

Joana Isabel de Oliveira Machado

FENILCETONÚRIA E SUAS VARIANTES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2008

Joana Isabel de Oliveira Machado

FENILCETONÚRIA E SUAS VARIANTES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2008

Joana Isabel de Oliveira Machado

FENILCETONÚRIA E SUAS VARIANTES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública.

RESUMO

A fenilcetonúria representa o erro do metabolismo dos aminoácidos mais comum entre a população caucasiana, atingindo um em cada 10.000 nascimentos. Este erro bioquímico resulta da deficiência em fenilalanina hidroxilase ou, em menor percentagem, de erros na síntese ou regeneração da tetrahydrobiopterina. É transmitida de forma autossómica recessiva.

O diagnóstico precoce desta doença é da máxima importância, uma vez que dele depende o seu tratamento. É efectuado o rastreio neonatal da fenilcetonúria aos recém-nascidos, através do teste de inibição bacteriana de Guthrie, vulgo, teste do pézinho. Outros métodos de diagnóstico incluem procedimentos fluorimétricos e de espectrometria.

Uma vez diagnosticados, os fenilcetonúricos devem iniciar o tratamento que consiste, maioritariamente, na restrição alimentar de fenilalanina e proteínas naturais. O tratamento dietético deve ser mantido por toda a vida, o que se torna difícil devido à grande complexidade da dieta. Quando não tratada, a fenilcetonúria pode resultar em complicações neurológicas irreversíveis. As mulheres fenilcetonúricas devem ter especial controlo alimentar durante a idade reprodutiva e gravidez, de modo a prevenir lesões no feto.

Novas abordagens terapêuticas têm surgido no sentido de diminuir a restrição do tratamento dietético.

Este trabalho monográfico pretendeu, através de revisão bibliográfica, compreender os mecanismos clínicos, genéticos e bioquímicos de uma doença hereditária do metabolismo, de simples diagnóstico, mas com grande variabilidade molecular, e conhecer propostas alternativas ao tratamento dietético da fenilcetonúria.

DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais que me proporcionaram a possibilidade de me licenciar. Aos meus amigos, que sempre me ajudaram e apoiaram.

Agradeço à Professora Doutora Inês Lopes Cardoso pela disponibilidade e orientação prestadas.

Agradeço ainda, pelas indicações dadas, pelo material dispensado e, sobretudo, pela simpatia com que me receberam, ao Doutor Rui Vaz Osório (Director do Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães) e à Doutora Carla Carmona (Psicóloga no Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães).

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que me ajudaram na sua realização, mas, em especial, a todos os fenilcetonúricos.

“A sabedoria começa na reflexão”

Sócrates

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MARCOS IMPORTANTES NA HISTÓRIA DA FENILCETONÚRIA.....	13
3. METABOLISMO DA FENILALANINA	14
4. FENILCETONÚRIA ORIGINADA PELA DEFICIÊNCIA EM FENILALANINA HIDROXILASE	16
4.1. Aspectos clínicos	16
4.2. Aspectos genéticos	17
4.3. Diagnóstico da fenilcetonúria.....	20
4.4. Tratamento.....	22
4.4.1. Princípios gerais	22
4.4.2. Abordagens terapêuticas alternativas	25
4.4.2.1. Terapia génica.....	25
4.4.2.2. Suplementos de aminoácidos neutros.....	27
4.4.2.3. Terapia enzimática com fenilalanina amónia liase.....	28
4.4.2.4. Suplementos de tetrahydrobiopterina.....	28
4.4.2.5. Transplante de fígado	30
4.5. Complicações na fase adulta.....	30
4.5.1. Complicações neurológicas	30
4.5.2. Deficiências nutricionais	32
4.5.3. Doenças ósseas	33
5. DESORDENS DO METABOLISMO DA TETRAHIDROBIOPTERINA ASSOCIADAS COM HIPERFENILALANINEMIA	33
5.1. Metabolismo da tetrahydrobiopterina.....	33
5.2. Desordens do metabolismo da tetrahydrobiopterina	35
6. SÍNDROME DA FENILCETONÚRIA MATERNA	36
6.1. Aspectos clínicos da síndrome da fenilcetonúria materna.....	36
6.2. Tratamento da síndrome da fenilcetonúria materna	37
6.3. Factores condicionantes do sucesso terapêutico.....	39
6.4. Aporte nutricional materno.....	40
6.5. A tetrahydrobiopterina na terapêutica da síndrome da fenilcetonúria materna.....	40
7. CONCLUSÃO.....	41
8. BIBLIOGRAFIA	42
ANEXOS	51
ANEXO I.....	52
ANEXO II.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional do centro activo da fenilalanina hidroxilase.....15

Figura 2 - Hidroxilação da fenilalanina16

Figura 3 - Esquema representativo da síntese da tetrahydrobiopterina.....35

LISTA DE ABREVIATURAS

- BH4** – Tetrahydrobiopterina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
cDNA – DNA complementar
DHPR – Dihidropteridina redutase
GTP - Guanosina trifosfato
GTPCH I - Guanosinatrifosfato ciclohidrolase I
HPA – Hiperfenilalaninemia
MS/MS – Espectroscopia de massa em “tandem”
PAH – Fenilalanina hidroxilase
PAH^{enu2} – Ratinho-modelo fenilcetonúrico
PAL – Fenilalanina amónia liase
PCD - Pterina carbinolamina-4-desidratase
PKU – Fenilcetonúria
PTPS - 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase
qBH₂ – Dihidropteridina quinóide
QI – Coeficiente de Inteligência
SR - Sepiapterina redutase

1. INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é uma desordem do metabolismo dos aminoácidos causada, na maioria dos casos, pela deficiente actividade da enzima hepática, fenilalanina hidroxilase (PAH) (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001; Rupp A *et al.*, 2001). Nestas condições, a fenilalanina é incapaz de se converter em tirosina, resultando na sua elevação. Através de vias metabólicas de transaminação secundária, a fenilalanina é convertida em fenilpiruvato, resultando na acumulação deste no sangue e noutros tecidos, o que acarreta danos irreversíveis no sistema nervoso central (Zschocke J, 2003).

A doença constitui, pois, uma forma de hiperfenilalaninemia (HPA) persistente (Guldberg P *et al.*, 1998; National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001). A fenilcetonúria representa a forma mais grave de hiperfenilalaninemia (elevação dos níveis de fenilalanina plasmática, causada pela deficiência em fenilalanina hidroxilase) e é a aminoacidopatia mais comum na Europa (Vallian S e Moeini H, 2006; Zschocke J, 2003).

O seu tratamento é difícil de implementar e consiste numa dieta com restrição de fenilalanina durante toda a vida. Quando não tratada, a fenilcetonúria apresenta-se como uma doença lentamente progressiva, com graves efeitos ao nível do desenvolvimento cognitivo (Matalon KM, 2001).

Os efeitos adversos de elevados níveis de fenilalanina nos fetos de mulheres fenilcetonúricas são bem conhecidos e, por isso mesmo, é de extrema importância existir um controlo rigoroso dos níveis de fenilalanina plasmática antes e durante a gestação. A síndrome da fenilcetonúria materna resulta em múltiplas anomalias congénitas para o feto, que podem ser evitadas mediante a adopção de uma dieta controlada pobre em proteínas e fenilalanina pela mulher (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Koch R *et al.*, 2000 (a)).

Uma pequena percentagem dos casos de fenilcetonúria é originada por defeitos no metabolismo da tetrahydrobiopterina (BH4), cofactor essencial para a actividade da fenilalanina hidroxilase (Zurflu MR *et al.*, 2008).

2. MARCOS IMPORTANTES NA HISTÓRIA DA FENILCETONÚRIA

Decorria o ano de 1934, quando Asbjörn Fölling recebeu no seu laboratório amostras de urina de dois irmãos com atraso mental e um odor corporal estranho. Depois de efectuar alguns testes, parcos nessa altura, comprovou que ambas as amostras continham uma substância que não era encontrada nas urinas normais, o ácido fenilpirúvico, responsável pelo tal odor anormal (Centerwall SA e Centerwall WR, 2000; Scriver CR, 2007).

Fölling relacionou, posteriormente, o atraso mental característico da doença, com um erro congénito do metabolismo, conceito sugerido há cerca de uma centena de anos por Archibald Garrod, e designou a condição de “oligofrenia fenilpirúvica”. No entanto, alguns anos mais tarde, Penrose e Quastel renomearam-na de fenilcetonúria, devido ao seu metabolito anormal (Centerwall SA e Centerwall WR, 2000; Scriver CR, 2007).

Em 1935, Lionel Penrose constatou que a doença era transmitida de forma autossómica recessiva, e cerca de 20 anos depois, Jervis conseguiu demonstrar que a actividade hepática da fenilalanina hidroxilase era deficiente em doentes fenilcetonúricos (Scriver CR, 2007).

Ainda na década de 50, Bickel traçou um plano alimentar para uma criança fenilcetonúrica com atraso mental, de onde excluiu a ingestão de fenilalanina (Scriver CR, 2007). Verificou que a dieta produzia uma marcada redução na concentração plasmática de fenilalanina e melhorias no comportamento dos fenilcetonúricos. Durante os anos seguintes, vários estudos indicaram que a referida dieta também prevenia o atraso mental (Levy HL, 1999), continuando essa como base terapêutica da fenilcetonúria até aos dias de hoje (Centerwall SA e Centerwall WR, 2000).

Guthrie desenvolveu em 1961 um teste laboratorial simples de rastreio do nível de fenilalanina plasmática, que ficou conhecido como teste de inibição bacteriana de Guthrie (Matalon KM, 2001). Este método conduziu à realização de programas de triagem neonatal da fenilcetonúria, facultando o diagnóstico precoce da doença e o respectivo tratamento. Nos anos 70, estes programas já eram rotina na maioria dos países desenvolvidos (Levy HL, 1999).

Por essa altura ainda, foi revelada uma nova forma de fenilcetonúria, ao serem identificados indivíduos com uma condição estranha chamada hiperfenilalaninemia maligna. A descoberta desta nova forma de fenilcetonúria revelou desordens na síntese ou regeneração da tetrahydrobiopterina, cofactor necessário para a actividade da fenilalanina hidroxilase (Centerwall SA e Centerwall WR, 2000).

Nos anos 80, o gene codificante da enzima fenilalanina hidroxilase foi localizado por Woo no cromossoma 12. O seu isolamento ampliou o conhecimento e compreensão da função da fenilalanina hidroxilase, e a relação das mutações com a actividade enzimática. Existem centenas de mutações que podem originar vários graus de severidade da fenilcetonúria (Matalon KM, 2001). Konecki obteve mais tarde a sequência genómica completa do gene codificante da enzima fenilalanina hidroxilase (Scriver CR, 2007).

Na década de 90, constitui-se um consórcio de análise mutacional do gene da fenilalanina hidroxilase, a análise mutacional na fenilcetonúria é levada a cabo em diversas populações humanas, e uma extensiva heterogeneidade alélica não ao acaso é descoberta (Scriver CR, 2007). Os avanços na compreensão molecular trouxeram potencial para o desenvolvimento de novas terapias para a doença (Matalon KM, 2001).

A fenilcetonúria é célebre, hoje em dia, como sendo uma das primeiras doenças genéticas humanas a ter uma terapia racional efectiva. Tal reconhecimento constituiu uma transformação no pensamento médico acerca das doenças genéticas em geral (Scriver CR, 2007).

3. METABOLISMO DA FENILALANINA

A fenilalanina é um aminoácido aromático essencial, metabolizado principalmente, no fígado. A fenilalanina em excesso, não necessária para o anabolismo proteico, é hidroxilada a tirosina, pela enzima fenilalanina hidroxilase. Esta, tem uma estrutura quaternária formando um tetrâmero, possuindo quatro cadeias polipeptídicas que trabalham conjuntamente (figura 1). Cada cadeia está ligada a um átomo de ferro, que liga o oxigénio necessário, de modo a formar tirosina (Murray RK *et al.*, 1996).

A enzima fenilalanina hidroxilase é constituída por três regiões: a região reguladora, responsável pela ligação à fenilalanina; a região que cataliza a formação de tirosina, e uma região de tetramerização, responsável pela combinação das quatro cadeias polipeptídicas (<http://www.pkunews.org/research/guttler.htm>).

A fenilalanina hidroxilase cataliza a reacção de hidroxilação da fenilalanina a tirosina, com o auxílio do cofactor tetrahydrobiopterina. Quando a tirosina se forma, a BH_4 é oxidada a dihydropteridina quinóide (qBH_2) que, por sua vez, é reduzida pela dihydropteridina redutase (DHPR), sendo a fenilalanina hidroxilase activada novamente (Figura 2). Pelo facto de 70 a 90% da fenilalanina ser, normalmente, convertida em tirosina, esta passa a ser um aminoácido essencial nos indivíduos com fenilcetonúria (Zschocke J, 2003).

Esta reacção encontra-se deficiente ou ausente nos doentes fenilcetonúricos. Consequentemente, a concentração plasmática de fenilalanina aumenta e os níveis de tirosina diminuem. De modo a inverter as elevadas concentrações de fenilalanina, são activadas vias de degradação alternativas do seu metabolismo. Os seus produtos de degradação, que são habitualmente indetectáveis, aumentam, sendo detectados na urina. Estes produtos de degradação incluem o ácido fenilpirúvico, o ácido feniláctico e o ácido fenilacético (Zschocke J, 2003).

4. FENILCETONÚRIA ORIGINADA PELA DEFICIÊNCIA EM FENILALANINA HIDROXILASE

4.1. Aspectos clínicos

Os fenilcetonúricos apresentam-se clinicamente normais, quando nascem. Apenas por volta dos 6 meses de idade, é que as crianças manifestam atrasos no desenvolvimento, espasmos, hipotonia e erupções da pele. Apresentam diminuição na pigmentação, tendo

pele, olhos e cabelo mais claros do que os restantes familiares. A excreção de fenilcetonas (ácido fenilacético) fornece à urina um odor característico. A microcefalia está presente em cerca de 68% das crianças não tratadas e a epilepsia abrange 25% destes doentes (Matalon KM 2001).

Os doentes não tratados ou os que abandonam o tratamento, caracterizam-se por danos a nível mental, comportamental, neurológico e físico. O atraso psicomotor é, habitualmente, profundo, e a maioria apresenta um coeficiente de inteligência (QI) baixo, agressividade e ansiedade (Walter JH *et al.*, 2006). Na fase da adolescência, estes doentes revelam comportamentos autistas e hiperactividade (Matalon KM, 2001).

A variabilidade clínica da fenilcetonúria sofre influência não só de factores genéticos, mas aspectos como a idade com que é iniciado o controlo metabólico, o tipo de tratamento adoptado, bem como, a característica específica examinada (o atraso mental em casos não tratados, a concentração de fenilalanina sanguínea e cerebral, deficiências neurológicas e neuropsiquiátricas) contribuem, também, para a heterogeneidade clínica da doença (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001).

4.2. Aspectos genéticos

Segundo o Relatório de Actividades de 2006 do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, Portugal apresentava desde o início do rastreio neonatal da fenilcetonúria até ao final de 2006, num total de 2.695.825 recém-nascidos estudados, uma prevalência de 1/10.870, existindo um total de 248 casos de fenilcetonúria (Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, 2006).

A fenilcetonúria exhibe uma grande variabilidade genética (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001). De acordo com a base de dados electrónica (www.pahdb.mcgill.ca), até ao início de Janeiro de 2007 tinham sido identificadas e descritas 528 mutações diferentes localizadas no gene codificante da fenilalanina hidroxilase, causadoras de defeitos com diferentes graus de gravidade na actividade da enzima (anexo I) (www.pahdb.mcgill.ca; Matalon KM, 2001). O gene da fenilalanina hidroxilase está localizado entre as bandas 2 e 4 da região 2 no braço longo do

cromossoma 12 (12q22-q24.1) (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Pfaendner NH *et al.*, 2005).

Algumas mutações causam a completa destruição da função da fenilalanina hidroxilase, outras, estão associadas com a actividade residual da enzima (Guldberg P *et al.*, 1998). Podem ser: deleções de partes de um gene; inserções de bases adicionais; mutações “missense” que alteram um aminoácido na proteína; defeitos no processo de “splicing”, nos quais a remoção dos intrões não é feita correctamente levando a que a leitura dos tripletos seja alterada, e, ainda, mutações “nonsense”, nas quais surge um codão de terminação prematuro o que leva a que a proteína fique mais curta perdendo a sua actividade catalítica (Matalon KM, 2001).

A fenilcetonúria é uma doença monogénica transmitida de forma autossómica recessiva. A maioria dos doentes fenilcetonúricos é heterozigótico contendo duas mutações diferentes, o que contribui para a heterogeneidade bioquímica e clínica da doença (Levy HL, 1989; National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001).

A análise molecular dos doentes fenilcetonúricos é de extrema importância, pois o genótipo fornece, habitualmente, uma previsão do fenótipo metabólico (Guldberg P *et al.*, 1998). No entanto, este facto nem sempre se verifica. Estudos demonstram que, em alguns casos da forma mais branda de hiperfenilalaninemia, foram descritas mutações severas. Isto é, a existência de duas mutações severas manifestou-se com um fenótipo brando, ao contrário do que seria de esperar, ou seja, que originasse um fenótipo severo (Matalon KM, 2001).

Nos últimos 15 anos têm sido feitas investigações no sentido de chamar a atenção para o variado espectro de mutações existentes no continente europeu. De facto, há grandes discrepâncias nas diferentes regiões da Europa, em relação às frequências relativas mutacionais. Cada região está ligada a determinadas mutações, especialmente, regiões com elevado grau de imigração em diferentes alturas (Desviat LR *et al.*, 1999; Zschocke J, 2003).

Em Portugal, as mutações mais frequentes são: IVS10-11G>A, uma mutação “splice junction” que resulta de alteração de guanina para adenina no nucleótido 1066, e as mutações “missense” R261Q (mudança de arginina para glutamina no aminoácido 261 que resulta de alteração de guanina para adenina no nucleótido 782) e V388M (mudança de valina para metionina no aminoácido 388 que resulta de alteração de guanina para adenina no nucleótido 1162) (Zschocke J, 2003; www.pahdb.mcgill.ca).

A mutação R261Q está, normalmente, associada a fenótipos moderados. Está relacionada com os alelos do haplótipo 1.8 (Pérez B *et al.*, 1997; Rivera I *et al.*, 1998; Tyfield LA *et al.*, 1991).

O aparecimento desta mutação é difícil de explicar através de migração recente ou antiga, evidenciando as dificuldades no uso de mutações recessivas para estudos de história populacional. A mutação R261Q, tem uma frequência alélica moderada em muitos países europeus, que não está relacionada com o movimento populacional do passado. Esta mutação está ligada a vários haplótipos, o seu reaparecimento recorrente em um ou mais fundadores é possível (Pérez B *et al.*, 1997; Tyfield LA *et al.*, 1991; Zschocke J, 2003).

A mutação V388M está associada à Península Ibérica. É uma mutação ligada ao haplótipo 1.7, e foi identificada primeiro em Portugal e, só depois, em Espanha (Rivera I *et al.*, 1998). Tem uma frequência alélica num único país ou em países adjacentes, o que sugere efeitos de fundadores locais, com um insignificante impacto de migração (Zschocke J, 2003). Esta mutação é compatível com o fenótipo moderado da fenilcetonúria (Desviat LR *et al.*, 1995; Pérez B *et al.*, 1997).

A mutação IVS10-11G>A é característica dos países mediterrânicos. É uma mutação muito comum no Sul da Europa (Zschocke J, 2003).

A análise mutacional e a determinação do genótipo devem ser efectuadas em todos os indivíduos fenilcetonúricos, não só para o diagnóstico inicial, mas também para aconselhamento genético, seguimento dos doentes e prognóstico a longo prazo (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001). A análise mutacional pode ser

usada também na determinação de genótipos associados com a possível resposta à tetrahydrobiopterina (Walter JH *et al.*, 2006).

4.3. Diagnóstico da fenilcetonúria

O diagnóstico da fenilcetonúria baseia-se na detecção da hiperfenilalaninemia (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Kohli S *et al.*, 2005; Roselli MA *et al.*, 2004).

Quando nascem, os fenilcetonúricos apresentam valores de fenilalanina normais, que aumentam nos primeiros dias de vida, com a ingestão de leite (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Kohli S *et al.*, 2005; Roselli MA *et al.*, 2004; Walter JH *et al.*, 2006).

Em Portugal, o rastreio neonatal da fenilcetonúria é efectuado a todos os recém-nascidos realizando o teste do pezinho, através do sangue colhido por picada no pé, entre o 3º e o 6º dia de vida, para uma ficha com um papel de filtro adequado (Vilarinho L *et al.*, 2006).

Dependendo da concentração de fenilalanina plasmática, durante uma dieta normal que inclua proteínas, a deficiência em fenilalanina hidroxilase pode ser classificada em hiperfenilalaninemia não-fenilcetonúrica, se a fenilalanina está entre 3-6 mg/dl, em fenilcetonúria moderada ou suave, quando a fenilalanina está entre 6-20 mg/dl, e em fenilcetonúria clássica, se a fenilalanina for superior a 20 mg/dl (Vallian S e Moeini H, 2006; Zschocke J, 2003; Zurflu MR *et al.*, 2008). Na deficiência em fenilalanina hidroxilase, a razão fenilalanina/tirosina é, normalmente, superior a 3 (Walter JH *et al.*, 2006).

Apesar da falta de unanimidade, relativamente à classificação das hiperfenilalaninemias, o seu objectivo é sempre o mesmo, isto é, indicar a necessidade, ou não, da implementação de um tratamento dietético imediato (Kohli S *et al.*, 2005; Walter JH *et al.*, 2006).

Existem diversos métodos para medir a fenilalanina plasmática nos estudos de rastreio neonatal da fenilcetonúria. Estes incluem o teste de inibição bacteriana de Guthrie,

procedimentos fluorimétricos baseados no método fluorimétrico de McCaman e Robins e a espectroscopia de massa em “tandem” (MS/MS) (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001; Vallian S e Moeini H, 2006).

Entre estes métodos, o teste de inibição bacteriana de Guthrie ou teste do pézinho é o eleito no rastreio populacional da fenilcetonúria, pois é relativamente rápido e pouco dispendioso. No entanto, é um teste semi-quantitativo, detectando apenas a presença, e não a exacta concentração de fenilalanina; não pode ser usado em recém-nascidos sujeitos a antibioterapia (Vilarinho L *et al.*, 2006), e verificam-se alguns falso-positivos, devido ao uso do inibidor β -2-tiofenilalanina (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001; Vallian S e Moeini H, 2006).

O teste modificado de McCaman e Robins modificado é um ensaio quantitativo. Apesar de ser relativamente sensível e exacto, sofre interferências, especialmente de antibióticos, originando falsos-positivos (Matalon KM, 2001).

O crescente uso e aplicação da espectroscopia de massa na triagem neonatal parece ser altamente justificado, já que este método permite o diagnóstico da fenilcetonúria com um número extremamente baixo de falsos-positivos e elevada precisão e exactidão (Matalon KM, 2001; Zaffanello M *et al.*, 2003). Esta metodologia possibilita, ainda, obter os níveis de tirosina, interpretar os níveis de fenilalanina, e identificar outras desordens metabólicas numa única amostra (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001).

A actividade da fenilalanina hidroxilase não é analisada, pois para tal é necessário recorrer a um teste invasivo, sendo requerida uma biópsia do fígado. As desordens relacionadas com defeitos na tetrahydrobiopterina devem ser analisadas através da medição da biopterina na urina ou no sangue, e através de análises do nível de dihidropteridina no sangue (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Walter JH *et al.*, 2006).

Após a confirmação do diagnóstico, a criança é sujeita a um tratamento dietético com restrição de fenilalanina (Matalon KM, 2001).

4.4. Tratamento

4.4.1. Princípios gerais

O princípio do tratamento da deficiência em fenilalanina hidroxilase é a redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina, de forma a prevenir os efeitos neuropatológicos da doença (Matalon KM, 2001).

Os fenilcetonúricos têm de adoptar uma dieta hipoproteica e pobre em fenilalanina, alcançada através da restrição das proteínas naturais até uma quantidade que atinja a necessidade de fenilalanina para a síntese proteica, e suplementação com um substituto proteico, de modo a colmatar a necessidade total de proteínas (Santos LL *et al.*, 2006).

Têm sido efectuados diversos estudos com crianças e adolescentes fenilcetonúricos, de modo a perceber o grau de influência que tem uma alimentação com restrição de fenilalanina nestes doentes. As crianças fenilcetonúricas com uma idade média de 10 anos que praticaram um controlo rigoroso da dieta desde as primeiras semanas de vida, apresentaram um grau normal de inteligência e funções neurológicas normais. Mantiveram um baixo nível de fenilalanina sanguínea, demonstraram ter uma boa capacidade de leitura e de fala, e um bom desempenho ao nível dos testes de comportamento e de inteligência. Estas crianças não apresentaram desajustes emocionais nem de conduta (Mira NVM e Marquez UML, 2000).

Por outro lado, as crianças fenilcetonúricas que adoptaram um controlo pouco rigoroso da dieta durante um período de tempo prolongado evidenciaram deficiências neurológicas, dificuldades na reintrodução do tratamento e uma diminuição acentuada do coeficiente de inteligência. As suas dificuldades de atenção, verbais e de grafismo e as perturbações da organização temporo-espacial e sensorio-motoras, aumentaram. Contudo, estas deficiências verificaram-se também em doentes que seguiram o tratamento (Arnold GL *et al.*, 2004).

A continuidade de uma dieta durante a idade adulta é controversa. Apenas no caso das mulheres fenilcetonúricas, devido à fenilcetonúria materna, estão bem estabelecidas as

vantagens do seguimento da dieta. Nos restantes casos, o efeito do abandono da dieta não se encontra bem determinado. Todavia, a favor desta continuidade, que requer autodisciplina, está o facto de melhorar o desenvolvimento intelectual e evitar a deterioração cognitiva e as complicações neurológicas, como tremores e epilepsia (Mira NVM e Marquez UML, 2000).

O suplemento de substituto proteico consiste numa mistura de aminoácidos isenta de fenilalanina que contém minerais, vitaminas e outros nutrientes, ou um hidrolizado proteico que contém uma pequena quantidade de fenilalanina (Spronsen FJ *et al.*, 2001). É importante ter em conta o adequado aporte nutricional ajustado a cada faixa etária (Matalon KM, 2001). A dieta deve ser efectuada para cada indivíduo, para que a fenilalanina e/ou os seus metabolitos não alcancem níveis tóxicos, e para que a ingestão de outros aminoácidos seja suficiente para fornecer as necessidades metabólicas do doente (Santos LL *et al.*, 2006).

Os custos dos hidrolizados e dos alimentos hipoproteicos, como, massas, bolachas e farinhas, são comparticipados pelo Estado em 100% (Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM), 2007).

A tirosina é incorporada por todas as proteínas e é um precursor da tiroxina, melanina e dos neurotransmissores dopamina e norepinefrina. Em proteínas normais, a razão fenilalanina:tirosina é de 1:1. Uma vez que os indivíduos fenilcetonúricos não conseguem sintetizar tirosina a partir da fenilalanina, devido à deficiência em fenilalanina hidroxilase, eles necessitam de fontes proteicas que forneçam cerca de dez vezes mais tirosina do que as proteínas normais. Assim, nestes indivíduos, a tirosina torna-se num aminoácido essencial. Se não tratada, a fenilcetonúria resulta em concentrações plasmáticas de tirosina muito baixas. Os fenilcetonúricos devem, por isso, tomar suplementos alimentares de tirosina isentos de fenilalanina, ou com pouca quantidade deste aminoácido (Bross R *et al.*, 2000; Matalon KM, 2001; Spronsen FJ *et al.*, 2001).

Os indivíduos com fenilcetonúria não podem ingerir, por exemplo, leite e produtos lácteos, carne, ovos, trigo, feijão, cereais, amendoins, lentilhas ou outras leguminosas.

As frutas e os vegetais podem ser consumidos, mas moderadamente (Santos LL *et al.*, 2006).

O leite materno e as fórmulas comerciais infantis fornecem quantidades adequadas de fenilalanina essencial. À medida que a criança vai ficando mais velha, são fornecidas quantidades rigorosas de frutos, vegetais e outros alimentos, em lugar do leite materno e das fórmulas comerciais infantis (Matalon KM, 2001; Kanufre VC *et al.*, 2007).

Os produtos alimentares comerciais para crianças e adultos consistem em cristais de aminoácidos, para que estes alimentos sejam completamente isentos de fenilalanina. Estes têm um sabor e odor muito desagradáveis. Têm sido criadas fórmulas alimentares com melhor palatabilidade, alterando as quantidades de aminoácidos presentes e eliminando as vitaminas e os minerais. A quantidade de produtos alimentares e os suplementos de vitaminas e minerais a tomar, são determinados individualmente pelos clínicos (Matalon KM, 2001; Santos LL *et al.*, 2006).

A monitorização dos níveis plasmáticos de fenilalanina deve ser efectuada semanalmente no primeiro ano de vida, quinzenalmente até aos três anos, e mensalmente a partir dessa idade. Devem ser efectuadas análises hematológicas, bioquímicas e de crescimento ósseo, regularmente (Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM), 2007).

De acordo com o “Consenso para o tratamento nutricional da fenilcetonúria”, a dieta deve ser iniciada logo após a confirmação da doença, isto é, valores plasmáticos de fenilalanina superiores a 6 mg/dl. Os níveis plasmáticos de fenilalanina devem ser idealmente mantidos entre 2 e 6 mg/dl (Matalon KM, 2001; Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM), 2007). O exercício físico, a gravidez e a existência de infecções, podem alterar as necessidades de fenilalanina de cada indivíduo (Santos LL *et al.*, 2006).

O tratamento dietético é complexo, exigente, para toda a vida, e requer a completa cooperação e compreensão da doença pelo paciente (Matalon KM, 2001). A qualidade de vida dos doentes sujeitos a dieta é severamente comprometida, e a adesão ao tratamento diminui à medida que os doentes envelhecem. Normalmente os doentes abandonam o

tratamento durante a adolescência por desconhecerem os benefícios da dieta no tratamento, por falta de tempo ou de condições financeiras, ou ainda, por pressão dos pares (Santos LL *et al.*, 2006).

Outro inconveniente deste tipo de tratamento é a frequente redução dos níveis plasmáticos de vários nutrientes (Levy HL, 1999).

Qualquer método que alivie a exigência e a concomitante tensão impostas pela dieta é bem-vindo pelos fenilcetonúricos, suas famílias, e profissionais de saúde. Conseqüentemente, tem havido um grande interesse em abordagens que digam respeito às bases genéticas e bioquímicas da fenilcetonúria (Levy HL, 1999).

4.4.2. Abordagens terapêuticas alternativas

4.4.2.1. Terapia génica

A terapia génica para a fenilcetonúria oferece esperança para o futuro. Este procedimento actua através da modificação da expressão de genes individuais ou da correcção de genes anormais, administrando ácido desoxirribonucleico (DNA) (Blau N e Scriver CR, 2004; www.asgt.org/).

Existem três estratégias diferentes de terapia génica: a substituição, a correcção ou o aumento de genes. Na substituição de genes, o gene mutado é removido e substituído por um gene normal. Na correcção, apenas a zona afectada do gene mutado é corrigida. Por fim, o aumento de genes envolve a introdução de material genético estranho na célula, de modo a recuperar a função do gene mutado. O material genético estranho pode ser introduzido nas células afectadas através de, por exemplo, adenovírus ou retrovírus. As células que recebem o gene irão conter, tanto o gene mutado, como o gene exógeno. Esta última estratégia de terapia génica é a que está a ser estudada para o tratamento da fenilcetonúria (Murray RK *et al.*, 1996).

Têm sido experimentados diferentes veículos de transferência do gene codificante da fenilalanina hidroxilase em ratinhos PAH^{enu2} (ratinho-modelo fenilcetonúrico). Estes,

incluem vectores não-virais, vectores adenovirais recombinantes, vectores retrovirais recombinantes e vectores associados a adenovirus recombinantes (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004).

Estudos mostraram que vectores derivados de um retrovirus recombinante permitem a transfecção eficiente de hepatócitos com o cDNA (DNA complementar) codificante de fenilalanina hidroxilase, *in vitro*. Contudo, a transfecção *in vivo* é pouco eficiente (Santos LL *et al.*, 2006).

Foram também efectuados estudos utilizando vectores derivados de um adenovirus recombinante expressando o cDNA da fenilalanina hidroxilase. Estes vectores foram colocados na circulação portal de ratinhos com deficiência em fenilalanina hidroxilase. Esta abordagem permitiu a recuperação de grande parte da actividade da fenilalanina hidroxilase hepática, normalizando os níveis plasmáticos de fenilalanina (Matalon KM, 2001).

A produção de anticorpos contra o vector adenoviral recombinante por parte do doente tem sido um grande obstáculo a esta estratégia. Contudo, tem sido demonstrado que a administração de um imunossupressor que impeça a resposta imune do hospedeiro, prolonga a expressão do gene codificante da fenilalanina hidroxilase e reduz a falta de pigmentação (Matalon KM, 2001).

A utilização de vectores associados a adenovirus recombinantes parece mais segura e mais eficaz. Estes vectores induzem uma mínima resposta imune e conduzem a efeitos terapêuticos mais prolongados. Este tratamento demonstrou ser muito satisfatório em ratinhos fenilcetonúricos machos, induzindo a redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina em pouco tempo. Inesperadamente, o tratamento foi menos eficaz em fêmeas, sendo necessários mais estudos para explicar esta diferença (Matalon KM, 2001).

Para além da terapia génica convencional, alguns estudos com terapia heteróloga (expressão da fenilalanina hidroxilase noutros tecidos que não o fígado) têm sido desenvolvidos para a fenilcetonúria (Matalon KM, 2001).

Para além das dificuldades técnicas tipicamente associadas com a terapia génica, outros problemas emergem de aspectos específicos da doença. Apesar da maior parte das mutações da fenilcetonúria levarem a uma perda de função, a proteína está presente frequentemente. Interações alélicas na fenilcetonúria são, ainda, fracamente compreendidas. É de esperar que, em alguns casos, seja também necessário inactivar os alelos anormais (Santos LL *et al.*, 2006).

4.4.2.2. Suplementos de aminoácidos neutros

A fenilalanina, tal como outros aminoácidos neutros (asparagina, cisteína, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, serina, treonina, tirosina, triptofano e valina) passa a barreira hematoencefálica através de transportadores de aminoácidos do tipo -L. Elevados níveis de fenilalanina, como os habitualmente observados nos indivíduos fenilcetonúricos, reduzem o transporte de outros aminoácidos neutros para o cérebro. Alguns destes, como a tirosina e o triptofano, são precursores de neurotransmissores, e foi sugerido que a síntese deficiente de neurotransmissores, é um factor que contribui para a disfunção cognitiva observada na fenilcetonúria (Matalon R *et al.*, 2003).

Consequentemente, uma nova estratégia terapêutica baseada na ingestão proteica moderada combinada com suplementos de aminoácidos neutros isentos de fenilalanina, foi introduzida. Esta estratégia foi apresentada em 1985 a adolescentes e adultos fenilcetonúricos com dificuldades em aderir à dieta restrita em fenilalanina. Apesar da grande quantidade de suplementos que os doentes têm de consumir (cerca de dez tabletes antes de cada refeição), este tipo de terapêutica tem tido uma boa aceitação (Matalon R *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstram não haver diferenças no desenvolvimento cognitivo ou efeitos adversos de adolescentes sob a dieta convencional, comparados com adolescentes com uma dieta menos restritiva em termos proteicos e com suplementos de aminoácidos neutros isentos de fenilalanina (Matalon R *et al.*, 2003; Santos LL *et al.*, 2006). Os aminoácidos neutros podem ser usados como suplemento do tratamento dietético convencional da fenilcetonúria, e devem permitir uma dieta mais liberal e promover a maior concordância com a mesma (Matalon R *et al.*, 2003).

4.4.2.3. Terapia enzimática com fenilalanina amónia liase

Outros estudos para o tratamento da fenilcetonúria envolvem a administração oral de fenilalanina amónia liase (PAL), uma enzima que actua, degradando a fenilalanina no lúmen intestinal, evitando a sua absorção (Blau N e Scriver CR, 2004; Matalon KM, 2001; Santos LL *et al.*, 2006).

Problemas associados com esta abordagem envolvem a inactivação da fenilalanina amónia liase pelas enzimas digestivas, e os elevados custos da purificação convencional desta enzima. Em seres humanos, apenas foi testada como enzima purificada (Santos LL *et al.*, 2006).

Quando injectada intravenosamente, a fenilalanina amónia liase exhibe baixa estabilidade e elevada imunogenicidade. Para evitar a inactivação da fenilalanina amónia liase pelas enzimas digestivas, a enzima foi imobilizada em microcápsulas semi-permeáveis. Com esta preparação, verifica-se uma redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina em ratinhos e humanos (Santos LL *et al.*, 2006).

Se este método terapêutico se tornar possível, espera-se que os doentes possam ter a sua tolerância às proteínas da dieta substancialmente aumentada, tomando a fenilalanina amónia liase juntamente com a refeição, de modo a degradar a fenilalanina em excesso (Matalon KM, 2001). No entanto, alguns estudos parecem sugerir que o tratamento da fenilcetonúria requer maiores reduções nas concentrações de fenilalanina plasmática, do que aquelas que esta enzima proporciona. Acresce ainda o facto de a fenilalanina amónia liase não originar a produção de tirosina, e segundo alguns estudos, a deficiência deste aminoácido é um factor a ter em conta nos efeitos cerebrais da fenilcetonúria (Blau N e Scriver CR, 2004; Levy HL, 1999).

4.4.2.4. Suplementos de tetrahidrobiopterina

Uma alternativa real à dieta com restrição de fenilalanina foi assinalada em diversos estudos, pela observação de fenilcetonúricos que demonstraram reduzidos níveis de fenilalanina plasmática após a administração oral de suplementos de tetrahidrobiopterina

(Matalon KM, 2001; Santos LL *et al.*, 2006). Nesses casos, o metabolismo do cofactor foi normal, contudo, a sua adição, em grande quantidade, normalizou o nível plasmático de fenilalanina (Matalon KM, 2001).

Alguns argumentos têm sido propostos para explicar a resposta à tetrahydrobiopterina: o aumento da afinidade de ligação da fenilalanina hidroxilase mutante, para a tetrahydrobiopterina; a protecção do tetrâmero activo contra a degradação; o aumento da biossíntese da tetrahydrobiopterina, e a regulação da expressão da fenilalanina hidroxilase (Santos LL *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que um número de mutações está relacionado com a resposta à administração oral de tetrahydrobiopterina (Levy HL, 1999). Diversos estudos atestam que em alguns doentes com hiperfenilalaninemia não-fenilcetonúrica, e fenilcetonúria clássica, moderada ou suave, a fenilalanina plasmática responde a elevadas doses de tetrahydrobiopterina, sendo, no entanto mais eficaz nas formas mais suaves da doença (Cerone R *et al.*, 2004; Muntau AC *et al.*, 2002).

Nesses doentes, é excluída a deficiência em tetrahydrobiopterina (Cerone R *et al.*, 2004; Muntau AC *et al.*, 2002).

A maior desvantagem do uso do cofactor no tratamento da fenilcetonúria é o seu elevado custo (Levy HL, 1999).

O factor mais importante que determina a conformidade com a terapia com o cofactor parece ser a combinação alélica no locus do gene da fenilalanina hidroxilase, e a intensidade da resposta à terapia com tetrahydrobiopterina nestes doentes, relacionada com a actividade enzimática das mutações identificadas. As mutações da fenilalanina hidroxilase que respondem ao teste de sobrecarga com tetrahydrobiopterina estão listadas em: www.bh4.org (anexo II) (Erlandsen H *et al.*, 2004).

O teste de sobrecarga com tetrahydrobiopterina deve ser efectuado rotineiramente nos recém-nascidos hiperfenilalaninémicos, para excluir a deficiência do cofactor (Erlandsen H *et al.*, 2004).

À desvantagem do custo do cofactor, acresce a escassez de estudos que demonstrem a eficácia a longo prazo do tratamento com tetrahidrobiopterina e o facto deste não ser adequado para todos os doentes (Walter JH *et al.*, 2006).

4.4.2.5. Transplante de fígado

O transplante de fígado corrige completamente a desordem molecular, mas a cirurgia do transplante e a medicação imunossupressora necessária após a sua realização, acarretam muitos riscos para o doente, e não representam, portanto, um substituto apropriado para a dieta (Levy HL, 1999).

4.5. Complicações na fase adulta

4.5.1. Complicações neurológicas

Apesar da extensa caracterização bioquímica da fenilcetonúria, o mecanismo que leva ao desenvolvimento de atraso mental como resultado da hiperfenilalaninemia, não é ainda conhecido (Walter JH *et al.*, 2006).

Uma hipótese lançada foi a de que uma elevada concentração plasmática de fenilalanina impede a entrada de outros aminoácidos neutros através da via L-aminoácido na barreira hematoencefálica, limitando a disponibilidade destes para a incorporação em proteínas. Existem muitas evidências para a inibição competitiva efectiva do sistema de transporte em doentes fenilcetonúricos. É apenas por inferência que as taxas de síntese proteica no cérebro parecem ser afectadas. Doentes não tratados têm pesos cerebrais mais baixos, alterações na estrutura da mielina, e redução da arborização dendrítica e do número de ligações sinápticas (Krause W *et al.*, 1985; Matalon R *et al.*, 2003; Pietz J *et al.*, 1999; Smith CB e Kang J, 2000).

Estudos de ressonância magnética de imagem em doentes fenilcetonúricos não tratados revelam alterações na substância branca não se conhecendo o significado clínico desta alteração. No entanto, sabe-se que, em doentes com elevados níveis de transporte de fenilalanina através da barreira hematoencefálica, a dieta alimentar é, habitualmente,

mais severa. A concentração de fenilalanina cerebral é, portanto, um assistente substancial no controlo clínico de indivíduos fenilcetonúricos, apesar de não ter grande impacto nas recomendações terapêuticas (Krause W *et al.*, 1985; Moats RA *et al.*, 2000).

Também permanece por explicar se as alterações da substância branca representam falhas na produção de mielina, destruição de mielina, ou uma combinação de ambos os processos (Philips MD *et al.*, 2001).

Investigações cinéticas de doentes por espectroscopia de ressonância magnética mostraram diferenças nas concentrações cerebrais de fenilalanina apesar dos níveis de fenilalanina plasmática serem similares. Estes foram influenciados por variações interindividuais de constantes de transporte de fenilalanina através da barreira hematoencefálica, e por variações na taxa de consumo de fenilalanina cerebral individual. Estas variações parecem ser factores causais para o desenvolvimento individual da fenilcetonúria (Koch R *et al.*, 2000 (b); Moats RA *et al.*, 2000; Möller HE *et al.*, 2003; Young SN e Palmour RM, 1999).

A elevada quantidade de fenilalanina cerebral reduz a concentração de aminoácidos intraneurais, dificultando o seu transporte para o cérebro, e inibe competitivamente a hidroxilação da tirosina e do triptofano. Por conseguinte, a síntese proteica diminui, o que afecta a proliferação dendrítica e a mielinização. Consequentemente a “reciclagem” de mielina aumenta e a síntese de neurotransmissores, como a serotonina, dopamina e norepinefrina é inibida (Cornejo EV e Raimann BE, 2004; Krause W *et al.*, 1985; National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001; Pietz J *et al.*, 1999).

Os indivíduos tratados podem demonstrar um risco aumentado de sintomas depressivos e baixa auto-estima. Todavia, não há qualquer correlação entre níveis elevados de fenilalanina e estes sinais, pensando-se que são consequência de estes indivíduos viverem com uma condição crónica, e não, devido ao efeito biológico dos níveis aumentados de fenilalanina (Walter JH *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que um pequeno número de adolescentes e adultos fenilcetonúricos desenvolveu doença neurológica, após atenuação da restrição dietética, tendo melhorado

com o retorno ao tratamento dietético. Estes indivíduos parecem ter tido um pobre controlo alimentar durante a infância. Para aqueles que têm um bom controlo alimentar na infância e que, mais tarde, atenuam a restrição dietética, o risco de desenvolver problemas é, provavelmente, menor. Em alguns casos, a deterioração neurológica parece estar relacionada com a deficiência severa em vitamina B12 (Walter JH *et al.*, 2006).

4.5.2. Deficiências nutricionais

A deficiência em vitamina B12 pode ocorrer em adolescentes e adultos que interrompem os suplementos vitamínicos, mas continuam com a dieta restritiva em proteínas (Walter JH *et al.*, 2006).

Os doentes que cumprem a dieta com restrição de fenilalanina, podem ter deficiência de outras vitaminas e minerais, incluindo selénio, zinco, ferro e retinol. No entanto, estas deficiências são inconsistentemente encontradas, não sendo claro terem algum significado clínico (Walter JH *et al.*, 2006).

Uma vez que os alimentos animais são fontes de ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa, incluindo, o ácido docosahexanóico e o ácido araquidónico, estudos parecem demonstrar que as crianças com hiperfenilalaninemia apresentam níveis deficientes destas moléculas em circulação e em lípidos eritrocitários (Agostoni C *et al.*, 2003).

Como os ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa podem ter um papel na neurotransmissão, a sua deficiência na dieta, pode contribuir para o fraco desenvolvimento dos doentes hiperfenilalaninémicos (Agostoni C *et al.*, 2003).

Foram efectuados estudos com suplementos alimentares de ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa em crianças fenilcetonúricas, com resultados positivos, durante esse período. Ao fim de 12 meses de suplementos de ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa, foi observado um aumento dos níveis de ácido docosahexanóico nos lípidos circulantes (Agostoni C *et al.*, 2003).

É, no entanto, desconhecido se os efeitos bioquímicos e/ou funcionais de uma dieta com ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa podem persistir para além do período de suplementação (Agostoni C *et al.*, 2003).

4.5.3. Doenças ósseas

A fisiopatologia do processo de desenvolvimento de osteoporose e osteopenia por parte dos doentes com fenilcetonúria clássica não é bem conhecida, mas provavelmente está relacionada com as alterações bioquímicas próprias da doença, com a adopção de dietas restritivas durante alturas críticas do desenvolvimento, e com a existência de factores genéticos, até agora desconhecidos. É difícil saber se uma diminuição da mineralização óssea, é primária, e consequência da própria desordem metabólica, ou se é secundária a uma deficiência nutricional não corrigida devidamente durante a infância (Villares JMM e Leal LO, 2006).

São vários os factores sugeridos para explicar a ocorrência de osteoporose e osteopenia em doentes fenilcetonúricos. O efeito patogénico derivado da acumulação de metabolitos tóxicos e da fenilalanina, que podem interferir negativamente nos processos de mineralização óssea; as carências nutricionais originadas pela dieta restritiva, na qual o aporte proteico de cálcio e de fósforo pode não ser o adequado, e as consequências das desordens metabólicas ou hormonais da própria doença, capazes de alterar o processo normal de mineralização óssea, são alguns aspectos que parecem promover o desenvolvimento de doenças ósseas (Villares JMM e Leal LO, 2006).

São, no entanto, necessários mais estudos para perceber, na totalidade, os factores que causam osteoporose e osteopenia nos fenilcetonúricos (Villares JMM e Leal LO, 2006).

5. DESORDENS DO METABOLISMO DA TETRAHIDROBIOPTERINA ASSOCIADAS COM HIPERFENILALANINEMIA

5.1. Metabolismo da tetrahydrobiopterina

A tetrahydrobiopterina é o cofactor necessário na hidroxilação da fenilalanina, tirosina e triptofano. É, portanto, essencial para a hidroxilação da fenilalanina a tirosina; para a hidroxilação da tirosina a L-dopa, que subsequentemente origina dopamina; e para a hidroxilação do triptofano a 5-hidroxitriptofano, necessário para a síntese de serotonina (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Restrepo S *et al.*, 1999). Consequentemente, a ausência ou a baixa actividade da BH4 compromete a síntese de neurotransmissores, nomeadamente da dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina (Restrepo S *et al.*, 1999).

As desordens relacionadas com o metabolismo da BH4 podem ocorrer na biossíntese do cofactor, em que estão envolvidas as enzimas guanosinatrifosfato ciclodrolase I (GTPCH I) e 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase (PTPS), ou na sua regeneração, que envolve a dihidropteridina redutase (DHPR) e a pterina carbinolamina-4-desidratase (PCD) (www.bh4.org).

A BH4 é sintetizada a partir de guanosina trifosfato (GTP) através da acção de três enzimas (Figura 3). A GTPCH I é a primeira enzima na biossíntese da BH4, catalizando a formação de 7,8- dihidroxineopterin trifosfato, a partir de GTP. A GTPCH I está sujeita a inibição pela BH4, ocorrendo esta inibição pela formação de um complexo dependente de BH4 entre a proteína p35 e a GTPCH I. Por outro lado a fenilalanina inverte esta inibição, o que pode explicar os elevados níveis de neopterin e biopterina em doentes hiperfenilalaninémicos (Erlandsen H *et al.*, 2004; www.bh4.org).

De seguida, o PTPS cataliza a conversão de 7,8- dihidroneopterin trifosfato a 6-piruvil-tetrahydropterina. Não estão até à data descritos processos de regulação desta enzima (Erlandsen H *et al.*, 2004; www.bh4.org).

A sepiapterina redutase (SR) é uma oxiredutase necessária para a redução de 6-piruvil tetrahydropterina a BH4 (Erlandsen H *et al.*, 2004; www.bh4.org).

A monoxigenação dos aminoácidos aromáticos é concomitante com a oxigenação de BH4 a pterina-4a-carbinolamina. Esta, é desidratada a dihidropteridina quinóide (qBH2) e água, pela PCD (Erlandsen H *et al.*, 2004; www.bh4.org).

Na última fase da regeneração da BH4, a qBH2 é reduzida a BH4 pela DHPR, dependente de NADH (Erlandsen H *et al.*, 2004; www.bh4.org).

Não há evidências de que a DHPR sofra regulação. No entanto, pensa-se que certos medicamentos podem inibir a sua actividade, tanto *in vivo* como *in vitro* (Blau N e Scriver CR, 2004; www.bh4.org).

5.2. Desordens do metabolismo da tetrahidrobiopterina

As desordens no metabolismo da BH4 também podem ser causa de fenilcetonúria, embora pouco comum. Estas devem ser tidas em conta como diagnóstico diferencial da hiperfenilalaninemias, pois têm diferente tratamento e prognóstico (Restrepo S *et al.*, 1999).

As referidas desordens foram, no passado, intituladas de fenilcetonúria maligna ou atípica. Actualmente, são designadas de acordo com a deficiência enzimática subjacente (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004).

Os defeitos no metabolismo da BH4 promovem a progressiva deterioração da função neurológica, que não pode ser evitada com a dieta restritiva em fenilalanina (Peng SSF *et al.*, 2004; Restrepo S *et al.*, 1999).

O seu diagnóstico é baseado na baixa razão biopterina:neopterina na urina; em concentrações baixas ou normais de biopterina e neopterina na urina; na medição dos níveis séricos de biopterina; na medição da actividade da DHPR no sangue, e de neurotransmissores específicos no líquido cefaloraquidiano (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004; Restrepo S *et al.*, 1999).

Os defeitos na tetrahydrobiopterina requerem um tipo de tratamento diferente daquele que é utilizado quando a causa de fenilcetonúria é a deficiência em fenilalanina hidroxilase (Matalon KM, 2001). A terapêutica proposta inclui a administração de tetrahydrobiopterina e dos neurotransmissores L-dopa e L-5-hidroxitriptofano, e carbidopa, que vão permitir a penetração da tetrahydrobiopterina no sistema nervoso central e a correcção da biossíntese dos neurotransmissores (Restrepo S *et al.*, 1999).

6. SÍNDROME DA FENILCETONÚRIA MATERNA

Em 1937, Jervis esteve, pela primeira vez, em contacto com a síndrome da fenilcetonúria materna, ao verificar que, mulheres fenilcetonúricas tinham tido filhos, alguns deles com fenilcetonúria. Uma vez que Jervis não conseguiu dar a real importância a esse facto, foi apenas em 1956 que se considerou a fenilcetonúria materna como sendo uma complicação da fenilcetonúria. De facto, neste erro inato do metabolismo dos aminoácidos, o fenótipo materno exerce influência no desenvolvimento fetal. Em 1980, foi, finalmente, reconhecida a síndrome da fenilcetonúria materna (Levy HL, 2003).

6.1. Aspectos clínicos da síndrome da fenilcetonúria materna

A fenilcetonúria materna caracteriza-se por elevados níveis de fenilalanina plasmática na grávida, que originam graves consequências no desenvolvimento fetal (Levy HL *et al.*, 2003), devido aos efeitos teratogénicos do aminoácido envolvido, a fenilalanina (Magee AC *et al.*, 2002).

Essas consequências englobam atraso mental, microcefalia, doença cardíaca congénita, dificuldades de aprendizagem, atraso no crescimento intrauterino, e dismorfologia facial (Koch R *et al.*, 2000 (a); Lee PJ *et al.*, 2003; Levy HL *et al.*, 2003; Walter JH *et al.*, 2006). A percentagem de aborto espontâneo nas mulheres não tratadas é maior do que nas mulheres com um bom controlo metabólico (Clarke JTR, 2003).

A concentração de fenilalanina no feto é 1,5 a 2 vezes a da mãe, devido ao gradiente positivo de fenilalanina desde a placenta até ao cérebro (Hendriksz CJ e Walter JH, 2004).

Para que as concentrações fetais sejam mantidas abaixo de 8,3mg/dl (500µmol/l), aconselha-se que as concentrações plasmáticas de fenilalanina materna se encontrem entre 1mg/dl (60µmol/l) e 4,2mg/dl (250µmol/l) (Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM), 2007). Contudo, um controlo metabólico entre 2 e 6 mg/dl parece ser satisfatório para garantir uma boa evolução fetal (Matalon KM, 2001). Baixas concentrações de fenilalanina também podem ser danosas, limitando a síntese proteica no cérebro fetal (Walter JH *et al.*, 2006).

6.2. Tratamento da síndrome da fenilcetonúria materna

A dieta com restrição de fenilalanina, juntamente com os produtos alimentares e suplementos necessários, nomeadamente de tirosina e de ácidos gordos essenciais, são nutricionalmente adequados para sustentar um desenvolvimento fetal normal (Magee AC *et al.*, 2002).

É recomendada a monitorização dos níveis plasmáticos de fenilalanina e tirosina, duas vezes por semana. As mulheres que aderem tardiamente à dieta ou que apresentam um coeficiente de inteligência baixo devem cumprir rigorosamente esta recomendação (Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM), 2007).

O início da dieta é recomendado que seja antes da concepção, ou até às 8 semanas de gestação (Koch R *et al.*, 2000 (a)), de modo a evitar os efeitos nocivos que os elevados níveis de fenilalanina têm no feto (Lee PJ *et al.*, 2003). Está demonstrado que, se o controlo metabólico não for alcançado até às 10-12 semanas de gravidez (Lee PJ *et al.*, 2004; Walter JH *et al.*, 2006), os efeitos da doença aumentam exponencialmente (Koch R *et al.*, 2003).

A redução dos níveis de fenilalanina materna, antes ou logo após a concepção, origina melhorias ao nível do crescimento cerebral e das disfunções neurológicas e psicométricas (Lee PJ *et al.*, 2003). A descendência nasce com mais peso, tem maior circunferência cerebral, menor incidência de doença cardíaca congénita, e com desenvolvimento e coeficiente de inteligência mais satisfatórios aos 4 e 8 anos de idade (Lee PJ *et al.*, 2004).

No caso de mulheres que não adoptam a dieta antes da gravidez, estudos demonstram que não é fácil iniciá-la mais tarde, numa altura de extrema ansiedade como são as primeiras semanas da gravidez, e o posterior controlo metabólico pode não ser o desejado durante o tempo restante de gestação (Lee PJ *et al.*, 2003; Koch R *et al.*, 2000 (a); Widaman KF e Azen C, 2003; Koch R *et al.*, 2003; Koch R, 2005; Walter JH *et al.*, 2006). De facto, é aconselhado o planeamento da gravidez, bem como o acompanhamento do cônjuge em todo o processo clínico e terapêutico da mulher fenilcetonúrica. Quando esta quer engravidar, é aconselhada a continuar com os métodos contraceptivos até que o nível de fenilalanina ideal seja alcançado e mantido por 4 semanas (Lee PJ *et al.*, 2003).

Quando este não é atingido nas primeiras semanas de gravidez, ou, quando a mulher fenilcetonúrica não cumpre, de todo, a dieta, é ponderada a hipótese de se provocar um aborto (Koch R *et al.*, 2000 (a)).

Alguns estudos indicam, no entanto, que nem sempre as mulheres que iniciam uma dieta antes da concepção têm mais sucesso do que aquelas que a iniciaram já enquanto grávidas, ou nem sequer a iniciaram (Waisbren SE e Azen C, 2003). Um estudo sugeriu que a relação entre a exposição pré-natal à fenilalanina e o desenvolvimento cognitivo da

descendência parece não ser linear, não havendo danos no desenvolvimento fetal até que a exposição alcance um nível crítico (Widaman KF e Azen C, 2003).

De facto, algumas crianças nascidas de gravidezes não tratadas desenvolveram-se normalmente, enquanto outras, cujas mães adoptaram a dieta pré-concepcionalmente manifestaram atraso mental (Waisbren SE e Azen C, 2003).

A análise destes casos especiais, revela conclusões interessantes relativamente a factores que protegem contra os efeitos teratogénicos da fenilalanina, bem como os efeitos prejudiciais de concentrações muito baixas deste aminoácido (Lee PJ *et al.*, 2004). Esta heterogeneidade pode ser atribuída a diferenças nos níveis de exposição à fenilalanina e ao momento em que essa exposição ocorreu. O impacto de um nível relativamente baixo de exposição durante um longo período de tempo pode não ser comparável ao impacto de elevados níveis durante um curto período de tempo (Waisbren SE e Azen C, 2003).

6.3. Factores condicionantes do sucesso terapêutico

O êxito da terapia da síndrome da fenilcetonúria materna depende, não só do risco biológico da elevada exposição à fenilalanina no útero (Waisbren SE e Azen C, 2003), mas também da altura de início do tratamento, da qualidade do controlo metabólico atingido e mantido durante a gravidez, do coeficiente de inteligência materno, da sua nutrição durante a gravidez, do seu genótipo para a fenilalanina hidroxilase, do apoio da família e amigos, do apoio da equipa clínica, do nível sócio-económico dos pais, da sua educação, e da sua confiança, quer a nível terapêutico, quer a nível de apoio emocional antes e durante a gravidez, quer no sistema de saúde ao qual pertence (Clarke JTR, 2003).

A severidade da mutação no gene da fenilalanina hidroxilase da mãe parece influenciar o desenvolvimento cognitivo fetal. Mães com mutações graves exibem níveis de fenilalanina mais elevados durante a gravidez (Widaman KF e Azen C, 2003) e, por conseguinte, tendem a ter menos sucesso no tratamento. Este facto inibe o início precoce do tratamento, o que, por sua vez, reduz a qualidade dos cuidados durante a gravidez (Clarke JTR, 2003).

A influência do coeficiente de inteligência materno no desenvolvimento fetal, também não pode ser ignorada (Güttler F *et al.*, 2003). Quando esse valor é baixo (inferior a 80), o controlo de fenilalanina durante a gravidez é desfavorável, e o desenvolvimento do feto é afectado negativamente (Koch R *et al.*, 2000 (a)). Obviamente que nestes casos, as mulheres necessitam de apoios extra, como a frequente monitorização bioquímica, consultas de nutrição, visitas ao domicílio, entre outros (Güttler F *et al.*, 2003).

6.4. Aporte nutricional materno

Durante a gravidez, o estado total de nutrição, especialmente as proteínas, vitaminas e energia, deve ser extremamente controlado (Waisbren SE e Azen C, 2003). Muitas vezes, o adequado aporte nutricional fica comprometido pela ocorrência de náuseas e vômitos, frequentes nas primeiras semanas de gestação (Koch R *et al.*, 2000 (a); Koch R *et al.*, 2003).

A etiologia da doença cardíaca relaciona-se com a deficiente ingestão de vitaminas e proteínas, especialmente de ácido fólico e vitamina B12, durante o primeiro trimestre de gravidez (Koch R *et al.*, 2000 (a)). As misturas de aminoácidos são a principal fonte de vitaminas e minerais para as fenilcetonúricas (Matalon KM, 2001).

Também o tamanho do feto está directamente ligado com o aporte energético, vitamínico e proteico proveniente da dieta, bem como, com o controlo dos níveis de fenilalanina plasmática materna e com o ganho de peso materno (Acosta PB *et al.*, 2001; Matalon KM, 2001).

6.5. A tetrahydrobiopterina na terapêutica da síndrome da fenilcetonúria materna

A futura utilização da tetrahydrobiopterina, isoladamente, ou combinada com a restrição da fenilalanina na alimentação das mulheres fenilcetonúricas, para o tratamento da fenilcetonúria materna, oferece esperanças para um bom desenvolvimento fetal, particularmente nos casos de fenilcetonúria moderada (Koch R, 2005).

Estudos sugerem que a combinação da dieta com a administração do cofactor pode aumentar a tolerância à fenilalanina e estabilizar os elevados picos de fenilalanina que ocorrem, por exemplo, durante infecções e estados catabólicos. Porém, são necessários estudos adicionais para a clara compreensão do papel da tetrahydrobiopterina no tratamento da síndrome da fenilcetonúria materna (Clarke JTR, 2003; Trefz FK e Blau N, 2003).

Em 1937, Jervis esteve, pela primeira vez, em contacto com a síndrome da fenilcetonúria materna, ao verificar que, mulheres fenilcetonúricas tinham tido filhos, alguns deles com fenilcetonúria. Uma vez que Jervis não conseguiu dar a real importância a esse facto, foi apenas em 1956 que se considerou a fenilcetonúria materna como sendo uma complicação da fenilcetonúria. De facto, neste erro inato do metabolismo dos aminoácidos, o fenótipo materno exerce influência no desenvolvimento fetal. Em 1980, foi, finalmente, reconhecida a síndrome da fenilcetonúria materna (Levy HL, 2003).

7. CONCLUSÃO

Mais de 70 anos passaram desde que Fölling descobriu a fenilcetonúria. A sua identificação como causa de atraso mental, o desenvolvimento de uma terapia efectiva e segura, e a introdução de programas de rastreio neonatal da fenilcetonúria, que possibilitam o diagnóstico precoce antes dos sintomas se instalarem, foram sem dúvida, grandes avanços para a área da saúde, nos últimos anos.

As variações genéticas humanas estão associadas com muitas doenças e deficiências, incluindo doenças crónicas com impacto na saúde pública.

Este trabalho permitiu-me perceber o grande componente multifactorial que caracteriza a fenilcetonúria, e compreender que as alterações genéticas interagem com factores ambientais e socioculturais, podendo alterar o risco de desenvolver determinada doença.

Os recentes desenvolvimentos e pesquisas na área da fenilcetonúria têm aumentado o conhecimento acerca das bases genéticas e moleculares da doença. A base deste trabalho monográfico, os artigos científicos, reflecte isso mesmo.

As novas estratégias terapêuticas para a fenilcetonúria apostam, sobretudo, na diversidade. Todas apresentam vantagens e desvantagens. É possível que nos próximos anos, os doentes fenilcetonúricos sejam tratados com a combinação de uma dieta menos restritiva e exigente, combinada com suplementos de aminoácidos isentos de fenilalanina com mais sabor, mais aminoácidos neutros e mais tetrahydrobiopterina. Além disso, alterar a terapia à medida que a idade avança é uma possibilidade atractiva.

Para concluir, o trabalho de pesquisa bibliográfica desenvolvido contribuiu para o melhor conhecimento dos aspectos mais relevantes relacionados com esta patologia. Com base nos artigos publicados, foi possível constatar que a área das doenças hereditárias de metabolismo, onde a fenilcetonúria se inclui, está em constante investigação e, também por isso, existem, ainda muitas questões por responder claramente.

8. BIBLIOGRAFIA

Acosta PB, Matalon K, Castiglioni L, et al. Intake of major nutrients by women in the Maternal Phenylketonuria (MPKU) Study and effects on plasma phenylalanine concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73: 792-796.

Agostoni C, Verduci E, Massetto N, et al. Long-term effects of long chain polyunsaturated fats in hyperphenylalaninemic children. *Arch Dis Child* 2003; 88: 582-583.

American Society of Gene Therapy. [Em linha]. Disponível em <http://www.asgt.org/>. [Consultado em 11/02/08].

Arnold GL, Vladutiu CJ, Orłowski CC, Blakely EM, DeLuca J. Prevalence of stimulant use for attentional dysfunction in children with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2004; 27: 137-43.

Blau, N. (2005). Tetrahydrobiopterin. [Em linha]. Disponível em http://www.bh4.org/biodefimages/Fig_bh4bio.gif. [Consultado em 03/03/2008].

Blau, N. (2005). Tetrahydrobiopterin. [Em linha]. Disponível em <http://www.bh4.org>. [Consultado em 23/01/2008].

Blau N, Scriver CR. New approaches to treat PKU: How far are we? *Molecular Genetics Metabolism* 2004; 81:1-2.

Bross R, Ball RO, Clarke JTR, Pencharz PB. Tyrosine requirements in children with classical PKU determined by indicator amino acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278 (2): 195-201.

Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of Phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 2000; 105: 89-103.

Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo M, Moller LB, Blau N. Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin responsive phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 81: 137-139.

Clarke JTR. The Maternal Phenylketonuria Project: A Summary of Progress and Challenges for the Future. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1584-1587.

Cornejo EV, Raimann BE. Diagnóstico, Clínica y Tratamiento de Fenylquetonuria (PKU). *Revista Chilena de Nutrición*. 2004; 31 (1): 25-30.

Desviat LR, Pérez B, Gámez A, et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *European Journal of Human Genetics* 1999; 7: 386-392.

Desviat LR, Pérez B, Lucca M, Cornejo V, Schmidt B, Ugarte M. Evidence in Latin América of recurrence of V388M, a phenylketonuria mutation with high in vitro residual activity. *Am J Hum Genet* 1995; 57 (2): 337-342.

Diwan, JJ. (1998). *Biochemistry of Metabolism*. [Em linha]. Disponível em <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/aacarbon.htm>. [Consultado em 05/02/2008].

Erlandsen H, Pey AL, Gámez A et al. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuric patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *PNAS* 2004; 101 (48): 16903-16908.

Guldberg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 71-79.

Güttler F, Azen C, Guldberg P, et al. Impact of the Phenylalanine Hydroxylase Gene on Maternal Phenylketonuria Outcome. *Pediatrics* 2003; 112 (6), 1530-1533.

Hendriksz CJ, Walter JH. Update on phenylketonuria. *Current Paediatrics* 2004; 14: 400-406.

Kanufre VC, Starling ALP, Leao E, et al. Breastfeeding in the treatment of children with PKU. *Jornal de Pediatria* 2007; 83 (5).

Koch R, Hanley W, Levy H, et al. Maternal Phenylketonuria: An International Study. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71: 233-239 (a).

Koch R, Hanley W, Levy H et al. The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1523-1529.

Koch R. Maternal phenylketonuria: the importance of early control during pregnancy. *Archives of Disease in Childhood* 2005; 90: 114-115.

Koch R, Moats R, Guttler F, Guldborg P, Nelson M. Blood-brain phenylalanine relationships in persons with phenylketonuria. *Pediatrics* 2000; 106 (5): 1093-1096 (b).

Kohli S, Saxena R, Thomas E, Rao P, Verma IC. Prenatal diagnoses of phenylketonuria. *Indian J Med Res* 2005; 122: 400-403.

Krause W, Halminski M, McDonald L, Dembure P, Saho R, Freides D, Elsas L. Biochemical and Neuropsychological Effects of Elevated Plasma Phenylalanine in Patients with Treated Phenylketonuria: a model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J Clin Invest* 1985; 75: 40-48.

Lee PJ, Lilburn M, Baudin J. Maternal Phenylketonuria: Experiences from the United Kingdom. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1553-1556.

Lee PJ, Ridout D, Walter JH, Cockburn F. Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97. *Archives of Disease in Childhood* 2004; 90: 143-146.

Levy HL. Historical Background for the Maternal PKU Syndrome. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1516-1518.

Levy HL. Invited Editorial: Molecular Genetics of Phenylketonuria and its Implications. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 667-670.

Levy HL. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. Commentary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 1811-1813.

Levy HL, Waisbren SE, Güttler F, et al. Pregnancy Experiences in the Woman With Mild Hyperphenylalaninemia. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1548-1552.

Magee AC, Ryan K, Moore A, Trimble ER. Follow up of fetal outcome in cases of maternal phenylketonuria in Northern Ireland. *Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition* 2002; 87: 141-143.

Matalon KM. Developments in Phenylketonuria. *Topics in Clinical Nutrition* 2001; 16(4): 41-50.

Matalon R, Surendran S, Matalon KM, et al. Future Role of Large Neutral Amino Acids in Transport of Phenylalanine Into the Brain. *Pediatrics* 2003; 112: 1570-1574.

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

Moats RA, Koch R, Moseley K, et al. Brain phenylalanine concentration in the management of adults with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 7-14.

Möller HE, Weglage J, Bick U, Wiedermann D, Feldmann R, Ullrich K. Brain Imaging and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients with Phenylketonuria. *Pediatrics* 2003; 112: 1580-1583.

Muntau AC, Rösohinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002; 347 (26): 2122-2132.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA et al. *Harper's Biochemistry*. 24th edition. United States of America: Pentrice-Hall International, Inc; 1996.

National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Phenylketonuria: Screening and Management. *Pediatrics* 2001; 108: 972-982.

National PKU News. [Em linha]. Disponível em <http://www.pkunews.org/research/guttler.htm>. [Consultado em 11/02/2008].

Peng SSF, Tseng WYI, Chien YH, Hwu WL, Liu HM. Diffusion Tensor Images in Children with Early-Treated, Chronic, Malignant Phenylketonuria: Correlation with Intelligent Assessment. *American Journal of Neuroradiology* 2004; 25: 1569-1574.

Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet* 1997; 60 (1): 95-102.

Pfaendner NH, Reuner G, Pietz J, et al. MR Imaging-Based Volumetry in Patients with Early-Treated Phenylketonuria. *American Journal of Neuroradiology* 2005; 26: 1681-1685.

Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase. [Em linha]. Disponível em <http://www.pahdb.mcgill.ca/>. [Consultado em 13/11/2007].

Philips MD, McGraw P, Lowe MJ, Mathews VP, Hainline BE. Diffusion-Weighted Imaging of White Matter Abnormalities in Patients with Phenylketonuria. *American Journal of Neuroradiology* 2001; 22: 1583-1586.

Pietz J, Kreis R, Rupp A, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 1999; 103: 1169-78.

Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Relatório de Actividades de 2006. Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães.

Restrepo S, Agüero H, Jayakar P, Luís AJ, Alfonso I. Clinical findings in untreated classic phenylketonuria. *International Pediatrics* 1999; 14 (4): 232-234.

Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Almeida IT, Lechner MC. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Gen* 1998; 35: 201-304.

Roselli MA, Lemes A, Reyno S, Vaglio A, Quadrelli R. Experiência metodológica en pesquisa neonatal de hiperfenilalaninemias. *Revista Médica del Uruguay* 2004; 20 (1): 72-78.

Rupp A, Kreis R, Zschocke J, et al. Variability of Blood-Brain Ratios of Phenylalanine in Typical Patients with Phenylketonuria. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001; 21: 276-284.

Santos LL, Magalhães MC, Januário JN, Aguiar MJB, Carvalho MRS. The time as come: a new scene for PKU treatment. *Online Journal Genetics and Molecular Research* 2006; 5(1): 33-44. Disponível em: www.funpecrp.com.br.

Scriver CR. The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Human Mutation* 2007; 28 (9): 831-845.

Smith CB, Kang J. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 (20): 11014-11019.

Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas (SPDM). Consenso para o tratamento nutricional de fenilcetonúria. *Acta Pediátrica Portuguesa* 2007; 38(1): 44-54.

Spronsen FJ, Rijn M, Bekhof J, Koch R, Smit PGA. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 153-157.

Trefz FK, Blau N. Potential Role of Tetrahydrobiopterin in the Treatment of Maternal Phenylketonuria. *Pediatrics* 2003; 112 (6); 1566-1569.

Tyfield LA, Osborn MJ, Holton JB. Molecular heterogeneity at the phenylalanine hydroxylase locus in the population of the south-west of England. *J Med Genet* 1991; 28 (4): 244-247.

Vallian S, Moeini H. A quantitative bacterial micro-assay for rapid detection of serum phenylalanine in dry blood-spots: Application in phenylketonuria screening. *J Appl Genet* 2006; 47 (1): 79-83.

Villares JMM, Leal LO. Recambio mineral óseo y densitometría ósea en pacientes sometidos a dieta de riesgo: hiperfenilalaninemia y galactosemia. *Anales de Pediatría* 2006; 64 (3): 284 – 284.

Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Almeida IT, Rivera I. Fenilcetonúria Revisitada. *Arquivos de Medicina* 2006; 20 (5-6): 161-172.

Waisbren SE, Azen C. Cognitive and behavioural development in maternal phenylketonuria offspring. *Pediatrics* 2003; 112: 1544-1547.

Walter JH, Lee PJ, Burgard P. Hyperphenylalaninaemia. In: Fernandes, Saudubray, van der Verghe, Walter. *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment*. Germany: Springer; 2006.pp. 222-232.

Widaman KF and Azen C. Relation of Prenatal Phenylalanine Exposure to Infant and Childhood Cognitive Outcomes: Results from the International Maternal PKU Collaborative Study. *Pediatrics* 2003; 112 (6): 1537-1543.

Young SN, Palmour RM. Research on genes: promises and limitations. Commentary. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 1999; 24 (4): 300-303.

Zaffanello M, Zamboni G, Maffeis C, Tatò L. Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false-positive and positive results at recall-testing. *Journal of Medical Screening* 2003; 10 (4): 181-183.

Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Human Mutation* 2003; 21: 345-56.

Zurflu MR, Zschocke J, Lindner M, et al. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Human Mutation* 2008; 29 (1): 167-175.

ANEXOS

ANEXO I

(Mutações da fenilalanina hidroxilase causadoras de fenilcetonúria)

ANEXO II

(Mutações da fenilalanina hidroxilase que respondem ao teste de sobrecarga com tetrahydrobiopterina)

