

Tetrahydrobiopterin responsiveness of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency

Responsividade à tetrahydrobiopterina em pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase

Luciana Giugliani¹, Angela Sitta², Carmen R. Vargas³,
Luiz C. Santana-da-Silva⁴, Tatiéle Nalin⁵, Maria Luiza Saraiva-Pereira⁶,
Roberto Giugliani⁷, Ida Vanessa D. Schwartz⁸

Resumo

Objetivo: Identificar indivíduos responsivos à tetrahydrobiopterina (BH₄) em uma amostra de pacientes brasileiros com hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina-hidroxilase (HPA-PAH).

Métodos: Estudo intervencional, amostragem por conveniência. Para serem incluídos no estudo, os pacientes deveriam: possuir diagnóstico bioquímico de HPA-PAH; ter idade ≥ 7 anos; estar em tratamento dietético; e apresentar níveis de fenilalanina (Phe) ≥ 6 mg/dL em todas as medidas realizadas no ano anterior à inclusão no estudo. Os níveis de Phe foram determinados por meio de espectrometria de massas *in tandem* no dia anterior (dia 1) e nos pontos de hora 0, 4 e 8 h (dia 2) e 24 h (dia 3) após ingestão de BH₄. Os critérios utilizados para definir responsividade ao BH₄ foram: critério 1-redução $\geq 30\%$ de Phe após 8 h da administração de BH₄; e critério 2-redução $\geq 30\%$ de Phe após 24 h da administração.

Resultados: Dezoito pacientes foram incluídos no estudo (mediana de idade = 14 anos, sexo masculino = 12). Cinco pacientes foram responsivos ao BH₄, sendo três (forma clássica: um; forma leve: dois) de acordo com ambos os critérios, e dois (forma clássica: um; forma não definida: um) de acordo com o critério 2. Os níveis de Phe plasmáticos do dia 1 não demonstraram variação nos pontos de hora ($p = 0,523$). Entretanto, quando comparamos os níveis de Phe nos pontos de hora dos dias 1 e 2, encontramos uma variação significativa ($p = 0,006$). A análise da associação genótipo-fenótipo confirmou o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄.

Conclusão: Os nossos achados estão de acordo com a literatura e indicam que um número relevante de pacientes brasileiros com HPA-PAH é responsivo à BH₄.

J Pediatr (Rio J). 2011;87(3):245-251: Fenilcetonúrias, fenilalanina hidroxilase, biopterina.

Abstract

Objective: To identify patients responsive to tetrahydrobiopterin (BH₄) in a sample of Brazilians with hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency (HPA-PAH).

Methods: Interventional study, convenience sampling. The inclusion criteria were: diagnosis of HPA-PAH; age ≥ 7 years; phenylalanine-restricted diet and phenylalanine (Phe) levels ≥ 6 mg/dL in all blood tests 1 year before inclusion. Blood samples were obtained the day before (day 1) and at 0, 4, 8 (day 2) and 24 h (day 3) after BH₄ intake. Phe levels were measured using tandem mass spectrometry. The criteria used to define responsiveness to BH₄ were: criterion 1- Phe reduction $\geq 30\%$ 8 h after BH₄ administration; criterion 2 - Phe reduction $\geq 30\%$ 24 h after BH₄ administration.

Results: Eighteen patients were enrolled (median age, 14 years; 12 boys). Five patients were responsive to BH₄, 3 according to both criteria (one classical PKU, two mild PKU); and two according to criterion 2 (one classical PKU; one indefinite PKU type). There were no differences between Phe serum levels on day 1 and at the other time points ($p = 0.523$). However, Phe levels on days 1 and 2 were significantly different ($p = 0.006$). The analysis of the phenotype-genotype association confirmed its multifactorial character.

Conclusion: A relevant number of Brazilian patients with HPA-PAH are responsive to BH₄, in agreement with other studies in the literature.

J Pediatr (Rio J). 2011;87(3):245-251: Phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase, biopterin.

1. Mestre, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.
2. Mestre, Ciências Biológicas (Bioquímica). UFRGS, Porto Alegre, RS.
3. Doutora, Ciências Biológicas (Bioquímica). Professora adjunta III, UFRGS, Porto Alegre, RS.
4. Doutor, Ciências Biológicas (Bioquímica). UFRGS, Porto Alegre, RS. Professor, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA.
5. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS.
6. Doutora, Genética Molecular, University of London (UL), Londres, Reino Unido. Professora associada, Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS.
7. Doutor, Genética. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. Professor titular, Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS.
8. Doutora, Ciências: Genética. Professora adjunta, Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, RS.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Apoio financeiro: FIPE, CNPq e CAPES.

Como citar este artigo: Giugliani L, Sitta A, Vargas CR, Santana-da-Silva LC, Nalin T, Saraiva-Pereira ML, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(3):245-251.

Artigo submetido em 25.10.10, aceito em 16.02.11.

doi:10.2223/JPED.2090

Introdução

A hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH), comumente chamada de fenilcetonúria (PKU), é um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes e o primeiro a ser tratado por dietoterapia¹. O tratamento clássico para essa doença baseia-se em uma dieta com baixo teor de fenilalanina (Phe). A restrição dietética de Phe protege o sistema nervoso central dos efeitos tóxicos da doença, prevenindo as manifestações clínicas associadas. Contudo, a dietoterapia é complexa e de longa duração. A baixa adesão ao tratamento é um problema enfrentado principalmente no atendimento a adolescentes e adultos, uma vez que as opções dietéticas são muito restritas².

Desde a publicação de Kure et al.³, que relatou os primeiros pacientes com HPA-PAH, cujos níveis plasmáticos de Phe diminuíram com a utilização oral de tetrahydrobiopterina (BH₄), vários outros estudos, usando protocolos diferentes e doses variadas de BH₄, demonstraram que pacientes com HPA-PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração oral de BH₄⁴⁻⁷. A partir desses estudos, ficou evidente que a maioria dos indivíduos responsivos ao BH₄ pertence ao grupo com "Fenilcetonúria leve" (PKU leve) e que cerca de 20 a 50% dos pacientes com HPA-PAH alcançam redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe associada ao uso de BH₄⁸. Os dados disponíveis sugerem que a presença ou ausência de responsividade ao BH₄ é multifatorial, sendo o genótipo um dos seus fatores determinantes⁹⁻¹¹.

Nesse contexto, este trabalho propõe um estudo inédito no Brasil, com o objetivo de identificar indivíduos responsivos à administração de BH₄ por via oral.

Metodologia

Esse é um estudo intervencional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A participação da indústria farmacêutica limitou-se à doação da BH₄ (*sapropterina dihidrocloride*, Kuvan[®]) necessária para a realização do estudo. Foram avaliados pacientes com HPA-PAH atendidos no Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA). Todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram incluídos no estudo pacientes com idade ≥ 7 anos e que possuíam níveis séricos de Phe ≥ 6 mg/dL nos 12 meses de vida anteriores à data de inclusão no estudo. Os critérios de exclusão foram: gestação; doença hepática sintomática; uso de levodopa; e seguimento ambulatorial irregular.

O tipo de HPA-PAH foi classificado de acordo com o nível de Phe plasmática ao diagnóstico (sem tratamento), critério adotado pelo ATDM-SGM/HCPA¹²: PKU clássica (Phe > 20 mg/dL); PKU leve (Phe entre 6 e 20 mg/dL); e HPA não PKU (Phe entre 2 e 6 mg/dL). Aqueles pacientes com dados ausentes e/ou duvidosos foram considerados "PKU indefinido"¹².

Teste de sobrecarga com BH₄

Os pacientes foram instruídos a permanecer dois dias no SGM/HCPA, recebendo dieta habitual, para a realização

das avaliações. No primeiro dia (dia pré-BH₄ ou dia 1), os pacientes foram submetidos a coletas de sangue às 8/12/16 h ou 9/13/17 h (ponto 0/ ponto 1/ ponto 2, respectivamente), para avaliar a variação dos níveis de Phe. No segundo dia (dia 2), foi aplicado um protocolo modificado do teste de sobrecarga com BH₄¹³, com administração oral de uma única dose de 20 mg/kg de BH₄ em todos os pacientes.

As coletas de sangue no dia 2 foram realizadas nos pontos de hora 0, 4 e 8 h (ponto 0 ou basal, ponto 1 e ponto 2, respectivamente), após a ingestão do medicamento. A coleta de sangue no dia 3 foi realizada 24 h após a ingestão do medicamento (ponto 3). Os níveis de Phe no sangue foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS) no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata, sendo a média entre as duas dosagens considerada como resultado final.

Os pacientes foram instruídos a permanecer em jejum por aproximadamente uma hora antes de todas as coletas de sangue. Caso algum dos pacientes não apresentasse níveis de Phe ≥ 6 mg/dL no ponto 0 do dia 2 (dia da sobrecarga com BH₄), o mesmo seria instruído a repetir esse protocolo em momento posterior, e o teste inicial não era considerado.

Responsividade ao BH₄

Foram utilizados dois critérios de responsividade ao BH₄, uma vez que não existe consenso sobre o melhor critério a ser utilizado:

critério 1: redução $\geq 30\%$ de Phe após 8 h da administração do medicamento⁸;

critério 2: redução $\geq 30\%$ de Phe após 24 h da administração do medicamento¹³.

Consumo dietético de Phe

Todos os pacientes foram instruídos a continuar a mesma prescrição dietética de Phe em que estavam antes do início do estudo (ou seja, dieta usual restrita em Phe). O consumo de Phe ao longo do estudo foi verificado por meio de inquérito alimentar de 3 dias, que foi aplicado do dia anterior à vinda dos pacientes ao SGM/HCPA até o dia da sobrecarga com o BH₄ inclusive. O consumo de Phe foi obtido através do cálculo do inquérito alimentar de cada dia, utilizando-se o programa de apoio à nutrição DietWin Profissional[®] 2008 (DietWin, Porto Alegre, RS). A quantidade de Phe prescrita foi verificada no prontuário do paciente e registrada em formulário específico.

Genótipo

Os dados relativos ao genótipo dos pacientes foram obtidos por meio de revisão de prontuário.

Análise estatística

As informações foram digitadas em planilha eletrônica, utilizando-se o programa Microsoft[®] Excel. A análise estatística foi realizada através do Programa Statistical Package for Social Sciences, versão 14.0 (SPSS[®] Inc, Chicago, IL). A análise descritiva foi realizada com o fornecimento das fre-

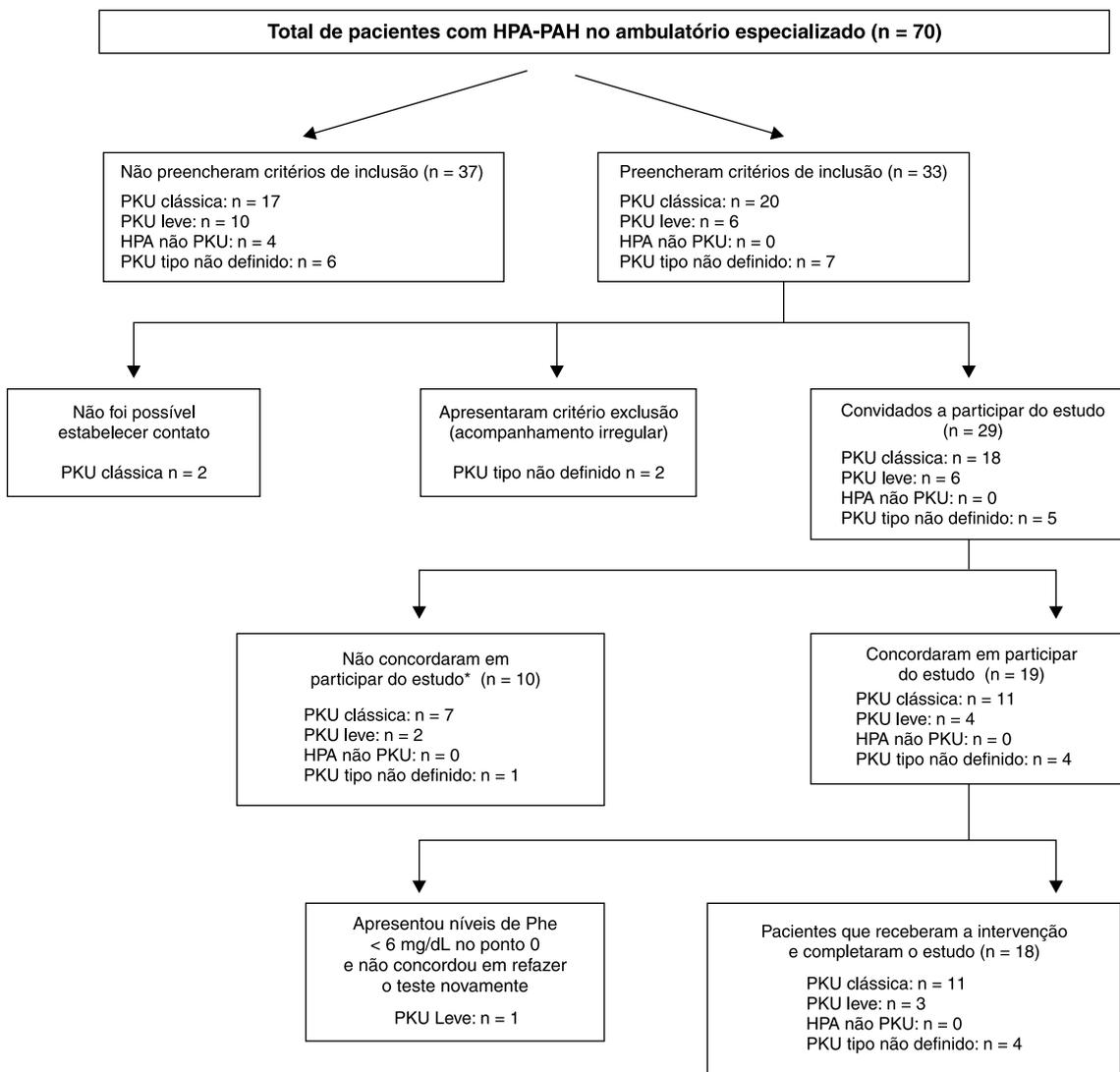
quências absolutas e relativas. As variáveis contínuas foram apresentadas como médias ± desvio padrão e mediana com intervalo interquartil. O teste ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para comparar os níveis de Phe ao longo do tempo, assim como para comparar o consumo de Phe ao longo dos três dias de inquérito alimentar. O teste *t* de Student para amostras pareadas foi utilizado para comparar os níveis de Phe pré e pós BH₄, em cada ponto de hora. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Dezoito pacientes, oriundos de 13 famílias não relacionadas, foram incluídos no estudo (Figura 1), sendo 12 (66,7%) do sexo masculino. A mediana (intervalo interquartil) de idade dos pacientes foi de 14 (11-21) anos. Consanguinidade parental não foi relatada.

Os valores de Phe plasmática e a porcentagem de redução nos pontos de hora após administração do BH₄ estão descritos na Tabela 1. Cinco pacientes foram considerados responsivos ao BH₄: três pacientes (forma clássica: um; forma leve: dois) de acordo com ambos os critérios e dois pacientes (forma clássica: um, forma não definida: um) de acordo com o critério 2. Considerando apenas o caso-índice de cada família (n = 13/18), quatro pacientes foram considerados responsivos: três pacientes (forma clássica: um; forma leve: dois) de acordo com ambos os critérios e um paciente (forma clássica: um) de acordo com o critério 2.

Em relação aos dados dietéticos, não houve diferença entre o consumo de Phe avaliado nos 3 dias do inquérito alimentar (p = 0,059). Os níveis plasmáticos de Phe do dia anterior ao do teste de sobrecarga com BH₄ não demonstraram variação nos pontos de hora de coleta (p = 0,523). Quando comparamos os níveis de Phe dos pontos de hora basais do



* Os pacientes e/ou seus responsáveis não concordaram em participar do estudo alegando principalmente não ter disponibilidade de tempo (ausência no trabalho/escola).

Figura 1 - Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo

Tabela 1 - Níveis de fenilalanina plasmática e porcentagem de redução após a administração oral de 20 mg/kg BH₄ em pacientes com HPA-PAH (n = 18)

Paciente*	Fenótipo	Genótipo		Níveis de Phe (mg/dL)				Alteração de Phe em comparação com ponto 0 (%)		
				Ponto 0	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
		Alelo 1	Alelo 2	(4 h)	(8 h)	(24 h)	(4 h)	(8 h)	(24 h)	
1	PKU ind	p.R158Q	p.R408W	10,5	9,4	9,3	7,9	-10,5	-11,4	-24,8
2	PKU cla	p.I65T	p.R408W	9,8	7,3	7	6,7	-25,5	-28,6	-31,6
3	PKU leve	p.L249F	p.V388M	6,5	4,9	5,8	5,7	-24,6	-10,8	-12,3
4	PKU cla	ND	ND	13,9	12,3	11,5	11,6	-11,5	-17,3	-16,5
6	PKU cla	p.V388M	IVS71 G>A	7,6	10,2	10	10,6	34,2	31,6	39,5
7	PKU leve	p.L348V	p.R408W	6,2	4,1	3,4	3,2	-33,9	-45,2	-48,4
8	PKU ind	p.L348V	p.R408W	6,5	4,8	5,6	7,4	-26,2	-13,8	13,7
10	PKU leve	ND	ND	8,7	5,3	5,3	3,6	-39,1	-39,1	-58,6
12	PKU cla	p.I65T	IVS2+5G>C	12,6	11,7	10,2	12	-7,1	-19,0	-4,8
13	PKU cla	ND	ND	8,7	7	7,9	7,1	-19,5	-9,2	-18,4
14	PKU cla	p.R261Q	IVS12+1G>A	6,7	6,4	6,4	5,4	-4,5	-4,5	-19,4
16	PKU cla	ND	ND	16	11,7	13,1	12,1	-26,9	-18,1	-24,4
17	PKU cla	p.R261Q	IVS12+1G>A	8,6	6,3	7,5	8,7	-26,7	-12,8	1,2
19	PKU ind	ND	ND	14,1	10,6	14,5	14,1	-24,8	2,8	-7,1
20	PKU ind	p.R158Q	p.R408W	13	9,6	11,1	8,6	-26,2	-14,6	-33,8
21	PKU cla	ND	ND	10	8	8,9	10,2	-20,0	-11,0	2,0
22	PKU cla	p.I65T	p.R261X	7,7	6,2	6,9	8,7	-19,5	-10,4	13,0
23	PKU cla	p.I65T	p.R176X	6,2	3,5	4,2	3,3	-43,5	-32,3	-46,8

BH₄ = tetrahydrobiopterina; cla = clássica; HPA-PAH = hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase; ind = indefinido; ND = não determinado; Phe = fenilalanina; PKU = fenilcetonúria.

* Pacientes irmãos: 1 e 20; 4, 16 e 21; 7 e 8; 14 e 17. Foram considerados responsivos os pacientes 7, 10 e 23 (critério 1) e pacientes 2, 7, 10, 20 e 23 (critério 2).

dia pré e pós BH₄ (9,44±3,12 mg/dL e 9,56±3,09 mg/dL, respectivamente), não encontramos diferença significativa (p = 0,795). Em relação ao ponto 1, as médias dos valores de Phe foram 8,88±2,77 mg/dL e 7,73±2,79 mg/dL nos dias pré e pós BH₄ respectivamente (p = 0,025). No ponto 2, a média dos valores de Phe foram 9,09±3,24 mg/dL e 8,07±2,84 mg/dL nos dias pré e pós BH₄, respectivamente (p = 0,006).

Em relação ao genótipo, os dois alelos mutantes do gene PAH eram conhecidos para 12 pacientes (Tabelas 1 e 2). A comparação dos resultados obtidos com aqueles descritos na literatura (Tabela 2) reforça o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄. Além disso, considerando as três duplas de irmãos (pacientes 1 e 20, pacientes 7 e 8 e pacientes 14 e 17) e o trio de irmãos (pacientes 4, 16 e 21) incluídos no estudo, somente uma das duplas (pacientes 14 e 17) e o trio de irmãos apresentaram concordância em relação à presença/ausência de responsividade.

Discussão

Esse estudo foi o primeiro trabalho realizado em indivíduos brasileiros com HPA-PAH, visando identificar pacientes

responsivos à administração de BH₄ por via oral. Os critérios de inclusão utilizados visaram selecionar os pacientes mais colaborativos (por isso, a adoção do ponto de corte 7 anos para idade) e menos aderentes ao tratamento (por isso, o ponto de corte 6 mg/dL para os níveis prévios de Phe). Portanto, a maioria dos pacientes selecionados pertencia ao grupo da PKU clássica. Além disso, sabe-se que em pacientes com níveis adequados de Phe (< 6 mg/dL) a pesquisa da responsividade ao BH₄ deve ser realizada mediante administração conjunta de BH₄ e de sobrecarga com Phe¹⁵, o que não era previsto pelo nosso protocolo.

Os níveis plasmáticos de Phe do dia anterior ao do teste de sobrecarga com BH₄ não demonstraram variação nos pontos de hora. Entretanto, quando comparamos os níveis de Phe nos pontos de hora do dia pré e pós BH₄, encontramos uma variação significativa entre eles, reforçando a hipótese de que a variação dos níveis de Phe pós-BH₄ seja um efeito do BH₄¹⁶. Os mecanismos moleculares responsáveis pela responsividade do BH₄ em pacientes HPA-PAH não estão claramente elucidados. Inúmeras hipóteses têm sido aventadas, tais como: a) efeito chaperona do BH₄; b) indução da expressão da PAH pelo BH₄; e c) estabilização do RNAm da PAH^{9,17}.

Tabela 2 - Responsividade ao BH₄: associação genótipo-fenótipo de uma amostra de pacientes brasileiros e comparação com dados da literatura (n = 12)

Pacientes*	Genótipo [†]		Fenótipo	Responsividade ao BH ₄ (presente estudo)*	Responsividade ao BH ₄ conforme genótipo na literatura ¹⁴ (número de pacientes descritos)
	Alelo 1	Alelo 2			
1	p.R158Q	p.R408W	PKU ind	Não	Não (um paciente); Sim (um paciente)
2	p.I65T	p.R408W	PKU cla	Sim	Sim (um paciente)
3	p.L249F	p.V388M	PKU leve	Não	ND
6	p.V388M	IVS71G>A	PKU cla	Não	ND
7	p.L348V	p.R408W	PKU leve	Sim	ND
8	p.L348V	p.R408W	PKU ind	Não	ND
12	p.I65T	IVS2+5G>C	PKU cla	Não	ND
14	p.R261Q	IVS12+1G>A	PKU cla	Não	ND
17	p.R261Q	IVS12+1G>A	PKU cla	Não	ND
20	p.R158Q	p.R408W	PKU ind	Sim	Não (um paciente); Sim (um paciente)
22	p.I65T	p. R261X	PKU cla	Não	Não (um paciente); Sim (um paciente)
23	p.I65T	p.R176X	PKU cla	Sim	ND

BH₄ = tetrahydrobiopterina; cla = clássica; ind = indefinido; ND = sem dados disponíveis; PKU = fenilcetonúria.

* Pacientes irmãos: 1 e 20; 7 e 8; 14 e 17.

† O paciente 10 possui seu genótipo desconhecido. Devido a isso, a presente tabela apresenta apenas quatro pacientes responsivos ao BH₄.

‡ Os pacientes apresentaram concordância em relação aos critérios de responsividade, ou seja, os pacientes responsivos apresentaram redução ≥ 30% dos níveis de Phe em 8 h e/ou 24 h após a administração de BH₄, e os não responsivos não apresentaram redução em ambos os pontos.

Embora o número de irmandades incluídas tenha sido pequeno (n = 4/18), os dados de genótipo e de variabilidade intrafamiliar estão de acordo com o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄. Esse achado reforça que, apesar da genotipagem ser útil na predição da responsividade ao BH₄, mais investigações são necessárias para que a mesma possa ser utilizada como teste definitivo para tanto⁸.

A taxa de responsividade ao BH₄ dos pacientes variou conforme o critério usado para definição de responsividade, sendo maior quando utilizado o critério 2 (redução ≥ 30% após 24 h da administração do medicamento). Quando comparamos os protocolos adaptados de 8 h com os de 24 h percebemos também que, quanto maior o tempo do teste, maior a possibilidade de detectar os "responsivos mais lentos"^{8,13}. Além disso, segundo a literatura, o ponto de corte a ser adotado para definição de responsividade ao BH₄ poderia variar conforme o fenótipo clínico do paciente, sendo menor para pacientes com PKU clássica (redução > 20% nos níveis de Phe) e maior para aqueles pacientes com PKU leve (redução ≥ 30% nos níveis de Phe)¹⁸. Se esse critério tivesse sido adotado neste estudo, a taxa de responsividade dos nossos pacientes PKU clássicos aumentaria de 2/18 (11,12%) para 5/18 indivíduos (27,78%).

Quando comparamos o tipo de PKU dos pacientes responsivos ao BH₄ com os dois critérios de responsividade utilizados, percebe-se que aqueles que possuíam PKU clássica aumentaram a porcentagem de responsividade ao longo do tempo (de um para dois pacientes, respectivamente). Entretanto, a taxa de responsividade ao BH₄ daqueles pacientes

que possuíam PKU leve permaneceu igual (2 pacientes em ambos os critérios).

Os nossos achados estão de acordo com a literatura. A redução significativa nos níveis de Phe em resposta à administração oral de BH₄ é normalmente observada em cerca de 50% em pacientes com PKU leve^{8,19}, e a redução dos níveis de Phe é maior em pacientes com fenótipos mais leves de PKU em comparação a pacientes com fenótipos mais graves, uma vez que a atividade residual da PAH é maior nas formas mais amenas da doença^{20,21}. Nossos resultados demonstraram que pacientes com PKU clássica também podem ser responsivos ao teste de BH₄. Como relatado na literatura, menos de 10% dos pacientes responsivos ao BH₄ pertence ao grupo de PKU clássica⁸. Isso se deve ao fato de que esses pacientes possuem atividade residual da PAH baixa ou até mesmo nula. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que os pacientes considerados não responsivos de acordo com o protocolo por nós utilizado ainda possam ser responsivos se testados por um período de tempo maior. Segundo estudos clínicos, verificou-se que protocolos de longa duração, como por exemplo, protocolos de 48 h, são essenciais para detectar responsivos mais lentos^{4,22,23}. Fiege & Blau¹⁸ observaram em seu estudo que um número elevado de pacientes com PKU clássica foram responsivos ao teste de sobrecarga com BH₄, particularmente quando o ponto de corte foi reduzido de 30 para 20% (6,8 para 26%).

Ainda não existe consenso em relação a um protocolo padrão-ouro para o diagnóstico da responsividade ao BH₄²⁴. Vários protocolos foram seguidos por diferentes estudos,

usando tanto a formulação não registrada do BH₄ (produzida pelo Laboratório Shirks, Suíça) quanto a nova formulação do BH₄ [(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina dihidroclorido, Sapropterin dihidroclorido; forma sintética do BH₄ utilizada no presente estudo]. Essa última foi aprovada pela FDA (para pacientes com idade igual ou superior a 4 anos) e EMEA (para pacientes com idade igual ou superior a 5 anos) para tratamento de HPA-PAH nos EUA e Europa, respectivamente^{17,25,26}. Esses estudos incluíram, também, a utilização de dieta normal ou dieta restrita em Phe, diferentes doses de BH₄ e diferentes pontos de hora para avaliar os níveis de Phe, por exemplo^{13,27}.

Resultados de diferentes estudos são difíceis de comparar, mas a redução de no mínimo 30% dos níveis de Phe é frequentemente considerada resposta clinicamente significativa ao tratamento. No entanto, é importante observar que esse limiar é arbitrário¹⁰. Para obter uma melhor compreensão sobre as práticas de diagnósticos e tratamento sobre HPA-PAH, um recente estudo foi realizado na Europa. Blau et al.²⁸ formularam um questionário constituído de 33 perguntas que foi enviado para 243 profissionais oriundos de 165 centros de PKU de 23 países da Europa. Cento e um questionários foram devolvidos de 93/165 centros de PKU (56%) de 19/23 países europeus (83%). Segundo dados do estudo, o teste de sobrecarga com BH₄ foi realizado como prática rotineira em 54% dos centros de PKU, dos quais 61% aplicaram o teste com uma dose única de BH₄ (20 mg/Kg). Quando questionados sobre como se define a responsividade ao BH₄, 34% responderam que a mesma define-se pela redução \geq 30% nos níveis de Phe após 24 h, seguidas de 17 e 12% na redução \geq 30% nos níveis de Phe após qualquer ponto de hora e 8 h após a ingestão do medicamento, respectivamente. Em relação à classificação do tipo de HPA-PAH, mais de 70% dos entrevistados classificaram PKU clássica como níveis de Phe $>$ 20 μ mol/L ao diagnóstico (sem tratamento). Entretanto, as definições para PKU leve e HPA não PKU variaram consideravelmente, não apenas entre países, mas também entre centros dentro de um mesmo país. Esses achados podem indicar a dificuldade em definir a gravidade da deficiência da PAH, demonstrando a necessidade de padronizar a classificação do tipo de HPA-PAH.

Acreditamos na necessidade de padronizar um teste único, simples e universal que facilite a identificação de responsivos ao BH₄. Esse teste deve ser prático em sua aplicação, definindo quantidade adequada a ser administrada de BH₄, consumo de Phe e pontos de hora padrões para dosagens de Phe, restringindo assim o número de mensurações dos níveis de Phe que precisam ser feitas e definindo um padrão-ouro para interpretação da responsividade ao medicamento.

Os potenciais benefícios do tratamento com BH₄ para pacientes PKU responsivos ao BH₄ incluem a redução dos níveis de Phe no sangue e restrições dietéticas menos rigorosas (como resultado do aumento da tolerância as proteínas naturais), que poderiam, conseqüentemente, levar a um aumento da adesão ao tratamento do paciente¹⁷. Entretanto, como esse medicamento é novo, atualmente não estão disponíveis evidências de melhor grau sobre a sua eficácia/efetividade a longo prazo para tratamento das PKU mais amenas (como

tratamento único) ou da PKU clássica (como tratamento auxiliar, associado à dieta com baixo teor de Phe).

Embora limitado pelo tamanho amostral, nossos dados sugerem que, em um futuro próximo, o tratamento com o BH₄ poderá beneficiar uma parte considerável de pacientes brasileiros com HPA-PAH que sofrem com as restrições dietéticas. Isso provavelmente significará uma melhora da qualidade de vida desses pacientes, assim como uma contribuição importante para a assistência dos mesmos, podendo gerar uma melhor adesão ao tratamento. Estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Merck Serono pela doação do medicamento Kuvan[®], utilizada no estudo. Também agradecem a Juarez Huve, Cristina Netto, Carolina Fischinger M. de Souza, Lilia Farret Refosco, à Casa de Apoio do HCPA e a toda equipe do Serviço de Genética Médica do HCPA pelo apoio e colaboração nesse estudo. Esse trabalho foi apoiado pelo FIPE/HCPA (projeto nº 07-553) e pelo Conselho Nacional de Pesquisa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. *Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism*. *Eur J Pediatr*. 1997;156:650-4.
2. Scriver C, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667-724.
3. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. *Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency*. *J Pediatr*. 1999;135:375-8.
4. Fiege B, Bonafe L, Ballhausen D, Baumgartner M, Thony B, Meili D, et al. *Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study*. *Mol Genet Metab*. 2005;86 Suppl 1:S91-5.
5. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, et al. *Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study*. *Lancet*. 2007;370:504-10.
6. Michals-Matalon K. *Sapropterin dihydrochloride, 6-R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria*. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17:245-51.
7. Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, et al. *Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study*. *J Pediatr*. 2009;154:700-7.
8. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. *Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria*. *Mol Genet Metab*. 2009;96:158-63.
9. Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Blau N, et al. *Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency*. *Hum Mutat*. 2008;29:167-75.

10. Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2004;82:101-11.
11. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, et al. 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;63:71-9.
12. Nalin T, Perry ID, Refosco LF, Netto CB, Souza CF, Schwartz IV, et al. Fenilcetonúria no sistema único de saúde: avaliação de adesão ao tratamento em um centro de atendimento do rio grande do sul. *Rev HCPA.* 2010;30:225-32.
13. Blau N. Defining tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsiveness in PKU. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:2-3.
14. BH₄ Databases [Internet]. BIOPKU : International Database of Patients and Mutations causing BH₄-responsive HPA/PKU; 2005. Disponível em: <http://www.bh4.org/BH4DatabasesBiopku.asp>. Acesso: 15/08/2008.
15. Ponzzone A, Porta F, Mussa A, Alluto A, Ferraris S, Spada M. Unresponsiveness to tetrahydrobiopterin of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Metabolism.* 2010;59:645-52.
16. Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:700-7.
17. Sanford M, Keating GM. Sapropterin: a review of its in the treatment of primary hyperphenylalaninaemia. *Drugs.* 2009;69:461-79.
18. Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH₄) responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr.* 2007;150:627-30.
19. Baldellou Vazquez A, Salazar Garcia-Blanco MI, Ruiz-Echarri Zalaya MP, Campos Calleja C, Ruiz Desviat L, Ugarte Perez M. Tetrahydrobiopterin therapy for hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency. When and how? *An Pediatr (Barc).* 2006;64:146-52.
20. Perez-Duenas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gomez L, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2004;37:1083-90.
21. Boveda MD, Couce ML, Castineiras DE, Cocho JA, Perez B, Ugarte M, et al. The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:812-5.
22. Belanger-Quintana A, Garcia MJ, Castro M, Desviat LR, Perez B, Mejia B, et al. Spanish BH₄-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S61-6.
23. Hennermann JB, Buhner C, Blau N, Vetter B, Monch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S86-90.
24. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002;347:2122-32.
25. Levy H, Burton B, Cederbaum S, Scriver C. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH₄) in phenylketonuria and its use in treatment. *Mol Genet Metab.* 2007;92:287-91.
26. Langenbeck U. Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:67-72.
27. Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemia: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab.* 2002;77:304-13.
28. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, Macdonald A, et al. Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab.* 2010;99:109-15.

Correspondência:
Roberto Giugliani
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP 90035-903 - Porto Alegre, RS
Tel.: (51) 3359.8011
Fax: (51) 3359.8010
E-mail: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br