

Myrian de Castro Magalhães Xavier

Dissertação de Mestrado

FREQÜÊNCIA DAS MUTAÇÕES
V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e
R408W, EM INDIVÍDUOS COM
FENILCETONÚRIA DO ESTADO DE
MINAS GERAIS

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2003

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 28 de abril de 2003, pela Banca examinadora constituída pelos professores:




Prof. Cláudia Graca da Fonseca



Prof. Roberto Giugliani



Prof. Maria Bernadete Lovato



Prof. Maria Raquel Santos Carvalho

Myrian de Castro Magalhães Xavier

**FREQÜÊNCIA DAS MUTAÇÕES
V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 E R408W, 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. Cleusa Graça da Fonseca

Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Prof^ª Maria Raquel Carvalho

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2003

Aos meus filhos, Felipe e Maria Beatriz,
para que acreditem que não há sonho impossível

Aos portadores de PKU,
na esperança de que este trabalho venha a contribuir para que tenham
uma vida melhor

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do empenho de várias pessoas, cujo compromisso com a ciência não mede esforços para suplantar as dificuldades em se fazer pesquisa com recursos escassos e em condições muito longe das ideais. Como forma de reconhecimento a todas estas pessoas, que tornaram possível a realização deste trabalho, gostaria de agradecer:

À professora Dra. Cleusa Graça da Fonseca, pelo crédito, orientação e apoio;

À professora Maria Raquel Santos Carvalho, pela orientação, incentivo, ensinamentos e críticas;

A todos os professores do Mestrado de Genética, por contribuírem para a aquisição de conhecimentos;

Aos funcionários do Departamento pela dedicação, amizade e carinho;

Aos colegas de Mestrado, Cristina, Letícia, Daniela, Rodrigo e Lino, pela amizade e estímulo;

À Luciana Lara pela grande colaboração, disponibilidade, entusiasmo e pela amizade que se desenvolveu entre nós;

Às companheiras de laboratório, Adriana, Ana Luiza, Luciene, Paula, Daiane e Joana, pela colaboração e agradável convivência;

Aos professores Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos, Dr. Edmar Chartone de Souza, Dr. Wilham Jorge, Dr. José Miguel Ortega e Dr. Kenneth J. Gollob, pela disponibilização de equipamentos. Aos colegas destes laboratórios, pela paciência e disponibilidade;

À Profa. Dra. Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, pela inestimável ajuda com as análises estatísticas;

Aos pacientes que participaram desta pesquisa e seus familiares, pela pronta contribuição e interesse;

À equipe dedicada do Ambulatório de Fenilcetonúria do Ambulatório São Vicente, pela contribuição e empenho;

Ao NUPAD, pela coleta das amostras e fornecimento de dados;

À Associação dos Pais e Amigos dos Pacientes Fenilcetonúricos e ao Instituto de Saúde da Mulher e da Criança pela divulgação e apoio;

À grande amiga Patrícia Maria Paixão Vaintraub pelo incentivo, carinho e compreensão;

Ao Márcio Antônio pela disponibilidade e colaboração com as ricas discussões;

Aos meus irmãos, Gustavo e Guilherme, pelo carinho e apoio constantes e pela compreensão nos momentos ausentes;

Às minhas tias e familiares, pelo carinho, presença e apoio incondicional;

Aos meus falecidos pais, pela vida, exemplo e fonte eterna de inspiração;

Aos meus filhos, Felipe e Maria Beatriz, pelo amor, carinho, incentivo, tolerância, ajuda e compreensão pelas horas dedicadas ao trabalho;

A todos o meu muito obrigada.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. APRESENTAÇÃO E RELEVÂNCIA	14
1.3. ASPECTOS CLÍNICOS	18
1.4. A SÍNDROME DA PKU MATERNA	19
1.5. ASPECTOS BIOQUÍMICOS	19
1.6. ASPECTOS NEUROQUÍMICOS	23
1.6.1. <i>Deficiência de neurotransmissores</i>	24
1.6.2. <i>Redução de síntese protéica</i>	25
1.6.3. <i>Anormalidades na mielinização</i>	25
1.7. TRATAMENTO	26
1.7.1. <i>Tratamento convencional: dieta pobre em fenilalanina</i>	26
1.7.2. <i>Alternativas de tratamento</i>	27
1.7.2.1. <i>Tabletes de PreKUnil</i>	28
1.7.2.2. <i>Administração de BH₄</i>	28
1.7.2.3. <i>Administração de fenilalanina amônia liase: testes terapêuticos usando modelos animais</i>	30
1.8. ASPECTOS MOLECULARES	31
1.8.1. <i>O gene e a enzima</i>	31
1.8.2. <i>Os haplótipos</i>	34
1.8.3. <i>As mutações</i>	35
1.9. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E POPULACIONAIS	36
1.9.1. <i>Heterogeneidade de locus e alta taxa de mutação</i>	37
1.9.2. <i>Efeitos da intervenção terapêutica nas freqüências alélicas</i>	38
1.9.3. <i>Heterose na PKU</i>	38

1.9.4. <i>Deriva genética e efeito fundador na PKU</i>	40
1.9.5. <i>Complementação interalélica</i>	40
1.9.6. <i>Problemas para estimativa das frequências alélicas na PKU</i>	41
1.9.7. <i>Estudos evolutivos usando o locus PAH</i>	42
1.10. A PKU NO BRASIL	43
1.11. A PKU EM MINAS GERAIS	44
1.12. ESCOLHA DAS MUTAÇÕES	44
1.12.1. <i>Mutação V388M</i>	46
1.12.2. <i>Mutação IVS10nt11</i>	49
1.12.3. <i>Mutação IVS12nt1</i>	52
1.12.4. <i>Mutação R408W</i>	55
1.13. OBJETIVOS	58
1.13.1. <i>Geral</i>	58
1.13.2. <i>Específicos</i>	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1. A AMOSTRA	59
2.1.1. <i>Composição da amostra</i>	59
2.1.2. <i>Coleta do sangue</i>	63
2.2. EXTRAÇÃO DO DNA	64
2.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR	65
2.4. DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO	67
2.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	67
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
2.7. COMPOSIÇÃO DOS MAPAS MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MUTAÇÕES	68
3. RESULTADOS	69
3.1. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA	69
3.1.1. <i>Amplificação por PCR dos éxons 11 e 12 do gene PAH</i>	69
3.1.2. <i>Deteccção dos RFLPs gerados pelas diferentes mutações</i>	73
3.1.2.1. <i>A deteção da mutação V388M</i>	73
3.1.2.2. <i>A deteção da mutação IVS10nt11</i>	75

3.1.2.3. A detecção da mutação IVS12nt1	77
3.1.2.4. A detecção da mutação R408W	79
3.2. CONTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES V388M, R408W, IVS10nt11, IVS12nt1 PARA A PKU EM MG	84
3.2.1. <i>Fração de alelos identificados com esta abordagem</i>	84
3.2.2. <i>Freqüências alélicas e genotípicas</i>	86
3.2.3. <i>Distribuição geográfica da PKU em Minas Gerais</i>	87
3.2.4. <i>Distribuição geográfica dos alelos V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e R408W no Estado de Minas Gerais</i>	87
3.3. CONTRIBUIÇÃO DA CONSANGÜINIDADE PARA A PKU EM MG	93
3.4. AVALIAÇÃO DAS INFLUÊNCIAS FENOTÍPICAS DOS DIFERENTES ALELOS E GENÓTIPOS	94
4. DISCUSSÃO	98
5. CONCLUSÕES	105
SUMMARY	108
BIBLIOGRAFIA	109
ANEXO A	122
ANEXO B	124

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Classificação das HPAs conforme os níveis séricos e tolerância à fenilalanina	17
TABELA 2	Mutações identificadas no gene <i>PAH</i> em populações européias e em negros norte-americanos	45
TABELA 3	Frequência relativa da mutação V388M em diferentes populações	46
TABELA 4	Frequência relativa da mutação IVS10nt11 em diferentes populações	49
TABELA 5	Frequência relativa da mutação IVS12nt1 em diferentes populações	52
TABELA 6	Frequência relativa da mutação R408W em diferentes populações	55
TABELA 7	Distribuição da amostra conforme a fonte de averiguação	60
TABELA 8	Classificação das HPAs em MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico	61
TABELA 9	Classificação das HPAs em MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina após sobrecarga	62
TABELA 10	Pacientes com PKU de MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina após sobrecarga	62
TABELA 11	Casamentos consangüíneos entre os pais de pacientes com PKU de MG	63
TABELA 12	Iniciadores para análise de mutações	66
TABELA 13	Frequência relativa das mutações V388M, IVS10nt11 e IVS12nt1 em pacientes do Estado de Minas Gerais	85
TABELA 14	Frequência relativa da mutação R408W em pacientes do Estado de Minas Gerais	86
TABELA 15	Distribuição dos alelos identificados em homozigose ou heterozigose	87

TABELA 16	Parâmetros fenotípicos de pacientes de MG com genótipo determinado	95
TABELA 17	Distribuição dos valores de fenilalanina sérica ao diagnóstico e no teste de sobrecarga conforme classe genotípica	97

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Rotas metabólicas envolvendo a fenilalanina e a tetraidrobiopterina	21
FIGURA 2	Estrutura do <i>locus PAH</i>	33
FIGURA 3	Representação tridimensional da enzima PAH	33
FIGURA 4	Princípio teórico de detecção da mutação V388M	48
FIGURA 5	Princípio teórico de detecção da mutação IVS10nt11	51
FIGURA 6	Princípio teórico de detecção da mutação IVS12nt1	54
FIGURA 7	Princípio teórico de detecção da mutação R408W	57
FIGURA 8	Produto da amplificação por PCR do éxon 11	71
FIGURA 9	Produto da amplificação por PCR do éxon 12	72
FIGURA 10	Detecção da mutação V388M	74
FIGURA 11	Detecção da mutação IVS10nt11	76
FIGURA 12	Detecção da mutação IVS12nt1	78
FIGURA 13	Detecção da mutação R408W usando controle positivo de digestão por conjunto de reações	81
FIGURA 14	Controle positivo de digestão para detecção da mutação R408W	82
FIGURA 15	Detecção da mutação R408W usando controle positivo de digestão por reação	83
FIGURA 16	Distribuição geográfica dos pacientes com PKU em MG	88
FIGURA 17	Distribuição geográfica dos alelos V388M em MG	89
FIGURA 18	Distribuição geográfica dos alelos IVS10nt11 em MG	90
FIGURA 19	Distribuição geográfica dos alelos IVS12nt1 em MG	91
FIGURA 20	Distribuição geográfica do alelo R408W em MG	92

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µmol	micromol
5-HT	5-hidroxitriptofano
ACRS	<i>amplification created restriction sites</i> , amplificação de sítios de restrição criados
BH ₄	tetraidrobiopterina
BTBR- <i>Pah</i> ^{enu2}	camundongo mutante para o gene PAH
cDNA	DNA complementar a um RNA
CpG	5' CG 3'
DHNP	D-eritro-diidroneopterina trifosfato
DHPR	diidropterina redutase
DNA	ácido desoxirribonucleico
Fen	fenilalanina
GTP	guanosina trifosfato
GTPCH	guanosina trifosfato cicloidrolase
HPA	hiperfenilalaninemia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVS10nt11	mutação por substituição de base, envolvendo o nucleotídeo -11 do íntron 10 do gene PAH. Esta mutação também é referida como IVS10nt546
IVS12nt1	mutação por substituição de base, envolvendo o nucleotídeo 1 do íntron 12 do gene PAH
kb	quilobases
kDa	quilo Daltons
Kg	quilogramas
LNAAs	aminoácidos grandes e neutros (fenilalanina, tirosina, triptofano, leucina, isoleucina, histidina, metionina e treonina)
M	molar

mg/d	miligrama por dia
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NADH	dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzido
ng	nanogramas
nmol	nanomol
NUPAD	Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAH	fenilalanina hidroxilase
PAL	fenilalanina amônia liase
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
PKU	fenilcetonúria
PTP	6-piruvol-tetraidropterina
PTPS	6-piruvol-tetraidropterina sintase
qBH2	quinóide diidrobiopterina
R408W	mutação no gene PAH, que leva à substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano, no resíduo 408 da proteína
RFLP	polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
rpm	rotações por minuto
SR	sepiapterina redutase
STR	repetições curtas em <i>tandem</i>
T ₃ e T ₄	Triiodotironina e tiroxina
Tir	tirosina
TRH	triptofano hidroxilase
Trp	triptofano
TYH	tirosina hidroxilase
V388M	mutação no gene PAH, que leva à substituição do aminoácido valina pelo aminoácido metionina, no resíduo 388 da proteína
VNTR	número variável de repetições em <i>tandem</i>

RESUMO

A fenilcetonúria é uma doença autossômica recessiva, causada por deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que converte a fenilalanina em tirosina. A dieta pobre em fenilalanina previne o retardo mental, tornando o diagnóstico precoce fundamental. Mais de 400 mutações foram descritas no gene *PAH*. Suas frequências variam conforme a população. Diversas delas tiveram sua atividade residual prevista (PRA) em estudos de expressão *in vitro*, permitindo antever o prognóstico. No Brasil, foram estudadas amostras de São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS). Em Minas Gerais (MG), onde são triados de 23.000 a 26.000 recém-nascidos/mês, a frequência de PKU é de 1:20.000. Como parte de um projeto maior de caracterização de mutações causadoras de PKU em MG, foram triadas as mutações V388M, IVS10nt11, IVS12nt1, R408W em 100 indivíduos com PKU. Foram identificados 65/200 alelos, correspondendo a 31% da amostra, com as seguintes frequências relativas: 42 alelos V388M (21%), 21 IVS10nt11 (10,5%), 2 IVS10nt1 (1%) e 1 R408W (0,75%). Dos 70 recém-nascidos averiguados por triagem neonatal, a frequência relativa foi: 19,3% V388M, 11,5% IVS10nt11, 0,7% IVs12nt1 e 1 (0,98%) R408W. A frequência da mutação V388M é a maior já descrita, sendo o dobro das de SP ou Portugal e o triplo das de RS e Espanha. A frequência da mutação IVS10nt11 foi similar à de Portugal e Espanha. Esta frequência contrasta com a de SP (17,4%), onde ela é a mutação mais comum. Esta mutação não foi encontrada no RS. A mutação IVS12nt1 apresentou frequência similar à descrita em Portugal., mas diferente das de SP (1,3 a 2,5%) e RS (6%). A frequência observada da mutação R408W, também é mais similar às de Portugal e Espanha. Valores mais altos foram relatados em SP (3,5%) e no RS (6%). A frequência destas mutações nas populações brasileiras sugere que a população mineira seja mais similar à portuguesa do que à paulista ou a gaúcha, que refletem maior contingente de descendentes de imigrantes do centro e leste da Europa. A distribuição geográfica dos pacientes com PKU e das mutações não sugere a existência de agregação regional. Sob o pressuposto de equilíbrio de Hardy-Weinberg, assumindo-se uma incidência da PKU em MG de 1:20.000, a frequência de heterozigotos na população mineira seria de 1:71. Esta frequência é menor do que a europeia (1:50). A frequência de casamentos consangüíneos entre os pais dos pacientes foi 22,3%. A consangüinidade aumenta a frequência dos genótipos homozigotos, levando a superestimativas das frequências alélicas e de heterozigotos. O genótipo V388M/V388M apareceu associado a níveis baixos de fenilalanina ao diagnóstico. Entretanto, 8/9 casos desenvolveram PKU clássica. Este achado não está de acordo com a PRA para este alelo, que acarretaria PKU leve. Em heterozigose, a mutação V388M aparece associada a fenótipos que variam de PKU leve à clássica. Esta variação pode refletir o efeito do alelo contralateral. A grande variação observada nos níveis de fenilalanina ao diagnóstico e sua baixa correlação com o diagnóstico nos primeiros meses de vida apontam para o seu baixo valor prognóstico, reforçando a necessidade da triagem de mutações.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação e relevância

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença grave, com manifestações clínicas importantes, como o retardo mental, e que apresenta uma frequência relativamente alta em populações caucasianas.

O diagnóstico precoce da doença é de grande importância para a instituição da terapia correta em tempo hábil. Através do programa de triagem neonatal, desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio e Diagnóstico e do Ambulatório de Fenilcetonúria da Faculdade de Medicina da UFMG, o diagnóstico precoce e o tratamento já vêm sendo realizados no Estado de Minas Gerais. Este programa foi implantado em 1994, atinge uma cobertura média de 94 % dos nascimentos do Estado, triando de 23.000 a 26.000 nascimentos ao mês, com um total de mais de 2.000.000 recém-nascidos testados até o presente.

Embora em nível mundial sejam muitos os estudos, ainda há pouca informação sobre as bases moleculares da PKU no Brasil. Os trabalhos desenvolvidos até agora, caracterizaram principalmente pacientes de São Paulo (Pérez e cols., 1996; Acosta e cols., 2000) e do Rio Grande do Sul (Pérez e cols., 1996). As informações sobre PKU em pacientes negros restringem-se a

um estudo desenvolvido nos Estados Unidos, em uma amostra de 16 pacientes negros norte-americanos (Hofman e cols., 1991). Não há descrição de mutações causando PKU em indígenas.

O Brasil é um país de extenso território e as populações das várias regiões se originaram de diferentes misturas de etnias, o que torna fundamental a caracterização molecular da PKU em cada região. Este é um dos objetivos do projeto PKU Brasil, que vai reunir os dados dos grupos de pesquisa regionais levando a uma melhor compreensão da doença, como ela acontece no Brasil. Através do NUPAD, do Ambulatório de Fenilcetonúria da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas, a UFMG participa do projeto PKU Brasil. Além das mutações que foram alvo do presente estudo, outras 5 cinco estão sendo testadas por outros membros do grupo de pesquisa. O presente trabalho é o primeiro a estudar indivíduos com PKU do Estado de Minas Gerais. Esta investigação, poderá levar ao delineamento de políticas assistenciais específicas para a nossa população.

Para os indivíduos afetados pela PKU, o diagnóstico molecular permitirá, em muitos casos, prever-se a gravidade da doença, a resposta à interrupção da dieta, e mesmo o rigor com que a dieta deve ser imposta para cada paciente. Através de estudos de expressão *in vitro* foi possível prever a atividade residual de diversas mutações causadoras de PKU. Além disso, pacientes portadores de algumas mutações específicas respondem a novos tratamentos alternativos, que permitem relaxar a dieta e em alguns casos até interrompê-la, o que representa uma melhora muito grande na qualidade de vida da pessoa com PKU e de sua família.

Portanto, fazer-se o diagnóstico molecular tão logo se detecte a doença é de grande importância, para confirmação do diagnóstico bioquímico, para definição de condutas terapêuticas e aconselhamento genético das famílias.

1.2. Definição e classificação

A fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600) é uma doença genética, transmitida de forma autossômica recessiva. É o erro inato do metabolismo de aminoácidos mais comum, afetando cerca de 1:10.000 indivíduos em várias populações caucasianas estudadas, com uma frequência de heterozigotos estimada em 2 % (revisto por Bickel e cols., 1973; Woo e cols., 1983; Eisensmith & Woo, 1992).

A PKU faz parte de um grupo de distúrbios metabólicos denominados hiperfenilalaninemias (HPAs). Como muitos erros inatos de metabolismo em humanos, as HPAs compreendem um amplo espectro de fenótipos clínicos e bioquímicos (Avigad e cols., 1991).

A maior parte das HPAs (98% a 99%) tem como causa primária a perda ou a redução da atividade da fenilalanina hidroxilase (PAH; fenilalanina 4-mono-oxigenase; EC1.14.16.1). Esta enzima é ativa nos hepatócitos humanos onde converterá, por hidroxilação irreversível, a fenilalanina (Fen) em tirosina (Tir). As HPAs também apresentam heterogeneidade de *locus*. Cerca de 1% a 2% dos casos são devidos a defeitos nos genes responsáveis pela biossíntese e regeneração da tetraidrobiopterina redutase (BH₄), cofator indispensável para ação da PAH (revisto por Scriver e cols., 1995). Os aspectos bioquímicos das HPAs serão discutidos em detalhe adiante.

As variantes das HPAs são caracterizadas com base nos níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico, ao teste de sobrecarga e na tolerância à fenilalanina. Usando estes critérios, para fins de diagnóstico e tratamento, quatro classes principais de HPA podem ser identificadas: PKU clássica, PKU moderada, PKU leve e HPAs não-PKU (TAB.1).

TABELA 1

Classificação das HPAs conforme os níveis séricos e a tolerância à fenilalanina

Tipos de HPA	Níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico	Tolerância à Fenilalanina
PKU clássica	> 1,2 mM	Tolerância baixa 250 - 350 mg/d
PKU moderada	0,9 – 1,2 mM	Tolerância média 350 – 400 mg/d
PKU leve	< 0,9 mM,	Tolerância média 400 – 600 mg/d
HPA não-PKU	0,25 – 0,8 mM	Tolerância normal Até > 600 mg/d

FONTE - adaptada de Güttler, 1980 e Guldberg e cols., 1998.

A PKU clássica é a expressão clínica de uma HPA severa, resultado de uma deficiência grave da atividade da PAH, com níveis séricos de fenilalanina acima de 1,2 mM. As formas moderada e leve provavelmente resultam de variantes da enzima PAH com maior atividade residual. As HPAs não-PKU são benignas e não requerem o tratamento. Além disto, as HPAs também podem aparecer de forma transitória. Os níveis séricos de fenilalanina são elevados ao nascimento, voltando ao normal após alguns meses de vida (revisto por Güttler, 1980; Avigad e cols., 1991; revisto por Scriver e cols., 1995; Guldberg e cols., 1998).

1.3. Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da PKU são decorrentes do acúmulo de fenilalanina e metabólitos secundários no sangue e outros líquidos corporais dos indivíduos afetados (revisado por Scriver e cols., 1995; Pérez e cols., 1997).

Indivíduos com PKU clássica não tratados apresentam:

- atraso de desenvolvimento psicomotor e retardo mental em graus variados;
- urina com odor característico, resultante da eliminação de fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato, o que justifica o uso do termo fenilcetonúria;
- crises convulsivas;
- *déficit* de crescimento;
- diminuição da pigmentação cutânea e eczema (Woo e cols., 1983; revisado por Scriver e cols., 1995; Nelson & Cox, 2000; OMIM).

Além desses sintomas, existem descrições de que, mesmo com a introdução de tratamento precoce, a maioria das crianças com PKU apresenta valores de QI mais baixos que o observado em seus familiares, dificuldade de aprendizado, além de dificuldades emocionais na adolescência (revisado por Levy, 1989; revisado por Scriver e cols., 1995).

Indivíduos com PKU ainda podem apresentar anormalidades na substância branca cerebral, visualizadas através de imagens de ressonância nuclear magnética. Estas alterações apresentam correlação positiva com a concentração de fenilalanina no sangue à época da realização do exame e mostram certo grau de reversibilidade sob concentrações menores de fenilalanina (Cleary e cols., 1995).

Adultos que interrompem o tratamento podem apresentar declínio das funções motoras e cognitivas, aumento da frequência de eczema, asma,

dor de cabeça e hiper e/ou hipoatividade (Thompson e cols., 1990; Koch e cols., 2002).

1.4. A Síndrome da PKU materna

A Síndrome da PKU materna é uma condição provocada pela exposição do feto a níveis altos de fenilalanina e seus derivados, durante a gestação de uma mãe com PKU, independente do genótipo do concepto. Além de malformações congênitas múltiplas e retardo mental, pode ocorrer morte intra-uterina. A frequência das anormalidades observadas na Síndrome da PKU materna apresenta correlação positiva com os níveis de fenilalanina no sangue materno (Woolf e cols., 1975; OMIM). Existem dados de que dois terços das mulheres com PKU grávidas nos Estados Unidos não seguiam a dieta antes da gravidez (Walter e cols., 2002; Brown e cols., 2002).

Além disto, foi descrito que, mesmo com a manutenção do tratamento durante a gestação, aproximadamente 30% das crianças nascidas de mães com PKU apresentam problemas sociais e de comportamento (Waisbren e cols., 2000).

1.5. Aspectos bioquímicos

A fenilalanina é um aminoácido essencial. Uma vez absorvida pelo intestino, a fenilalanina é transportada para o interior das células, onde sofrerá um dos seguintes processos:

- incorporação protéica;
- conversão metabólica por transaminação ou decarboxilação: ambas são vias secundárias pouco utilizadas, a não ser em caso de excesso de

fenilalanina, quando a transaminação é aumentada, mas não a ponto de substituir a hidroxilação;

- hidroxilação pela PAH: responsável por até 75% do metabolismo da fenilalanina, indicando ser este o principal fator determinante do estado de equilíbrio dos níveis séricos deste aminoácido em mamíferos (revisto por Scriver e cols., 1995).

O balanço desses processos levará à manutenção da homeostasia da fenilalanina no organismo, resultando em níveis que vão variar apenas leve e transitoriamente, dentro de limites estritos (revisto por Scriver e cols., 1995; revisto por Scriver & Waters, 1999).

Na FIG. 1-B está representado o esquema da hidroxilação da fenilalanina nos hepatócitos. A hidroxilação da fenilalanina requer pelo menos quatro fatores essenciais: a enzima PAH, a fenilalanina, o oxigênio e um cofator, a tetraidrobiopterina (BH_4). Para que a reação de hidroxilação ocorra, o cofator, que é um carreador de elétrons, deve estar oxidado na forma de tetraidrobiopterina (BH_4). Sob ação da PAH, a BH_4 é desidratada a diidrobiopterina (qBH_2). Nesta reação, um átomo do oxigênio do O_2 é reduzido a H_2O pelo NADH, e uma molécula de água é liberada (FIG. 1-C). Simultaneamente, a fenilalanina hidroxilase insere o outro átomo do oxigênio na fenilalanina para formar o grupo hidroxila da tirosina. A diidrobiopterina é então reduzida de volta à BH_4 numa reação dependente de NADH (revisto por Scriver e cols., 1995; revisto por Thony e cols., 2000).

A regeneração da BH_4 , que permite sua reutilização, é catalisada pela diidrobiopterina redutase (DHPR). A reciclagem da BH_4 é essencial para o metabolismo da fenilalanina, garantindo o suprimento da forma reduzida do cofator (revisto por Scriver e cols., 1995; revisto por Thony e cols., 2000).

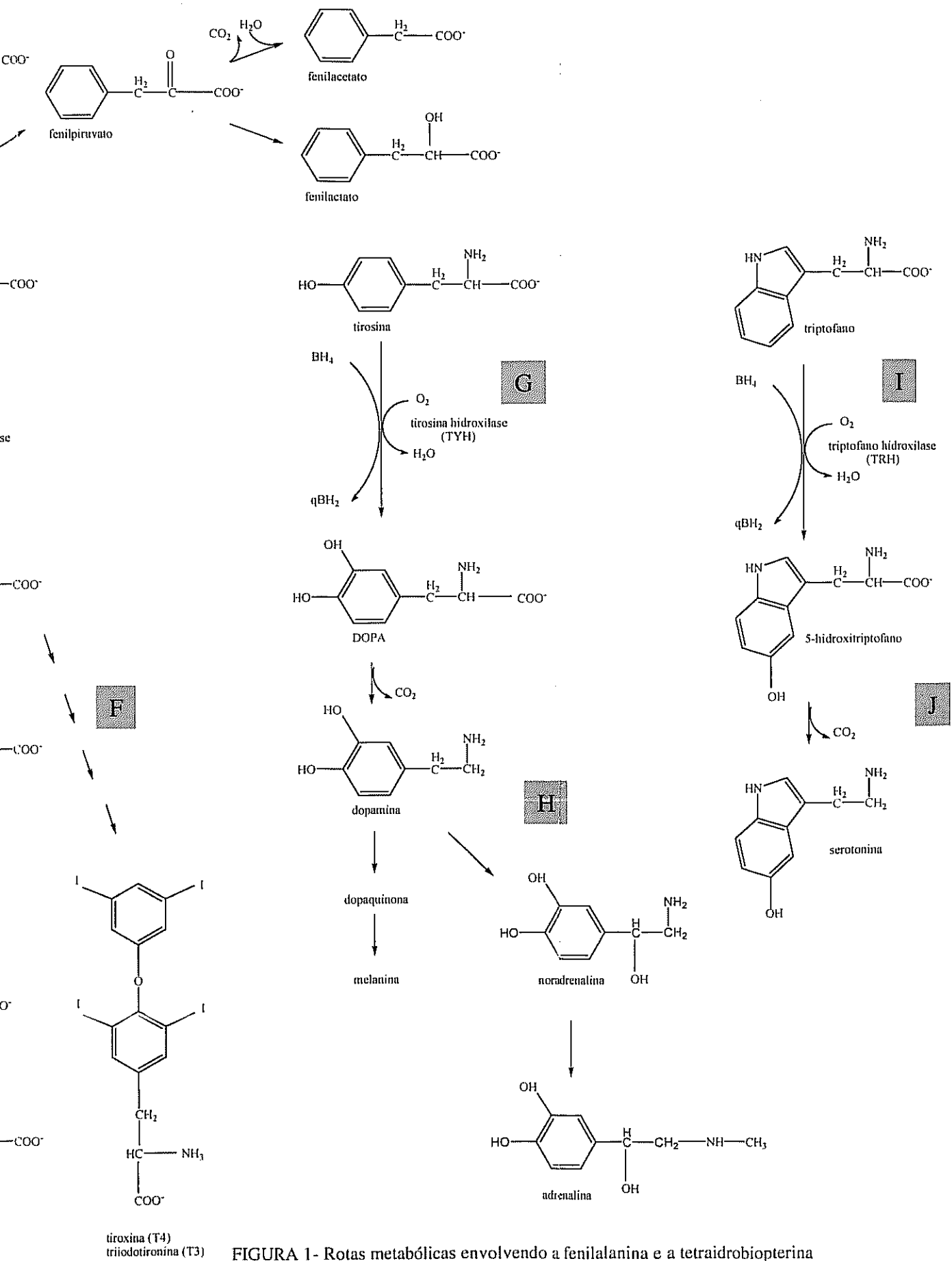
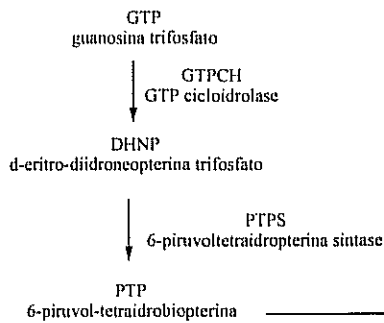
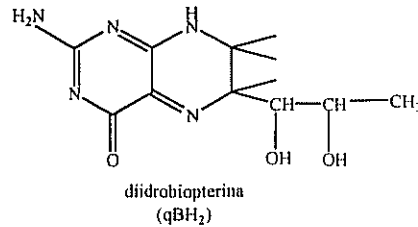
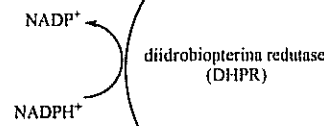
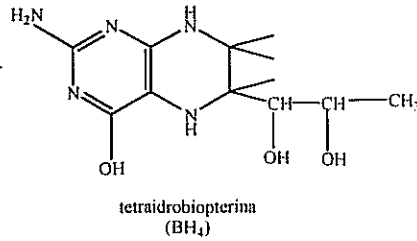
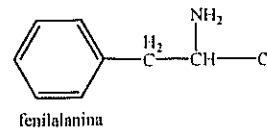
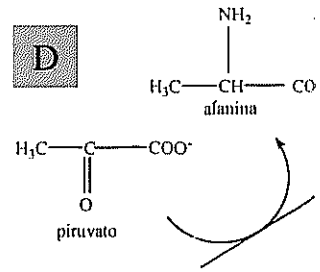
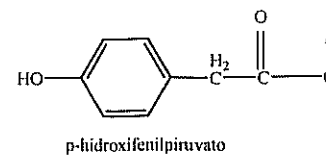
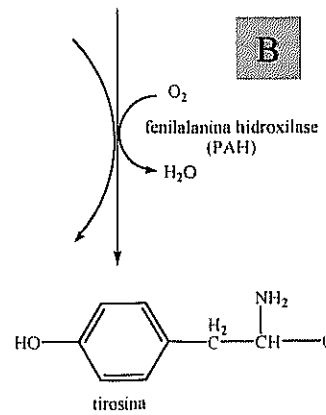
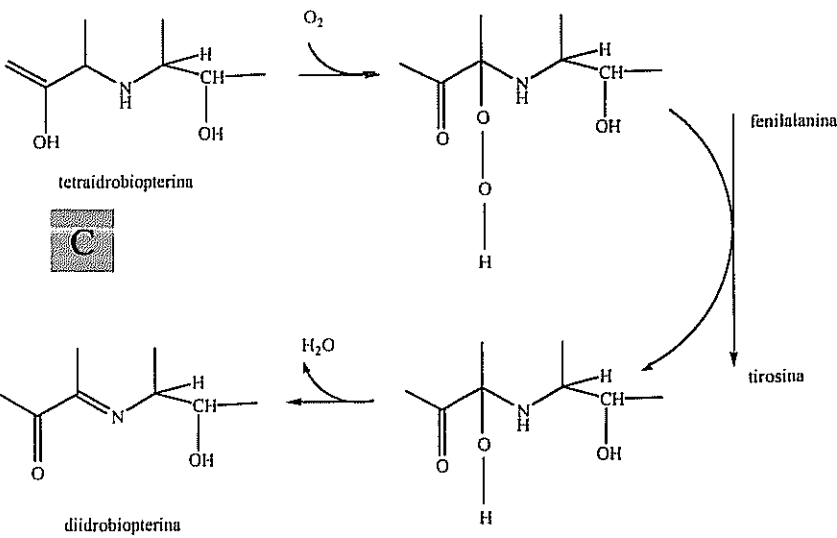
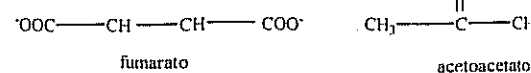
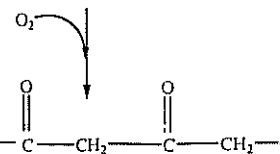
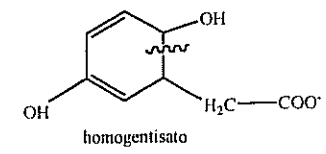
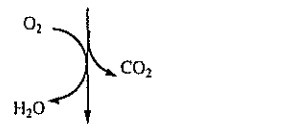


FIGURA 1 - Rotas metabólicas envolvendo a fenilalanina e a tetraidrobiopterina

A - síntese da tetraidrobiopterina (BH_4); B - hidroxilação da fenilalanina; C - regeneração do BH_4 ; D - transaminação da fenilalanina; E - co conversão da tirosina em fumarato e acetoacetato; F - síntese de tiroxina e triiodotironina; G - hidroxilação da tirosina; H - síntese de catecolaminas e melanina; I - hidroxilação do triptofano; J - síntese de serotonina

A

SR
sepiapterina redutase

**D****B****E****C**

Já a biossíntese de BH_4 requer 3 enzimas: a GTP ciclohidrolase (GTPCH), a 6-piruvil-tetraidropterina sintase (PTPS) e a sepiapterina redutase (SR). Estas enzimas catalisam a formação da BH_4 a partir de guanosina trifosfato (GTP) via dois compostos intermediários: D-eritro-diidroneopterina trifosfato (DHNP) e 6-piruvil-tetraidropterina (PTP). Este processo está esquematizado na FIG. 1-A. Defeitos nas enzimas envolvidas tanto na biossíntese de BH_4 quanto na sua regeneração, são responsáveis pela heterogeneidade de *locus* das HPAs (Woo e cols., 1983; revisto por Scriver e cols., 1995; revisto por Thony e cols., 2000).

Além da PAH, outras enzimas usam a BH_4 como cofator. Dentre elas estão a tirosina hidroxilase (TYH) e a triptofano hidroxilase (TRH), que catalisam, respectivamente, a hidroxilação da tirosina em DOPA e do triptofano (*Trp*) em 5-hidroxitriptofano (5-HT; FIG. 1-G, 1-I). A decarboxilação de DOPA e de 5-HT produz os neurotransmissores dopamina e serotonina, respectivamente (FIG. 1-H, 1-J; revisto por Scriver e cols., 1995; Nelson & Cox, 2000). Em função disto, os pacientes com deficiência de BH_4 apresentam um quadro neurológico mais severo do que os pacientes com HPA por deficiência de PAH (revisto por Scriver e cols., 1995; Teigen e cols., 1999).

Portanto, a fenilalanina, a partir de sua hidroxilação em tirosina, é precursor de vários compostos: a dopamina, os hormônios noradrenalina e adrenalina, e a melanina, produzida via intermediário dopaquinona. A tirosina também é incorporada aos hormônios tireoidianos T3 e T4. Estas reações estão representadas na FIG. 1-F (Nelson & Cox, 2000).

Normalmente, as vias catabólicas de fenilalanina e tirosina convertem-nas em fumarato e acetoacetato (FIG. 1-E). Havendo deficiência de PAH, parte do excesso de fenilalanina segue vias catabólicas normalmente pouco utilizadas. A transaminação da fenilalanina produz o fenilpiruvato, que se acumula nos tecidos e sangue e é excretado na urina. O fenilpiruvato pode ser

decarboxilado em fenilacetato ou reduzido a fenilactato, que também são excretados na urina (FIG. 1-D). O fenilactato confere à urina um odor característico, descrito como cheiro de urina de rato e encontrado tipicamente em indivíduos com PKU (Nelson & Cox, 2000).

1.6. Aspectos neuroquímicos

Duas hipóteses foram propostas para explicar os mecanismos causadores dos danos cerebrais na PKU:

- a teoria dos metabólitos tóxicos, cujos defensores atribuem os danos cerebrais ao acúmulo dos metabólitos tóxicos da fenilalanina;
- a teoria do transporte, cujos defensores consideram que os danos resultem da interferência dos níveis elevados de fenilalanina no transporte cerebral de outros aminoácidos.

A primeira hipótese foi proposta com base na observação, em modelos animais, de que o fenilpiruvato, o fenilactato e o fenilacetato podem inibir muitos processos metabólicos e reações enzimáticas. Entretanto, estes efeitos são observados apenas quando estes metabólitos estão em níveis muito mais elevados, do que aqueles encontrados em indivíduos com PKU (Knudsen e cols., 1995; Kaufman, 1998; Pietz e cols., 1999).

A segunda hipótese foi proposta com base na observação de que os aminoácidos grandes e neutros (*large and neutral amino acids*, LNAAs; fenilalanina, tirosina, triptofano, leucina, isoleucina, histidina, metionina e treonina) competem por canais de um mesmo sistema de transporte para cruzarem a barreira hematoencefálica.

Tem sido proposto, que os altos níveis de fenilalanina circulante, associados à maior afinidade deste aminoácido pelos canais de transporte, levariam a uma redução dos níveis cerebrais dos demais LNAAs. Esta hipótese vem sendo reforçada através de evidências experimentais, tanto nos modelos animais quanto nos estudos em humanos (revisto por Pardridge, 1998).

Em humanos, a quantidade de fenilalanina no cérebro de indivíduos com PKU, foi medida através de ressonância nuclear magnética por espectroscopia quantitativa, durante a administração oral de fenilalanina, isoladamente ou associada aos demais LNAAs. Sem a suplementação dos demais LNAAs, houve um aumento de fenilalanina no cérebro, acompanhado de alterações da atividade cerebral, avaliada por eletroencefalograma espectral. Quando da suplementação com demais LNAAs, um bloqueio do influxo de fenilalanina foi observado e não houve alterações da atividade cerebral (Pietz e cols., 1999).

Os danos cerebrais observados na PKU são basicamente de três tipos, todos de uma ou outra maneira, decorrentes do excesso de fenilalanina e do decréscimo dos demais LNAAs no cérebro. São eles:

1.6.1. Deficiência de neurotransmissores

Os altos níveis de fenilalanina e disponibilidade reduzida de tirosina e triptofano no cérebro parecem reduzir a biossíntese de dopamina, noradrenalina e serotonina. Em humanos com PKU, foram descritos níveis mais baixos dos metabólitos destes neurotransmissores na urina e líquido cefalorraquidiano (Lykkelund e cols., 1988).

Também contribui para a redução observada na biossíntese destes neurotransmissores, o fato de que as enzimas tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase são inibidas por excesso de fenilalanina. Indivíduos com PKU

clássica excretam níveis elevados de pterinas na urina e foi demonstrado que o excesso de fenilalanina estimula a produção de BH₄, por interferir no controle por retroalimentação da biossíntese deste cofator (Harada e cols., 1993).

Entretanto, apesar de aumentar a disponibilidade de BH₄, o efeito inibitório do excesso de fenilalanina sobre a tirosina hidroxilase e a triptofano hidroxilase no cérebro predomina e a síntese das catecolaminas e serotonina é sensivelmente reduzida (revisito por Surtees & Blau, 2000).

1.6.2. Redução de síntese protéica

A síntese de proteínas no cérebro sob hiperfenilalaninemia vem sendo estudada exclusivamente em modelos animais. Foi observado que a HPA provoca redução no tamanho cerebral, no número de células cerebrais, bem como reduz a incorporação de aminoácidos às proteínas nos estados crônico ou agudo. Foi sugerido que esta redução na síntese protéica se deva tanto à diminuição da concentração dos LNAAs livres quanto à diminuição do nível de metionil-tRNA e inibição da fosforilação normal da proteína ribossômica S₆, estes últimos refletindo na iniciação da síntese protéica (Hughes & Johnson, 1977; Binek-Singer & Johnson, 1982; revisito por Surtees & Blau, 2000).

1.6.3. Anormalidades na mielinização

Indivíduos com PKU apresentam diminuição da mielinização e alterações na composição da mielina. A mielina é um composto sulfatado. Em animais foi demonstrado, que as enzimas do sistema ativador de sulfato são sensíveis à fenilalanina. O excesso de fenilalanina levaria à hipomielinização dos oligodendrócitos e gliose da substância branca (revisito por Surtees & Blau, 2000).

Além disso, a mielina hipossulfatada é mais sujeita à degradação proteolítica. Portanto, as anormalidades de mielinização observadas nos indivíduos com PKU parecem ser devidas tanto à diminuição da produção de mielina, quanto a alterações em sua estrutura, que levam a uma degradação mais rápida. Ambos os efeitos são secundários ao aumento dos níveis cerebrais de fenilalanina (revisto por Surtees & Blau, 2000).

1.7. Tratamento

1.7.1. Tratamento convencional: dieta pobre em fenilalanina

O tratamento convencional da fenilcetonúria é essencialmente dietético. Consiste basicamente em restringir a ingesta de fenilalanina, reduzindo drasticamente o consumo de alimentos com alto conteúdo protéico. Entretanto, como se trata de um aminoácido essencial, o aporte de quantidades mínimas de fenilalanina é necessário, de modo a impedir que o organismo recorra à rabdomiólise para manter a síntese protéica (revisto por Scriver e cols., 1995).

A alimentação de um paciente com PKU deve ser acompanhada por um nutricionista. A dieta é prescrita de forma a manter os níveis séricos de fenilalanina dentro dos intervalos de referência para fenilcetonúricos: 120 a 360 $\mu\text{mol/L}$ para lactentes e pré-escolares, até 480 $\mu\text{mol/L}$ para escolares e até 700 $\mu\text{mol/L}$ para adolescentes (Starling e cols., 1999).

Como orientação geral, os alimentos são divididos em grupos (Starling e cols., 1999):

- alimentos proibidos: carnes, leites e derivados, ovos, grãos tipo feijão, milho, grão de bico, amendoim, lentilha; farinha de trigo; aveia; adoçantes contendo aspartame;
- alimentos permitidos, mas de forma controlada: frutas, legumes e verduras;
- alimentos permitidos: algumas frutas como laranja, maçã e pêra; alguns doces de frutas; alguns alimentos industrializados tais como gelatina vegetal, refrigerantes não-dietéticos, picolés de frutas, açúcar, balas de frutas, alimentos especiais com baixa concentração de fenilalanina, polvilho.

Para completar o aporte protéico necessário às atividades orgânicas, utiliza-se uma mistura de aminoácidos que contém pouca ou nenhuma fenilalanina. A mistura de aminoácidos é importada e de alto custo. No Brasil, alimentos especiais com baixa concentração de fenilalanina são poucos, produzidos em pequena escala, e os preços são elevados (Starling e cols., 1999).

Além da restrição de fenilalanina, a suplementação concomitante de tirosina também tem sido recomendada, uma vez que a conversão de fenilalanina em tirosina está bloqueada (Starling e cols., 1999).

1.7.2. Alternativas de tratamento

Tratamentos alternativos vêm sendo testados, visando principalmente os adolescentes e adultos jovens, que têm grande dificuldade para seguir as recomendações de restrição dietética, monitoramento e controle dos níveis de fenilalanina. Certamente, também beneficiarão as mulheres com PKU que desejem engravidar (Walter e cols., 2002; Brown e cols., 2002). As alternativas terapêuticas à dieta de restrição de fenilalanina são:

1.7.2.1. Tabletes de PreKUnil

Uma destas propostas alternativas vem sendo aplicada a um grupo de pacientes adolescentes e adultos da Dinamarca. Eles recebem um aporte extra de aminoácidos grandes e neutros (LNAAs), principalmente tirosina e triptofano, sob a forma de tabletes (PreKUnil, Nilab A/S). O uso dos tabletes permite a ingestão de uma quantidade maior de alimentos, que contenham fenilalanina, do que aquela permitida pela dieta convencional (Abring e cols., 2000; Nilab A/S).

Este tratamento se baseia no princípio teórico de que os LNAAs dependem de um único transportador para cruzar a barreira hematoencefálica. Desta forma, a fenilalanina em níveis altos competiria com os demais LNAAs, impedindo que estes cheguem ao sistema nervoso central (Pardridge, 1998).

O efeito do PreKUnil foi avaliado através do monitoramento das funções psicológicas e imagens de ressonância magnética em dois grupos de indivíduos afetados por PKU: um sob dieta convencional e outro com dieta mais livre associada ao uso do PreKUnil. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos. O tratamento mostrou-se portanto, uma alternativa efetiva (Abring e cols., 2000; Nilab A/S).

1.7.2.2. Administração de BH₄

Em 1999, Kure e colaboradores, observaram que indivíduos portadores de mutações no gene da PAH e sem evidências de deficiência de BH₄, respondiam à administração oral deste cofator. A sensibilidade ou a resistência ao tratamento, parece estar relacionada ao tipo de alteração que as mutações provocam na estabilidade da enzima PAH ou na sua afinidade pela BH₄.

Mais tarde, foi demonstrado que mais de 70% dos pacientes com níveis plasmáticos de fenilalanina menores que 800 $\mu\text{mol/L}$ respondiam a administração de BH_4 concomitante à dieta de restrição de fenilalanina. A suplementação oral com 10 mg/kg de BH_4 reduziu a concentração de fenilalanina plasmática para valores menores que 360 $\mu\text{mol/L}$ na maioria dos pacientes com HPA por deficiência de PAH e com níveis de fenilalanina menores que 1.200 $\mu\text{mol/L}$, bem como aumentou a tolerância à fenilalanina em alguns indivíduos com PKU clássica (Bernegger & Blau, 2002).

Apesar de ser um achado relativamente recente, alguns estudos já listam mutações específicas que apresentaram uma boa resposta a este tratamento. A mutação V388M, incluída no presente estudo, faz parte desta lista. Estas mutações são substituições de aminoácidos. A maior parte delas se encontra no domínio catalítico da PAH, algumas se encontram no domínio regulatório e uma está no domínio de tetramerização. Muitas destas mutações estão associadas a variantes com atividade residual considerável (maior que 25%), quando expressas em sistemas celulares eucariontes (Steinfeld e cols., 2002; Bardelli e cols., 2002; Bernegger & Blau, 2002; Blau, 2003).

Embora seja uma alternativa prática para controle da PKU, o custo da BH_4 comercialmente disponível é elevado. O custo anual aproximado do tratamento com BH_4 é similar ao da dieta restritiva convencional para os recém-nascidos. Entretanto, estes custos aumentam bastante com a idade, uma vez que a dose diária é ajustada de acordo com o peso corporal (Bernegger & Blau, 2002).

A dieta pobre em fenilalanina é muito restritiva e representa um impacto significativo na qualidade de vida destas famílias. Desta forma, a possibilidade de adotar uma dieta normal associada a uma dose diária de BH_4 , pode reduzir significativamente o estresse a que estas famílias estão submetidas.

1.7.2.3. Administração de fenilalanina amônia liase: testes terapêuticos usando modelos animais

O desenvolvimento de modelos animais de doenças genéticas humanas tem como um de seus objetivos a avaliação de novas propostas terapêuticas. Até o surgimento das primeiras linhagens de camundongos com deficiência de PAH, um fenótipo correlato à PKU era induzido via administração de fenilacetato, que entretanto não reproduz todas as anormalidades metabólicas da PKU humana. Além disso, a administração de fenilacetato pode levar à subnutrição, cujos efeitos no desenvolvimento cerebral se tornam difíceis de separar daqueles relativos à hiperfenilalaninemia (McDonald e cols., 1990; Schedlovsky e cols., 1993; revisto por Huttenlocher, 2000; McDonald e cols., 2002).

A linhagem de camundongos com PKU (*BTBR-Pah^{enu2}*) veio contribuir para a investigação de diferentes aspectos da doença, sejam eles aspectos desconhecidos da etiologia molecular ou novas formas de tratamento. Os estudos de caracterização genética, bioquímica e fenotípica têm mostrado grande similaridade desta linhagem com a PKU humana (McDonald & Charlton, 1997; McDonald e cols., 2002).

Para fins experimentais, uma das características mais interessantes desta linhagem é a hipopigmentação dos mutantes, sob níveis elevados de fenilalanina. Qualquer redução nos níveis de fenilalanina é capaz de ser detectada através de aumento na produção de pigmento e 5% de atividade da PAH é capaz de reverter o fenótipo da pelagem (McDonald e cols., 2002).

Um outro tipo de tratamento alternativo foi testado em camundongos destas linhagens. Os animais receberam doses da enzima fenilalanina amônia liase (PAL; EC 4.3.1.5). A PAL é uma enzima autocatalítica, e ao contrário da PAH, não necessita de cofator para converter a fenilalanina em quantidades

insignificantes de amônia e cinamato, um metabólito pouco tóxico. A enzima atua no trato gastrointestinal degradando a fenilalanina antes da sua absorção (Sarkissian e cols., 1999; Nelson & Cox, 2000).

A PAL administrada a esses camundongos foi produzida por uma linhagem de *Escherichia coli* transformada com o gene PAL de *Rhodospiridium toruloides*. Um decréscimo dos níveis séricos de fenilalanina foi observado, tanto após injeções da enzima PAL purificada, quanto após a ingestão de um preparado contendo células da própria linhagem modificada de *Escherichia coli*. Postula-se que a administração de PAL poderia permitir a adoção de uma dieta menos restritiva após a infância (Sarkissian e cols., 1999).

Recentemente, uma linhagem de *Lactococcus lactis* foi modificada pela inserção de um vetor de expressão, onde foi subclonado o cDNA da PAL isolado de *Petroselinum crispum*. A administração deste pró-biota modificado levou a uma redução significativa dos níveis plasmáticos de fenilalanina em ratos com HPA (Liu e cols., 2002). Esta abordagem pode vir a se constituir em uma alternativa economicamente viável à dieta de restrição de fenilalanina. O *Lactococcus lactis* não se fixa a mucosa intestinal, conferindo a esta estratégia terapêutica a plasticidade necessária, sem os riscos de produzir uma redução excessiva na absorção de fenilalanina.

1.8. Aspectos moleculares

1.8.1. O gene e a enzima

O gene *PAH* humano foi mapeado no cromossomo 12, mais precisamente em 12q22-24.1 (Lidsky e cols., 1985). Posteriormente, o *locus pah* foi mapeado no cromossomo 10 de camundongos (Ledley e cols., 1988).

O cDNA foi clonado, e permitiu a detecção de alguns polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) no locus *PAH* (Woo e cols., 1983; Lidsky e cols., 1985). A seqüência completa do gene *PAH* abrange um segmento genômico de aproximadamente 90 kb. Possui 13 éxons e o tamanho dos 12 íntrons varia de 1 a 23 kb. O mRNA maduro tem aproximadamente 2,4 kb e codifica uma proteína de 452 aminoácidos (Nowacki e cols., 1998; revisto por Erlandsen & Stevens, 1999; ver FIG. 2).

A fenilalanina hidroxilase é uma metaloenzima, que contém um íon ferro associado a cada subunidade. A forma ativa da enzima é tetramérica. Cada monômero possui três domínios:

- regulatório: resíduos de 1 a 142;
- catalítico: resíduos de 143 a 410;
- tetramerização: resíduos de 411 a 452.

O peso molecular do monômero varia de 50 kDa a 53 kDa (revisto por Erlandsen & Stevens, 1999; ver FIG. 3).

A enzima fenilalanina hidroxilase murina também tem 452 aminoácidos e apresenta 8% de divergência com a seqüência humana, sendo que a maioria das diferenças se localiza na porção N-terminal (Scriver e cols., 2000).

Uma base de dados foi constituída para a organização dos dados referentes à enzima: *PAHdb- Phenylalanine hydroxylase Locus Knowledgebase*. Atualmente, estão catalogados mais de 400 alelos variantes, a maioria dos quais patogênicos, bem como os resultados de estudos de expressão *in vitro* (Nowacki e cols., 1998; Scriver e cols., 2000).

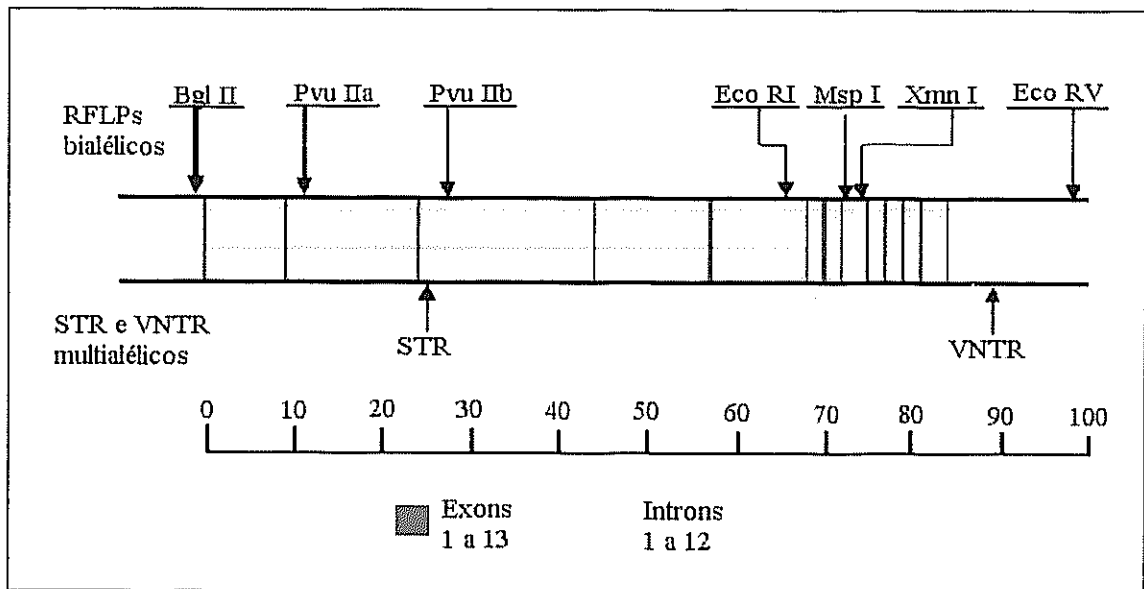


FIGURA 2 - Estrutura do locus PAH

A figura indica a posição relativa dos exons e tamanho dos introns do gene PAH (~ 90 kb; cromossomo 12q24.1). Os marcadores polimórficos usados para definição dos haplótipos também estão representados. B

FONTE - Adaptado de Nowacki e cols., 1998.



FIGURA 3 - Representação tridimensional da enzima PAH

À esquerda, monômero com os domínios: regulatório em azul, catalítico em amarelo e de tetramerização em verde. O ferro está representado pela esfera vermelha. À direita, forma ativa tetramérica.

FONTE - Erlandsen & Stevens, 1999.

1.8.2. Os haplótipos

A clonagem do cDNA do gene *PAH* humano possibilitou o estudo direto da estrutura do *locus* *PAH*. Desde então, foram identificados vários polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) dentro ou próximos ao gene, nomeados de acordo com a enzima de restrição que permite sua identificação (Woo e cols., 1983; Lidsky e cols., 1985; Scriver e cols., 2000).

O sistema de haplotipagem mais comumente usado baseia-se na detecção de 7 RFLPs bialélicos (*Bgl*III; *Pvu*IIa; *Pvu*IIb; *Eco*RI; *Msp*I; *Xmn*I e *Eco*RV), uma VNTR (*variable number of tandem repeats*), composta pela repetição em *tandem* uma seqüência de 30 pb, e uma repetição de tetranucleotídeos (*short tandem repeat*, STR) com 9 alelos. A posição relativa destes polimorfismos no *locus* *PAH* está representada na FIG. 2. A combinação destes alelos dos RFLPs, da VNTR e do microssatélite permite a geração de um grande número de haplótipos, dos quais 87 já são conhecidos (Scriver e cols., 2000).

Uma vez que o número de mutações em *PAH* é alto, e que estas se encontram dispersas por todo o gene, a haplotipagem tem sido usada para o diagnóstico pré-natal e para a detecção de heterozigotos, quando não se consegue identificar que mutações estão segregando na família (Woo e cols., 1983; Woo, 1989; Caillaud e cols., 1992; Desviat e cols., 1993).

As freqüências haplotípicas variam entre populações. Estudos dos haplótipos em alelos normais, isto é, não causadores de HPA, podem esclarecer sobre a evolução humana e sobre a história das populações humanas (ver mais detalhes em aspectos populacionais).

1.8.3. As mutações

As mutações no gene *PAH* podem ser classificadas quanto ao tipo em:

- 60% de sentido trocado, que podem ou não causar doença;
- 6% sem sentido;
- 13% em sítios de processamento e maturação de mRNA;
- pequenas deleções e inserções, geralmente menores que 20 pb e que mantêm a fase de leitura (Nowacki e cols., 1998).

Algumas destas 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%. Este amplo espectro de variação da atividade residual, além do grande número de combinações alélicas possíveis, explica em parte a variabilidade observada, nos fenótipos enzimático, metabólico ou cognitivo (Okano e cols., 1991; Rey e cols., 1992; Giannattasio e cols., 1997; Kayaalp e cols., 1997; Guldberg e cols., 1998; Jennings e cols., 2000; Waters e cols., 2000).

Também existem relatos de uma mesma mutação associada tanto à PKU quanto à HPA não-PKU, bem como de pacientes que apresentam mutações idênticas e fenótipos bastante diferentes (Avigad e cols., 1991; Guldberg e cols., 1996; Gjetting e cols., 2001).

Apesar disso, tem sido descrita, correlação entre o genótipo do indivíduo e o fenótipo apresentado. Desta forma, determinadas mutações estariam relacionadas a uma classe específica de PKU, o que tornaria possível antecipar, para alguns pacientes, as necessidades dietéticas e a resposta à interrupção da dieta (Kayaalp e cols., 1997; revisto por Eisensmith e cols., 1995; Güttler & Guldberg, 1996; revisto por Guldberg e cols., 1998; Bénit e cols., 1999; Greeves e cols., 2000; Güttler & Guldberg, 2000; Rivera e cols., 2000; Gjetting e cols., 2001).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para investigar se a identificação das mutações levaria a uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica da PKU.

Foram avaliadas, por exemplo, as correlações entre a atividade residual prevista nos estudos de expressão *in vitro* com os níveis de fenilalanina ao diagnóstico e a tolerância à fenilalanina. As maiores correlações foram observadas entre a atividade residual prevista e a tolerância à fenilalanina (Desviat e cols., 1997).

GuIdberg e colaboradores, em 1998, propuseram e testaram um modelo simples de previsão do fenótipo com base no genótipo. Um valor arbitrário (AV) foi atribuído a cada mutação, de acordo com a severidade que confere ao fenótipo metabólico (AV = 1, para mutações associadas à PKU clássica; AV = 2, para PKU moderada; AV = 4, para PKU leve; AV = 8, para HPA não-PKU). A soma dos valores conferidos pelos dois alelos é comparado ao de uma tabela e permite a inclusão do paciente em uma das quatro classes fenotípicas esperadas. Este sistema apresentou um grau de concordância médio 79% entre o fenótipo previsto e o observado.

À medida que mais dados de estudos como estes se acumulem, será possível demonstrar uma maior ou menor eficiência do uso do diagnóstico molecular para colaborar na definição da proposta terapêutica individual.

1.9. Aspectos epidemiológicos e populacionais

A incidência de PKU varia amplamente entre as populações, e uma média de 1:10.000 foi estimada para populações caucasianas, com valores intermediários entre 1:2.600, na Turquia (Ozalp e cols., 1986), e 1:20.000 na

Suécia e na Bulgária (revisado por Zschocke, 2003). A incidência de PKU em Portugal é de 1:15.000 e na Espanha os valores regionais se encontram entre 1:6.600 e 1:10.000 (revisado por Zschocke, 2003).

A distribuição e a frequência relativa das diversas mutações, que afetam o gene *PAH*, assim como a associação destas mutações com determinados haplótipos, também apresentam diferenças populacionais marcantes (Daiger e cols., 1989; revisado por Eisensmith e cols., 1992; Zschocke e cols., 1995; Rivera e cols., 1998).

Uma questão intrigante é que forças evolutivas mantêm a frequência da PKU relativamente elevada. Em pacientes não-tratados, o coeficiente de inteligência é freqüentemente muito baixo, a ponto de tornar a reprodução dos afetados bastante improvável (Woolf e cols., 1975).

A frequência de alelos, que conferem um valor adaptativo tão baixo quando em homozigose, deveria diminuir a níveis muito baixos, a menos que fosse mantida por fatores como heterogeneidade de *locus*, altas taxas de mutação, intervenção terapêutica, heterose, efeito de fundador, deriva (Eisensmith & Woo, 1992; Kracmack & Zschocke, 2003), ou ainda por complementação interalélica associada ao grande número de alelos deletérios (Clark, 1998). Nos itens que se seguem estes fatores serão considerados assim como a influência deles na estimativa das frequências alélicas na PKU.

1.9.1. Heterogeneidade de *locus* e alta taxa de mutação

Embora haja heterogeneidade de *locus* nas HPAs, a incidência de 1:10.000 refere-se especificamente a mutações no gene *PAH* (Woo e cols., 1989).

Alta taxa de mutação também é uma explicação pouco provável, uma vez que a maioria das mutações causadoras de fenilcetonúria apresenta forte associação com haplótipos específicos, sugerindo eventos mutacionais únicos (Eisensmith & Woo, 1992). Por outro lado, freqüências elevadas de PKU são observadas apenas em populações caucasóides, o que descarta a hipótese de que o *locus* como um todo seja hipermutável.

Entretanto, algumas mutações estão de fato associadas a mais de um haplótipo, o que poderia ser explicado por recombinação, conversão gênica ou eventos mutacionais recorrentes (Desviat e cols., 1995; Eisensmith & Woo, 1992; Eisensmith e cols., 1995; Giannattasio e cols., 1997).

1.9.2. Efeitos da intervenção terapêutica nas freqüências alélicas

O tratamento da PKU previne eficientemente o retardo mental e conseqüentemente eleva o valor adaptativo dos afetados. Entretanto, a dieta para PKU está disponível há apenas uma ou duas gerações, tempo insuficiente para produzir impacto nas freqüências alélicas. Também não existem relatos ou evidências, que sugiram casamento preferencial entre heterozigotos ou que famílias com membros afetados tenham número maior de descendentes do que outras famílias (Krawczak & Zschocke, 2003).

1.9.3. Heterose na PKU

A alta incidência de PKU entre os turcos, irlandeses, escoceses, eslavos e judeus iemenitas, bem como em descendentes destes povos, incitou estudos visando esclarecer a ocorrência de heterose.

Para testar esta hipótese, Woolf e colaboradores (1975), compararam a taxa de abortos espontâneos entre mulheres heterozigotas

(mães de crianças com PKU) e homozigotas normais na Irlanda e no oeste da Escócia. As heterozigotas apresentaram uma maior concentração de fenilalanina no sangue e tecidos e uma taxa menor de aborto espontâneo, quando comparadas às homozigotas normais.

Posteriormente, foi proposto um mecanismo pelo qual concentrações mais elevadas de fenilalanina, como aquelas observadas no sangue das heterozigotas, poderiam reduzir as taxas de aborto, pela diminuição ou reversão da toxicidade da ocratoxina A. Esta micotoxina, produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, pode contaminar grãos e outros alimentos, provocando nefropatia e aborto em humanos (Woolf e cols., 1975; Woolf, 1986). A ocratoxina A compete com a fenilalanina pela fenilalanil-t-RNA sintetase. O t-RNA carregado com a ocratoxina A bloqueia a síntese protéica (Creppy e cols., 1980). Níveis mais altos de fenilalanina sérica reduziram este efeito.

Mais recentemente houve uma maior oferta de alimentos e a generalização do uso de equipamentos de refrigeração. Antes disso, o consumo de alimentos contaminados, mais do que uma exceção, era a norma. Mesmo que hoje estas condições tenham mudado, os efeitos deste mecanismo ao longo da evolução das populações caucasóides não podem ser descartados (Woolf, 1986; Eisensmith & Woo, 1992; Eisensmith e cols., 1992).

Por outro lado, também há relatos de taxas de aborto mais elevadas em mulheres heterozigotas (Saugstad, 1973; Blyumina, 1974, citados em Krawczak & Zschocke, 2003). Esta questão ainda aguarda uma definição.

Apesar de a hipótese de heterose seja difundida na literatura, fica em aberto a pergunta: porque outras populações do hemisfério Norte, como chineses ou japoneses, submetidos a condições alimentares bastante semelhantes, têm baixas freqüências de fenilcetonúria?

A alta freqüência de mutações muito deletérias, associada à variação de tipo e freqüência destas mutações entre as diferentes populações, sugere heterose associada a diversos eventos fundadores. Entretanto é difícil, hoje, identificar-se que fatores teriam produzido a heterose.

1.9.4. Deriva genética e efeito fundador na PKU

Muitos trabalhos documentam um forte desequilíbrio de ligação entre as diversas mutações e os haplótipos no *locus PAH*, sugerindo eventos fundadores separados. Estudos das bases moleculares da PKU em populações da Europa e Ásia indicam que a maioria das mutações no gene *PAH*, associadas com a PKU, senão todas elas, ocorreram recentemente na história do homem. Tem sido sugerido, que a distribuição e a freqüência da maioria dos alelos *PAH* na Europa possa ser devida, pelo menos em parte, a efeito de fundador e deriva genética (Okano e cols., 1991; Wang e cols., 1991; Caillaud e cols., 1992; Goltsov e cols., 1992; Desviat e cols., 1993; Eisensmith & Woo, 1992; Giannattasio e cols., 1997).

1.9.5. Complementação interalélica

Exemplos de complementação interalélica têm sido identificados ocasionalmente na natureza. Nesta situação, sujeitos portadores de duas mutações diferentes em um mesmo *locus*, e que, em homozigose, causam doença, no heterozigoto composto produziram um fenótipo normal.

Entretanto, não existem evidências moleculares para complementação interalélica na PKU, embora seja possível, que a freqüência das mutações causadoras de PKU aumente porque os alelos deletérios seriam protegidos da seleção nos heterozigotos compostos.

Em estudos de simulação, Clark (1998) mostrou que há condições em que são produzidas freqüências de equilíbrio de alelos deletérios surpreendentemente altas. Este autor encontrou, que no caso de n alelos deletérios, completamente recessivos em relação ao alelo normal, e que apresentem complementação interalélica total, a freqüência somada dos alelos deletérios no equilíbrio é a \sqrt{n} multiplicada por aquela calculada, quando há apenas um alelo deletério. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a alta freqüência da PKU.

Mais uma vez, esta hipótese, sozinha, não explicaria porque altas freqüências da doença são observadas apenas em populações caucasianas.

1.9.6. Problemas para estimativa das freqüências alélicas na PKU

Testar matematicamente estas hipóteses é muito difícil. A freqüência das mutações causadoras de PKU é estimada nos sujeitos afetados, correspondendo a q^2 . A freqüência destas mesmas mutações em heterozigose ($2pq$) nunca é averiguada. Desta forma, a estimativa das freqüências alélicas das diferentes mutações, baseada em contagem direta, não é possível.

Outros métodos de estimativa de freqüência alélica têm como pressuposto, que o *locus* estudado esteja em equilíbrio na população em questão. Fazer-se pressuposição de equilíbrio, no caso do *locus PAH*, pode implicar em erro, devido à grande quantidade de alelos causadores de algum tipo de HPA, e porque não se conhece:

- as relações de dominância entre cada um destes alelos e o alelo "normal", isto é, o efeito de cada um dos alelos mutados no heterozigoto;
- o coeficiente de seleção para cada alelo mutado;
- o valor adaptativo dos indivíduos normais não-portadores, dos heterozigotos e dos homozigotos para cada um dos alelos mutados;
- a taxa de mutação do gene *PAH*;

- a natureza e a força dos mecanismos seletivos envolvidos.

Na falta destas informações, para permitir estudos sobre as forças evolutivas que mantêm, em um *locus* multialélico, as freqüências de alelos deletérios observadas, é costume tratar-se o conjunto de alelos mutados como um único alelo, ao qual se atribui recessividade completa. Deste modo, estimam-se as freqüências esperadas de equilíbrio entre as forças de mutação e seleção.

Crow & Kimura (1970) obtiveram expressões aproximadas para tais freqüências de equilíbrio e mostraram que os graus de dominância e de complementação interalélica são importantes na determinação destas freqüências de equilíbrio. No caso da PKU, estes efeitos teriam que ser devidamente avaliados, embora ela se encaixe no modelo proposto por Clark (1998) que prevê que o *locus* tenha vários alelos deletérios. Estudos das relações interalélicas certamente contribuirão para testar o modelo.

1.9.7. Estudos evolutivos usando o *locus PAH*

Os haplótipos do gene *PAH* vêm sendo utilizados para estudar as migrações humanas. Kidd e colaboradores (2000) mediram o desequilíbrio de ligação entre marcadores genéticos situados nas regiões 5' e 3' do gene *PAH* e distantes aproximadamente 65 kb entre si. As amostras continham uma média de 50 indivíduos, representando 29 populações diferentes, e incluíram, pela primeira vez, populações da África e das Américas. O estudo mostrou que o segmento genômico em desequilíbrio de ligação varia substancialmente entre as populações de diferentes regiões do mundo, refletindo a história evolutiva destas populações.

As migrações humanas também parecem ter desempenhado um papel importante na distribuição das mutações da PKU (Desviat e cols., 1995).

Estudos recentes têm mostrado a presença de mutações PKU oriundas do Mediterrâneo em países da América Latina, provavelmente aqui introduzidas com a migração destes povos do Sul da Europa (Pérez e cols., 1993, 1996, 1997).

As análises das mutações de PKU na América Latina e suas origens podem proporcionar informações não apenas sobre as bases genéticas da PKU nestes países, mas também sobre a história recente destes povos (Arzimanoglou e cols., 1995; Pérez e cols., 1996).

1.10. A PKU no Brasil

Poucos são os dados sobre a PKU na população brasileira. Até o presente momento, os estudos publicados são relativos a uma amostra de indivíduos afetados pela PKU da região Sul do país e de São Paulo (Pérez e cols., 1996; Acosta e cols., 2000; Acosta e cols., 2001).

A população brasileira se constitui de uma complexa mistura étnica e foi originada predominantemente de europeus do sul e oeste, pretos africanos e ameríndios. A proporção destas três principais populações, assim como outras contribuições menores, variam significativamente entre as diferentes regiões do país (Holanda, 1971). Considerando-se esta complexa mistura étnica, pode-se prever que a frequência das mutações PKU varie conforme a região.

Além disso, na literatura internacional, os dados referentes a populações negras são muito poucos (Hofman e cols., 1991). Não há dados sobre populações indígenas. Isto torna particularmente relevante o estudo das mutações causadoras de PKU no Estado de Minas Gerais.

1.11. A PKU em Minas Gerais

O programa de triagem neonatal para fenilcetonúria vem sendo desenvolvido no Estado de Minas Gerais desde 1994. Atualmente este programa cobre em média 94% dos nascimentos de Minas Gerais (Januário, 2002). São triados de 22.000 a 26.000 recém-nascidos por mês. O número total de recém-nascidos triados ultrapassa os 2.000.000. A incidência da PKU em Minas Gerais é de aproximadamente 1:20.000 nascimentos (Aguilar, 2002).

1.12. Escolha das mutações

Para a escolha das mutações considerou-se a distribuição das mutações mais freqüentes nas populações que contribuíram para a formação da população brasileira, em especial aquelas da Península Ibérica, e da Europa como um todo. Foram utilizadas informações do banco de dados *PAH Mutation Analyses Consortium Database* (Scriver e cols., 2000) e também publicações que continham dados sobre origem e evolução das mutações no gene *PAH*. Dados disponíveis no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) referentes a composição da população brasileira também foram consultados (Lara e cols., 2002).

Na TAB. 2, são mostradas as mutações mais freqüentes nas populações européias (revisto por Scriver e cols., 1995). Foram incluídos os dados referentes a mutações causadoras de PKU em negros norte-americanos, já que estes são as únicas informações referentes a populações negróides da literatura. Em negrito estão as mutações, que são objeto do presente estudo e sublinhadas, as mutações que serão investigadas por outros membros do grupo de pesquisa na amostra de pacientes de Minas Gerais.

TABELA 2
Mutações identificadas no gene *PAH* em populações européias e em negros norte-americanos

Mutação	Freqüência (%)	População	Éxon	Alteração	Método
R408W	31	Europeus	12	CGG→TGG	<i>Styl</i>
V388M	19	Portugueses	11	GTG→ATG	<i>BsaAI</i>
IVS12nt1	11	Europeus	12	G→A	<i>RsaI</i>
IVS10nt11	6	Europeus	11	G→A	<i>DdeI</i>
<u>Y414C</u>	5	Europeus	12	TAC→TGC	ASO
<u>I65T</u>	5	Europeus	3	ATT→ACT	<i>TaqI</i>
<u>R261Q</u>	4	Europeus	7	CGA→CAA	<i>HinfI</i>
F39L	2	Europeus	2	TTC→TTG	SSCP/ <i>MaellI</i>
L255S	*12,5	Negros EUA	7	TTG→TCG	PCR/Seq
D94	-	Portugueses	3	3pb(Ile)	PCR
<u>R252W</u>	-	Mediterrâneo	7	CGG→TGG	<i>AvaI</i>
A259V	-	França	7	GCC→GTC	SSCP
<u>R261X</u>	-	Europa(Norte)	7	CGA→CAA	<i>DdeI</i>
G272X	-	Europa(Norte)	7	CGA→TGA	<i>BamHI</i>
Y277D	-	França	7	TAT→GAT	SSCP
D364ou365	-	Suécia	11	3pb(leu)	PCR
R408Q	-	Escandinávia	12	CGG→CAG	SSCP

FONTE - Adaptado de Scriver e cols., 1995 e *Hofman e cols., 1991.

NOTA - Em negrito, mutações objeto do presente estudo; sublinhadas, mutações descritas anteriormente no Brasil e que serão investigadas por outros membros do grupo de pesquisa nesta mesma amostra.

Neste trabalho investigamos as mutações V388M, IVS10nt11, R408W e IVS12nt1 conforme especificado nos itens abaixo:

1.12.1. Mutação V388M

Descoberta em pacientes japoneses (OMIM; Takahashi e cols., 1992), foi posteriormente descrita em alta frequência em pacientes caucasóides de Portugal (Leandro e cols., 1995).

A TAB. 3 mostra a frequência relativa do alelo V388M em vários países.

No Chile, a mutação está associada a um haplótipo diferente do observado no Brasil. Como envolve um dinucleotídeo CpG, é muito provável que a mutação seja recorrente (Desviat e cols., 1995).

TABELA 3
Frequência relativa da mutação V388M em diferentes populações

Local	Frequência relativa (%)	Referência
Brasil (RS)	6	Perez e cols., 1996
Brasil (SP)	9,1	Acosta e cols., 2001
Portugal	8,6	Rivera e cols., 1998
Espanha	6,2	Perez e cols., 1997
Chile	13	Desviat e cols., 1995
Alemanha	<1	Zschocke, 2003
Dinamarca	<1	Zschocke, 2003
Bélgica	<1	Zschocke, 2003
França	<1	Zschocke, 2003
República Tcheca	<1	Zschocke, 2003

A mutação V388M consiste na substituição de G→A do primeiro nucleotídeo do códon 388, resultando na substituição de uma valina por uma metionina (Takahashi e cols., 1992).

Estudos de expressão *in vitro* mostram que a variante exibe aproximadamente 20% da atividade da enzima normal, por apresentar redução na afinidade tanto pela fenilalanina quanto pelo cofator BH₄ (Leandro e cols., 2000).

A mutação pode ser detectada através da digestão com a enzima de restrição *Bsa*AI do produto amplificado do éxon 11. O sítio de restrição (TAC/GTG) é eliminado pela mutação (Desviat e cols., 1995).

O modelo teórico para detecção desta mutação está esquematizado na FIG. 4.

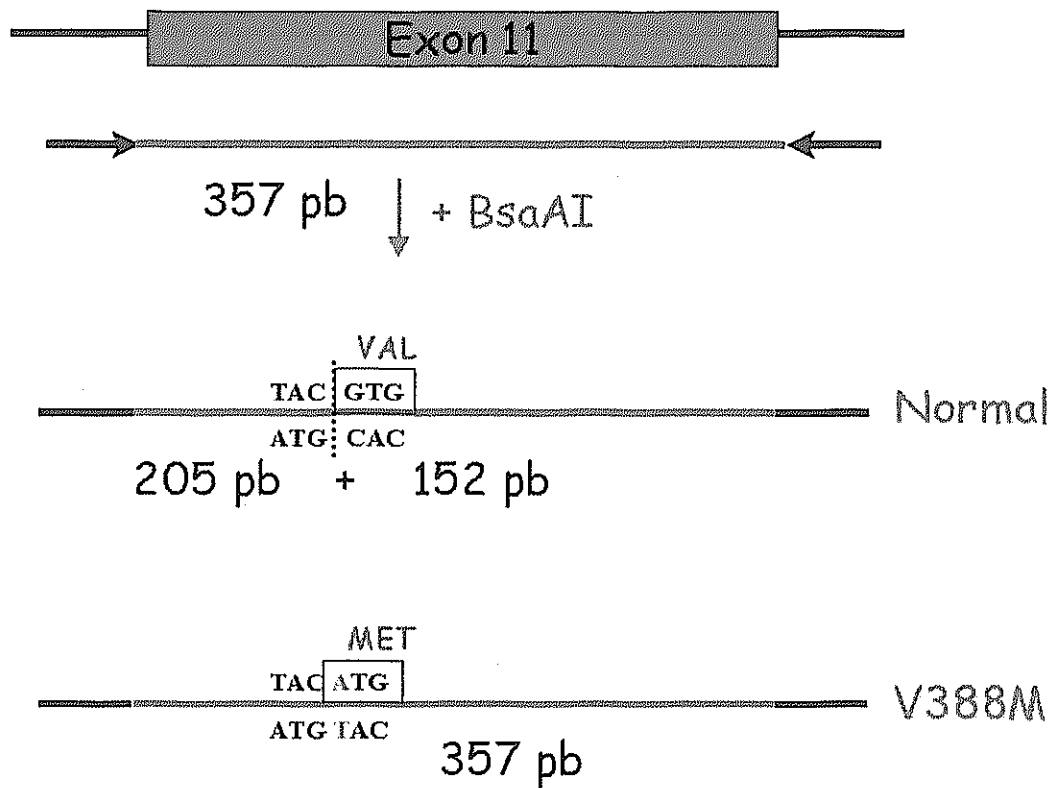


FIGURA 4 - Princípio teórico de detecção da mutação V388M

A detecção desta mutação se baseia no resultado obtido ao se submeter o produto de amplificação por PCR do exon 11 do gene *PAH* à digestão com a enzima de restrição *BsaAI*. Os fragmentos amplificados possuem 357 pb. Após digestão com *BsaAI*, os alelos normais, que possuem o sítio de restrição, geram fragmentos de 205 pb e 152 pb. A mutação de G/C para A/T (representados em vermelho no alelo V388M) abole o sítio de restrição e o fragmento permanece com os 357 pb originais. Na enzima PAH, a mutação provoca a substituição de valina por metionina no resíduo 388.

1.12.2. Mutação IVS10nt11

Também citada como IVS10nt546, é a mutação mais freqüente no mediterrâneo (OMIM).

No Brasil, é a mais freqüente em São Paulo (17,4%; Acosta e cols., 2001). A IVS10nt11, também é a mutação mais freqüente tanto na Espanha (14,7%; Pérez e cols., 1997), quanto em Portugal (10,8%; Rivera e cols., 1998).

A TAB. 4 mostra as freqüências relativas do alelos IVS10nt11 em vários países.

TABELA 4
Freqüência relativa da mutação IVS10nt11 em diferentes populações

Local	Freqüência relativa (%)	Referência
Brasil (RS)	0	Perez e cols., 1996
Brasil (SP)	17,4	Acosta e cols., 2001
Portugal	10,8	Rivera e cols., 1998
Espanha	14,7	Perez e cols., 1997
Chile	21,1	Pérez e cols., 1993
Argentina	32,1	Pérez e cols., 1993
Itália	4 -19	Zschocke, 2003
Bulgária	25	Zschocke, 2003
Alemanha e Polônia	10	Zschocke, 2003
Inglaterra e Suíça	4	Zschocke, 2003
França	8	Zschocke, 2003

Esta mutação ativa um sítio crítico de maturação do RNA, resultando numa inserção de 9 nucleotídeos entre os éxons 10 e 11. Por isto, 3 aminoácidos adicionais são inseridos na seqüência normal, causando mudanças conformacionais e perda de atividade catalítica da PAH.

Em homozigose, a IVS10nt11 acarreta manifestações clínicas severas (Dworniczak e cols., 1991).

A IVS10nt11 pode ser detectada por digestão, com a enzima *Ddel*, do produto amplificado por PCR do éxon 11, que também abrange parte do íntron 10. A mutação cria um sítio de restrição para esta enzima (Eiken e cols., 1996).

O modelo teórico para detecção desta mutação está esquematizado na FIG. 5.

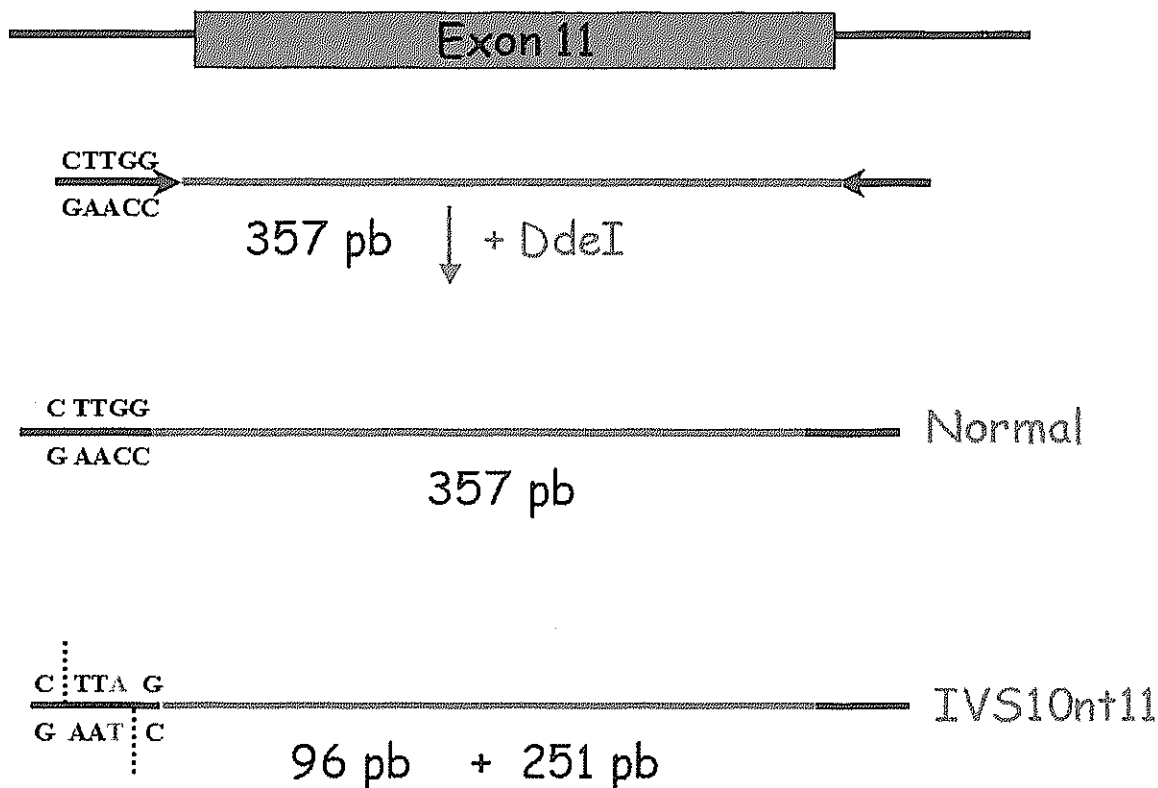


FIGURA 5 - Princípio teórico de detecção da mutação IVS10nt11

A detecção desta mutação se baseia na separação eletroforética do produto de amplificação por PCR do exon 11, que abrange parte do intron 10, digerido com a enzima de restrição *DdeI*. Os fragmentos amplificados possuem 357 pb e os alelos normais não possuem o sítio para a enzima *DdeI* nesta sequência. A mutação de G/C para A/T (representadas em vermelho no alelo IVS10) cria o sítio de restrição, gerando fragmentos de 96 pb e 251 pb. A mutação ativa um sítio crítico de *splicing* resultando numa inserção de 9 nucleotídeos entre os exons 10 e 11. Por isto, 3 aminoácidos adicionais são inseridos na sequência normal da enzima PAH.

1.12.3. Mutação IVS12nt1

Foi a primeira mutação identificada no gene PAH e é citada como uma das mais freqüentes dentre os alelos PKU caucasianos (OMIM; DiLella e cols., 1986).

No Brasil, os pacientes de Porto Alegre portadores da IVS12nt1 descendem de alemães ou poloneses (Pérez e cols., 1996).

A TAB. 5 mostra as freqüências relativas do alelos IVS12nt1 em vários países.

TABELA 5
Freqüência relativa da mutação IVS12nt1 em diferentes populações

Local	Freqüência relativa (%)	Referência
Brasil (RS)	6	Perez e cols., 1996
Brasil (SP)	1,3 - 2,5	Perez e cols., 1996, Acosta e cols., 2001
Portugal	<1	Zschocke, 2003
Espanha	0	Zschocke, 2003
Alemanha	10	Zschocke, 2003
Dinamarca	37	Zschocke, 2003
Itália	0 - 9	Zschocke, 2003
Bulgária	25	Zschocke, 2003
Inglaterra	16 - 27	Zschocke, 2003
França	7 - 9	Zschocke, 2003
Irlanda	<1 - 6	Zschocke, 2003

A substituição de G→A abole a seqüência de reconhecimento para maturação do RNA na extremidade 5' do íntron 12, resultando em uma deleção de 116 pares de base do cDNA, que correspondem ao éxon 12.

Por conseqüência, a proteína sintetizada tem 52 aminoácidos a menos na porção C-terminal e a atividade da PAH é abolida (Marvit e cols., 1987).

A mutação pode ser identificada através de digestão do produto de PCR do éxon 12, que também abrange parte do íntron 12, usando um dos iniciadores ACRS (*amplification created restriction sites*). Este iniciador insere uma base diferente daquela presente na seqüência normal, criando um sítio de restrição artificial para a enzima *RsaI*. A presença da mutação abole o sítio (Eiken e cols., 1991).

O modelo teórico para detecção desta mutação está esquematizado na FIG. 6.

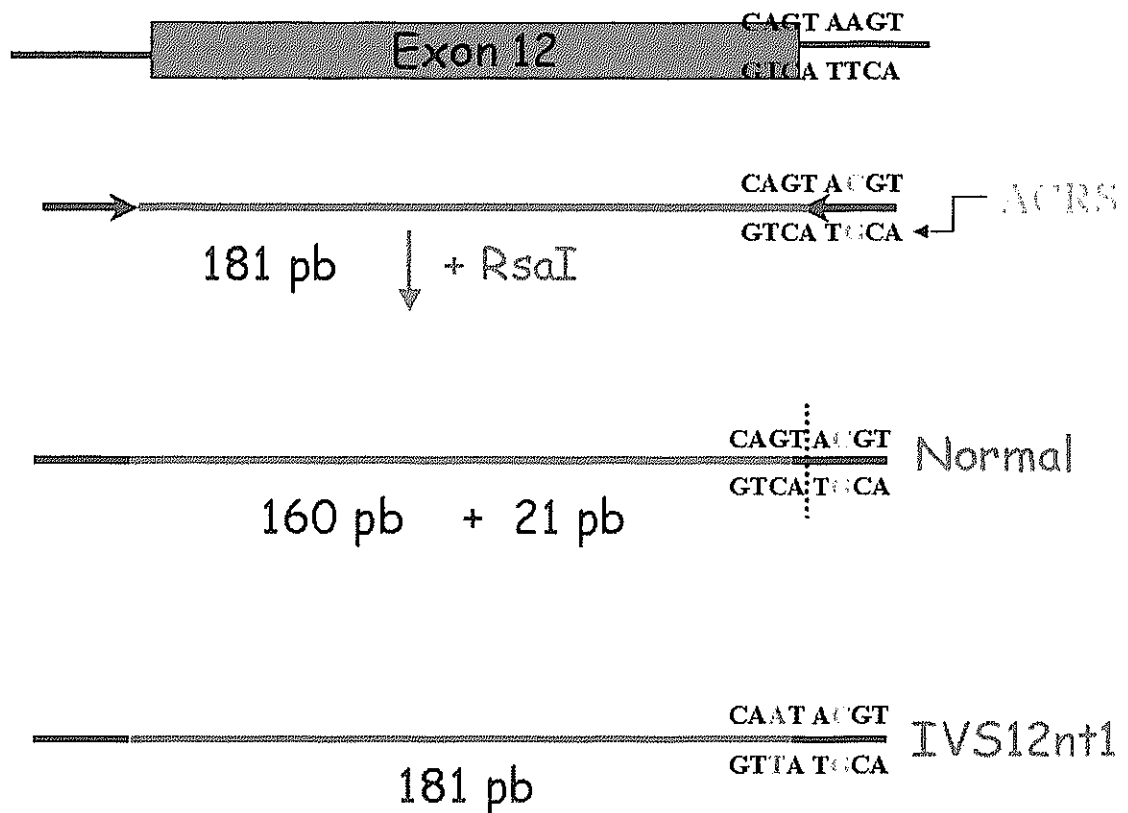


FIGURA 6 - Princípio teórico de detecção da mutação IVS12nt1

A mutação pode ser identificada através de digestão do produto de PCR do exon 12, que também abrange parte do intron 12, usando um dos primers ACRS (*amplification created restriction sites*). Este primer insere uma base diferente (representada em amarelo) daquela presente na seqüência normal criando um sítio de restrição artificial para a enzima *RsaI*. A digestão dos alelos normais, gera fragmentos de 160 pb e 21 pb. A substituição de G/C por A/T (representadas em vermelho no alelo IVS12) abole o sítio de restrição nos alelos IVS12, que permanecem com os 181 pb originais. A mutação no sítio 5' doador de splicing resulta na deleção de 116 pares de base do cDNA, que correspondem ao exon 12. Por consequência, a proteína sintetizada tem 52 aminoácidos a menos na porção C-terminal.

1.12.4. Mutação R408W

Esta é uma das mutações mais comuns, atingindo uma frequência de até 84% em pacientes caucasianos (Zschocke, 2003). A mutação R408W está associada a diferentes haplótipos nas regiões noroeste e leste da Europa, sugerindo que tenha tido 2 origens independentes: uma céltica e uma eslava (Eisensmith & Woo, 1992). No Brasil, os pacientes de Porto Alegre com o alelo R408W, são descendentes de alemães ou poloneses (Pérez e cols., 1996).

A TAB. 6 mostra as frequências relativas do alelos R408W em vários países. Os dados se referem às maiores frequências encontradas dos alelos, independente do haplótipo associado.

TABELA 6
Frequência relativa da mutação R408W em diferentes populações

Local	Frequência relativa (%)	Referência
Brasil (RS)	6	Perez e cols., 1996
Brasil (SP)	3,5	Acosta e cols., 2001
Portugal	0,9	Rivera e cols., 1998
Espanha	0 - 3	Zschocke, 2003
Alemanha	19 - 38	Zschocke, 2003
Dinamarca	17	Zschocke, 2003
Inglaterra	1 - 12	Zschocke, 2003
Irlanda	25 - 56	Zschocke, 2003
Estônia	84	Zschocke, 2003

NOTA - Foram consideradas as maiores frequências, independente do haplótipo associado.

Descrita por DiLella e colaboradores em 1987, esta mutação é uma transição C→T no éxon 12, que resulta na substituição de uma arginina por um triptofano no resíduo 408 da PAH.

Esta mutação é detectada por digestão com a enzima de restrição *Sfi*I, do produto amplificado por PCR do éxon 12 (Eiken e cols., 1996). O sítio de restrição é criado pela mutação.

O modelo teórico para detecção desta mutação está esquematizado na FIG. 7.

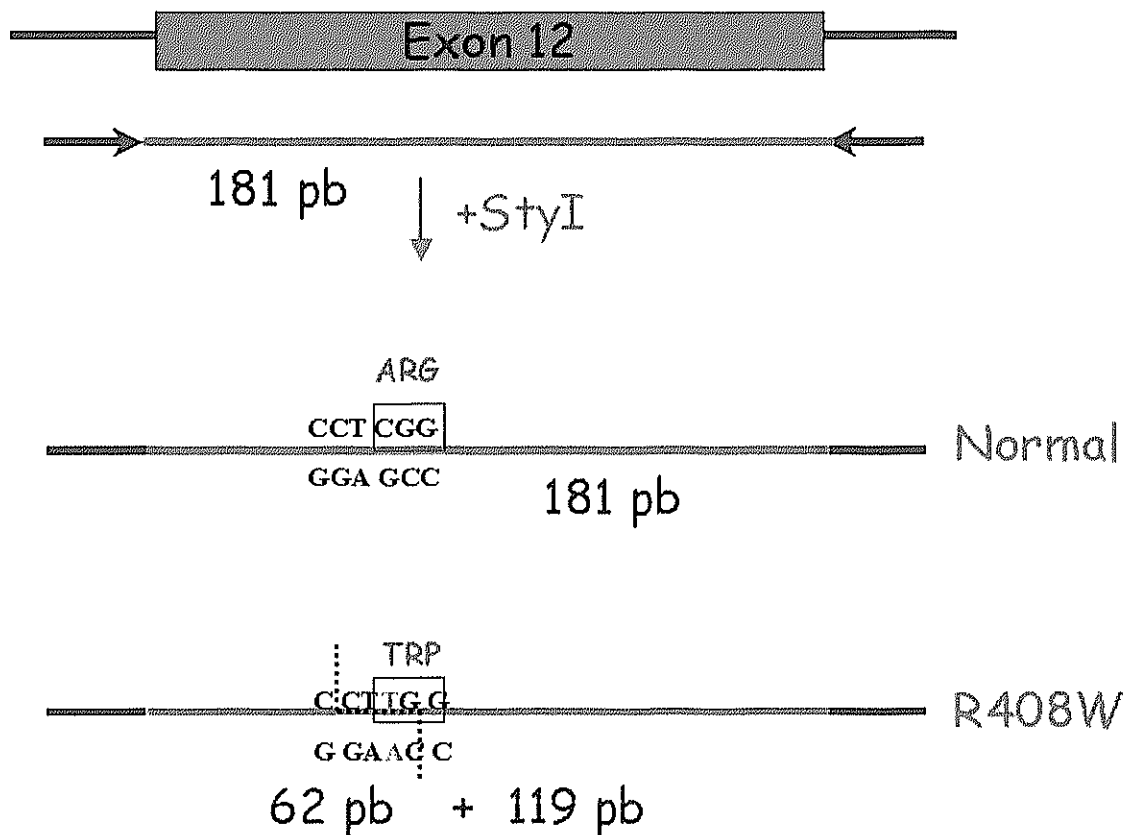


FIGURA 7 - Princípio teórico de detecção da mutação R408W

A detecção desta mutação se baseia no resultado obtido ao se submeter o produto de amplificação por PCR do exon 12 do gene *PAH* à digestão com a enzima de restrição *StyI*. Os fragmentos amplificados possuem 181 pb e os alelos normais não possuem o sítio para a enzima *StyI* nesta seqüência. A mutação de C/G para T/A (representados em vermelho no alelo R408W) cria o sítio de restrição, gerando fragmentos de 62 pb e 119 pb. Na enzima *PAH*, a mutação provoca a substituição de arginina por triptofano no resíduo 408.

1.13. Objetivos

São objetivos do presente estudo:

1.13.1. Geral

Caracterizar o espectro de mutações causadoras de fenilcetonúria no Estado de Minas Gerais.

1.13.2. Específicos

1. Padronizar os métodos de detecção das mutações V388M, R408W, IVS10nt11 e IVS12nt1;
2. Determinar a frequência relativa das mutações V388M, R408W, IVS10nt11 e IVS12nt1 no gene *PAH* em indivíduos com fenilcetonúria do Estado de Minas Gerais;
3. Verificar a distribuição geográfica destas mutações considerando os municípios do Estado de Minas Gerais.
4. Averiguar a correlação genótipo/fenótipo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. A amostra

2.1.1. Composição da amostra

Foram estudados 100 indivíduos, todos com diagnóstico de PKU, que são atendidos no Ambulatório de Fenilcetonúria do Ambulatório São Vicente, do complexo do Hospital das Clínicas da UFMG. Este ambulatório é coordenado pelo Prof. Dr. Marcos José Burle de Aguiar, do Departamento de Pediatria desta Universidade.

Dos 100 pacientes, 70 foram detectados através do Programa de Triagem Neonatal, desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, coordenado pelo Dr. José Nelio Januário, do Departamento de Clínica Médica. O programa teve início em setembro de 1993, e atualmente atinge todo o Estado de Minas Gerais, com uma cobertura média de 94% dos nascimentos (Januário, 2002). Os 70 pacientes averiguados através de triagem neonatal, nasceram entre 14 de março de 1994 e 21 de outubro de 2001.

Outro grupo de pacientes com PKU da amostra são atendidos no Ambulatório São Vicente e não foram triados pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais.

Além destes, foram submetidos a triagem de mutação os irmãos dos casos-índice dos dois grupos. Estas crianças foram colocadas em grupos separados por terem sido averiguadas secundariamente à averiguação de seus irmãos.

Para análise dos dados, os pacientes foram distribuídos em 4 classes conforme mostrado na TAB. 7:

TABELA 7
Distribuição da amostra conforme a fonte de averiguação

Fonte de averiguação	Número de indivíduos testados por mutação	
	V388M, IVS10nt11 e IVS12nt1	R408W
Averiguados pelo Programa de Triagem Neonatal	70	51
Irmãos de crianças averiguadas pelo Programa de Triagem Neonatal	9	6
Averiguados no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG	19	10
Irmãos de pacientes averiguados no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG	2	-
Total	100	67

A distribuição dos pacientes, conforme os critérios usados para classificação fenotípica em Minas Gerais, está na TAB. 8.

TABELA 8

Classificação das HPAs em MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico

Tipo provável de HPA (em 6 meses de acompanhamento)	Níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico	Número	Frequência (%)
HPA transitória	< 240 $\mu\text{mol/L}$	0	0
HPA permanente	240 $\mu\text{mol/L}$ – 600 $\mu\text{mol/L}$	10	10,3
PKU	> 600 $\mu\text{mol/L}$	87	89,7
Total	-	97	100

FONTE: adaptado de Starling e cols., 1999

Após este diagnóstico provável inicial, os pacientes são acompanhados durante seis meses, seguindo as recomendações dietéticas específicas para cada caso. Aqueles pacientes com níveis séricos de fenilalanina menores que 240 $\mu\text{mol/L}$, recebem diagnóstico de HPA transitória e são acompanhados durante mais algum tempo, mantendo dieta normal para a idade. Caso os níveis de fenilalanina permaneçam menores que 240 $\mu\text{mol/L}$, recebem alta do serviço com diagnóstico de HPA transitória (Starling e cols., 1999).

Os pacientes cujos níveis séricos de fenilalanina são maiores que 600 $\mu\text{mol/L}$, são submetidos ao teste de sobrecarga de fenilalanina para a definição do diagnóstico. O teste de sobrecarga consiste em fornecer ao paciente, durante três dias consecutivos, uma dieta contendo quantidades

normais de fenilalanina (180 mg/kg/dia). Com base nos níveis séricos de fenilalanina após a sobrecarga, o diagnóstico é definido conforme a TAB. 9 (Starling e cols., 1999).

TABELA 9

Classificação das HPAs em MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina após sobrecarga

Tipo de HPA	Níveis séricos de fenilalanina após sobrecarga
HPA permanente	< 600 $\mu\text{mol/L}$
PKU leve	600 $\mu\text{mol/L}$ – 1.200 $\mu\text{mol/L}$
PKU clássica	> 1.200 $\mu\text{mol/L}$

FONTE: adaptado de Starling e cols., 1999.

Apenas os pacientes com entrada através do Programa de Triagem Neonatal foram submetidos ao teste de sobrecarga. Da amostra de 70 pacientes deste estudo, 49 foram submetidos a teste de sobrecarga (ver TAB.10).

TABELA 10

Pacientes com PKU de MG de acordo com os níveis séricos de fenilalanina após sobrecarga

Tipo de PKU	Número de indivíduos	Freqüência (%)
PKU leve	15	30,6
PKU clássica	34	69,4
Total	49	100

Averiguou-se também a ocorrência de casamentos consangüíneos nas famílias dos pacientes. Este dado foi obtido para 79 dos 100 pacientes. Como nem sempre foi possível determinar o grau de parentesco, anotou-se apenas a ocorrência (S) ou ausência (N) de consangüinidade entre os pais (TAB. 11).

TABELA 11

Casamentos consangüíneos entre os pais de pacientes com PKU de MG

Consangüinidade entre os pais	Número	Freqüência (%)
Sim	16	22,2
Não	56	77,8
Total	72	100

2.1.2. Coleta do sangue

Foram coletados de 3 a 5 mL de sangue total de cada indivíduo, mediante consentimento informado dos pais ou responsáveis (ANEXO A). O projeto foi aprovado pela comissão de ética da UFMG. As coletas foram feitas com técnica asséptica, utilizando tubos tipo *vacutainer* com EDTA. O sangue foi mantido congelado a -20° C até o momento da extração do DNA.

2.2. Extração do DNA

Para a extração de DNA a partir de sangue periférico foi adaptado o protocolo descrito por Miller e colaboradores (1988).

Protocolo para extração de DNA de sangue venoso 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, 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%, 6 µL de Proteinase K a 20%;
11. Incubar por uma noite em banho-maria a 56° C ou deixar por 48 h a temperatura ambiente;
12. Adicionar 0,75 mL de NaCl 5M 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 delicadamente por inversão;
16. Desprezar o etanol 100% e lavar o *pellet* duas vezes com etanol 70%;
17. Transferir o *pellet* para um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL;
18. Deixar o *pellet* à temperatura ambiente;
19. Ressuspender o DNA em 300 µL de TE;
20. Armazenar a 4° C.

A concentração do DNA extraído foi determinada através de espectrofotometria (*Spectrophotometre Hitachi, U-2001*), depois do quê foram preparadas alíquotas com uma concentração de 50 ng/ μ L para utilização nas reações de PCR.

2.3. Amplificação por PCR

Os segmentos do gene PAH que incluem as mutações a serem estudadas, foram amplificados por PCR, com os iniciadores mostrados na TAB.12.

As reações de PCR foram feitas no termociclador *Programmable Thermal Controller (PTC-100)* da *MJ Research*, e para cada conjunto de iniciadores foi utilizado um programa específico:

- Para iniciadores 11A (F) e 11B (R), que amplificam o éxon 11, procedeu-se uma desnaturação inicial de 95° C por 4 min., seguida de 24 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min., anelamento a 65°C por 1 min. e extensão a 72° C por 1 min., finalizados com 5 min. de extensão a 72° C.
- Para iniciadores 12A (F) e 12BIVS12nt1Ra (R), que amplificam o éxon 12, procedeu-se uma desnaturação inicial de 94° C por 5 min., seguida de 25 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min., anelamento a 50°C por 1 min. e extensão a 72° C por 1 min., finalizados com 5 min. de extensão a 72° C.

TABELA 12
Iniciadores para análise de mutações

MUTAÇÃO	INICIADORES (5' – 3')
V388M e IVS10nt11	11A: (F) AAG GAA CGG GGT AGA TGA GAG AAG GGG C
	11B: (R) GGT ACA AAG TTG CTG TAG ACA TTG GAG TCC
R408W e IVS12nt1	12 A: (F) CCA AAT GGT GCC CTT CAC TCA AGC C
	12BIVS12nt1Ra: (R) CTC GTA AGG TGT AAA TTA CGT A

Fonte: Zschocke e cols., 1995 e Eiken e cols., 1991, 1996.

Cada reação de PCR foi feita em tubos tipo *Eppendorf* de 500 μ L. Para cada conjunto de iniciadores a reação foi otimizada para um volume total de 50 μ L, contendo:

- Com iniciadores 11A (F) e 11B (R): tampão Phoneutria: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂; 200 μ mol de cada dNTP; 0,2 nmol de cada iniciador; 1 U de Taq DNA polimerase (PhN, Phoneutria); 100 ng de DNA.
- Com iniciadores 12A (F) e 12B IVS12nt1Ra (R): tampão Phoneutria: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂; 200 μ mol de cada dNTP; 0,1 nmol do iniciador 12B IVS12nt1Ra (R) e 0,008 nmol do iniciador 12A (F); 1 U de Taq DNA polimerase (PhN, Phoneutria); 200 ng de DNA.

Para cada conjunto de reações de PCR foi usado um controle negativo, no qual todos os reagentes estavam presentes, mas 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.

Tanto para averiguar o funcionamento da PCR quanto para determinar a quantidade de produto a ser submetido à digestão, todos os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, e visualizados após coloração com brometo de etídio (Sambrook & Russel, 2001).

2.4. Digestão com enzima de restrição

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à digestão com endonucleases de restrição específicas, de acordo com a recomendação dos fabricantes. As amostras foram incubadas a 37° C durante 16 h e, em seguida, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As enzimas específicas para cada mutação são:

- V388M – *BsaAI* – *NEW ENGLAND BioLabs*
- IVS10nt11 – *Ddel* - *Promega*
- R408W – *StyI* – *NEW ENGLAND BioLabs*
- IVS12nt1 – *RsaI* – *Amersham Pharmacia Biotech*

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (V388M), 12% (IVS12nt1 e IVS10nt11) ou 15% (R408W) (Sambrook & Russell, 2001), e os géis foram corados com prata (Santos e cols., 1993) ou com brometo de etídio (Sambrook & Russell, 2001).

Os resultados foram visualizados diretamente no transiluminador da *Nucleo Vision (Nucleo Tek)* e as imagens foram capturadas com o *software Gel Expert (Nucleo Tek)*.

2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através dos seguintes procedimentos do pacote computacional SAS (1995):

- Para obtenção dos coeficientes de regressão e teste dos fatores que influenciam as variáveis dependentes, foram conduzidas, respectivamente, análises de regressão e dos quadrados mínimos para número desigual nas subclasses, mediante os procedimentos PROC REG e PROC GLM (SAS, 1995);
- Os fatores incluídos no modelo foram testados por meio do teste de "F", considerando um nível de probabilidade maior ou igual a 0,05;
- As médias ajustadas, e seus respectivos erros padrão, foram obtidas por meio da metodologia dos quadrados mínimos, considerando o número desigual nas subclasses, disponível na opção LSMEANS, do procedimento PROC GLM (SAS, 1995);
- Para comparação das médias das diferentes subclasses foram realizados contrastes, por meio da opção CONTRAST, do procedimento PROC GLM (SAS, 1995).

2.7. Composição dos mapas mostrando a distribuição geográfica das mutações

Os mapas foram gentilmente 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. Padronização da metodologia

3.1.1. Amplificação por PCR dos éxons 11 e 12 do gene *PAH*

Um dos objetivos deste estudo foi a padronização da metodologia de detecção destes RFLPs, uma vez que a triagem das mutações causadoras da PKU nos pacientes de Minas Gerais não se limitará a esta amostra, se estendendo a todo paciente que venha a ser atendido no Ambulatório de Fenilcetonúria.

Como as reações de PCR não estavam detalhadas na literatura, foi necessário testar várias condições diferentes, onde se variou desde a temperatura de anelamento dos iniciadores, quanto as quantidades de iniciadores e de DNA utilizados nas reações. O objetivo foi obter produtos de PCR homogêneos e suficientes para este estudo. As condições que se mostraram ideais são as descritas no item 2.3.

Para análise das mutações objetos do presente estudo, foram amplificados os éxons 11 e 12 do gene *PAH*, usando materiais e metodologia descritos no item 2.3. O rendimento das reações de PCR foi conferido através

de eletroforese em gel de agarose a 2%, quando se avaliou a quantidade a ser usada nas reações de digestão com as enzimas de restrição específicas para cada mutação.

As FIG. 8 e 9 mostram géis de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, onde foram aplicados produtos das PCRs dos éxons 11 e 12 respectivamente.

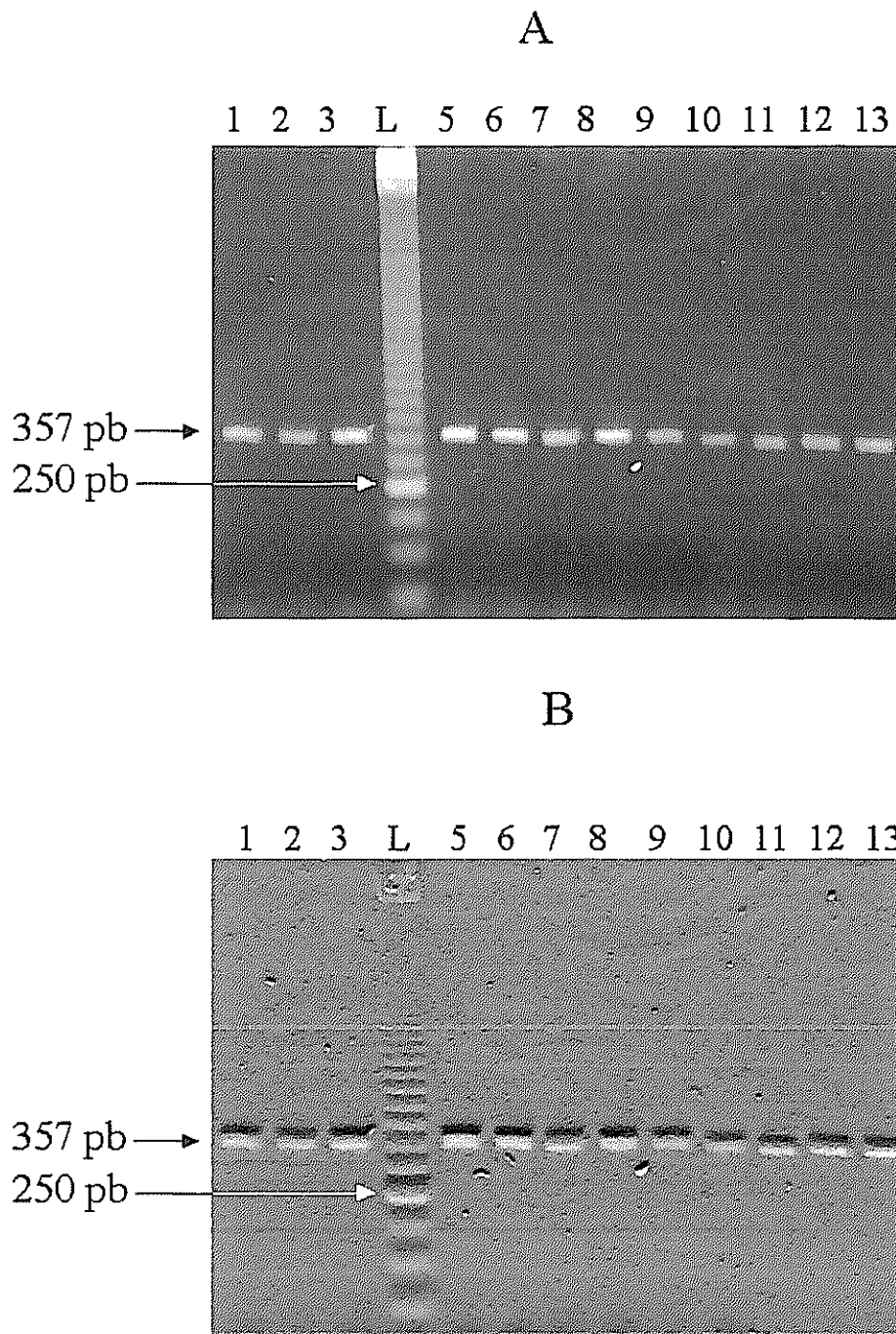


FIGURA 8 - Produto da amplificação por PCR do exon 11

Separação eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização usando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra a amplificação por PCR do exon 11 do gene *PAH* usando iniciadores e condições de reação detalhadas no texto. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech, estando indicada a banda em realce de 250 pb. Nas demais canaletas, de 1 a 13, bandas de 357 pb, amplificadas de diferentes pacientes.

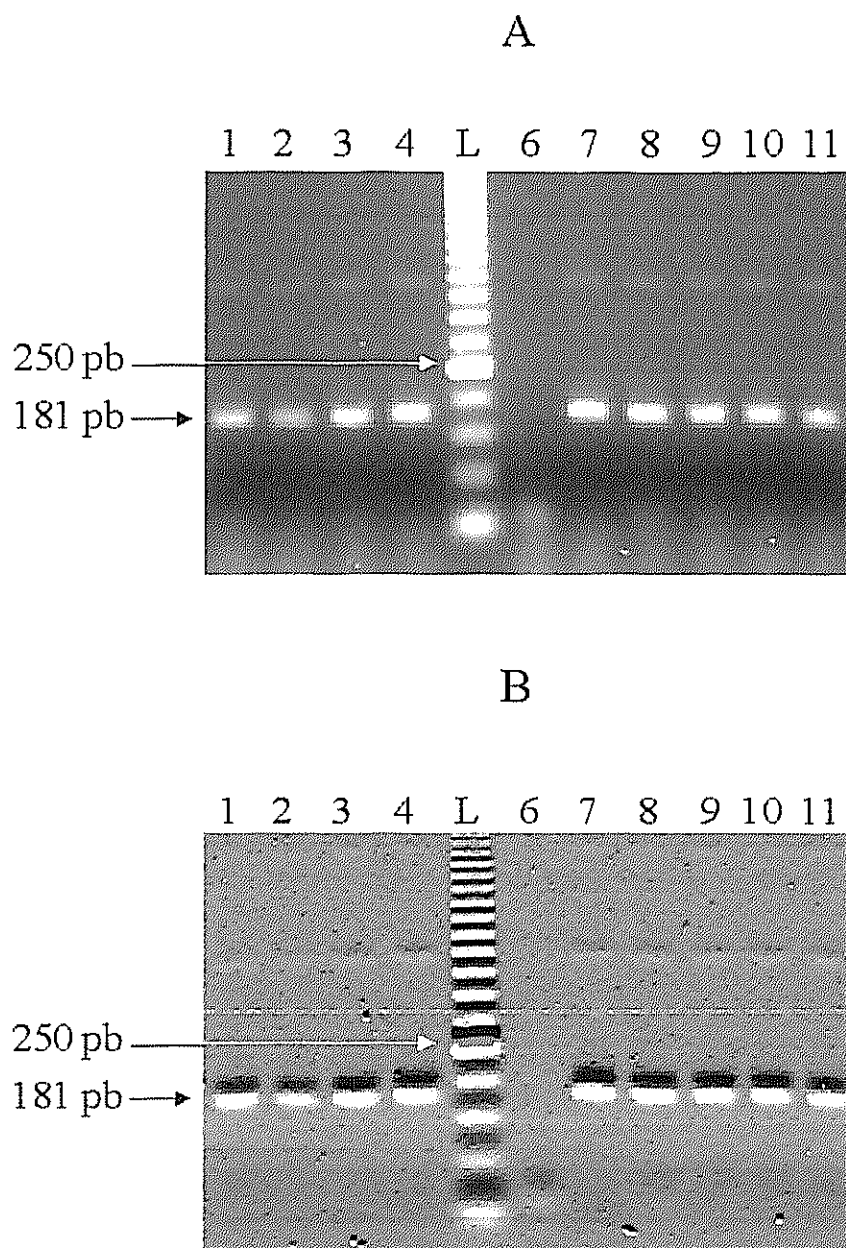


FIGURA 9 - Produto da amplificação por PCR do exon 12

Separação eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização usando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra a amplificação por PCR do exon 12 do gene *PAH* usando iniciadores e condições de reação detalhadas no texto. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech, estando indicada a banda em realce de 250 pb. Na canaleta 6, controle negativo de PCR. Nas demais canaletas, de 1 a 4 e 7 a 11, bandas de 181 pb, amplificadas de diferentes pacientes.

3.1.2. Detecção dos RFLPs gerados pelas diferentes mutações

3.1.2.1. A detecção da mutação V388M

Um total de 100 indivíduos não-aparentados e afetados por PKU do Estado de Minas Gerais foi triado para a presença da mutação V388M. O produto da PCR do éxon 11 de cada paciente foi submetido a digestão com a enzima de restrição *BsaAI* durante 16h à 37°C. As reações de digestão foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e a quantidade de produto da PCR a ser digerida foi definida de acordo com o rendimento obtido por reação de PCR, avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

A FIG. 10 mostra um gel dos produtos de digestão da PCR do éxon 11 (357 pb), com a enzima de restrição *BsaAI*. Alelos normais possuem o sítio de restrição e a digestão gera fragmentos de 205 pb e 152 pb. A mutação V388M abole o sítio da enzima e o fragmento permanece com os 357 pb originais. No gel mostrado na FIG. 10 aparecem 2 pacientes heterozigotos e 2 pacientes homozigotos para a mutação V388M.

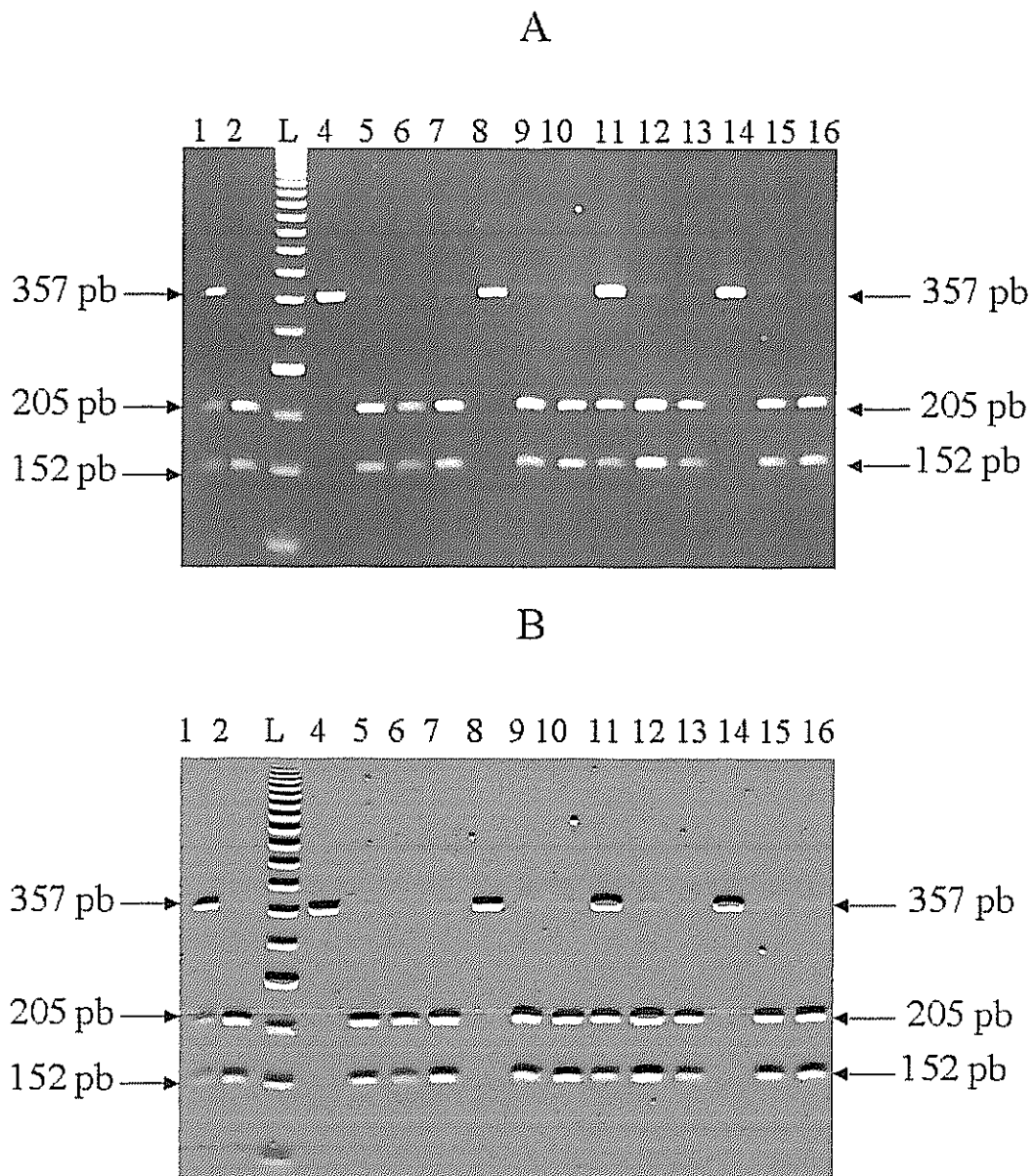


FIGURA 10 - Detecção da mutação V388M

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 11 (357 pb), com a enzima de restrição *Bsa*AI. Alelos normais possuem o sítio e geram fragmentos de 205 pb e 152 pb. A mutação V388M abole o sítio da enzima e o fragmento permanece com os 357 pb originais. Nas canaletas 1 e 11, pacientes heterozigotos para a mutação V388M. Nas canaletas 8 e 14, pacientes homozigotos para a mutação V388M. Na canaleta 4, produto da PCR do exon 11 não digerido. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50 pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech. Nas demais canaletas, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação.

3.1.2.2. A detecção da mutação IVS10nt11

Um total de 100 indivíduos não-aparentados e afetados por PKU do Estado de Minas Gerais foi triado para a presença da mutação IVS10nt11. O produto da PCR do éxon 11 de cada paciente foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Ddel* durante 16h à 37°C. As reações de digestão foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e a quantidade de produto da PCR a ser digerida foi definida de acordo com o rendimento obtido por reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

A FIG. 11 mostra um gel dos produtos de digestão da PCR do éxon 11 (357 pb), com a enzima de restrição *Ddel*. Como a mutação cria o sítio de restrição da enzima, foi necessário usar um controle positivo de digestão. Com esta finalidade foi usado um produto de PCR de 181 pb que contém 2 sítios para a enzima *Ddel*. O controle foi feito para cada reação e a digestão do fragmento controle gera bandas de 108 pb, 38 pb e 35 pb.

Alelos normais para a mutação IVS10nt11 não possuem o sítio reconhecido pela *Ddel* e permanecem com os 357 pb originais. Alelos portadores da mutação IVS10nt11 possuem o sítio de restrição e são digeridos em fragmentos de 251 pb e 96 pb. No gel da FIG.11 aparecem 3 pacientes heterozigotos para a mutação IVS10nt11.

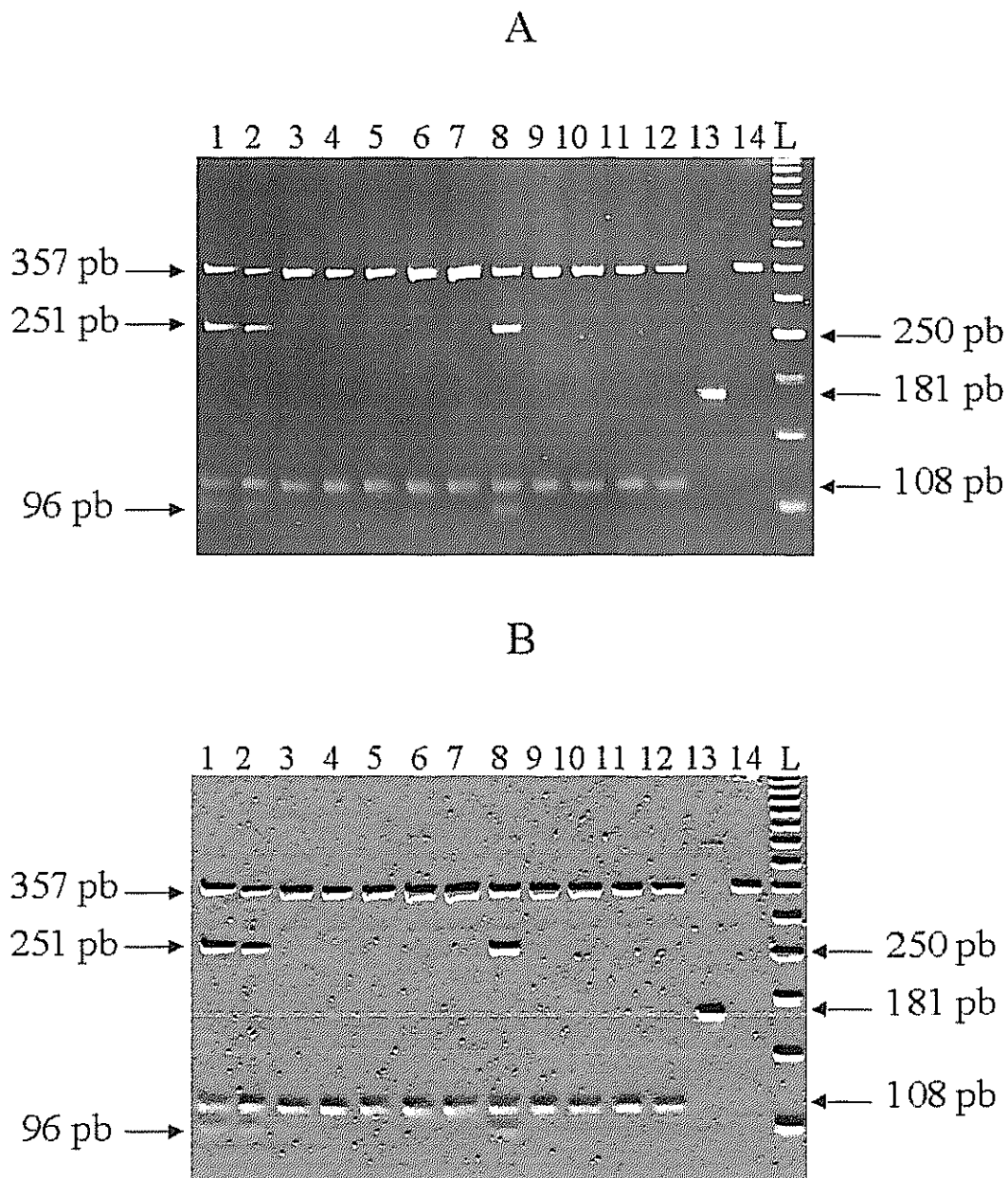


FIGURA 11 - Detecção da mutação IVS10nt11

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 11 (357 pb), com a enzima de restrição *DdeI*. Como a mutação cria o sítio, para cada teste, foi usado como controle positivo de digestão um produto de 181 pb, que contém 2 sítios da *DdeI* e gera fragmentos de 108 pb (indicado), de 38 pb e de 35 pb (não visíveis). Alelos normais do exon 11 não são digeridos (permanecem com 357 pb) e alelos IVS10nt11 geram fragmentos de 251 pb e 96 pb. Nas canaletas 1, 2 e 8, pacientes heterozigotos para a mutação IVS10nt11. Na canaleta 13, produto não digerido do controle positivo de digestão. Na canaleta 14, produto não digerido da PCR do exon 11. Nas canaletas de 3 a 7 e de 9 a 12, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação IVS10nt11. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech.

3.1.2.3. A detecção da mutação IVS12nt1

Um total de 100 indivíduos não-aparentados e afetados por PKU do Estado de Minas Gerais foi triado para a presença da mutação IVS12nt1. O produto da PCR do éxon 12 de cada paciente foi submetido a digestão com a enzima de restrição *RsaI* durante 16h à 37°C. As reações de digestão foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e a quantidade de produto da PCR a ser digerida foi definida de acordo com o rendimento obtido por reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

A FIG. 12 mostra um gel dos produtos de digestão da PCR do éxon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *RsaI*. O sítio de restrição para a enzima *RsaI* foi criado pelo iniciador ACRS em todos os alelos amplificados por PCR. Alelos normais para a mutação IVS12nt1 são digeridos em fragmentos de 160 pb e 21 pb. A mutação IVS12nt1 abole o sítio da enzima e o fragmento permanece com os 181 pb originais. No gel da FIG. 12 aparece 1 paciente heterozigoto para a mutação IVS12nt1.

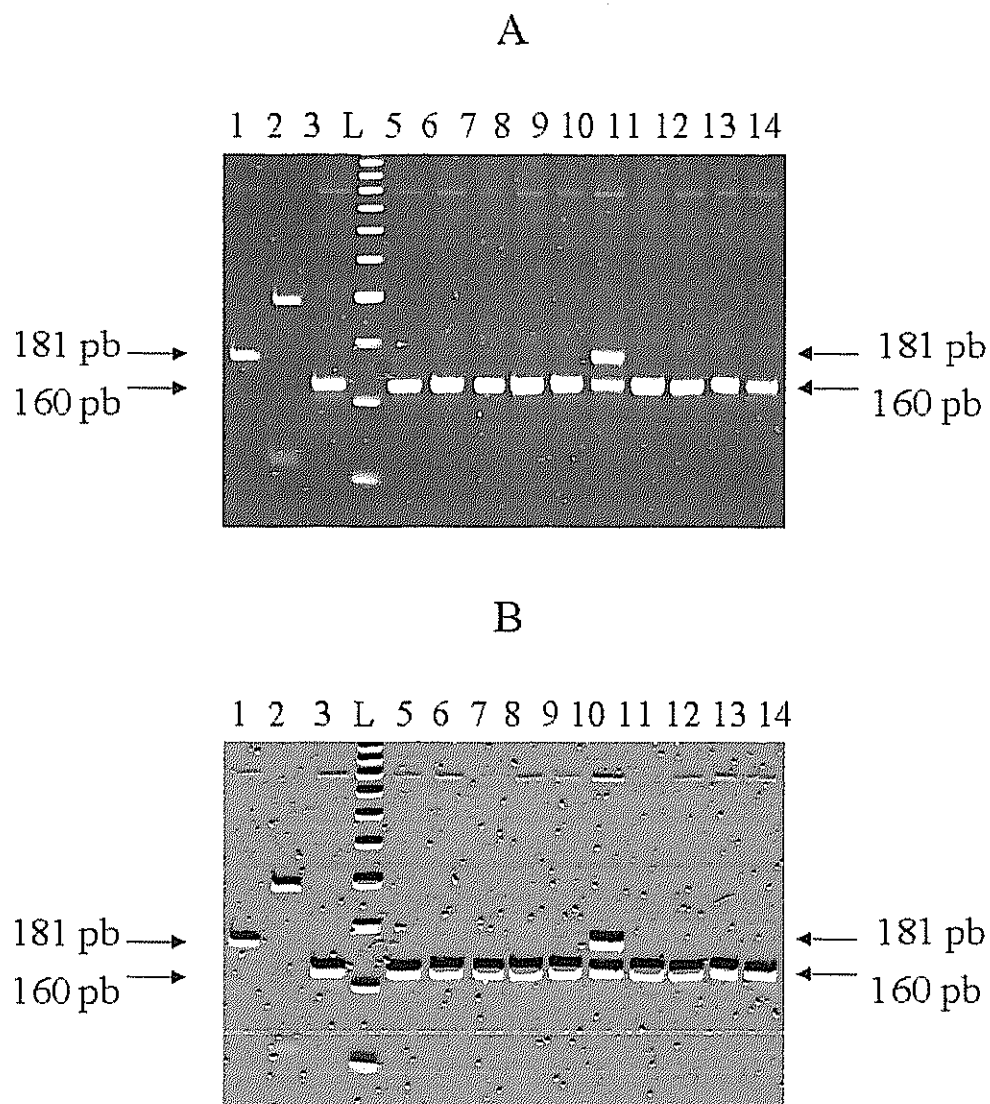


FIGURA 12 - Detecção da mutação IVS12nt1

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *RsaI*. O primer utilizado cria um sítio artificial em todos os alelos, gerando fragmentos de 160 pb (indicado) e de 21 pb (não visíveis). A mutação IVS12nt1 abole o sítio da enzima e o fragmento permanece com os 181 pb originais. Na canaleta 10, paciente heterozigoto para a mutação IVS12nt1. Nas canaletas 3, de 5 a 9 e de 11 a 14, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação IVS12nt1. Na canaleta 1, produto da PCR do exon 12 não digerido. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50 pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech.

3.1.2.4. A detecção da mutação R408W

A mutação R408W foi testada em 67 dos 100 pacientes da amostra, devido a dificuldades técnicas com a enzima de restrição *StyI*, que apresentou uma perda gradual de atividade durante o desenvolvimento do projeto.

Para detecção da mutação R408W, o produto da PCR do éxon 12 de cada paciente foi submetido a digestão com a enzima de restrição *StyI* durante 16h à 37°C. As reações de digestão foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e a quantidade de produto da PCR a ser digerida foi definida de acordo com o rendimento obtido por reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12 ou 15%.

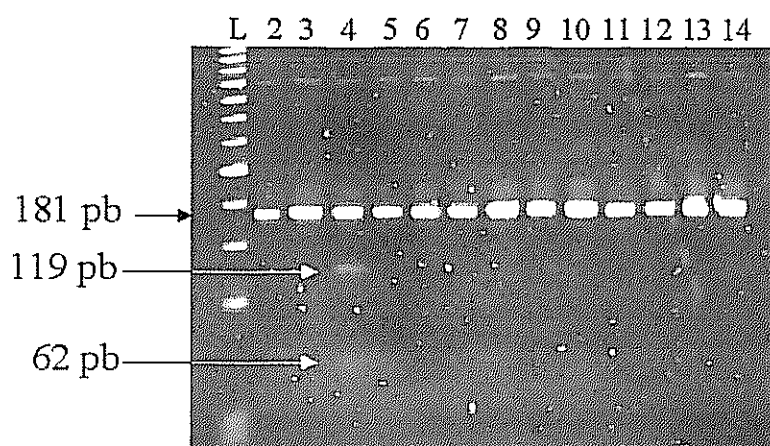
A FIG. 13 mostra um gel de poliacrilamida 12% com produtos de digestão da PCR do éxon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *StyI*. Alelos normais não possuem o sítio de restrição e o fragmento permanece com os 181 pb originais. Alelos com a mutação R408W possuem o sítio da enzima e são digeridos em fragmentos de 119 pb e 62 pb. Um dos pacientes neste gel é heterozigoto para a mutação R408W.

Como a presença da mutação cria o sítio de restrição para a enzima *StyI*, foi necessário usar-se um controle positivo de digestão. Com esta finalidade foram utilizados produtos de PCR de tamanho conhecido e que continham um sítio para a enzima *StyI*. Inicialmente, usou-se um produto de PCR com 357 pb, que submetido a digestão com *StyI* gera fragmentos de 228 pb e 129 pb. Este controle foi feito em um tubo separado para cada conjunto de 40 tubos de reação de digestão. A FIG. 14 mostra o controle positivo de digestão, que foi feito para o conjunto de reações de digestão dos pacientes representados no gel da FIG. 13.

Como depois de um tempo a enzima passou a proporcionar apenas digestão parcial, optou-se por usar um controle de digestão por tubo. Para garantir uma melhor visualização dos fragmentos em caso de presença da mutação, passou-se a utilizar, como controle positivo de digestão, um produto de PCR com 592 pb. Uma vez submetido à digestão com *Styl*, este produto gera bandas de 497 pb e 95 pb.

A FIG. 15 mostra, em uma das canaletas, a digestão do produto de PCR do mesmo paciente heterozigoto para R408W, que aparece na FIG. 13, usando-se controle positivo de digestão por tubo. Como pode ser observado na FIG.15, o controle positivo apresenta digestão parcial. Só foram considerados neste trabalho os resultados cujo controle positivo de digestão mostrou digestão completa.

A



B

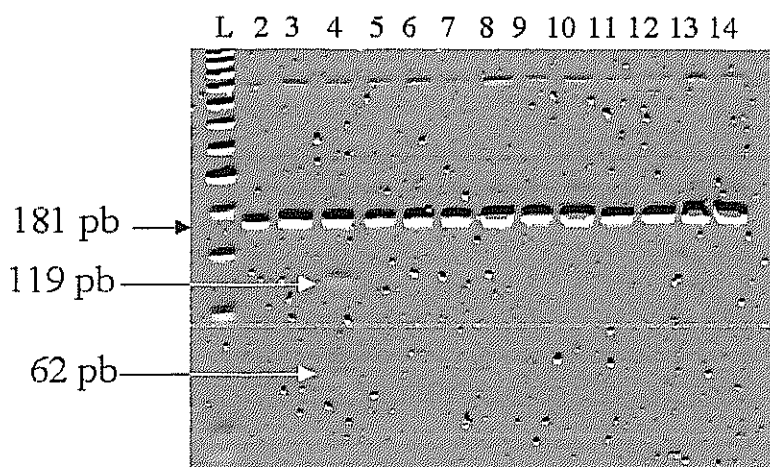


FIGURA 13 - Detecção da mutação R408W usando controle positivo de digestão por conjunto de reações

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *StyI*. Alelos normais não possuem o sítio e o fragmento permanece com os 181 pb originais. A mutação R408W cria o sítio da enzima e gera fragmentos de 119 pb e 62 pb. Na canaleta 4, paciente heterozigoto para a mutação R408W. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50 pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech. Nas demais canaletas, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação. O controle positivo de digestão foi feito em tubo separado para cada conjunto de 40 reações e foi aplicado em outro gel, que está mostrado na FIG. 14.

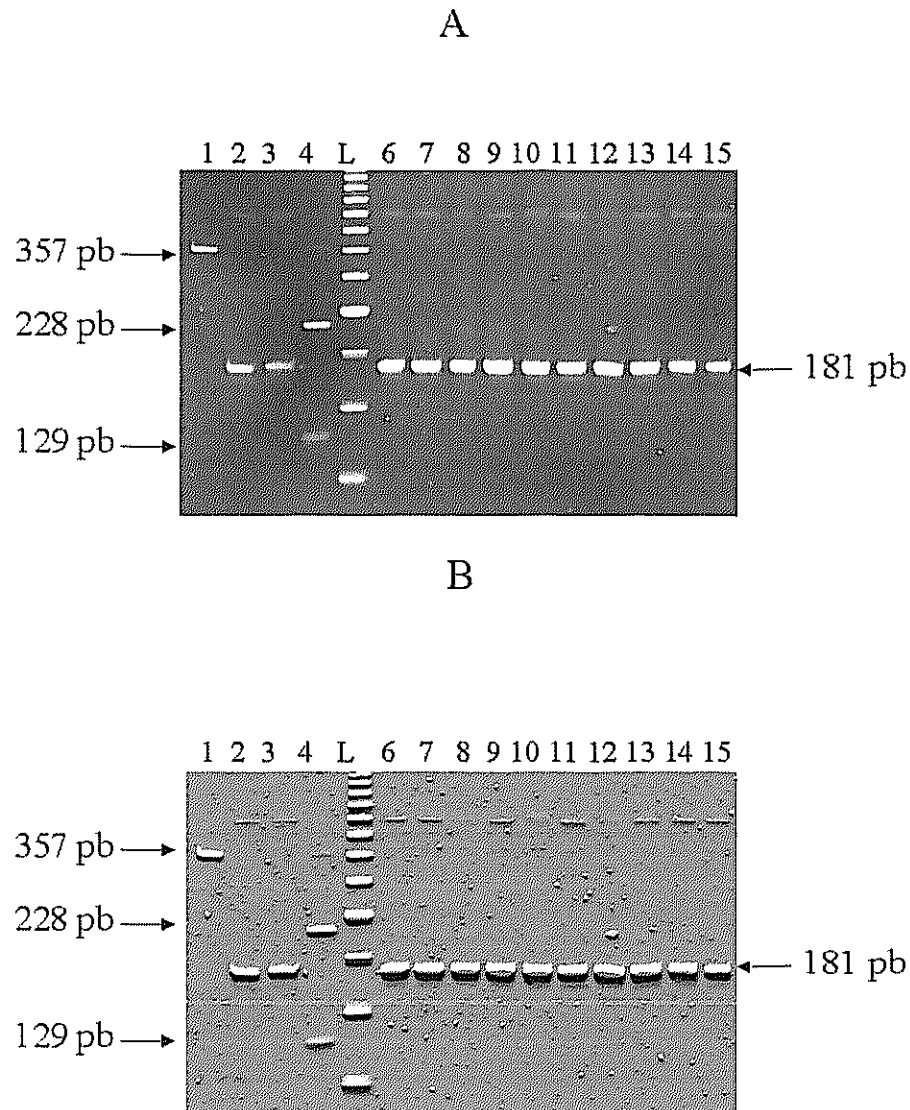


FIGURA 14 - Controle positivo de digestão para detecção da mutação R408W

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation). A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *Styl*. Como a mutação cria o sítio de restrição, foi feito um tubo teste de controle positivo de digestão para cada conjunto de 40 tubos testados, utilizando-se o mesmo pré-mix. O produto utilizado para este controle tem 357 pb e um sítio para a *Styl* gerando fragmentos de 228 pb e 129 pb. Na canaleta 1, produto de 357 pb não digerido. Na canaleta 2, produto da PCR do exon 12 não digerido. Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50 pb Ladder da Amersham Pharmacia Biotech. Nas demais canaletas, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação R408W, apresentando apenas a banda não digerida, com os 181 pb originais.

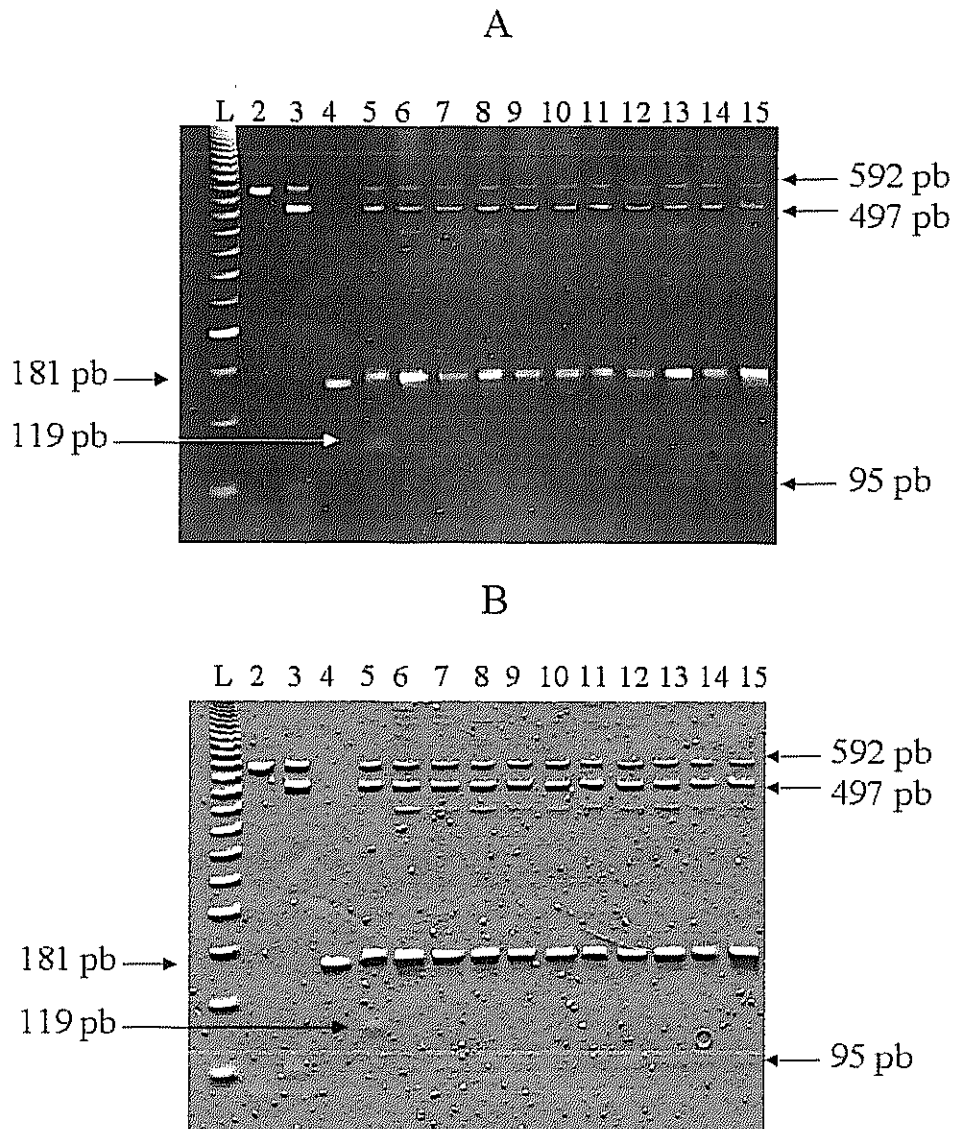


FIGURA 15 - Detecção da mutação R408W usando controle positivo de digestão por reação

Separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, corado com brometo de etídio. Em A, fotografia convencional e em B visualização utilizando recurso *emboss* do *software Gel Expert (Nucleo Vision, Nucleo Tech Corporation)*. A figura mostra produtos de digestão da PCR do exon 12 (181 pb), com a enzima de restrição *Styl*. Como a enzima cria o sítio foi usado em cada teste, como controle positivo de digestão, um produto de 592 pb, que possui um sítio para a enzima *Styl*, gerando fragmentos de 497 pb e 95 pb. Estas bandas estão indicadas, e a presença da banda de 592 pb significa que a digestão não foi completa. Alelos normais não possuem o sítio e o fragmento permanece com os 181 pb originais. A mutação R408W cria o sítio da enzima e gera fragmentos de 119 pb (indicado) e 62 pb (não visível). Na canaleta L, marcador de peso molecular DNA 50 pb *Ladder* da *Amersham Pharmacia Biotech*. Na canaleta 2, produto de 592 pb não digerido. Na canaleta 3, produto de 592 pb com digestão parcial. Na canaleta 4, produto da PCR do exon 12 não digerido. Na canaleta 5, paciente heterozigoto para a mutação R408W. Nas demais canaletas, pacientes com ambos os alelos normais para a mutação.

3.2. Contribuição das mutações V388M, R408W, IVS10nt11, IVS12nt1 para a PKU em MG

3.2.1. Fração de alelos identificados com esta abordagem

Nas TAB. 13 e 14 são apresentados os dados relativos à distribuição de frequência das diferentes mutações testadas nos subgrupos da amostra. Os resultados da mutação R408W foram apresentados em separado, em função da diferença no número de pacientes testados.

De um total de 200 alelos causadores de PKU leve ou clássica, averiguados neste estudo, foram identificados 42 alelos V388M, 21 alelos IVS10nt11, 2 alelos IVS12nt1, e 1 alelo R408W. Foram identificados, portanto, 66 alelos, correspondendo a aproximadamente 33% dos alelos PKU da amostra.

TABELA 13

Freqüência relativa das mutações V388M, IVS10nt11 e IVS12nt1 em pacientes do Estado de Minas Gerais

Fonte de averiguação	Número de indivíduos	Número de alelos	Alelos identificados e freqüência relativa da mutação					
			V388M		IVS10nt11		IVS12nt1	
			N	(%)	N	(%)	N	(%)
Averiguados pelo Programa de Triagem Neonatal	70	140	27	19,3	16	11,5	1	0,7
Irmãos de crianças averiguadas pelo Programa de Triagem Neonatal	9	18	10	55,5	2	11,1	1	5,5
Averiguados no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG	19	38	4	10,5	3	7,9	0	0
Irmãos de pacientes averiguados no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG	2	4	1	25	0	0	0	0
Total	100	200	42	21	21	10,5	2	1

TABELA 14

Frequência relativa da mutação R408W em pacientes do Estado de Minas Gerais

Fonte de averiguação	Número de indivíduos	Número de alelos	Alelos identificados e frequência relativa da mutação R408W	
			N	(%)
Averiguados pelo Programa de Triagem Neonatal	51	102	1	0,98
Irmãos de crianças averiguadas pelo Programa de Triagem Neonatal	6	12	0	0
Averiguados no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG	10	20	0	0
Total	67	134	1	0,75

3.2.2. Frequências alélicas e genotípicas

Da amostra testada, 10 pacientes são homozigotos para a mutação V388M e 3 para a mutação IVS10nt11. Além disto, foram identificados 3 heterozigotos compostos com o genótipo V388M/IVS10nt11 e 1 com IVS10nt11/IVS12nt1 (ver TAB. 15).

Do total de 66 alelos identificados, 32 estão presentes em heterozigose com um outro alelo não identificado. Em 51 pacientes nenhuma das mutações pesquisadas foi identificada.

TABELA 15

Distribuição dos alelos identificados em homozigose ou heterozigose

Mutação	Alelos em homozigose	Alelos em heterozigose	Total
V388M	20	22	42
IVS10nt11	6	15	21
IVS12nt1	0	2	2
R408W*	0	1	1
Total	26	39	65

*NOTA: Para a mutação R408W o total de alelos testados foi 134.

3.2.3. Distribuição geográfica da PKU em Minas Gerais

Todos os pacientes com PKU confirmada, atendidos no Ambulatório de Fenilcetonúria do Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG, foram distribuídos no mapa do Estado de Minas Gerais de acordo com sua procedência (FIG. 16). Não parece haver regiões com altas frequências da doença. Municípios com maior número de casos são os de maior densidade populacional ou aqueles onde ocorrem famílias com mais de um caso.

3.2.4. Distribuição geográfica dos alelos V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e R408W no Estado de Minas Gerais

As FIG. 17 a 20 mostram, no mapa de Minas Gerais, a distribuição geográfica dos alelos identificados no presente estudo, conforme o município de procedência dos pacientes. Não se observa agregação regional na distribuição de qualquer dos quatro alelos. Municípios com maior número de determinado alelo refletem a presença de irmãos na amostra.

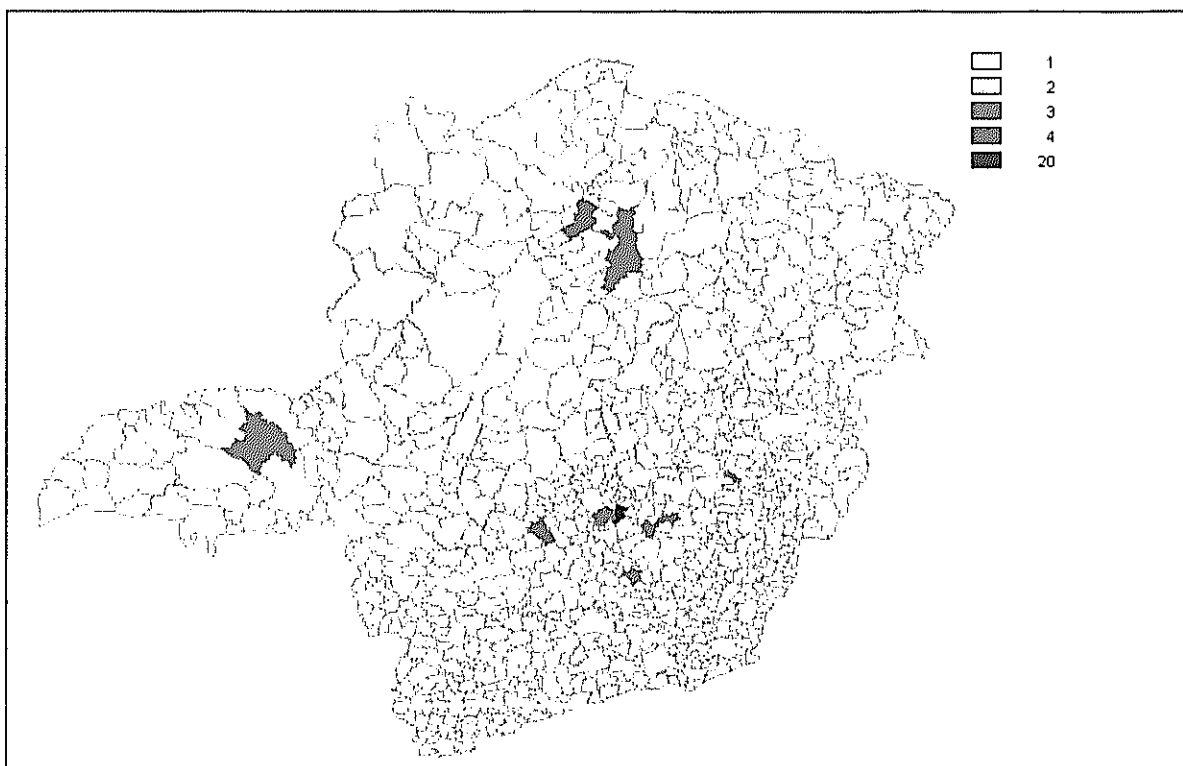


FIGURA 16 - Distribuição geográfica dos pacientes com PKU em MG

Todos os pacientes com diagnóstico confirmado de PKU e atendidos no ambulatório de fenilcetonúria estão representados neste mapa de acordo com o município de procedência.

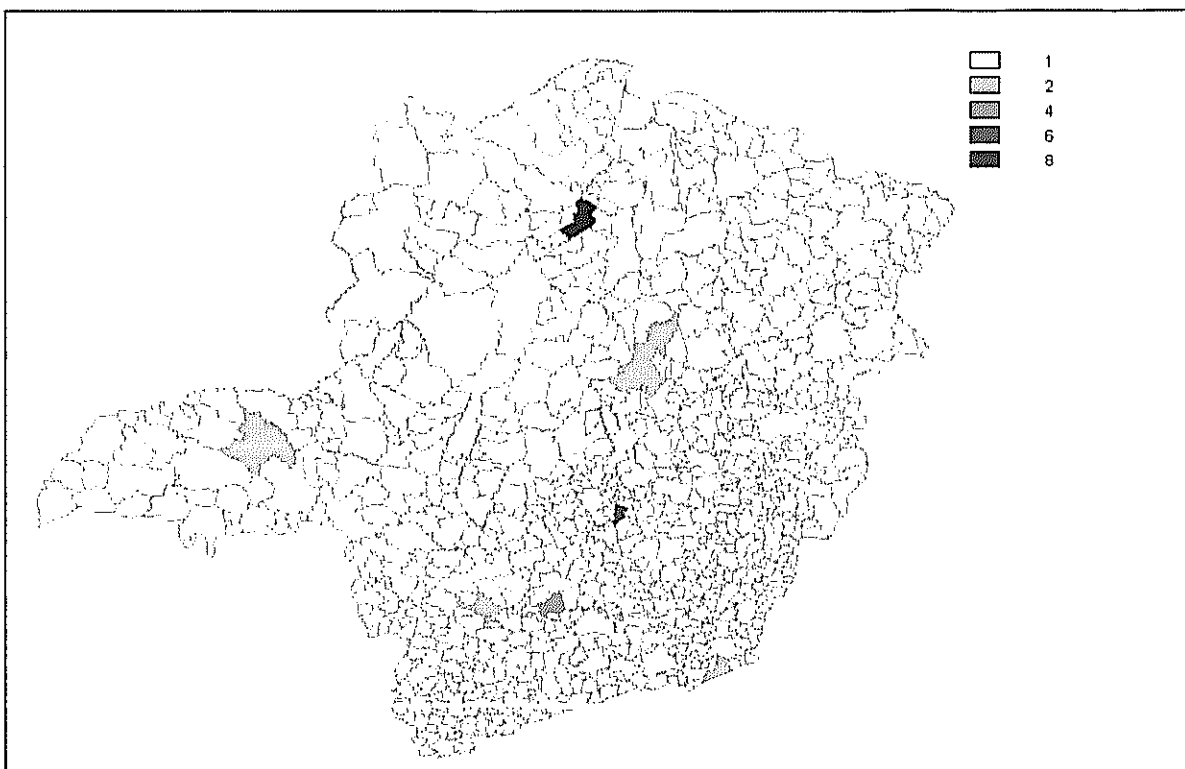


FIGURA 17 - Distribuição geográfica dos alelos V388M em MG

Estão representados neste mapa os 42 alelos V388M identificados no presente estudo, conforme o município de procedência dos pacientes.

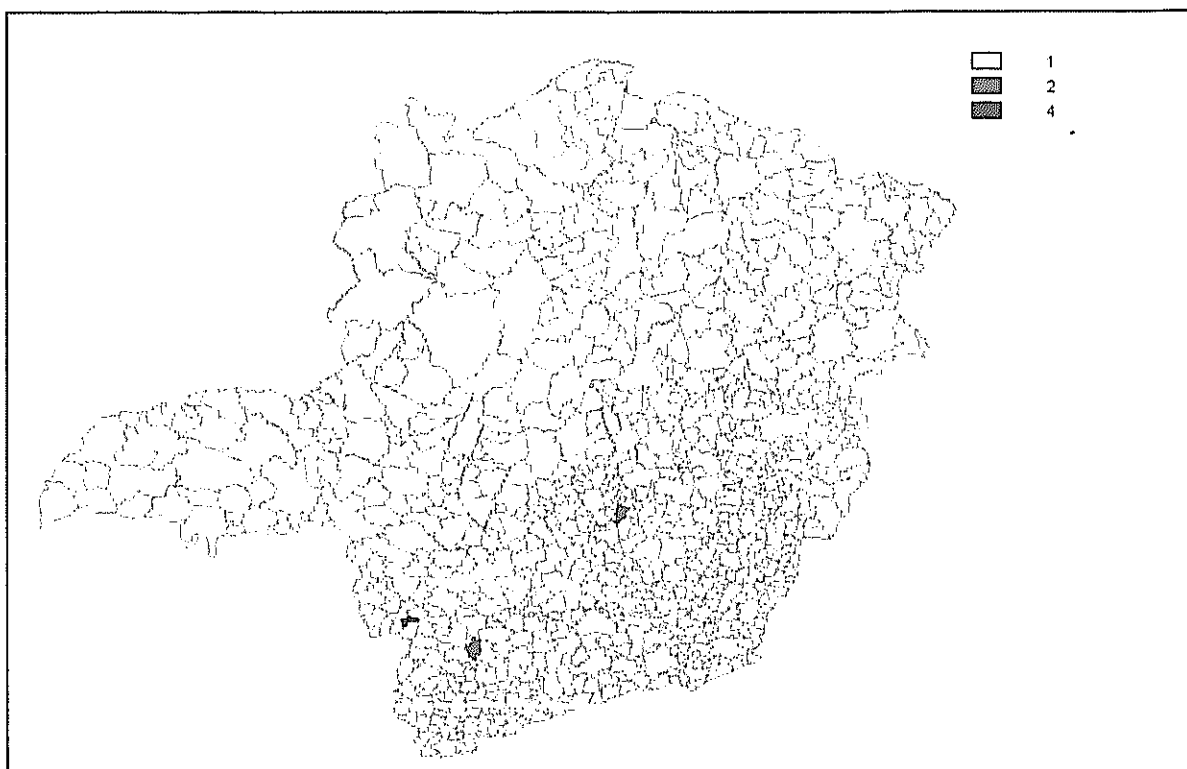


FIGURA 18 - Distribuição geográfica dos alelos IVS10nt11 em MG

Estão representados neste mapa os 21 alelos IVS10nt11 identificados no presente estudo, conforme o município de procedência dos pacientes.

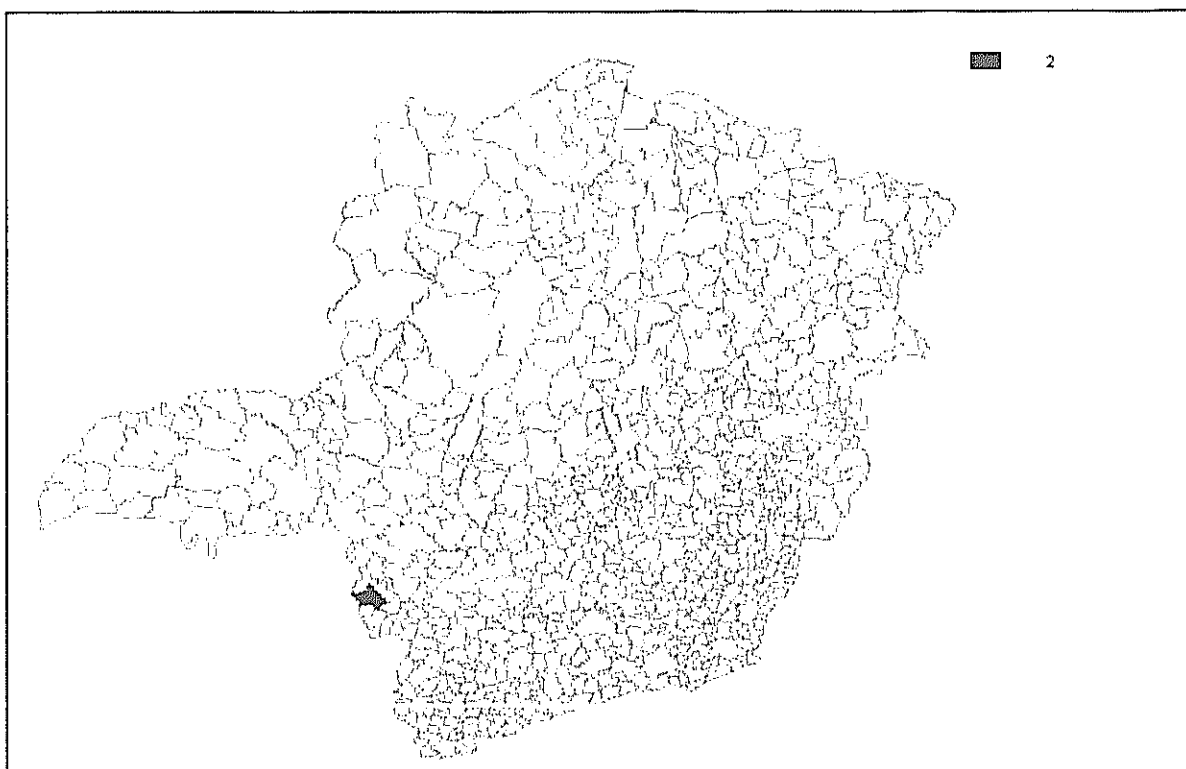


FIGURA 19 - Distribuição geográfica dos alelos IVS12nt1 em MG

Estão representados neste mapa os 2 alelos IVS12nt1 identificados no presente estudo, conforme o município de procedência dos pacientes.

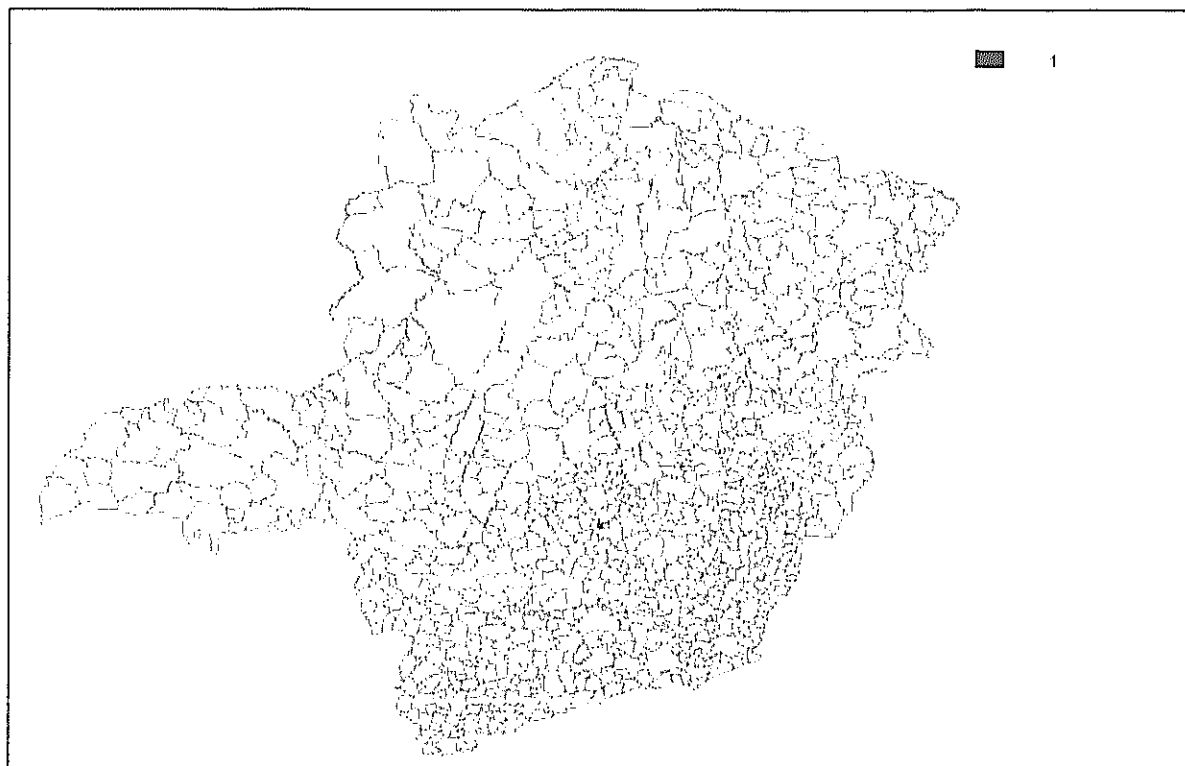


FIGURA 20 - Distribuição geográfica do alelo R408W em MG

Está representado neste mapa o alelo R408W identificado no presente estudo, conforme o município de procedência do paciente. À direita do mapa, a legenda mostra o número de alelos por município que cada cor representa.

3.3. Contribuição da consangüinidade para a PKU em MG

Informações sobre consangüinidade entre os pais estão disponíveis para 72 famílias da amostra. Nestas, há relato de consangüinidade em 16 (22,2%). Para evitar-se a distorção produzida pela presença de irmãos, apenas os casos-índice foram incluídos neste cálculo.

Freire-Maia, em 1990, revisando os dados relativos à consangüinidade no Brasil, encontra um índice de endogamia médio (F) de 0,0029 para o Estado de Minas Gerais. Estes dados não podem ser diretamente comparados, uma vez que o grau de consangüinidade não foi averiguado para a presente amostra e não foi possível fazer-se uma estimativa de F.

Sob o pressuposto de que a população do Estado de Minas Gerais estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a freqüência do alelo q (representando a soma de todos os alelos causadores de PKU) poderia ser estimada a partir da incidência da doença.

Através dos testes de triagem neonatal, a incidência de PKU em MG foi estimada em 1:20.000 (Aguiar, 2002). Com base neste dado, a freqüência de q seria 0,0071 e de $2pq$ de 0,0141, ou seja, a freqüência de heterozigotos para PKU na população do Estado de Minas Gerais seria de aproximadamente 1:71.

Este valor é muito provavelmente uma superestimativa, uma vez que os altos índices de casamentos consangüíneos entre os pais dos pacientes com PKU estão atuando no sentido de favorecer o aparecimento de indivíduos homozigotos.

3.4. Avaliação das influências fenotípicas dos diferentes alelos e genótipos

Na TAB. 16 são apresentados os dados referentes aos níveis de fenilalanina medidos ao diagnóstico (Fen diagnóstico) dos pacientes que tiveram as duas mutações identificadas.

Na parte superior da tabela estão os dados relativos aos pacientes detectados através do Programa de Triagem Neonatal do NUPAD, ou seja, com diagnóstico precoce, e na parte inferior aqueles dos pacientes diagnosticados tardiamente.

Os níveis séricos de fenilalanina medidos após teste de sobrecarga (Fen sobrecarga) foram testados apenas nos pacientes diagnosticados precocemente, quando estes atingiram a idade de seis meses.

Os valores previstos de atividade enzimática residual (PRA) de cada alelo foram estimados com base em estudos de expressão *in vitro*. Os valores de PRA mostrados na TAB. 16 correspondem à soma dos valores conferidos por cada um dos alelos do genótipo, conforme publicado no banco de dados PAHdb.

TABELA 16

Parâmetros fenotípicos de pacientes de MG com genótipo determinado

Código paciente	Diagnóstico	Fen diagnóstico (μM)	Fen sobrecarga (μM)	*PRA (%)	Alelo 1	Alelo 2
114	Precoce	427	NT	0	IVS10nt11	IVS10nt11
115	Precoce	447	1221	21,5	IVS10nt11	V388M
101	Precoce	874	1435	43	V388M	V388M
95	Precoce	880	1625	43	V388M	V388M
71	Precoce	904	1472	43	V388M	V388M
218	Precoce	989	1380	21,5	IVS10nt11	V388M
109	Precoce	1104	1009	43	V388M	V388M
80	Precoce	1195	982	21,5	V388M	IVS10nt11
77	Precoce	1722	1636	0	IVS10nt11	IVS12nt1
70	Precoce	1950	NT	43	V388M	V388M
128	Tardio	1171	NT	0	IVS10nt11	IVS10nt11
117	Tardio	1203	NT	0	IVS10nt11	IVS10nt11
107	Tardio	1411	NT	43	V388M	V388M
127	Tardio	1486	NT	43	V388M	V388M
108	Tardio	1523	NT	43	V388M	V388M
119	Tardio	1591	NT	43	V388M	V388M
67	Tardio	1766	NT	43	V388M	V388M

NOTA - * PRA = atividade enzimática residual prevista para o genótipo

São irmãos: 107, 108, 109 e 119; 67 e 101; e 114 e 117.

As médias ajustadas dos níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico foram de $1078,73 \pm 121,30 \mu\text{M}$ para os pacientes com diagnóstico precoce e de $1564,68 \pm 169,77 \mu\text{M}$ para aqueles com diagnóstico tardio. A

diferença entre as médias ajustadas de fenilalanina ao diagnóstico, conforme precoce ou tardio, foi significativa ($F= 6,98$; $p<0,02$).

As médias ajustadas dos níveis de fenilalanina ao diagnóstico de acordo com os genótipos foram de $1348,90 \pm 103,53 \mu\text{M}$ para indivíduos V388M/V388M; de $1120,03 \pm 210,21 \mu\text{M}$ para indivíduos V388M/IVS10nt11; e de $852,66 \pm 191,49 \mu\text{M}$ para indivíduos IVS10nt11/IVS10nt11. Estas médias foram comparadas entre si e cada uma delas com a média dos demais genótipos identificados. Foram observadas diferenças significativas entre os valores médios de fenilalanina ao diagnóstico dos homozigotos para a mutação IVS10nt11, quando comparados aos dos homozigotos para a mutação V388M ($F= 5,20$; $p<0,04$). Os valores médios de fenilalanina ao diagnóstico dos homozigotos para a mutação IVS10nt11 também diferiram significativamente dos valores dos outros pacientes, nos quais as duas mutações foram identificadas ($F=6,38$; $p<0,02$).

A comparação entre os níveis séricos médios de fenilalanina ao teste de sobrecarga neste grupo de pacientes não mostrou diferenças significativas ($F=1,38$; $p>0,33$) conforme o genótipo dos pacientes. A correlação entre a atividade residual prevista para cada genótipo também não foi estatisticamente significativa neste grupo.

Uma abordagem similar à descrita acima foi realizada com a amostra total, subdividida nas seguintes classes genotípicas: 1 - V388M/V388M; 2 - V388M/IVS10nt11; 3 - IVS10nt11/IVS10nt11; 4 - V388M/desconhecido; 5 - IVS10nt11/desconhecido; 6 - desconhecido/desconhecido. As médias ajustadas dos níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico e ao teste de sobrecarga, para cada classe fenotípica estão apresentadas na TAB. 17.

TABELA 17

Distribuição dos valores de fenilalanina sérica ao diagnóstico e no teste de sobrecarga conforme classe genotípica

Classe genotípica	N	Fen diagnóstico (média ± EP)	Fen sobrecarga (média ± EP)
V388M/V388M	10	1348,90 ± 203,37	1385,25 ± 251,28
V388M/IVS10nt11	3	895,84 ± 380,64	1194,33 ± 290,15
IVS10nt11/IVS10nt11	3	927,39 ± 372,35	-
V388M/desc	15	1195,25 ± 172,62	1423,27 ± 151,52
IVS10nt11/desc	11	1767,84 ± 211,23	1942,00 ± 224,75
desc/desc	53	1420,29 ± 98,11	1608,73 ± 98,56

NOTA - desc = desconhecido. Como havia apenas uma ocorrência do genótipo IVS10nt11/IVS12nt1, este foi agrupado com IVS10nt11/desc.

As diferenças identificadas quando contrastadas as médias ajustadas de fenilalanina ao diagnóstico, conforme precoce ou tardio, não foi significativa ($F= 0,02$; $p> 0,90$) como também foi não significativa conforme a classe genotípica ($F= 1,73$; $p> 0,13$). Estas médias foram comparadas entre si e cada uma delas com a média dos demais genótipos identificados, e as diferenças não foram significativas.

4. DISCUSSÃO

A amostra deste estudo, composta por 100 indivíduos, incluiu aproximadamente 2/3 dos pacientes com diagnóstico de PKU do Estado de Minas Gerais. Esta amostra é maior do que as amostras totais de diversos países europeus. A triagem das mutações V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e R408W permitiu a detecção de aproximadamente 33% dos alelos PKU da amostra.

Como a amostra é constituída por quatro grupos de pacientes, de acordo com a forma de averiguação (ver TAB. 7), as estimativas das freqüências relativas das diferentes mutações nos afetados foram feitas para todos os grupos, separados e em conjunto. Na discussão que se segue, os dados de freqüência relativa das mutações serão analisados com base apenas naquelas calculadas para os pacientes averiguados através do Programa de Triagem Neonatal do NUPAD, uma vez que os outros grupos são mais sujeitos a vieses de averiguação.

A mutação V388M foi a mais freqüente neste estudo. A freqüência relativa observada (19,3%), é maior do que as freqüências encontradas na literatura para outras populações. As mais altas freqüências relativas desta mutação na Europa ocorrem na Península Ibérica, sendo de 8,6%, em Portugal (Rivera e cols., 1998), e 6,2%, na Espanha (Pérez e cols., 1997). No Brasil, esta freqüência variou de 6% nos pacientes de Porto Alegre (Pérez e cols.,

1996) a 9,1% dos pacientes de São Paulo (Pérez e cols., 1996; Acosta e cols., 2001). Esta diferença nas freqüências relativas, quando se compara a população mineira com a portuguesa, pode ser devida a um efeito de fundador e influência da migração de outras populações. Entretanto, a distribuição geográfica desta mutação no Estado de Minas Gerais não apresenta distorções óbvias, que reforcem esta hipótese.

A mutação IVS10nt11 se encontra distribuída por toda a Europa com freqüências que variam de 1 a 25% (revisto por Zschocke, 2003). No Brasil, foi a que apresentou maior freqüência relativa nos pacientes de São Paulo, 17,4% (Acosta e cols., 2001) e não foi encontrada em nenhum dos pacientes de Porto Alegre (Pérez e cols., 1996). A freqüência observada em Minas Gerais (11,5%) é bastante similar às observadas em Portugal (10,8%; Rivera e cols., 1998) e na Espanha (14,7%; Pérez e cols., 1997), onde ela é a mutação mais freqüente.

A mutação IVS12nt1 foi identificada em 6% dos alelos PKU de Porto Alegre (Pérez e cols., 1996) e em 1,3 a 2,5% dos alelos de São Paulo (respectivamente Acosta e cols., 2001; Pérez e cols., 1996). A freqüência observada em Minas Gerais foi de 0,7%. Esta diferença nas freqüências relativas em populações brasileiras, reflete, provavelmente, diferenças na história destas populações, uma vez que esta mutação é freqüente no centro e norte europeus. Foi relatado que pacientes de Porto Alegre portadores da IVS12nt1, têm ascendência alemã ou polonesa (Pérez e cols., 1996). A mutação IVS12nt1 não foi identificada na Espanha (Pérez e cols., 1997), e em Portugal aparece em menos de 1% dos alelos (revisto por Zchocke, 2003).

Em relação à mutação R408W, os resultados são bastante semelhantes aos observados para a mutação IVS12nt1. A mutação R408W foi identificada em 6% dos alelos PKU de Porto Alegre (Pérez e cols., 1996) e 3,5% dos alelos PKU de São Paulo (Acosta e cols., 2001). Como para a mutação IVS12nt1, os pacientes de Porto Alegre com a mutação R408W descendem de alemães ou poloneses (Pérez e cols., 1996). A freqüência

observada em Minas Gerais foi de 1%. A R408W também é mais freqüente no norte e centro europeus, embora esteja associada a diferentes haplótipos, sugerindo a ocorrência de dois eventos mutacionais. Esta mutação, representa apenas 0,9% dos alelos PKU de Portugal (Rivera e cols., 1998) e apenas um alelo foi encontrado na Espanha (revisto por Zschocke, 2003).

Em conjunto, estas 4 mutações, sugerem que a contribuição de indivíduos do centro e norte europeus seja bem menor na população mineira do que nas populações de São Paulo ou do Rio Grande do Sul, o que está de acordo com os registros históricos do povoamento do Brasil (Holanda, 1971). Como ainda não foi feita a haplotipagem dos alelos encontrados em MG não se pode afirmar sobre a origem dos mesmos. A análise da distribuição geográfica dos pacientes com PKU e dos diferentes alelos não sugere a existência de qualquer agregação regional.

A estimativa das freqüências alélicas das mutações causadoras de PKU, usando outro método que não seja o de contagem direta, é pouco segura por diversos motivos: ao se pressupor equilíbrio de Hardy-Weinberg, não se considera o grande número de alelos do *locus PAH*; não se conhecem as relações de dominância entre estes vários alelos, nem se existe complementação interalélica; não foram determinados o valor adaptativo dos vários genótipos; não foi estimada a taxa de mutação do gene *PAH*; não estão esclarecidas a natureza e a força dos mecanismos de seleção envolvidos na PKU. Em função disto, os resultados da presente amostra não foram usados em tentativas de estimar-se as diferentes freqüências alélicas, restringindo-se a análise à freqüência relativa das mutações, como visto na literatura.

Outro aspecto relevante, e que vem sendo pouco considerado, é o efeito da consangüinidade na PKU. Presumivelmente, os efeitos das diversas forças evolutivas que, atuando no fenótipo, selecionam alelos e genótipos, serão diferentes de acordo com a estrutura, o tamanho e a história de cada população (Crow & Kimura, 1970; Clark, 1998; Krawczak & Zschocke, 2003). O

efeito da consangüinidade em alelos que aparecem em baixa freqüência, seria o de elevar consideravelmente a probabilidade de que entrem em homozigose, e os efeitos serão tão maiores quanto mais baixas forem as freqüências alélicas (Clark, 1998; revisto por Jorde e cols., 2000).

Em caucasianos, tomando como base uma incidência média de PKU de 1:15.000 e uma freqüência de portadores de 1:50, foi estimado que cerca de 5% dos casos sejam devidos a casamentos consangüíneos (revisto por Jorde e cols., 2000).

Calculando-se a partir da incidência de 1:20.000 da PKU estimada para o Estado de Minas Gerais (Aguiar, 2002), a freqüência de heterozigotos, sob pressuposto de equilíbrio de Hardy-Weinberg, seria de 1:71. Entretanto, quando analisamos a freqüência de consangüinidade entre os pais dos indivíduos com o genótipo homozigoto mais freqüente na presente amostra, o V388M/V388M, verificamos que de 6 pacientes que são casos índices, 5 (83%) são filhos de pais consangüíneos. Além disto, há o achado de que, no total da amostra, a freqüência de consangüinidade entre os pais foi de 22,2%. Estes altos índices de consangüinidade sugerem que a freqüência dos alelos causadores de PKU em Minas Gerais seja bem menor do que as estimadas a partir de q^2 , sob o pressuposto de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O mesmo raciocínio vale para a freqüência dos heterozigotos.

Um dos principais objetivos da triagem de mutações na PKU é permitir inferências sobre o futuro curso clínico de pacientes com HPA. Através de estudos de expressão *in vitro*, foi estimada a atividade residual prevista (PRA) para muitas das mutações causadoras de HPA. Uma vez determinado o genótipo de um paciente, a atividade residual prevista para o genótipo é comparada com os parâmetros fenotípicos usados para diagnóstico (níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico ou após teste de sobrecarga e tolerância à fenilalanina). Na maioria dos estudos onde se pesquisou as correlações genótipo-fenótipo, levando em consideração as PRA, foram detectadas

correlações significativas (Okano e cols., 1991; Eisensmith e cols., 1996; Waters e cols., 1998; Rivera e cols., 2000).

Usamos esta mesma abordagem para testar nossa amostra. Os resultados foram mais consistentes quando utilizamos os genótipos do que os alelos, apesar do pequeno tamanho da amostra com o genótipo definido.

O valor de atividade residual prevista considerado para o alelo V388M é de 21,5% da atividade da enzima normal e para o genótipo V388M/V388M é de 43%. Esta redução de atividade se deve à menor afinidade tanto pela fenilalanina quanto pelo cofator BH₄. Esta mutação em homozigose é descrita na literatura como causadora de PKU leve ou moderada (Desviat e cols., 1995; Leandro e cols., 2000).

No presente estudo, quando se consideram os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico, o genótipo V388M/V388M apareceu associado à PKU leve ou moderada em quatro de cinco (4/5) indivíduos. O quinto indivíduo apresentou PKU clássica. Já no grupo de diagnóstico tardio, os quatro pacientes com este genótipo apresentavam níveis de fenilalanina ao diagnóstico típicos de PKU clássica. Quando se avaliam os níveis séricos de fenilalanina ao teste de sobrecarga, três, dos quatro pacientes com diagnóstico precoce de PKU leve, apresentam níveis de fenilalanina característicos de PKU clássica.

Isto significa que, 8 dos 9 pacientes com o genótipo V388M/V388M apresentaram PKU clássica. Os valores baixos de fenilalanina observados ao diagnóstico, e nunca no teste de sobrecarga, sugerem que não se trate de um efeito do método utilizado para dosagem. A diferença da repercussão fenotípica observada para este genótipo na população mineira, em relação a sua atividade residual prevista, pode ser causada por diferenças no alelo presente em nossa população, refletindo mutações adicionais dentro do locus ou por efeitos do

background genético diferente. Um resultado semelhante foi relatado previamente na população portuguesa (Rivera e cols., 2000).

Aqui vale ressaltar, que de um total de 10 indivíduos com o genótipo V388M/V388M, apenas 6 são casos índices, sendo os demais 4 pacientes, seus irmãos, o que estaria homogeneizando o *background* genético no qual o genótipo está se expressando. A identificação dos alelos contralaterais nos outros alelos V388M identificados neste estudo e que estão em heterozigose, permitirá que se tirem conclusões melhor embasadas sobre o comportamento deste alelo.

A mutação IVS10nt11 causa mudanças conformacionais e perda de atividade catalítica da PAH, uma vez que leva à inserção de 3 aminoácidos adicionais na enzima. Esta mutação em homozigose acarreta manifestações clínicas severas (Dworniczak e cols., 1991; Güttler & Guldberg, 1996). Apesar da atividade residual prevista desta mutação ser nula, os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico dos portadores do genótipo IVS10nt11/IVS10nt11 foi menor do que os com o genótipo V388M/V388M (ver Tab. 16).

O resultado mais marcante do presente estudo, entretanto, é a observação de diversos pacientes (5/8) que apresentam níveis pouco elevados de fenilalanina ao diagnóstico, mas à época do teste de sobrecarga, apresentaram PKU clássica. Este achado reforça a necessidade da triagem de mutação como parte do processo de diagnóstico, uma vez que, o conhecimento do genótipo permite prever a forma clínica de PKU que o paciente vai apresentar, mais eficientemente do que os níveis séricos de fenilalanina nos primeiros meses de vida.

Estudos posteriores devem determinar as mutações presentes em todos os alelos causadores de PKU dos pacientes de Minas Gerais, assim como a origem dos alelos aqui identificados. Estes estudos, além de levarem à caracterização do espectro mutacional subjacente à PKU em Minas Gerais,

permitirão inferências sobre a origem e composição da população mineira a partir de um segmento autossômico. Esta informação é interessante, uma vez que os estudos realizados até o momento se baseiam predominantemente nas variações do DNA mitocondrial e do cromossomo Y.

5. CONCLUSÕES

1. De um total de 200 alelos triados para as mutações V388M, IVS10nt11, IVS12nt1 e 102 alelos triados para a mutação R408W, foram identificados 66 alelos, correspondendo a 33% da amostra.
2. No total da amostra foram identificados: 42 alelos V388M (21%), 21 IVS10nt11 (10,5%), 2 IVS10nt1 (1%) e 1 R408W (0,75%).
3. Considerando-se apenas os 70 recém-nascidos triados pelo Programa de Triagem Neonatal, a frequência relativa das mutações foi: 19,3% V388M, 11,5% IVS10nt11 e 0,7% IVs12nt1. Para a mutação R408W, foram testados 51 indivíduos triados pelo Programa de Triagem Neonatal e um alelo foi encontrado, correspondendo a 0,98%.
4. A mutação V388M, 19,3%, foi a mais freqüente neste estudo. Esta frequência é a maior descrita até o momento e é cerca de duas vezes maior do que as registradas em São Paulo ou Portugal e três vezes maior do que as da Espanha e do Rio Grande do Sul.
5. A mutação IVS10nt11 foi encontrada com frequência similar à observada em Portugal e na Espanha. Este dado contrasta com o observado em São Paulo, onde ela é a mutação mais comum, com uma frequência de 17,4%. Este

resultado também difere do observado no Rio Grande do Sul, onde ela não foi encontrada.

6. A mutação IVS12nt1 surgiu na presente amostra em frequência similar à descrita em Portugal. Este valor difere do observado em São Paulo (1,3 a 2,5%) e no Rio Grande do Sul (6%).

7. A frequência observada da mutação R408W (0,98%), também é mais similar ao observado em Portugal e Espanha (0,9%). Valores mais alto foram relatados em São Paulo (3,5%) e no Rio Grande do Sul (6%).

8. A frequência destas mutações nas populações brasileiras sugerem que a população mineira seja mais similar a portuguesa do que a paulista ou a gaúcha, que refletem maior contingente de descendentes de imigrantes do centro e leste da Europa.

9. A análise da distribuição geográfica dos pacientes com PKU e dos diferentes alelos não sugere a existência de qualquer agregação regional.

10. Sob o pressuposto de equilíbrio de Hardy-Weinberg, assumindo-se uma incidência da PKU em MG de 1:20000, a frequência de heterozigotos na população mineira seria de 1:71. Esta frequência é um pouco menor do que a estimada na Europa (1:50).

11. A frequência de casamentos consangüíneos entre os pais dos sujeitos da amostra foi de 22,3%. Estes altos índices de consangüinidade devem estar contribuindo para o aumento da frequência dos genótipos homozigotos. Em função disto, a frequência do alelo causador da doença, assim como de heterozigotos, assumindo-se o pressuposto de equilíbrio de Hardy-Weinberg, seriam seguramente superestimadas.

12. A mutação V388M, quando em homozigose, apareceu associada a níveis baixos de fenilalanina ao diagnóstico. Entretanto, no teste de sobrecarga, ou

nos casos de diagnóstico tardio, esta mutação acarreta um fenótipo bioquímico compatível com PKU clássica (8/9 casos). Estes resultados não estão de acordo com a atividade residual prevista para este alelo, que segundo os estudos de expressão acarretam a forme leve de PKU.

13. Em heterozigose, a mutação V388M aparece associada a um quadro de PKU moderada ou leve em 3/11 casos e à PKU clássica em 3/11 casos. Em 2/11 casos os níveis séricos de fenilalanina ao diagnóstico foram compatíveis com PKU clássica, mas por ocasião do teste de sobrecarga se enquadraram em PKU moderada ou leve. Em outros 3/11 casos, ocorreu o inverso. Esta variação pode refletir o efeito do alelo contralateral, já que nos homozigotos da nossa amostra, a manifestação clínica tendeu a longo prazo à fenilcetonúria clássica.

14. A grande variação observada nos valores de fenilalanina ao diagnóstico e a discrepância destes com os testes de sobrecarga apontam para o seu baixo valor prognóstico, reforçando a necessidade da triagem de mutações.

SUMMARY

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease, produced by phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, resulting in failure to convert phenylalanine to tyrosine. Low phenylalanine intake reduces symptoms of the disease. Since prevention of mental retardation depends on the dietary therapy beginning in the first three weeks of life, early diagnosis is fundamental. More than 400 mutations have already been described in the PAH gene, with frequencies varying in the different populations. Through *in vitro* expression studies the predicted residual activity (PRA) has been established for many of these mutations. Therefore, it is possible to foresee the outcome for a patient on the basis of the genotype. Up to now, mutation studies were developed only for samples of São Paulo State (SP) and Rio Grande do Sul State (RS) populations in Brazil. In the state of Minas Gerais (MG), 23,000 to 26,000 newborn/month are tested for in the PKU neonatal screening program. PKU frequency is estimated to be 1:20,000. We have screened a sample of 100 PKU patients from MG for the mutations V388M, IVS10nt11, IVS12nt1, and R408W. The following relative frequencies were observed: 42 V388M alleles (21%), 21 IVS10nt11 alleles (10.5%), two IVS12nt1 alleles (1%), and one R408W allele (0.75%). Considering only the 70 patients screened by the newborn screening program these frequencies were: 19.3% V388M, 11.5% IVS10nt11, and 0.7% IVS12nt1. For R408W mutation 51 patients were screened and one allele (0.98%) was found. The frequency found for the V388M mutation is the highest described; so far twice the value of those found in SP and Portugal, and three times those reported in Spain and RS. Frequency of IVS10nt11 is similar to those described in Portugal and Spain. Much higher values were described in SP (17.4%), where it is the most frequent mutation, but it has not been found in RS. Frequencies of IVS12nt1 and R408W were similar to those reported in Portugal. For both mutations, frequencies in SP and RS are higher. The frequencies of these mutations suggest that the population of Minas Gerais is more closely related to that of Portugal, while those from SP and RS reflect central and east European migrations. Geographic distribution of PKU patients as well as mutations showed no aggregation in MG. Assuming Hardy-Weinberg equilibrium and a PKU incidence of 1:20,000 in MG, the heterozygote frequency would be 1:71, lower than that reported in Europe (1:50). Consanguinity was reported for 22.3% of the PKU families. High consanguinity levels increase the frequencies of the homozygote genotypes, leading to overestimated allele and heterozygote frequencies. The V388M/V388M genotype produced low phenylalanine levels at the diagnosis. However, eight out nine cases developed classical PKU. In the literature this genotype is associated to a mild to moderate PKU. In heterozygosis the V388M mutation produced all types of PKU phenotypes, probably reflecting the effect of the other allele in the locus. The high variation in the early phenylalanine levels and their low correlation with the outcome point to a low predictive value of these tests, urging for an early genotyping program.

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.
- 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
- 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.
- Arzimanoglou, I., Tuchman, A., Li, Z., Gilbert, F., Denning, C., Valverde, K., Zar, H., Quittell, L. Arzimanoglou, I.** (1995). Cystic fibrosis carrier screening in Hispanics. *Am J Hum Genet.* 56: (2) 544-7
- 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
- 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
- Bickel, H., Schmidt, H. Schurrle, L.** (1973). Dietary treatment of inborn errors of amino acid and carbohydrate metabolism. *Bibl Nutr Dieta.* (18) 181-201
- Binek-Singer, P., Johnson, T. C.** (1982). The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. *Biochem J* 206:407-414
- 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
- Brown, A. S., Fernhoff, P. M., Waisbren, S. E., Frazier, D. M., Singh, R., Rohr, F., Morris, J. M., Kenneson, A., MacDonald, P., Gwinn, M., Honein, M. Rasmussen, S. A.** (2002). Barriers to successful dietary control among pregnant women with phenylketonuria. *Genet Med.* 4: (2) 84-9
- Caillaud, C., Vilarinho, L., Vilarinho, A., Rey, F., Berthelon, M., Santos, R., Lyonnet, S., Briard, M. L., Osorio, R. V., Rey, J. et al.** (1992). Linkage disequilibrium between phenylketonuria and RFLP haplotype 1 at the phenylalanine hydroxylase locus in Portugal. *Hum Genet.* 89: (1) 69-72
- Clark, A. G.** (1998). Mutation-selection balance with multiple alleles. *Genetica.* 102-103: (1-6) 41-7
- Cleary, M. A., Walter, J. H., Wraith, J. E., White, F., Tyler, K. Jenkins, J. P.** (1995). Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change. *J Pediatr.* 127: (2) 251-5

- Creppy, E. E., Schlegel, M., Roschenthaler, R., Dirheimer, G. (1980). Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxina in mice. *Toxicol Lett* 6:77-80
- Crow, J. F., Kimura, M. (1970). Populations in approximate equilibrium. In: *An introduction to population genetics theory*. (Harper & Row Publishers Inc.) New York, N.Y., pp. 255-318
- 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 in European families with phenylketonuria (PKU). *Am J Hum Genet.* 45: (2) 310-8
- Daiger, S. P., Reed, L., Huang, S. S., Zeng, Y. T., Wang, T., Lo, W. H., Okano, Y., Hase, Y., Fukuda, Y., Oura, T. et al. (1989). Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in Asian families with phenylketonuria (PKU). *Am J Hum Genet.* 45: (2) 319-24
- 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. Ugarte, M. (1993). Phenylketonuria in Spain: RFLP haplotypes and linked mutations. *Hum Genet.* 92: (3) 254-8
- DiLella, A. G., Marvit, J., Brayton, K. Woo, S. L. (1987). An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature.* 327: (6120) 333-6
- DiLella, A. G., Marvit, J., Lidsky, A. S., Guttler, F. Woo, S. L. (1986). Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature.* 322: (6082) 799-803

- Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Kalaydjieva, L., Bartholome, K., Grudda, K. Horst, J. (1991). Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: the major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. *Genomics*. 11: (2) 242-6
- 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., 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. Woo, S. L. (1992). Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum Mutat*. 1: (1) 13-23
- 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
- Erlandsen, H. Stevens, R. C. (1999). The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 68: (2) 103-25
- Freire-Maia, N. (1990) Casamentos consangüíneos no Brasil. *Rev. Brasil. Biol*. 50(4): 863-866

- Giannattasio, S., Jurgelevicius, V., Lattanzio, P., Cimbalistiene, L., Marra, E. Kucinskis, V. (1997). Phenylketonuria mutations and linked haplotypes in the Lithuanian population: origin of the most common R408W mutation. *Hum Hered.* 47: (3) 155-60
- Gjetting, T., Romstad, A., Haavik, J., Knappskog, P. M., Acosta, A. X., Silva, W. A., Jr., Zago, M. A., Guldborg, 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
- Guldborg, 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
- Guldborg, 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., Ponzoni, 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., Guldborg, P. (1996). The influence of mutations of enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr.* 155 Suppl 1: S6-10

- Guttler, F., Guldberg, P.** (2000). Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S150-3
- Harada, T., Kagamiyama, H. Hatakeyama, K.** (1993). Feedback regulation mechanisms for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science.* 260: (5113) 1507-10
- 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
- Holanda, S. B.** (1971). *Raízes do Brasil.* 6^a ed. Editora Jose Olympio. Rio de Janeiro
- Hughes, J. V. Johnson, T. C.** (1977). The effects of hyperphenylalaninaemia on the concentrations of aminoacyl-transfer ribonucleic acid in vivo. A mechanism for the inhibition of neural protein synthesis by phenylalanine. *Biochem J.* 162: (3) 527-37
- 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
- Jorde, L.B., Carey, J.C., Bamshad, M.J., White, R.L.** (2000). Herança autossômica dominante e recessiva. In: *Genética Médica.* (Editora Guanabara Koogan S.A.) 2^a ed. Rio de Janeiro, RJ, pp. 53-79
- 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

- Kidd, J. R., Pakstis, A. J., Zhao, H., Lu, R. B., Okonofua, F. E., Odunsi, A., Grigorenko, E., Tamir, B. B., Friedlaender, J., Schulz, L. O., Parnas, J. Kidd, K. K. (2000). Haplotypes and linkage disequilibrium at the phenylalanine hydroxylase locus, PAH, in a global representation of populations. *Am J Hum Genet.* 66: (6) 1882-99
- 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., Burton, B., Hoganson, G., Peterson, R., Rhead, W., Rouse, B., Scott, R., Wolff, J., Stern, A. M., Guttler, F., Nelson, M., de la Cruz, F., Coldwell, J., Erbe, R., Geraghty, M. T., Shear, C., Thomas, J. Azen, C. (2002). Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis.* 25: (5) 333-46
- 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
- Lara, L.S., Carvalho, M.R.S., Soares, I.M.G., Fonseca, C.G., Aguiar, M.J.B., Januário, J.N., Castillo, D.M. (2002). *Freqüência das mutações causadoras de PKU em Minas Gerais: uma meta-análise da origem e estratificação populacional.* Anais da X Semana de Iniciação Científica e II Semana do Conhecimento da UFMG:p 33
- 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
- Leandro, P., Rivera, I., Lechner, M. C., de Almeida, I. T. Konecki, D. (2000). The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol Genet Metab.* 69: (3) 204-12

- Ledley, F. D., Ledbetter, S. A., Ledbetter, D. H. Woo, S. L. (1988). Localization of mouse phenylalanine hydroxylase locus on chromosome 10. *Cytogenet Cell Genet.* 47: (3) 125-6
- Levy, H. L. (1989). Molecular genetics of phenylketonuria and its implications. *Am J Hum Genet.* 45: (5) 667-70
- Lidsky, A. S., Law, M. L., Morse, H. G., Kao, F. T., Rabin, M., Ruddle, F. H. Woo, S. L. (1985). Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: (18) 6221-5
- 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
- Liu, J., Jia, X., Zhang, J., Xiang, H., Hu, W. Zhou, Y. (2002). Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 30: (4) 243-57
- Lykkelund, C., Nielsen, J. B., Lou, H. C., Rasmussen, V., Gerdes, A. M., Christensen, E. Guttler, F. (1988). Increased neurotransmitter biosynthesis in phenylketonuria induced by phenylalanine restriction or by supplementation of unrestricted diet with large amounts of tyrosine. *Eur J Pediatr.* 148: (3) 238-45
- Marvit, J., DiLella, A. G., Brayton, K., Ledley, F. D., Robson, K. J. Woo, S. L. (1987). GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res.* 15: (14) 5613-28
- McDonald, J. D., Bode, V. C., Dove, W. F. Shedlovsky, A. (1990). The use of N-ethyl-N-nitrosourea to produce mouse models for human phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *Prog Clin Biol Res.* 340C: 407-13
- McDonald, J. D. Charlton, C. K. (1997). Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase locus. *Genomics.* 39: (3) 402-5

- McDonald, J. D., Andriolo, M., Cali, F., Mirisola, M., Puglisi-Allegra, S., Romano, V., Sarkissian, C. N. Smith, C. B. (2002). The phenylketonuria mouse model: a meeting review. *Mol Genet Metab.* 76: (4) 256-61
- 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
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000). Bioenergetics and metabolism. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, New York, pp. 485-903
- 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
- Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R. C., Longhi, R., Riva, E., Giovannini, M., Cerone, R., Romano, C. Woo, S. L. (1991). Phenylketonuria missense mutations in the Mediterranean. *Genomics.* 9: (1) 96-103
- 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., 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
- 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. 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
- 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
- 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
- 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

- SAS.** (1995) *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Inst. Inc., Cary, NC
- Saugstad, L. F.** (1973). Increased "reproductive casualty" in heterozygotes for phenylketonuria. *Clin Genet.* 4: (2) 105-14
- Scriver, C. H., Kaufman, S., Eisensmith, R. C. and Woo, S. L. C.** (1995). The Hyperphenylalaninemias. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. (Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. and Valle D, ed.). McGraw-Hill, USA, pp. 967-1000.
- 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
- Shedlovsky, A., McDonald, J. D., Symula, D. Dove, W. F.** (1993). Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics.* 134: (4) 1205-10
- Starling, A. L. P., Aguiar, M. J. B., Kanufre, V. C., Soares, S. F.** (1999). Fenilcetonúria. *Rev Med Minas Gerais* 9: (3) 106-110
- Steinfeld, R., Kohlschutter, A., Zschocke, J., Lindner, M., Ullrich, K. Lukacs, Z.** (2002). Tetrahydrobiopterin monotherapy for phenylketonuria patients with common mild mutations. *Eur J Pediatr.* 161: (7) 403-5
- Surtees, R. Blau, N.** (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2: S109-13
- Takahashi, K., Kure, S., Matsubara, Y. Narisawa, K.** (1992). Novel phenylketonuria mutation detected by analysis of ectopically transcribed phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblast. *Lancet.* 340: (8833) 1473
- 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

- Thompson, A. J., Smith, I., Brenton, D., Youl, B. D., Rylance, G., Davidson, D. C., Kendall, B. Lees, A. J. (1990). Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet*. 336: (8715) 602-5
- Thony, B., Auerbach, G. Blau, N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*. 347 Pt 1: 1-166
- Waisbren, S. E., Hanley, W., Levy, H. L., Shifrin, H., Allred, E., Azen, C., Chang, P. N., Cipic-Schmidt, S., de la Cruz, F., Hall, R., Matalon, R., Nanson, J., Rouse, B., Trefz, F. Koch, R. (2000). Outcome at age 4 years in offspring of women with maternal phenylketonuria: the Maternal PKU Collaborative Study. *Jama*. 283: (6) 756-62
- 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
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R. C., Harvey, M. L., Lo, W. H., Huang, S. Z., Zeng, Y. T., Yuan, L. F., Furuyama, J. I., Oura, T. et al. (1991). Founder effect of a prevalent phenylketonuria mutation in the Oriental population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: (6) 2146-50
- Waters, P. J., Parniak, M. A., Nowacki, P. Scriver, C. R. (1998). In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat*. 11: (1) 4-17
- Waters, P. J., Parniak, M. A., Akerman, B. R. Scriver, C. R. (2000). Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab*. 69: (2) 101-10
- 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) 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
- 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

URL

IBGE - <http://www.ibge.gov.br/>

Nilab - <http://www.nilab.com/dk/referencer.html>

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

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

SUS - <http://www.datasus.gov.br>

ANEXO A

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(ões) 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,
confirmando 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. Confirmando 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 B

**Lista de reagentes usados neste trabalho com as respectivas
procedências**

Reagentes e substâncias	Firmas
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. - Indústrias Químicas
DNTPs Oligonucleotídios (iniciadores para PCR)	GibcoBRL – Bethesda Research Laboratories
Proteinase K Trisma base Brometo de etídio EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)	Sigma Chemical Company
SDS (duodecil sulfato de sódio) Tris-HCl Ficol 400 Persulfato de amônia Agarose Marcador de peso molecular (50 pb) TEMED Enzima <i>AfaI</i> (<i>RsaI</i>)	Amersham Pharmacia Biotech
Enzima <i>StyI</i> Enzima <i>BsaAI</i>	New England BioLabs
Taq DNA polimerase	Phoneutria Biotecnologia e serviços
Enzima <i>DdeI</i>	Promega Corporation
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](#)