., Durmus, Z. and Tarikahya, Y.** (1986). Incidence of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in a sample of the newborn population. *J Inherit Metab Dis.* 9 (Suppl 2): 237

- Pardridge, W. M.** (1998). Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 23: (5) 635-44
- Perez, B., Desviat, L. R., De Lucca, M. and Ugarte, M.** (1994). Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. *Acta Paediatr Suppl.* 407: 34-6
- Perez, B., Desviat, L. R. and Ugarte, M.** (1997). Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet.* 60: (1) 95-102
- Perez, B., Desviat, L. R., De Lucca, M., Cornejo, V., Raimann, E. and Ugarte, M.** (1999). Molecular characterization of phenylalanine hydroxylase deficiency in Chile. Mutations in brief no. 243. Online. *Hum Mutat.* 13: 503.
- Perez, B., Desviat, L. R., De Lucca, M., Schmidt, B., Loghin-Grosso, N., Giugliani, R., Pires, R. F. Ugarte, M.** (1996). Mutation analysis of phenylketonuria in south Brazil. *Hum Mutat.* 8: (3) 262-4
- Perez, B., Desviat, L. R., Die, M., Cornejo, V., Chamoles, N. A., Nicolini, H. Ugarte, M.** (1993). Presence of the Mediterranean PKU mutation IVS10 in Latin America. *Hum Mol Genet.* 2: (8) 1289-90
- Pey, A. L., Desviat, L. R., Gamez, A., Ugarte, M. Perez, B.** (2003). Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat.* 21: (4) 370-8
- Pietz, J., Kreis, R., Rupp, A., Mayatepek, E., Rating, D., Boesch, C. Bremer, H. J.** (1999). Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 103: (8) 1169-78
- Pietz, J., Lutz, T., Zwygart, K., Hoffmann, G. F., Ebinger, F., Boesch, C. and Kreis, R.** (2003). Phenylalanine can be detected in brain tissue of healthy subjects by ¹H magnetic resonance spectroscopy. *J Inherit Metab Dis.* 26: 683-92.
- Przyrembel, H. Bremer, H. J.** (2000). Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S12□□__
- Reis A. H.,** (2003). *Freqüência da mutação R261X em pacientes com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais.* Monografia apresentada para

obtenção do título de Bacharel em Genética, ao Departamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte

- Rey, F., Abadie, V., Lyonnet, S., Berthelon, M., Caillaud, C., Melle, D., Labrune, P., Saudubray, J. M., Munnich, A. Rey, J.** (1992). Phenotypic expression of 12 mutations of the phenylalanine hydroxylase gene. *Arch Fr Pediatr.* 49: (8) 705-10
- Rivera, I., Leandro, P., Lichter-Konecki, U., Tavares de Almeida, I. Lechner, M. C.** (1998). Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet.* 35: (4) 301-4
- Rivera, I., Cabral, A., Almeida, M., Leandro, P., Carmona, C., Eusebio, F., Tasso, T., Vilarinho, L., Martins, E., Lechner, M. C., de Almeida, I. T., Konecki, D. S. Lichter-Konecki, U.** (2000). The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Genet Metab.* 69: (3) 195-203
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press) Cold Spring Harbor, New York, pp. 5.40-5.46
- Santana da Silva, L. C., Carvalho, T. S., da Silva, F. B., Morari, L., Fachel, A. A., Pires, R., Refosco, L. F., Desnick, R. J., Giugliani, R., Saraiva Pereira, M. L.** (2003). Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol Genet Metab.* 79 (1): 17-24
- Santos, F. R., Pena, S. D. Epplen, J. T.** (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet.* 90: (6) 655-6
- Sarkissian, C. N., Shao, Z., Blain, F., Peevers, R., Su, H., Heft, R., Chang, T. M. Scriver, C. R.** (1999). A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: (5) 2339-44
- Scriver, C. C.** (1998). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, *Pediatrics*, 1963;32:318-343. *Pediatrics.* 102: (1 Pt 2) 236-7

- Scriver, C. R.** (2002). Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr.* 140: (5) 502-6
- Scriver, C. R., Hurtubise, M., Konecki, D., Phommarinh, M., Prevost, L., Erlandsen, H., Stevens, R., Waters, P. J., Ryan, S., McDonald, D. Sarkissian, C.** (2003). PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat.* 21: (4) 333-44
- Scriver, C. R., Kaufman, S.,** (2001). Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill. pp 1667–1724.
- Scriver, C. R., Waters, P. J.** (1999). Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* 15: (7) 267-72
- Scriver, C. R., Waters, P. J., Sarkissian, C., Ryan, S., Prevost, L., Cote, D., Novak, J., Teebi, S. Nowacki, P. M.** (2000). PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Hum Mutat.* 15: (1) 99-104
- Shiman, R., Xia, T., Hill, M. A. and Gray, D. W.** (1994). Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. II. Substrate binding and the role of activation in the control of enzymatic activity. *J Biol Chem.* 269: 24647-56.
- Smith, I. and Knowles, J.** (2000). Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S89-93
- Sokal, R. R., & Rohlf J.** (1969). Analysis of Frequencies. In: Emerson, R., Kennedy, D, Park, R. B., Beadle, G. B., Whitaker, D. M., editors. *Biometry.* New York: W.H. Freeman and company. pp 549-610.
- Spaapen, L. J. Rubio-Gozalbo, M. E.** (2003). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab.* 78: (2) 93-9
- Starling, A. L. P., Aguiar, M. J. B., Kanufre, V. C., Soares, S. F.** (1999). Fenilcetonúria. *Rev Med Minas Gerais* 9: (3) 106-110
- Start, K.** (1998). Treating phenylketonuria by a phenylalanine-free diet. *Prof Care Mother Child.* 8: (4) 109-10

- Steinfeld, R., Kohlschutter, A., Ullrich, K. and Lukacs, Z. (2003).** A hypothesis on the biochemical mechanism of BH(4)-responsiveness in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Amino Acids*. 25: 63-8.
- Surtees, R. Blau, N. (2000).** The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 159 Suppl 2: S109-13
- Teigen, K., Froystein, N. A. Martinez, A. (1999).** The structural basis of the recognition of phenylalanine and pterin cofactors by phenylalanine hydroxylase: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 294: (3) 807-23
- Thony, B., Auerbach, G. Blau, N. (2000).** Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*. 347 Pt 1: 1-166
- Tyfield, L. A., Stephenson, A., Cockburn, F., Harvie, A., Bidwell, J. L., Wood, N. A., Pilz, D. T., Harper, P. and Smith, I. (1997).** Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. *Am J Hum Genet*. 60: 388-96
- Waisbren, S. E., Mahon, B. E., Schnell, R. R. and Levy, H. L. (1987).** Predictors of intelligence quotient and intelligence quotient change in persons treated for phenylketonuria early in life. *Pediatrics*. 79: 351-5
- Walter, J. H., White, F. J., Hall, S. K., MacDonald, A., Rylance, G., Boneh, A., Francis, D. E., Shortland, G. J., Schmidt, M. Vail, A. (2002).** How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet*. 360: (9326) 55-7
- Weglage, J., Wiedermann, D., Denecke, J., Feldmann, R., Koch, H. G., Ullrich, K. Moller, H. E. (2002).** Individual blood-brain barrier phenylalanine transport in siblings with classical phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 25: (6) 431-6
- Woo, S. L., Lidsky, A. S., Guttler, F., Chandra, T. Robson, K. J. (1983).** Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*. 306: (5939) 151-5
- Woo, S. L. (1989).** Molecular basis and population genetics of phenylketonuria. *Biochemistry*. 28: 1-7.

- Woolf, L. I., McBean, M. S., Woolf, F. M. Cahalane, S. F. (1975).** Phenylketonuria as a balanced polymorphism: the nature of the heterozygote advantage. *Ann Hum Genet.* 38: (4) 461-9
- Woolf, L. I. (1986).** The heterozygote advantage in phenylketonuria. *Am J Hum Genet.* 38: (5) 773-5
- Yang, Y., Drummond, B. M., Garcia, H. J. (2001).** Molecular analysis of phenylketonuria (PKU) in Newborns from Texas. *Hum Mutat* 17 (6) 523
- Zorzi, G., Thony, B. Blau, N. (2002).** Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *J Neurochem.* 80: (2) 362-4
- Zschocke, J., Graham, C. A., Carson, D. J. Nevin, N. C. (1995).** Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. *Am J Hum Genet.* 57: (6) 1311-7
- Zschocke, J. (2003).** Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 21: (4) 345-56

OMIM - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

PAHdb - <http://www.macgill.ca/pahdb>

SUS - Sistema Único de Saúde - <http://www.datasus.gov.br>

ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto: ESPECTRO E FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES CAUSADORAS DE FENILCETONÚRIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Este projeto está sendo proposto com o objetivo de esclarecer que mutações causam a fenilcetonúria no Estado de Minas Gerais.

A fenilcetonúria é uma doença genética. Os pacientes apresentam aumento de fenilalanina no sangue. A fenilalanina faz parte das proteínas dos alimentos. Dentro do nosso corpo, ela sofrerá modificações: através de uma série de transformações, a fenilalanina dará origem a muitos compostos importantes para o nosso organismo. Estas transformações são feitas por enzimas. A deficiência de uma destas enzimas, chamada fenilalanina hidroxilase, causa a fenilcetonúria.

Para uma pessoa apresentar fenilcetonúria, é preciso que ela receba uma cópia defeituosa (mutação) do gene que codifica a fenilalanina hidroxilase do pai e outra da mãe. Pessoas que têm uma cópia defeituosa e uma cópia normal, não têm a doença, mas podem transmiti-la a seus filhos. Estas pessoas são chamadas de heterozigotas.

Mais de 300 mutações diferentes já foram identificadas no gene da fenilalanina hidroxilase. A criança afetada pode ter duas mutações iguais ou diferentes. Algumas destas mutações já são bem conhecidas, outras não. Se uma criança com fenilcetonúria tem mutações bem conhecidas, é possível ter uma idéia mais clara sobre como a doença será nesta criança.

Para sabermos qual(ais) a(s) mutação(ções) presente(s) em uma criança precisamos colher uma pequena quantidade de sangue desta criança. Esta amostra de sangue será usada para identificarmos que mutações provocam a fenilcetonúria na criança. Quando soubermos o resultado do exame, os pais serão informados pelos médicos da equipe dos resultados.

Para a realização do exame precisamos colher uma pequena quantidade de sangue (3 a 10 ml) no braço do seu(sua) filho(a) através de agulha. O material usado é todo descartável, não causando riscos para seu(sua) filho(a). O único incômodo é a dor da picada, que é discreta e dura pouco (menos de um minuto). O exame não é obrigatório. Cabe aos pais ou responsáveis decidir se desejam autorizar a participação da criança na pesquisa ou não. Se a pessoa não desejar autorizar a participação da criança na pesquisa, não tem problema, a criança continuará a ser atendida da mesma forma pelos membros da equipe.

Caso os pais autorizem a participação da criança na pesquisa, garantimos a todos o sigilo sobre os dados clínicos e laboratoriais, e a proteção de sua identidade, em caso de publicação na imprensa científica ou leiga.

O participante deve ter ciência de que, mesmo após a assinatura deste termo, ele pode se desligar do projeto, à qualquer momento, se isto lhe convier. No final do termo de consentimento há os telefones do pesquisador e do órgão da Universidade que controla as pesquisas. Qualquer dúvida, os pais ou responsáveis poderão ligar para um dos números. Uma cópia deste termo será entregue aos pais ou responsáveis.

Eu, _____, _____ anos, tendo lido o termo acima e esclarecidas eventuais dúvidas, declaro minha decisão em participar do projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, ----1----1-----.

Eu, _____, _____ anos, abaixo assinado,----- mãe,----- pai,----- ou responsável por _____, _____ anos, tendo lido o termo acima e esclarecido todas as minhas dúvidas, autorizo a participação de meu filho (ou minha filha) no projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, ----1----1-----.

Assinatura da mãe, pai ou responsável:-----.

Eu, _____ abaixo assinado, confirmo ter lido este termo de consentimento informado juntamente com o (a) Sr.(a) _____, respondido suas perguntas e explicado todas as possíveis implicações de sua participação no projeto. Confirmo outrossim que deixei claro que caso não desejem participar na pesquisa isto não terá qualquer repercussão no atendimento que recebem neste Serviço.

Belo Horizonte, ----1----1-----.

Assinatura do profissional:-----.

Pesquisador responsável: Marcos José B. Aguiar, Telefone: 3274-3453

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
Telefone: 32489364

ANEXO 2 - Reagentes e fornecedores

Reagentes	Firmas
dNTPs Oligonucleotídeos (iniciadores para PCR)	GibcoBRL – Bethesda Research Laboratories
Acetato de sódio Ácido acético Ácido bórico Cloreto de sódio Etanol Tritriplex III Hidróxido de sódio Azul de bromofenol Formaldeído Nitrato de prata	Merck S.A.
Proteinase K Trisma base Brometo de etídio EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético)	Sigma Chemical Company, via SARDI
SDS (duodecilsulfato de sódio) Tris-HCl Ficol 400 Persulfato de amônia Agarose Marcador de peso molecular ladder 50 pb TEMED (N', N', N', N'-terametil etilenodiamina)	Amersham Pharmacia Biotech
Taq DNA polimerase	Phoneutria - Biotecnologia e serviços
Ddel Hinfl Rsal TaqI	Promega Corporation Invitrogen
Acrilamida	Vetec

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)