

DETECÇÃO DE METEROZIGOTOS PARA FENILCETONÚRIA CLÁSSICA
E POR DEFICIÊNCIA DE SÍNTESE DE BH₂

JANICE CARNEIRO COELHO

Dissertação apresentada ao Curso
de Ciências Biológicas da Univer-
sidade Federal do Rio Grande do
Sul para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas -
ênfase em Genética.

Orientadora

Profa. Dra. Tania Weimer

Co-orientador

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Porto Alegre

1984

Dedicatória

Ao meu pai e minha mãe
 que fizeram tudo para
 que eu chegasse onde
 estou.

Agradecimentos

Ao meu marido, pela compreensão e auxílio na revisão dos originais.

Ao Alex, pelo apoio amigo e auxílio na parte estatística.

Aos pais dos pacientes fenilcetonúricos, sem os quais não seria possível a execução deste trabalho.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela cedência da zona de coleta onde foi possível obter as amostras, e principalmente às funcionárias Jussara e Glaci que não se cansaram em coletá-las.

Aos amigos da Unidade de Genética Médica que contribuíram para a realização deste estudo.

Ao CNPq pelo auxílio parcial número 40.2434/82.

À PROPESP / UFRGS.

Índice

	Pg
I. Introdução.....	1
I.1 - Fenilcetonúria.....	1
I.2 - Detecção de heterozigotos.....	8
I.3 - Objetivos.....	18
II. Material e Métodos.....	21
II.1 - Métodos Laboratoriais.....	21
II.1.1 - Coleta da amostra.....	21
II.1.2 - Dosagens.....	22
II.1.2.1 - Dosagem de fenilalanina (P) no soro.....	22
II.1.2.2 - Dosagem de tirosina (T) no soro.....	22
II.2 - Métodos estatísticos.....	23
II.3 - Caracterização da amostra.....	24
II.3.1 - Controles.....	24
II.3.2 - Heterozigotos.....	27
III. Resultados.....	36
III.1 - Amostra controle.....	36
III.2 - Heterozigotos para fenilcetonúria clássica.....	38
III.3 - Heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH ₂	39
III.4 - Comparação entre amostras.....	41
III.5 - Análise discriminante.....	47
IV. Discussão.....	52
V. Resumo e conclusões.....	58
VI. Referências bibliográficas.....	60
VII. Apêndice.....	67

VII.1 - Valores de P, T, P/T e P ² /T na amostra controle.....	67
VII.1.1 - Sexo feminino.....	67
VII.1.2 - Sexo masculino.....	68
VII.2 - Valores de P, T, P/T e P ² /T nos heterozigotos para fe- nilcetonúria clássica.....	69
VII.2.1 - Sexo feminino.....	69
VII.2.2 - Sexo masculino.....	69
VII.3 - Valores de P, T, P/T e P ² /T nos heterozigotos para fe- nilcetonúria por deficiência de síntese de BH2.....	70
VII.3.1 - Sexo feminino.....	70
VII.3.2 - Sexo masculino.....	70

I. Introdução

I.1. Fenilcetonúria

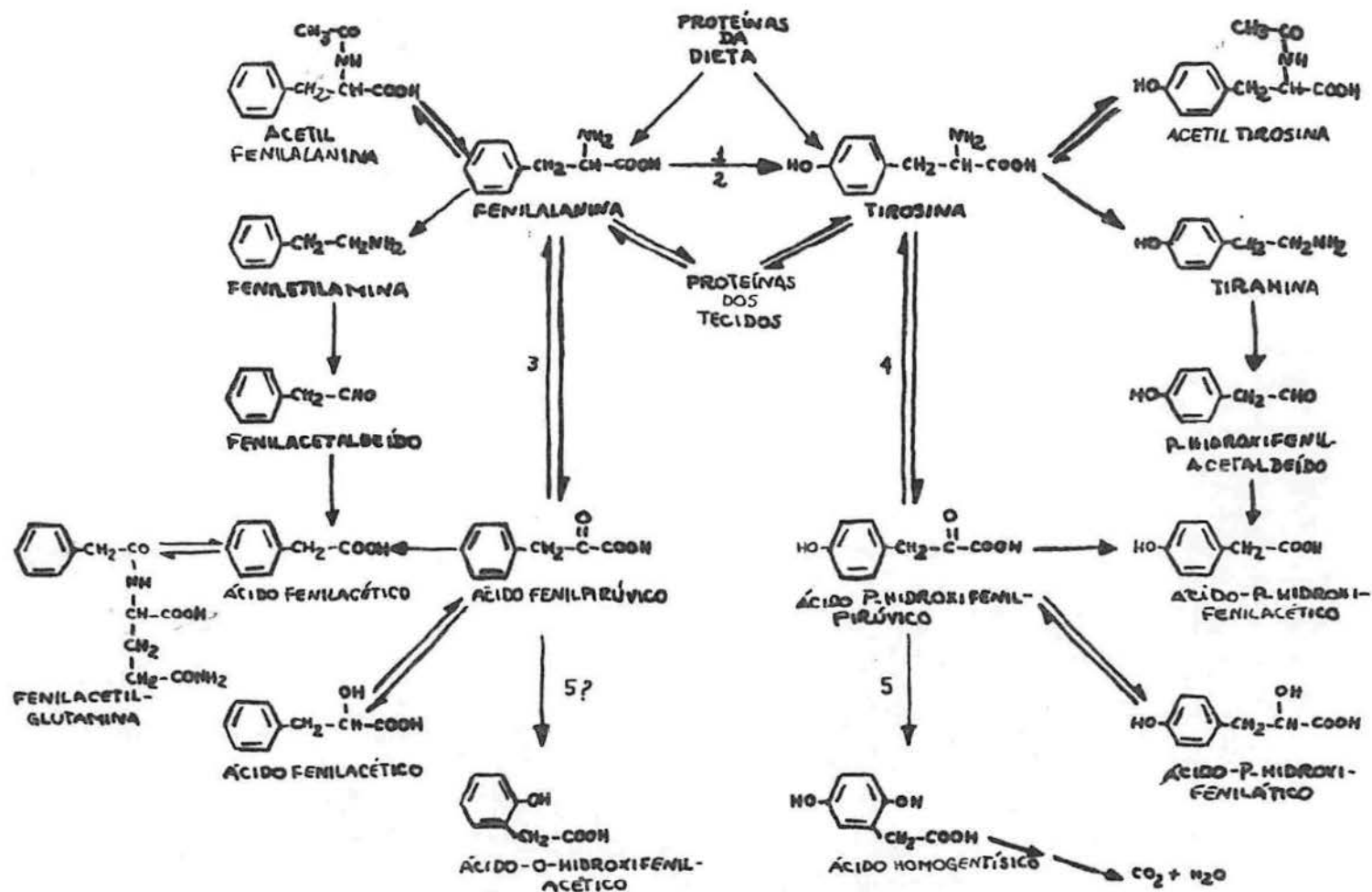
Fenilcetonúria (PKU) e as hiperfenilalaninemias (HFA) compreendem uma série de distúrbios metabólicos causados por um defeito genético no sistema enzimático que cataliza a conversão de fenilalanina à tirosina (figura I.1), causando níveis teciduais elevados de fenilalanina (Tourian e Sidbury, 1983).

Este erro metabólico foi primeiramente descrito em 1934 como oligofrenia fenilpirúvica (Følling, 1934), devido ao fato de ter sido encontrado um acúmulo de ácido fenilpirúvico na urina de certos pacientes com retardo mental.

Os pacientes com esta doença apresentam pele clara, eczema cutâneo, retardo neuro-motor, deficiência mental, convulsões e agressividade (Nyhan, 1979). O dano neurológico tem sido atribuído aos altos níveis de fenilalanina no sistema nervoso central, competindo com os demais aminoácidos pelo transporte para dentro dos neurônios, criando um desequilíbrio entre os aminoácidos intracelulares e interferindo na síntese protéica e na sinaptogênese (Tourian e Sidbury, 1983).

Atualmente conhecem-se várias formas de

Figura I.1: Algumas rotas do metabolismo da fenilalanina e tirosina



1= fenilalanina-4-hidroxilase; 2= di-hidrobiopterina redutase; 3= fenilalanina-alanina aminotransferase; 4= tirosina-glutamato aminotransferase; 5= p-hidroxifenilpirúvico oxidase.
 Fonte= Nyhan, 1979

hiperfenilalaninemias classificadas de acordo com o respectivo erro metabólico (tabela I.1).

O primeiro tipo, denominado fenilcetonúria clássica, compreende um defeito na enzima fenilalanina-4-hidroxilase, também chamada de fenilalanina-4-monooxigenase, E.C. 1.14.16.1, resultando no acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos, ácido fenilpirúvico, ácido fenilacético e ácido fenilático (figura I.1), na urina (Tourian e Sidbury, 1983).

Os tipos II e III parecem decorrer de pequenos defeitos na atividade da fenilalanina-4-hidroxilase, que não chegam a provocar grandes danos (Tourian e Sidbury, 1983).

A observação de alguns pacientes com hiperfenilalaninemia que continuaram a deteriorar neurologicamente apesar de adequadamente tratados levou a identificação de formas atípicas desse distúrbio decorrentes da deficiência do cofator tetra-hidrobiopterina (BH4), essencial a hidroxilação de fenilalanina, tirosina e triptofânio (figura I.2). O deficit deste cofator pode ser consequência ou da deficiência da enzima di-hidrobiopterina redutase, E.C.1.6.99.7, (HFA tipo IV, primeiramente descrita por Kaufman e cols., 1975 e por Rey e cols., 1977) ou da deficiência na biossíntese de BH2 (HFA tipo V, descrita por Bartholomé e cols., 1977; Kaufman e cols., 1978 e Niedermieser e cols., 1979).

Os tipos VI, VII e VIII de hiperfenilalaninemias compreendem defeitos primários no catabolismo da tirosina levando

Tabela I.1: Classificação das hiperfenilalaninemias

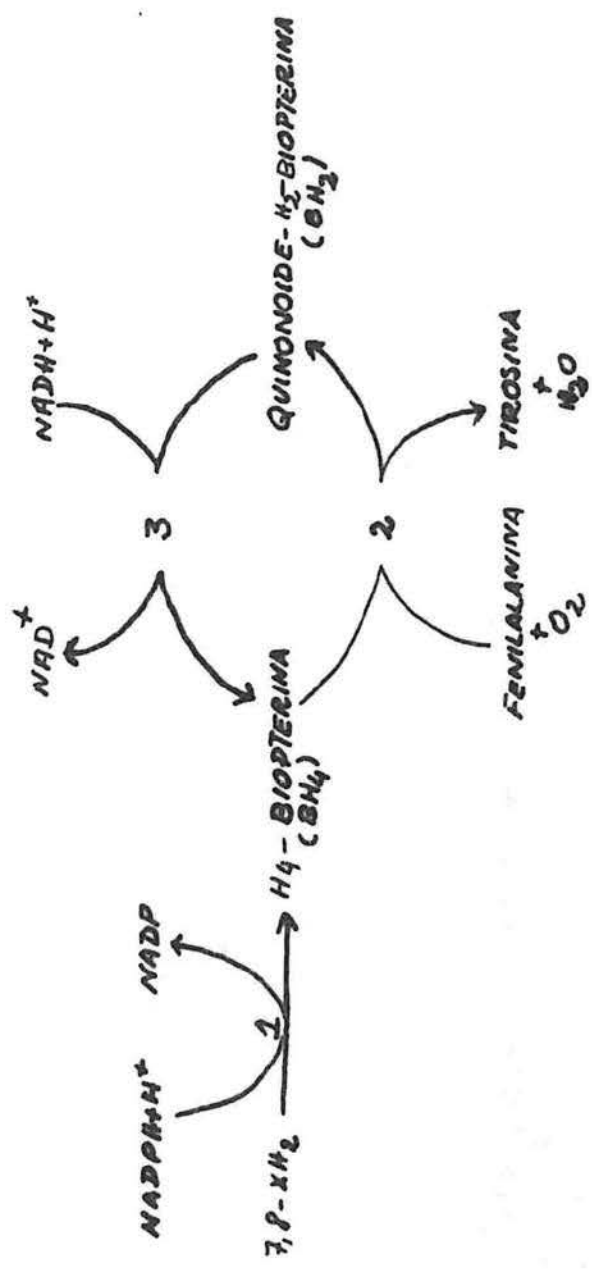
Tipo	Nome	Aspectos clínicos	Defeito	Fenilalanina	Tirosina
I	Fenilcetonúria Clássica	Retardo mental e sintomas associados, se não tratado.	Fenilalanina-4-hidroxilase ausente.	Maior que 20mg/100 mL com dieta normal.	Normal-baixa.
II	Hiperfenilalaninemia persistente	Normal; pode apresentar retardo, nos casos mais severos, se não há tratamento.	Decréscimo na atividade da fenilalanina-4-hidroxilase.	Precocemente é igual ao tipo I, depois os níveis se mantêm entre 4-20mg/100 mL.	Normal-baixa.
III	Hiperfenilalaninemia transitória	Normal.	Atraso na maturação da hidroxilase da fenilalanina.	Precocemente é igual ao tipo I, voltando a níveis normais progressivamente.	Normal-baixa.
IV	Deficiência na di-hidrobiopterina redutase	Inicialmente normal, convulsões, desenvolvimento anormal no primeiro ano de vida.	Deficiência ou ausência da di-hidrobiopterina redutase.	Variável, pode ser como no tipo I.	Normal.
V	Função anormal da di-hidrobiopterina	Mioclonia, movimentos incontrolados, tetraplegia, pele gordurosa, hipertermia recorrente.	Defeito na síntese da di-hidrobiopterina.	Pode ser maior que 20mg/100 mL.	Normal

Tabela I.1 (cont.): Classificação das hiperfenilalaninemias

Tipo	Nome	Aspectos clínicos	Defeito	Fenilalanina	Tirosina
VI	Hiperfenilalaninemia persistente e tirosinemia	Ataxia progressiva e convulsões aparecendo entre os 12 e 18 meses de idade.	Catabolismo da tirosina.	10mg/100 ml	Elevada
VII	Tirosinemia neonatal transitória	Associada com baixo peso ao nascer e alta ingestão de proteínas.	Inibição da oxidase do ácido p-hidroxifenilpirúvico.	Transitoriamente elevada, oscila de 4 a 20mg/100 ml.	Transitoriamente elevada; oscila de 5 a 50mg/100 ml.
VIII	Tirosinemia hereditária	Doença renal crônica.	Deficiência de: 1) desidrogenase do p-OH-fenilpiruvato; 2) tirosina aminotransferase citoplasmática e 3) fumarilacetato.	2 a 8mg/100 ml	4mg/100 ml

Fonte: Tourian e Sidbury, 1983

Figura I.2: Biossíntese de BH4



- 1= di-hidrofolato redutase;
- 2= fenilalanina-4-hidroxiase;
- 3= di-hidrobiopterina redutase

Fonte= Tourian e Sidbury, 1983

à hipertirosinemia e conseqüente hiperfenilalaninemia que pode ser transitória no tipo VII ou persistente nos tipos VI e VIII (Tourian e Sidbury, 1983).

Todas as hiperfenilalaninemias parecem ser autossômicas recessivas com exceção da HFA tipo VI, que foi observada apenas em homens, nas três famílias estudadas, parecendo possuir herança recessiva ligada ao X (Tourian e Sidbury, 1983).

A alta freqüência das hiperfenilalaninemias juntamente com seu fácil diagnóstico fazem com que essas doenças sejam os erros inatos do metabolismo mais conhecidos.

O diagnóstico diferencial entre a fenilcetonúria clássica (HFA tipo I) e a fenilcetonúria por deficiência de BH4 (HFA tipo IV e V) é feito através da administração oral ou intravenosa de BH4 (Danks e cols., 1978). Os pacientes que apresentam HFA tipo IV ou V após 4 horas de ingestão do cofator já estarão com os níveis sanguíneos de fenilalanina consideravelmente mais baixos (Giugliani e cols., 1984), enquanto os pacientes com fenilcetonúria clássica manterão o mesmo nível de fenilalanina no sangue.

Para a distinção entre os dois tipos de fenilcetonúria por deficiência de BH4 é feita a análise de metabólitos da biopterina na urina e no plasma (Scriver e Clow, 1980) e de biopterina e neopterina na urina (Niederwieser e cols., 1980).

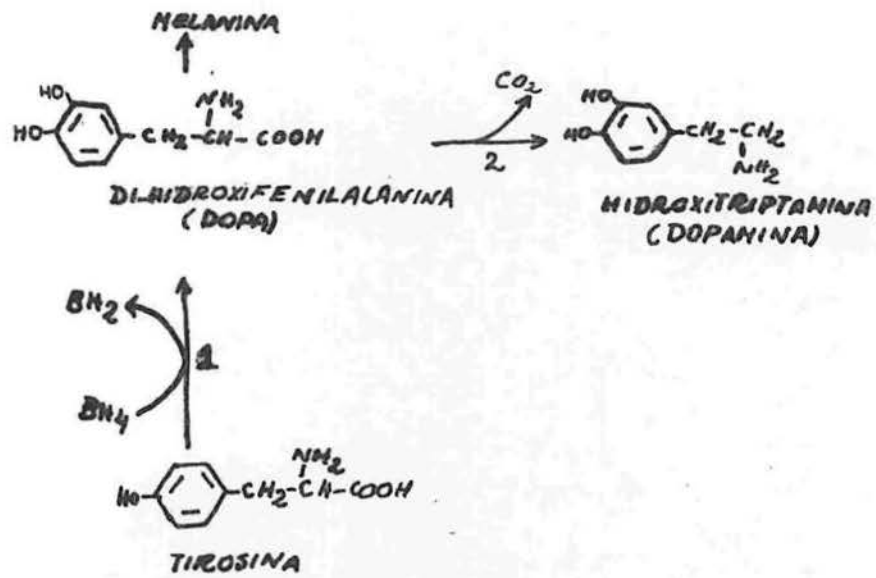
O tratamento empregado para estes três tipos de hiperfenilalaninemias também difere. Para a fenilcetonúria clássica o tratamento consiste basicamente numa dieta pobre em fenilalanina (Bickel, 1953), enquanto que para os outros tipos é mais complexo. Pacientes com fenilcetonúria por deficiência de BH4 possuem uma supressão na síntese dos neurotransmissores dopamina, serotonina e 5-hidroxitriptofânio, já que as rotas de formação destes neurotransmissores estarão prejudicadas devido à ausência de BH4, cofator essencial também à tirosina-3-monooxigenase (E.C.1.14.16.2) e triptofânio-5-monooxigenase (E.C.1.14.16.4); ver figuras I.3 e I.4 (Curtius e cols., 1979). Estes pacientes não respondem ao tratamento com dieta pobre em fenilalanina mas o fazem favoravelmente à administração oral de BH4, que deve ser associada ao uso de 5-hidroxitriptofânio, L-Dopa e um inibidor da dopa descarboxilase, carbidopa (Bartholomé e cols., 1975).

I.2. Detecção de heterozigotos

Para a detecção de heterozigotos para fenilcetonúria têm sido usados vários métodos.

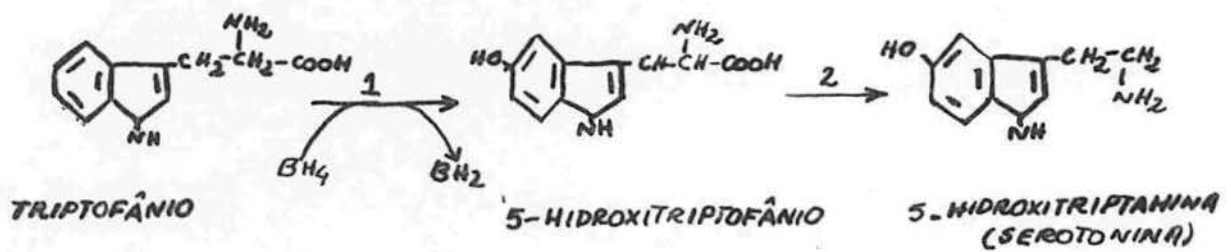
Como a enzima fenilalanina-4-hidroxilase está localizada principalmente no fígado, não sendo portanto acessível ao estudo, os métodos para a detecção de portadores são indiretos e feitos através da dosagem de fenilalanina e tirosina plasmáticas. Na tabela I.2 há uma compilação de alguns dos métodos utilizados.

Figura I.3: Síntese de DOPA e dopamina



1= tirosina-3-monooxigenase
2= DOPA descarboxilase

Figura I.4: Síntese de 5-hidroxitriptofânio e serotonina



1= triptofânio-5-monooxigenase
2= hidroxitriptofânio descarboxilase

Tabela I.2: Resumo de alguns métodos utilizados para detecção de heterozigotos para fenilcetonúria.

Autores	Material e Métodos	Tipo de discriminação
Hsia e cols., 1956	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue após sobrecarga oral de fenilalanina. .Determinação colorimétrica da fenilalanina pela fenilalanina descarboxilase de <u>Streptococcus faecalis</u>. 	<ul style="list-style-type: none"> .15% dos indivíduos testados estavam sobre a zona de sobreposição.
Knox e Messinger, 1958	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas. .Determinação colorimétrica da fenilalanina pela fenilalanina descarboxilase de <u>S. faecalis</u>. 	<ul style="list-style-type: none"> .20% dos indivíduos analisados estavam sobre a zona de sobreposição.
Jervis, 1960	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue e urina após sobrecarga oral de fenilalanina. .Determinação de ácido fenilpirúvico, ácido fenilacético e ácido indolacético na urina e de tirosina e fenilalanina no sangue. 	<ul style="list-style-type: none"> .Não há diferenças significativas entre controles e heterozigotos quanto aos metabólitos estudados. Há diferenças entre os dois grupos quanto aos níveis de fenilalanina, embora seja notada uma área de sobreposição entre eles. Não há sobreposição entre os 2 grupos quanto aos níveis de tirosina.
Rampini e cols., 1969	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue após sobrecarga oral de fenilalanina. .Dosagem de fenilalanina e tirosina por cromatografia de coluna. .Relação: P/T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Pela relação P/T obtiveram um erro de classificação de 18,9% que, com a função discriminante diminuiu para 5,5%.

Tabela I.2 (cont.): Resumo de alguns métodos utilizados para detecção de heterozigotos para fenilcetonúria.

Autores	Material e Métodos	Tipo de discriminação
Jackson e cols., 1971	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de pelo menos 3 horas. .Dosagem de fenilalanina e tirosina em analisador de aminoácidos. .Relação: P/T 	<ul style="list-style-type: none"> .A relação P/T possui alto grau de discriminação embora ainda haja sobreposição entre os dois grupos.
Blau e cols., 1973	<ul style="list-style-type: none"> .Urina colhida após sobrecarga oral de fenilalanina. .Determinação de ácidos aromáticos por cromatografia gasosa. 	<ul style="list-style-type: none"> .O melhor discriminante é o ácido o-hidroxifenilacético sendo notada uma excreção significativamente maior do mesmo no grupo de heterozigotos.
Dlek e cols., 1974	<ul style="list-style-type: none"> .Urina colhida após sobrecarga oral de fenilalanina. .Dosagem dos metabólitos da fenilalanina por cromatografia gasosa. 	<ul style="list-style-type: none"> .Discriminação completa pelo ácido mandélico e incompleta com 3 outros metabólitos analisados.
Griffin e Elsas, 1975	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas. .Dosagem de fenilalanina e tirosina em analisador de aminoácidos. .Relações: P/T e P^2/T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Discriminação quase completa com a relação P^2/T e completa com a função discriminante.
Westwood e Raine, 1975	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas e após sobrecarga oral de fenilalanina. .Dosagem de fenilalanina e tirosina em analisador de aminoácidos. .Relação: P/T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Sobreposição significativa entre os 2 grupos.

Tabela I.2 (cont.): Resumo de alguns métodos utilizados para detecção de heterozigotos para fenilcetonúria.

Autores	Material e Métodos	Tipo de discriminação
Güttler e Hansen, 1977	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas e após sobrecarga oral de fenilalanina. .Dosagens fluorimétricas de fenilalanina e tirosina. .Relação: P/T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Sobreposição entre controles e heterozigotos de 2,4%.
Jagenburger e Rödger, 1977	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum. .Taxa de eliminação de fenilalanina por constante de infusão intravenosa deste aminoácido. 	<ul style="list-style-type: none"> .Discriminação total.
Paul e cols, 1978	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas. .Dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio em analisador de aminoácidos. .Função discriminante por análise Linear multivariada. 	<ul style="list-style-type: none"> .Área de sobreposição de 3,75%.
Thalhamer e cols., 1979, 1980 e 1982	<ul style="list-style-type: none"> .Linfócitos. .Dosagem de vários aminoácidos por analisador de aminoácidos. .Relação: P/T. 	<ul style="list-style-type: none"> .A concentração intracelular de fenilalanina e tirosina dos heterozigotos foi mais alta que a dos controles. .Não há diferenças significativas entre os 2 grupos quanto à relação P/T.

Tabela I.2 (cont.): Resumo de alguns métodos utilizados para detecção de heterozigotos para fenilcetonúria.

Autores	Material e Métodos	Tipo de discriminação
Tenenholz e cols., 1983	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas. .Dosagens fluorimétricas de fenilalanina e tirosina. .Relações: P/T e P²/T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Discriminação completa com a função discriminante.
Lehmann e cols., 1984	<ul style="list-style-type: none"> .Sangue em jejum de 12 horas colhido após dose oral de L-[²H₅] fenilalanina. .Dosagem de fenilalanina e tirosina por cromatografia Líquida de alta pressão. .Relação: L-[²H₅]P/L-[²H₄]T e função discriminante. 	<ul style="list-style-type: none"> .Erro de classificação estatística abaixo de 2%.

Assim, por exemplo, Hsia e cols. (1956), tentaram a detecção de heterozigotos através de dosagens sucessivas de fenilalanina no soro, feitas após uma sobrecarga oral de fenilalanina (1, 2 e 4 horas após a ingestão). Eles concluíram que a capacidade de metabolizar fenilalanina era bem mais baixa nos heterozigotos que nos controles normais, mas a separação entre os dois grupos não foi satisfatória.

Knox e Messinger (1958) dosaram a fenilalanina sérica em indivíduos mantidos em jejum durante uma noite. Esta análise permitiu a distinção entre heterozigotos e controles normais, mas 20% dos indivíduos analisados encontraram-se sobre a zona de sobreposição entre os dois grupos.

Em 1960, Jervis dosou fenilalanina e tirosina no sangue de pessoas submetidas a uma sobrecarga oral de fenilalanina. As dosagens foram feitas a 0, 2, 4, 6 e 8 horas após a ingestão do aminoácido. Os resultados quanto a fenilalanina mostraram os mesmos níveis de sobreposição encontrados pelos pesquisadores anteriores, mas para a tirosina não houve sobreposição entre heterozigotos e controles. O autor sugeriu a determinação de tirosina como uma maneira de auxiliar na detecção de heterozigotos. Além destes dois aminoácidos foram dosados, na urina, os ácidos fenilpirúvico, hidroxifenilacético e indolacético, não sendo obtidas diferenças significativas quanto às suas concentrações entre os dois grupos.

A dosagem de metabólitos urinários da fenilalanina e tirosina por cromatografia gasosa após sobrecarga oral de

fenilalanina, também foi usada por vários autores. Blau e cols. (1973), dosando vários ácidos aromáticos na urina de heterozigotos para fenilcetonúria e de controles, colhida após uma sobrecarga oral de fenilalanina, observaram que o ácido o-hidroxifenilacético estava significativamente aumentado no primeiro grupo. Embora a excreção deste ácido possa discriminar os dois grupos, os autores afirmam que este método deve ser associado à dosagem de fenilalanina e tirosina séricas, após sobrecarga oral de fenilalanina. Em 1974, Olek e cols., conseguiram separar heterozigotos de controles normais quanto a excreção do ácido mandélico. Os demais metabólitos estudados por estes autores não diferiram significativamente entre os dois grupos.

Também foram feitas tentativas para distinguir portadores de controles normais através da estimativa da concentração intracelular de fenilalanina e tirosina em Linfócitos (Thalhammer e cols., 1979, 1980 e 1982) e pela taxa de eliminação da fenilalanina, avaliada através da constante de infusão intravenosa deste aminoácido (Jagenburg e Rödger, 1977). O primeiro método necessita de maiores aperfeiçoamentos, pois embora seja detectada uma concentração mais alta de fenilalanina e tirosina nos heterozigotos, não há diferença entre os dois grupos quanto a relação fenilalanina e tirosina (P/T). Já o segundo método permite a separação entre os dois grupos, mas requer um grande consumo de tempo e recursos.

As dosagens séricas de fenilalanina e tirosina

juntamente com outros aminoácidos analisadas por uma função discriminante e por relações como P/T e P^2/T , foram propostas por vários autores.

Em 1969, Rampini e cols., propuseram a distinção entre heterozigotos e controles normais pela relação P/T . O erro de classificação encontrado foi de 18,9%. Os indivíduos que permaneceram na zona de sobreposição entre os dois grupos foram então analisados por uma função discriminante tendo então o erro de classificação diminuído para 5,5%.

Jackson e cols. (1971), utilizaram a relação entre fenilalanina e tirosina dosadas em sangue em jejum de pelo menos 3 horas. Os autores afirmam ter esta relação, se determinada em conjunção com as concentrações de fenilalanina, alto grau de discriminação, embora tenha havido uma significativa sobreposição entre os dois grupos analisados.

Griffin e Elsas (1975), determinaram as concentrações de fenilalanina e tirosina após jejum de 12 horas e compararam estes níveis e as relações P/T e P^2/T , concluindo que a última relação permitiu a separação entre a maioria dos heterozigotos e controles estudados. Usando uma função discriminante por análise de regressão multilinear, conseguiram então a completa separação entre os dois grupos.

Westwood e Raine (1975), usando a relação P/T obtida em sangue em jejum e após sobrecarga oral de fenilalanina e uma função discriminante obtiveram uma sobreposição

significativa entre o grupo de heterozigotos e o controle analisados.

Güttler e Hansen (1977) propõem, para a separação entre heterozigotos e controles normais, a relação P/T obtida em sangue em jejum e após sobrecarga oral de fenilalanina, analisadas por uma função discriminante. A não completa separação entre os dois grupos é justificada pelos autores como sendo devida a fatores técnicos.

Em 1978, Paul e cols., propuseram dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio em jejum, por cromatografia de troca iônica. Os resultados foram analisados por uma função Linear multivariada e mostraram uma área de sobreposição de 3,75% entre os dois grupos.

Mais recentemente, Tenenholz e cols. (1983), desenvolveram um método de dosagens fluorimétricas de fenilalanina e tirosina em soro em jejum medindo as relações P/T e P^2/T juntamente com uma função discriminante que leva em conta o logarítmo das concentrações de fenilalanina e tirosina. Os autores concluem que as dosagens de fenilalanina e tirosina em jejum juntamente com a fórmula discriminante empregada, são as duas maneiras mais adequadas, até então, para a distinção entre portadores e não portadores; os autores não conseguiram, no entanto, classificar alguns indivíduos.

Lehmann e cols. (1984) dosaram fenilalanina e tirosina após uma sobrecarga oral de fenilalanina deuterizada

(L-[$^2\text{H}_5$]P). Os resultados analisados por uma função discriminante e pela relação $\text{L-}[^2\text{H}_5]\text{P}/\text{L-}[^2\text{H}_4]\text{T}$ mostraram um erro de classificação estatística inferior a 2%.

Como se pode ver, de todas as técnicas empregadas, com exceção da de Jagenburg e Rödger (1977) que tem as desvantagens já citadas anteriormente, as que melhor separam homozigotos normais de heterozigotos são as que utilizam as relações P/T e P^2/T associadas a uma análise por função discriminante, independentemente do método utilizado para dosagem de fenilalanina e tirosina.

Até o momento a maioria dos autores têm se preocupado principalmente com a detecção de heterozigotos para fenilcetonúria clássica. Poucos estudos se referem a portadores do gene para outras hiperfenilalaninemias (Koepp e Hoffmann, 1975; Güttler e Hansen, 1977) e desconhecemos relatos na literatura sobre a identificação de heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH₂ (HFA tipo U).

I.3 Objetivos

Segundo dados compilados por Thalhammer (1975), a frequência de PKU varia de cerca de 1:5000 na Irlanda à cerca de 1:70000 na Suécia. Estes valores incluem pacientes com fenilcetonúria clássica e com formas mais amenas de hiperfenilalaninemias (HFA tipos II e III).

Dhondt (1984) estima que 2% dos afetados por

hiperfenilalaninemias apresentam deficiência de BH4.

Na nossa região, não existem estudos populacionais para sabermos a frequência desses genes. Wannmacher (1973), no entanto, pesquisando 500 crianças com retardo mental encontrou 2 com fenilcetonúria clássica.

Atualmente, existem catalogados pela Unidade de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre mais 2 afetados pelo tipo clássico da doença e 4 com deficiência de síntese de BH2.

Em vista desses achados e da importância para o aconselhamento genético da identificação de portadores, decidimos fazer este trabalho, cujos objetivos são:

1 - Estudar, na população de Porto Alegre, indivíduos normais e heterozigotos comprovados para dois tipos de hiperfenilalaninemias (tipo I e V) quanto a cinco medidas: a) níveis séricos de fenilalanina dosada em sangue em jejum de 12 horas; b) níveis séricos de tirosina dosada em sangue em jejum de 12 horas; c) relação P/T; d) relação P^2/T e e) função discriminante por análise de regressão multilinear proposta por Griffin e Elsas (1975).

2 - Verificar se há diferença sexual em cada grupo quanto a esses valores.

3 - Selecionar entre os 5 índices estudados, o que melhor separa heterozigotos de indivíduos normais.

4 - Verificar a possibilidade de distinguir heterozigotos para fenilcetonúria clássica daqueles para deficiência de síntese de BH₂.

II. Material e Métodos

II.1 Métodos Laboratoriais

II.1.1 Coleta da amostra

A amostra consta de 2 grupos de heterozigotos (para PKU clássica e para PKU por deficiência de síntese de BH₂) e um grupo controle.

Os heterozigotos foram contatados previamente e compareceram ao serviço de coleta de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de onde foi obtida a amostra controle.

Todos os indivíduos estudados estavam em jejum de pelo menos 12 horas.

Foram obtidos 3 mL de sangue sem anticoagulante e separado o soro por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O soro foi congelado a -20° C e assim mantido até o momento das dosagens.

O tempo entre a coleta e os testes foi em média de uma semana não havendo efeito de estocagem, nessas condições, nas concentrações de fenilalanina e/ou tirosina.

II.1.2 Dosagens

II.1.2.1 Dosagem de fenilalanina (P) no soro:

Foi feita de acordo com o método fluorimétrico de McCaman e Robins (1962) com algumas modificações:

O soro foi desproteínizado com TCA 0,6 N. A cada 25 μ l de soro desproteínizado foi adicionado 400 μ l de uma mistura reagente composta de tampão succinato 0,3 M, pH 5,8; ninhidrina 30 mM e L-Leucil-L-alanina 5 mM.

Após, os tubos foram incubados em banho a 60°C por 2 horas e quando retirados foram passados para um banho de água a 20°C para que esfriassem. A todos os tubos foi adicionado 2,5 ml de reagente cúprico (carbonato de sódio anidro 1,6 g, tartarato de sódio e potássio 0,1 g, sulfato de cobre 0,6 g e água até 1 litro) e deixados em repouso por 10 a 15 minutos. A seguir foi feita a leitura das fluorescências em fluorímetro Turner modelo 111 usando como filtro primário 365 nm e secundários 415 nm e 535 nm. Para o cálculo da concentração foi usado como referência um padrão contendo 2 mg de fenilalanina (Sigma).

II.1.2.2 Dosagem de tirosina (T) no soro:

Foi realizada de acordo com o método fluorimétrico de Philips (1967) com algumas modificações:

O soro foi desproteínizado com TCA 0,6 N. A cada 20 μ l de soro desproteínizado foi adicionado 500 μ l de uma mistura

reagente contendo ácido nítrico 0,3 N, nitrito de sódio 1% e 1-nitroso-2-naftol em etanol 0,3 g%.

Os tubos contendo amostra e mistura reagente foram colocados em um banho fervente por 10 minutos e após foi-lhes adicionado 3 ml de água destilada. A seguir foi lida a fluorescência em fluorímetro Turner modelo 111 com filtro primário 435 nm e secundário 535 nm. As concentrações foram calculadas frente a uma curva padrão de tirosina.

II.2 Métodos estatísticos

Para caracterizar a amostra, as comparações foram feitas usando a variante do χ^2 , sugerida por Shields e Heeler (1979) para amostras de tamanho pequeno, dada pela fórmula:

$$\lambda_s = 2 [\sum \ln (n!) - \sum \ln (m!)]$$

em que n são os valores observados e m, os esperados.

De posse das concentrações de fenilalanina (P) e tirosina (T) foram calculadas duas relações P/T e P²/T, para cada controle e heterozigoto (Griffin e Elsas, 1975).

Com os dados obtidos para o grupo controle foram calculados os limites da normalidade (média \pm dois desvios padrões).

Para as comparações entre as médias de P, T, P/T e P²/T foi usado teste "t" de Student ou sua variável t' quando as

variâncias diferiram significativamente (Snedecor e Cochran, 1973).

Para obter uma melhor discriminação entre os heterozigotos para os dois tipos de hiperfenilalaninemia e entre estes e os controles, foi desenvolvida a função discriminante:

$$\Sigma = a_1 (P) + a_2 (T)$$

sugerida por Griffin e Elsas (1975) em que a_1 e a_2 foram derivados de uma função discriminante Linear obtida a partir de uma análise multivariada (Snedecor e Cochran, 1973). Para desenvolvê-la utilizou-se o programa de análise de regressão múltipla descrito por Boratto (1984).

II.3 Caracterização da amostra

A amostra foi dividida em dois grupos, um controle e um de heterozigotos comprovados para fenilcetonúria.

II.3.1 Controles

Fizeram parte deste grupo, 41 pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que foram submetidos à coleta de sangue para exames complementares diversos, no período de 19 de março de 1984 a 7 de maio do mesmo ano. Os motivos pelos quais o grupo controle foi submetido a coleta de sangue, estão apresentados na tabela II.1. A análise da mesma permite observar que nenhum dos indivíduos testados apresentou fenilcetonúria ou deficiência mental de outra etiologia. Não temos, no entanto,

informações quanto a existência ou não dessas anomalias nos seus familiares.

Tabela II.1: Motivo do encaminhamento dos indivíduos do grupo controle à coleta de sangue.

Motivo do encaminhamento	Número de indivíduos			
	M	F	T	%
Obesidade	0	2	2	5,0
Dosagens hormonais	3	2	5	12,0
Controle da glicose sangüínea	1	2	3	7,0
Exames pré-operatórios	1	1	2	5,0
Problemas urológicos	1	3	4	10,0
Problemas ginecológicos	0	3	3	7,0
Problemas pulmonares	2	2	4	10,0
Problemas reumáticos e musculares	2	5	7	17,0
Problemas cardíacos	1	0	1	2,5
Problemas gastrointestinais	3	0	3	7,0
Sem informação	3	3	6	15,0
Voluntários	1	0	1	2,5
Total	18	23	41	100,0

M = sexo masculino;

F = sexo feminino;

T = total.

Deste grupo, 44% pertence ao sexo masculino.

Na ocasião da coleta foi obtida informação quanto a

ocorrência ou não de gravidez nos controles femininos e as sabidamente grávidas foram excluídas da amostra, já que segundo Cabalska e cols. (1982), há alterações no metabolismo da tirosina e da fenilalanina durante a gravidez, tanto em heterozigotos para fenilcetonúria como em indivíduos genotipicamente normais.

Deste grupo controle foi registrada a idade (tabela II.2) que variou de 20 a 39 anos, para o sexo feminino (média de 28 anos) e de 16 a 39 anos, sendo a média de 31 anos, para o sexo masculino. O nível sócio-econômico também foi registrado (tabela II.3) tomando por base as categorias sócio-econômicas utilizadas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Não há diferenças nos níveis sócio-econômicos entre homens e mulheres ($\lambda_s = 0,81$; gl = 1; $p > 0,30$). A maioria dos indivíduos (60%) é de nível sócio-econômico baixo (renda mensal até 3 salários mínimos, classes C e D) sendo que os demais distribuem-se igualmente nas classes A ou B.

Tabela II.2: Idade (anos) da amostra controle

Sexo	Número estudado	Intervalo	\bar{x}	s
F	23	20 - 39	28,4	5,9
M	18	16 - 39	31,3	5,2
Total	41	16 - 39	29,7	5,7

\bar{x} = média;

s = desvio padrão.

Tabela II.3: Níveis sócio-econômicos da amostra controle

Sexo	Níveis					Total
	A	B	C	D	S.I	
M	N	4	3	7	1	
	%	26,7	20,0	46,7	6,6	3
F	N	3	4	12	1	
	%	15,0	20,0	60,0	5,0	3

A = renda mensal acima de Cr\$ 342.000,00 (acima de 6 salários mínimos);

B = renda mensal entre Cr\$ 342.000,00 e Cr\$ 172.000,00 (de 3 a 6 salários mínimos);

C = renda mensal entre Cr\$ 171.000,00 e Cr\$ 57.000,00 (de 1 a 3 salários mínimos);

D = renda mensal abaixo de Cr\$ 57.000,00.

S.I = sem informação.

M = sexo masculino.

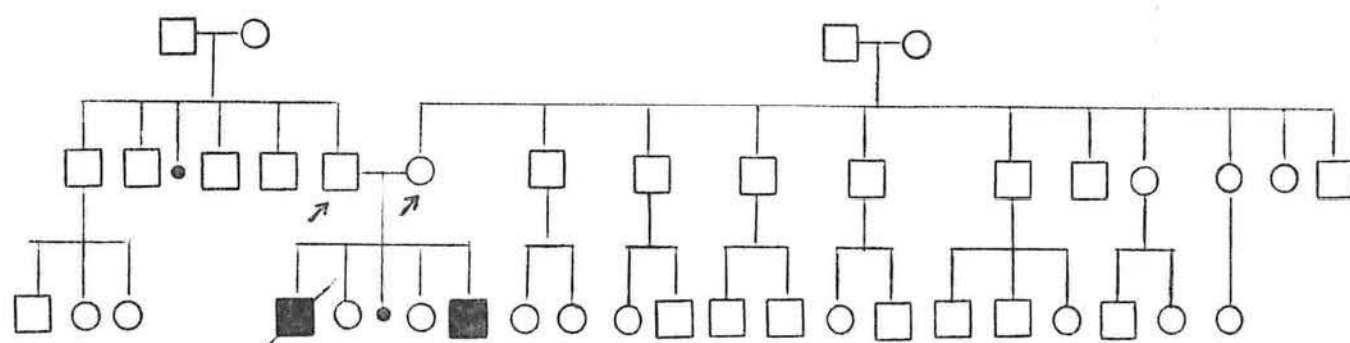
F = sexo feminino.

II .3.2 Heterozigotos

Fizeram parte deste grupo, 14 heterozigotos comprovados para fenilcetonúria, pais de pacientes com o tipo clássico (HFA tipo I) cujos heredogramas estão apresentados nas figuras II.1 a II.4, e de afetados por deficiência de síntese de

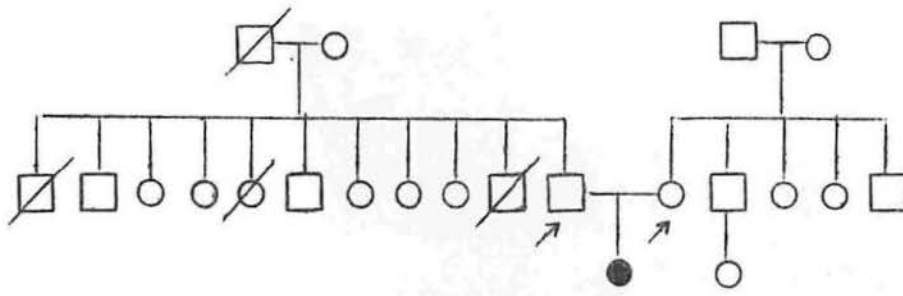
BH2 (HFA tipo U), estando seus heredogramas apresentados nas figuras II.5 a II.7. Duas das famílias com PKU clássica foram identificadas por Wannmacher (1973). As demais foram localizadas na Unidade de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os diagnósticos das deficiências de BH2 foram feitos clinicamente pelo Dr. R. Giugliani e confirmados laboratorialmente, na Suíça, pelo Dr. A. Niederwieser (Giugliani e cols., 1983).

Figura II.1: Heredograma da família I.



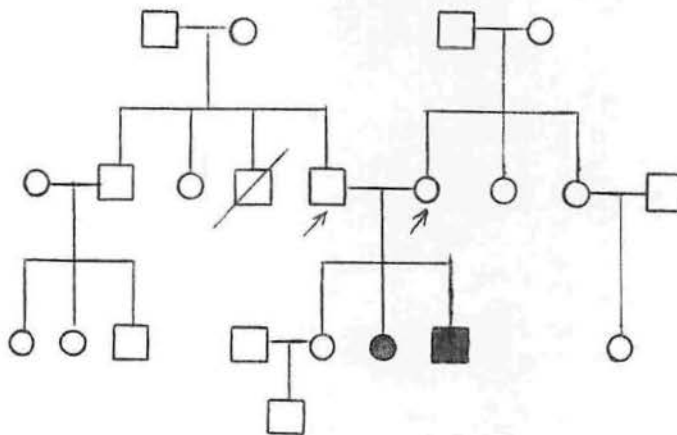
- = afetados com fenilcetonúria (PKU).
- / = falecido com PKU.
- = abortos.
- ↗ ↘ = heterozigotos estudados.

Figura II.2: Heredograma da família II.



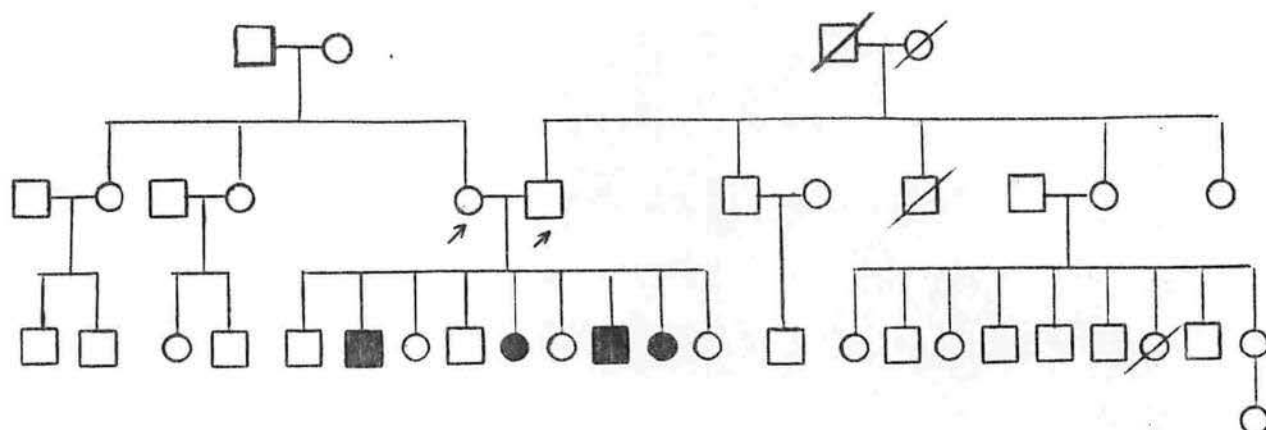
- = afetado com PKU.
- ☒ = falecidos sem história clínica de PKU.
- ☐○ = heterozigotos estudados.

Figura II.3: Heredograma da família III.



- = afetados com PKU.
- ☒ = falecido sem história clínica de PKU.
- ☐○ = heterozigotos estudados.

Figura II.4: Heredograma da família IV.

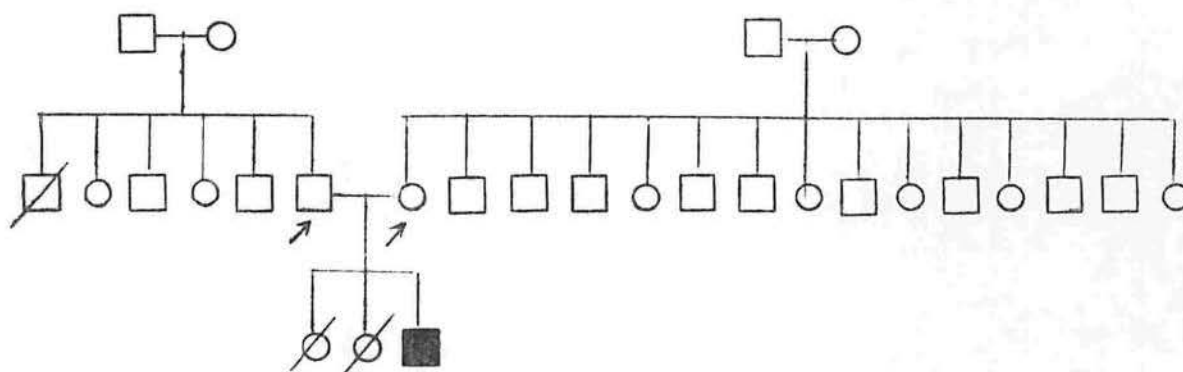


■● = afetados com PKU.

☒☑ = falecidos sem história clínica de PKU.

☐○ = heterozigotos estudados.
↗ ↘

Figura II.5: Heredograma da família V.

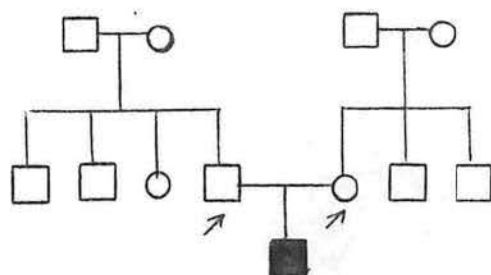


■ = afetado com PKU.

☒☑ = falecidos sem história clínica de PKU.

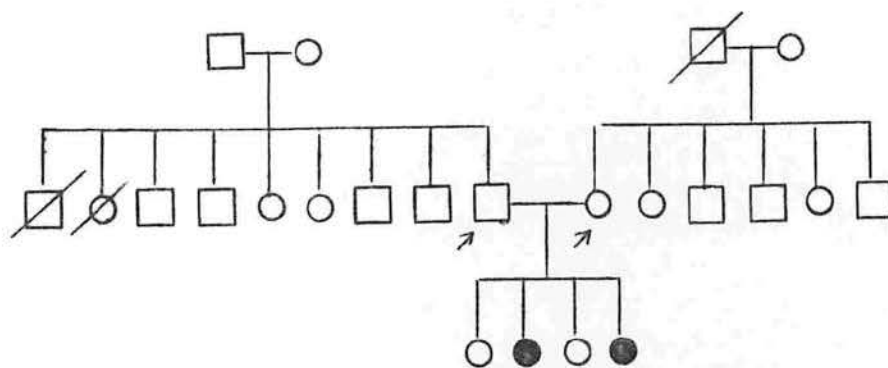
☐○ = heterozigotos estudados.
↗ ↘

Figura II.6: Heredograma da família VI.



- = afetado com PKU.
- = heterozigotos estudados.
- ↗ ↘

Figura II.7: Heredograma da família VII.



- = afetados com PKU.
- ◻/◻ = falecidos sem história clínica de PKU.
- = heterozigotos estudados.
- ↗ ↘

Como pode-se observar pelas figuras II.1 à II.7 nenhum dos casos possui consanguinidade entre os pais. Por esta razão, resolveu-se estudar a origem ancestral dos mesmos (tabela II.4). Como se pode ver 38% dos heterozigotos para

fenilcetonúria clássica são de origem alemã, sendo os demais predominantemente brasileiros; entre os heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2 observa-se 50% de italianos e 17% de alemães. Araújo (1973) e Weimer (1979), estudando amostras da população de Porto Alegre, encontraram 0,6% (n = 2028) e 1,2% (n = 593) de alemães, sendo os valores de italianos de 1,3% e 0,5% respectivamente. Os dados destes autores não diferem estatisticamente entre si. Comparando-os com os do presente trabalho observa-se um excesso de alemães entre heterozigotos para fenilcetonúria clássica ($\chi^2 = 24,92$; gl = 1; $p < 0,001$) e de italianos entre os heterozigotos por deficiência de síntese BH2 ($\chi^2 = 27,76$; gl = 1; $p < 0,001$). Apesar dos pequenos tamanhos amostrais, estes dados parecem sugerir que, em nossa população, as frequências dos genes para fenilcetonúria clássica e por deficiência de síntese de BH2 podem estar mais elevadas entre alemães e italianos, respectivamente.

Entre os portadores de PKU clássica, a idade (tabela II.5) variou de 32 a 65 anos no grupo masculino e de 26 a 56 anos no feminino, sendo as médias 44 e 37 anos, respectivamente. Entre os heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2 a idade dos homens variou de 28 a 36 anos com média de 32 anos e a das mulheres oscilou entre 30 e 36 anos com média de 33 anos.

Não houve diferenças significativas entre os sexos (Clássica: $t = 0,4$, gl = 4, $0,7 > p > 0,6$; Deficiência de síntese de BH2: $t = 0,083$, gl = 4, $p > 0,9$), nem entre os dois tipos de

heterozigotos ($t = 1,15$, $gl = 10$, $0,3 > p > 0,2$). As idades são também semelhantes entre estes e os controles ($t' = 1,94$, $gl = 51$, $0,1 > p > 0,05$).

Tabela II.4: Origem ancestral dos pais de pacientes com fenilcetonúria clássica e por deficiência de síntese de BH2.

Tipo	Origem	P	M	N	%
Clássica	A	2	1	3	38
	I	0	0	0	0
	B	1	2	3	38
	Pol	1	0	1	12
	S/I	0	1	1	12
Deficiência de síntese de BH2	A	1	0	1	17
	I	2	1	3	50
	B	0	2	2	33
	S/I	0	0	0	0

A = alemã; B = brasileira; I = italiana; Pol = polonesa;

P = pai; M = mãe;

S/I = sem informação.

Tabela II.5: Idade (anos) dos heterozigotos para fenilcetonúria clássica e por deficiência de síntese de BH2.

Tipo	Sexo	N estudado	Intervalo	\bar{x}	s	S/I
Clássica	M	4	32 - 65	44,3	18,1	1
	F	4	26 - 56	37,3	16,2	1
Deficiência de síntese de BH2	M	3	28 - 36	32,3	4,0	-
	F	3	30 - 36	32,6	6,4	-

M = sexo masculino;

F = sexo feminino;

\bar{x} = média;

s = desvio padrão;

S/I = sem informação.

Também foi registrado o nível sócio-econômico deste grupo (tabela II.6) com base nas mesmas categorias utilizadas para os controles. Dos heterozigotos para fenilcetonúria clássica 75% pertencem a classe B (renda mensal de 3 a 6 salários mínimos) os 25% restantes pertencem a classe C. Do outro grupo a maioria (67%) pertence a classe A (acima de 6 salários mínimos) sendo o restante da classe C (33%).

Controles e heterozigotos diferiram significativamente quanto ao nível sócio-econômico ($\chi^2 = 4,89$, gl = 1, $p < 0,05$). Esta diferença pode ter-se acentuado devido ao

pequeno número amostral do grupo de heterozigotos.

Tabela II.6: Níveis sócio-econômicos dos heterozigotos para fenilcetonúria clássica e por deficiência de síntese de BH2.

Tipo	Níveis				Total	
	A	B	C	D		
Clássica	N	0	6	2	0	8
	%	-	75	25	-	
Deficiência de síntese de BH2	N	4	0	2	0	6
	%	67	-	33	-	

A = renda mensal acima de Cr\$ 342.000,00 (acima de 6 salários mínimos);

B = renda mensal entre Cr\$ 342.000,00 e Cr\$ 172.000,00 (de 3 a 6 salários mínimos);

C = renda mensal entre Cr\$ 171.000,00 e Cr\$ 57.000,00 (de 1 a 3 salários mínimos);

D = renda mensal abaixo de Cr\$ 57.000,00.

III. Resultados

III.1 Amostra controle

A tabela III.1 mostra os resultados dos níveis de fenilalanina e tirosina e das relações P/T e P²/T no grupo controle. Os valores obtidos para cada indivíduo, controle ou heterozigoto, encontram-se no apêndice desta dissertação.

A concentração de fenilalanina variou de 61,7 $\mu\text{M/L}$ a 118,4 $\mu\text{M/L}$ com média de 82,1 $\mu\text{M/L}$ e desvio padrão de 15,4, no sexo feminino.

No sexo masculino obteve-se uma média de 75,9 $\mu\text{M/L} \pm 16,0$ sendo que o intervalo foi de 54,4 $\mu\text{M/L}$ a 123,5 $\mu\text{M/L}$.

A média obtida para a concentração de tirosina, no sexo feminino, foi de 88,7 $\mu\text{M/L} \pm 19,8$, o valor respectivo para o masculino sendo 83,7 $\mu\text{M/L} \pm 18,0$. Os intervalos foram: 48,5 $\mu\text{M/L}$ a 124,7 $\mu\text{M/L}$ para as mulheres e 40,8 $\mu\text{M/L}$ a 118,6 $\mu\text{M/L}$ para os homens. No grupo masculino um indivíduo havia apresentado uma concentração muito elevada de tirosina (140,1 $\mu\text{M/L}$). Tal valor estava acima do limite de normalidade (média \pm dois desvios padrões), calculado com base nos resultados dos demais controles. Por esta razão, este indivíduo foi excluído da amostra.

A partir das concentrações de fenilalanina e tirosina calculou-se para cada indivíduo as relações P/T e P^2/T .

Para a proporção P/T obteve-se tanto nas mulheres quanto nos homens uma média de 0,9 com desvio padrão de 0,2. O intervalo para o sexo feminino sendo de 0,6 a 1,3 e para o sexo masculino de 0,6 a 1,5.

A relação P^2/T variou, entre as mulheres, de 43,4 a 163,9 com uma média de $79,0 \pm 26,7$ e entre os homens de 41,9 a 150,2 com média de $70,1 \pm 23,4$.

Não há diferenças significativas entre os sexos para esses valores (P: $t = 1,54$, $gl = 39$, $0,2 > p > 0,1$; T: $t = 1,11$, $gl = 39$, $0,3 > p > 0,2$; P/T : $t = 0,3$, $gl = 39$, $0,8 > p > 0,7$; P^2/T : $t = 0,94$, $gl = 39$, $0,4 > p > 0,3$).

Tabela III.1: Níveis de fenilalanina e tirosina sérica ($\mu\text{M/L}$) na amostra controle.

	F: n = 23			M: n = 18		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	61,7 - 118,4	82,1	15,4	54,4 - 123,5	75,9	16,0
T	48,5 - 124,7	88,7	19,8	40,8 - 118,6	83,7	18,0
P/T	0,6 - 1,3	0,9	0,2	0,6 - 1,5	0,9	0,2
P^2/T	43,4 - 163,9	79,0	26,7	41,9 - 150,2	70,1	23,4

M = sexo masculino; F = sexo feminino; \bar{x} = média; s = desvio padrão.

III.2 Heterozigotos para fenilcetonúria clássica

Os resultados obtidos para os heterozigotos para fenilcetonúria clássica estão relacionados na tabela III.2.

No sexo feminino observou-se uma média de 155,9 $\mu\text{M/L}$ para o nível de fenilalanina sendo o desvio padrão de 21,7 e o intervalo de 138,6 $\mu\text{M/L}$ a 187,6 $\mu\text{M/L}$. Nos homens os valores variaram de 146,4 $\mu\text{M/L}$ a 187,6 $\mu\text{M/L}$ com média de 161,1 $\mu\text{M/L} \pm 18,4$.

As concentrações de tirosina oscilaram de 55,0 $\mu\text{M/L}$ a 141,5 $\mu\text{M/L}$ no sexo feminino e de 86,5 $\mu\text{M/L}$ a 116,9 $\mu\text{M/L}$ no masculino. A média, para as mulheres, foi de 92,1 $\mu\text{M/L} \pm 36,1$ e para os homens, de 101,3 $\mu\text{M/L} \pm 13,5$.

Tanto para o nível de fenilalanina como para o de tirosina não foram observadas diferenças significativas entre os sexos (P: $t = 0,31$, $gl = 6$, $0,8 > p > 0,7$; T: $t = 0,41$, $gl = 6$, $0,7 > p > 0,6$).

As relações P/T e P^2/T são também semelhantes (P/T : $t = 0,62$, $gl = 6$, $0,6 > p > 0,5$; P^2/T : $t = 0,28$, $gl = 6$, $0,8 > p > 0,7$). A média de P/T , no sexo feminino sendo de $1,8 \pm 0,5$ com intervalo de 1,3 a 2,5 e no masculino de $1,6 \pm 0,3$, sendo o intervalo de 1,3 a 1,9.

Para a relação P^2/T foi obtida uma média de $278,4 \pm 47,4$ para o sexo feminino e de $263,5 \pm 78,1$ para o masculino. O intervalo variou de 248,7 a 349,2 para as mulheres e de 199,5 a 373,2 para os homens.

Tabela III.2: Níveis de fenilalanina e tirosina sérica ($\mu\text{M/L}$) em heterozigotos para fenilcetonúria clássica.

	F: n = 4			M: n = 4		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	138,6 - 187,6	155,9	21,7	146,4 - 187,6	161,1	18,4
T	55,0 - 141,5	92,1	36,1	86,5 - 116,9	101,3	13,5
P/T	1,3 - 2,5	1,8	0,5	1,3 - 1,9	1,6	0,3
P^2/T	248,7 - 349,2	278,4	47,4	199,5 - 373,2	263,5	78,1

M = sexo masculino; F = sexo feminino;

\bar{x} = média; s = desvio padrão.

III.3 Heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2

A tabela III.3 apresenta os resultados obtidos nos heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2.

A concentração de fenilalanina variou de $102,9 \mu\text{M/L}$

a 164,6 $\mu\text{M/L}$ nas mulheres, com média de 130,3 $\mu\text{M/L} \pm 31,4$ e de 154,3 $\mu\text{M/L}$ a 174,9 $\mu\text{M/L}$ com média de 166,3 $\mu\text{M/L} \pm 10,7$ nos homens.

A média e o desvio padrão encontrados para o nível de tirosina nas mulheres foram de 67,2 $\mu\text{M/L}$ e 20,3 e nos homens 103,9 $\mu\text{M/L}$ e 22,2. Os intervalos oscilaram de 44,5 $\mu\text{M/L}$ a 83,8 $\mu\text{M/L}$ no sexo feminino e de 78,6 $\mu\text{M/L}$ a 120,5 $\mu\text{M/L}$ no masculino.

A relação P/T variou de 1,6 a 2,3 no sexo feminino e de 1,2 a 2,1 no masculino, sendo as médias 1,9 $\pm 0,3$ e 1,6 $\pm 0,4$, respectivamente.

A média para a relação P^2/T nas mulheres foi igual a 263,3 $\pm 59,9$, tendo o intervalo oscilado de 207,7 a 323,3. Para os homens o intervalo foi de 197,5 a 366,3 e a média de 278,5 $\pm 84,6$.

Os valores encontrados são semelhantes entre os sexos (P : $t = 1,53$, $gl = 4$, $p > 0,3$; T : $t = 1,72$, $gl = 4$, $0,2 > p > 0,1$; P/T : $t = 0,83$, $gl = 4$, $0,5 > p > 0,4$; P^2/T : $t = 0,3$, $gl = 4$, $0,8 > p > 0,7$).

Tabela III.3: Níveis de fenilalanina e tirosina sérica ($\mu\text{M/L}$) em heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de BH2.

	F: n = 3			M: n = 3		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	102,9 - 164,6	130,3	31,4	154,3 - 174,9	166,3	10,7
T	44,5 - 83,8	67,2	20,3	78,6 - 120,5	103,9	22,2
P/T	1,6 - 2,3	1,9	0,3	1,2 - 2,1	1,6	0,4
P ² /T	207,7 - 323,3	256,3	59,9	197,5 - 366,3	278,5	84,6

M = sexo masculino; F = sexo feminino;

\bar{x} = média; s = desvio padrão.

III.4 Comparação entre amostras

Como não foram encontradas diferenças significativas entre homens e mulheres nas amostras estudadas, para a comparação entre os grupos, preferiu-se juntar os sexos, aumentando assim o tamanho amostral. Este critério foi utilizado para todas as comparações efetuadas.

A tabela III.4 apresenta as comparações feitas entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria clássica.

A concentração de fenilalanina foi

significativamente maior nos heterozigotos que nos controles ($t = 11,3$, $gl = 47$, $p < 0,001$). Os intervalos variaram de $54,4 \mu\text{M/L}$ a $123,5 \mu\text{M/L}$ nos controles e de $138,6 \mu\text{M/L}$ a $187,6 \mu\text{M/L}$ nos heterozigotos, não havendo sobreposição entre os dois grupos o que pode ser também visualizado na figura III.1.

Quanto as concentrações de tirosina, não houve diferenças significativas entre os dois grupos ($t = 1,05$, $gl = 47$, $0,4 > p > 0,3$).

O intervalo para a relação P/T variou de $1,3$ a $2,5$ entre os heterozigotos e de $0,6$ a $1,5$ nos controles. Embora haja alguma sobreposição entre os grupos, as médias diferiram significativamente entre si ($t' = 5,3$, $gl = 47$, $p < 0,001$).

A relação P^2/T variou de $41,9$ a $163,9$ no grupo controle e de $199,5$ a $373,2$ no de heterozigotos. As diferenças entre os grupos foram significativas ($t' = 8,8$, $gl = 47$, $p < 0,001$), sem sobreposição entre os mesmos, como pode também ser observado na figura III.2.

As comparações entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2 podem ser vistas na tabela III.5.

Os níveis de fenilalanina variaram de $102,9 \mu\text{M/L}$ a $174,9 \mu\text{M/L}$ nos heterozigotos e de $54,4 \mu\text{M/L}$ a $123,5 \mu\text{M/L}$ nos controles. As concentrações de fenilalanina foram significativamente maiores nos primeiros ($t = 7,9$, $gl = 45$, $p < 0,001$), embora tenha ocorrido uma zona de sobreposição entre eles (figura III.1).

Tabela III.4 Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria clássica, quanto aos níveis de fenilalanina e tirosina séricas ($\mu\text{M/L}$).

	Controles: n = 41			Heterozigotos: n = 8		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	54,4 - 123,5	79,4	15,8	138,6 - 187,6	158,5	18,8
T	40,8 - 124,7	86,6	19,0	55,0 - 141,5	96,7	25,7
P/T	0,6 - 1,5	0,9	0,2	1,3 - 2,5	1,7	0,4
P ² /T	41,9 - 163,9	75,1	25,4	199,5 - 373,2	271,0	60,3

\bar{x} = média; s = desvio padrão.

Tabela III.5: Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de BH2 quanto aos níveis de fenilalanina e tirosina séricas ($\mu\text{M/L}$).

	Controles: n = 41			Heterozigotos: n = 6		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	54,4 - 123,5	79,4	15,8	102,9 - 174,9	148,3	28,8
T	40,8 - 124,7	86,6	19,0	44,5 - 120,5	85,5	27,7
P/T	0,6 - 1,5	0,9	0,2	1,2 - 2,3	1,8	0,4
P ² /T	41,9 - 163,9	75,1	25,4	197,5 - 366,3	267,4	66,7

\bar{x} = média; s = desvio padrão.

Figura III.1: Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria quanto aos níveis séricos de fenilalanina ($\mu\text{M/L}$).

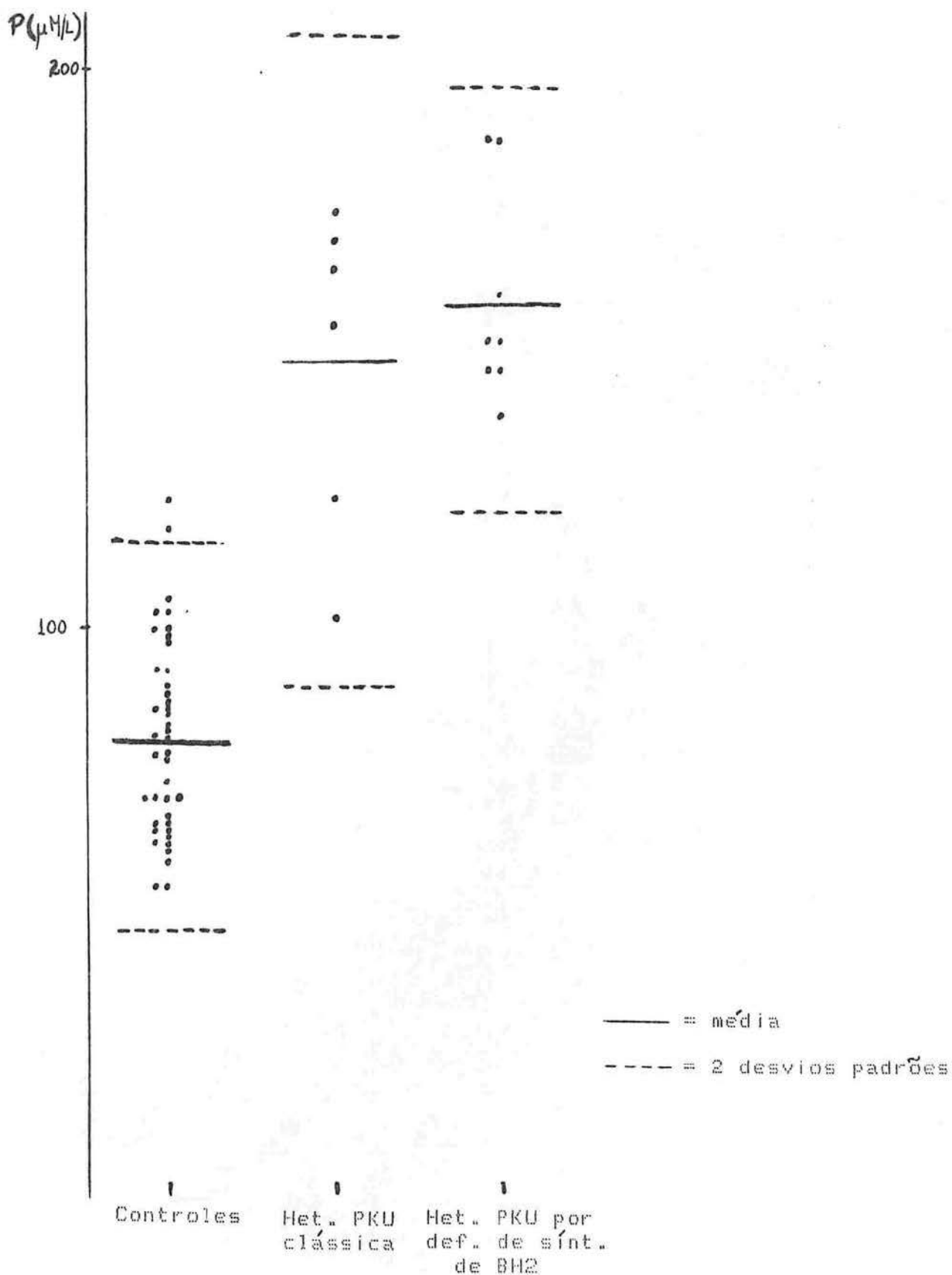
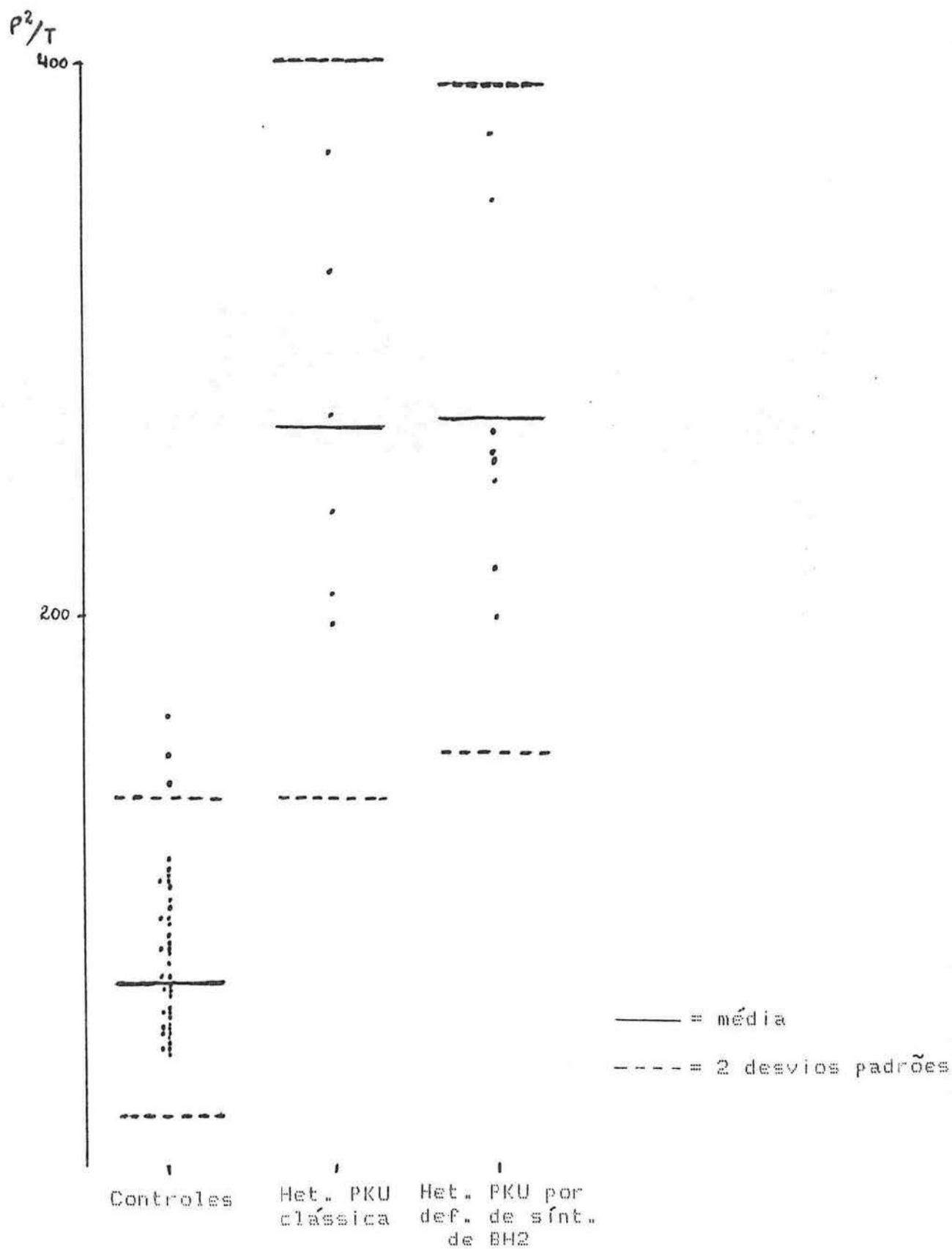


Figura III.2: Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria quanto a relação P^2/T .



Os níveis de tirosina foram também semelhantes entre estes grupos ($t = 0,26$, $gl = 45$, $0,8 > p > 0,7$).

Nos heterozigotos, as relações P/T e P^2/T variaram de 1,2 a 2,3 e de 197,5 a 366,3, respectivamente, enquanto nos controles os valores foram de 0,6 a 1,5 para P/T e 41,9 a 163,9 para P^2/T . As diferenças encontradas foram significativas para ambas as relações (P/T : $t = 8,0$, $gl = 45$, $p < 0,001$; P^2/T : $t = 6,8$, $gl = 45$, $p < 0,001$), embora para a primeira haja alguma superposição entre os grupos (figura III.2).

Na tabela III.6 encontram-se as comparações feitas entre os portadores para os dois tipos de hiperfenilalaninemia.

Em nenhum dos parâmetros analisados foram encontradas diferenças significativas entre estes grupos (P : $t = 0,74$, $gl = 12$, $0,5 > p > 0,4$; T : $t = 0,71$, $gl = 12$, $0,5 > p > 0,4$; P/T : $t = 0,44$, $gl = 12$, $0,7 > p > 0,6$; P^2/T : $t = 0,09$, $gl = 12$, $p > 0,9$).

As sobreposições encontradas entre os dois tipos de heterozigotos quanto ao nível de fenilalanina e a relação P^2/T , podem também ser observadas nas figuras III.1 e III.2, respectivamente.

Tabela III.6: Comparação entre heterozigotos para fenilcetonúria clássica e heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2, quanto aos níveis de fenilalanina e tirosina sérica ($\mu\text{M/L}$).

	Clássica: n = 8			Deficiência de síntese de BH2: n = 6		
	Intervalo	\bar{x}	s	Intervalo	\bar{x}	s
P	138,6 - 187,6	158,5	18,8	102,9 - 174,9	148,3	28,8
T	55,0 - 141,5	96,7	25,7	44,5 - 120,5	85,5	27,7
P/T	1,3 - 2,5	1,7	0,4	1,2 - 2,3	1,8	0,4
P ² /T	199,5 - 373,2	271,0	60,3	197,5 - 366,3	267,4	66,7

\bar{x} = média; s = desvio padrão.

III.5 Análise discriminante

Outro método utilizado para distinguir controles dos dois grupos de heterozigotos, e estes últimos entre si, foi através da função discriminante:

$$\Sigma = a_1 (P) + a_2 (T)$$

Os coeficientes a_1 e a_2 foram obtidos através de análise multivariada tendo sido feitas 3 comparações: controle versus cada um dos grupos de heterozigotos e estes entre si.

Os valores obtidos estão indicados na tabela III.7.

Tabela III.7: Valores de a_1 e a_2 obtidos através das análises discriminantes.

	Controles	Controles	Het. PKU clássica
	X	X	X
	Het. PKU clássica	Het. PKU def. de sínt. de BH2	Het. PKU def. de sínt. de BH2
a_1	0,021388	0,05564	0,021672
a_2	-0,0214	-0,0688	-0,02302

Com estes índices, foram calculados, para cada indivíduo, controle ou heterozigoto, o valor da função discriminante, estando os resultados na tabela III.8.

Tabela III.8: Resultados obtidos pela função discriminante.

Comparação	Intervalo	\bar{x}	s	t	p
Controles X Het. PKU clássica	-0,92 a 0,70	-0,13	0,39	9,48	<0,001
Controles X Het. PKU def. sínt. BH2	-4,06 a 0,69	-1,56	1,24	7,00	<0,001
Het. PKU clássica X Het. PKU def. sínt. BH2	0,70 a 1,89	1,20	0,44	0,13	>0,8

\bar{x} = médias; s = desvio padrão;

Os heterozigotos para PKU clássica diferem significativamente dos controles ($t = 9,48$, $gl = 47$, $p < 0,001$) sendo a média para os primeiros de $1,32 \pm 0,41$ e para os segundos de $-0,13 \pm 0,39$.

Na segunda análise a média para os controles foi de $-1,56 \pm 1,24$, e para os heterozigotos por deficiência de síntese de BH2 de $2,35 \pm 1,31$, sendo as diferenças significativas ($t = 7,00$, $gl = 45$, $p < 0,001$).

As comparações entre os dois tipos de heterozigotos, não revelaram, no entanto, diferenças significativas ($t = 0,13$, $gl = 16$, $0,9 > p > 0,8$). A média para os heterozigotos para PKU clássica foi de $1,20 \pm 0,44$ e para os portadores de deficiência de síntese de BH2 de $1,24 \pm 0,46$.

As funções discriminantes obtidas nos 3 tipos de comparações estão ilustradas nas figuras III.3 a III.5. Nos dois primeiros gráficos, a reta de regressão representa um novo eixo, cada qual com uma nova origem (z), cujos valores são, para a figura III.3, $z = 1,00298$ e para a figura III.4, $z = 1,5289$. Os indivíduos cuja função discriminante localiza-se abaixo de z são considerados homozigotos normais e aqueles com valores acima de z são heterozigotos. No terceiro gráfico, pode-se ver que todos os indivíduos ficam em torno da reta, uma vez que a mesma não discriminou os dois tipos de portadores.

Figura III.3: Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria clássica através da função discriminante.

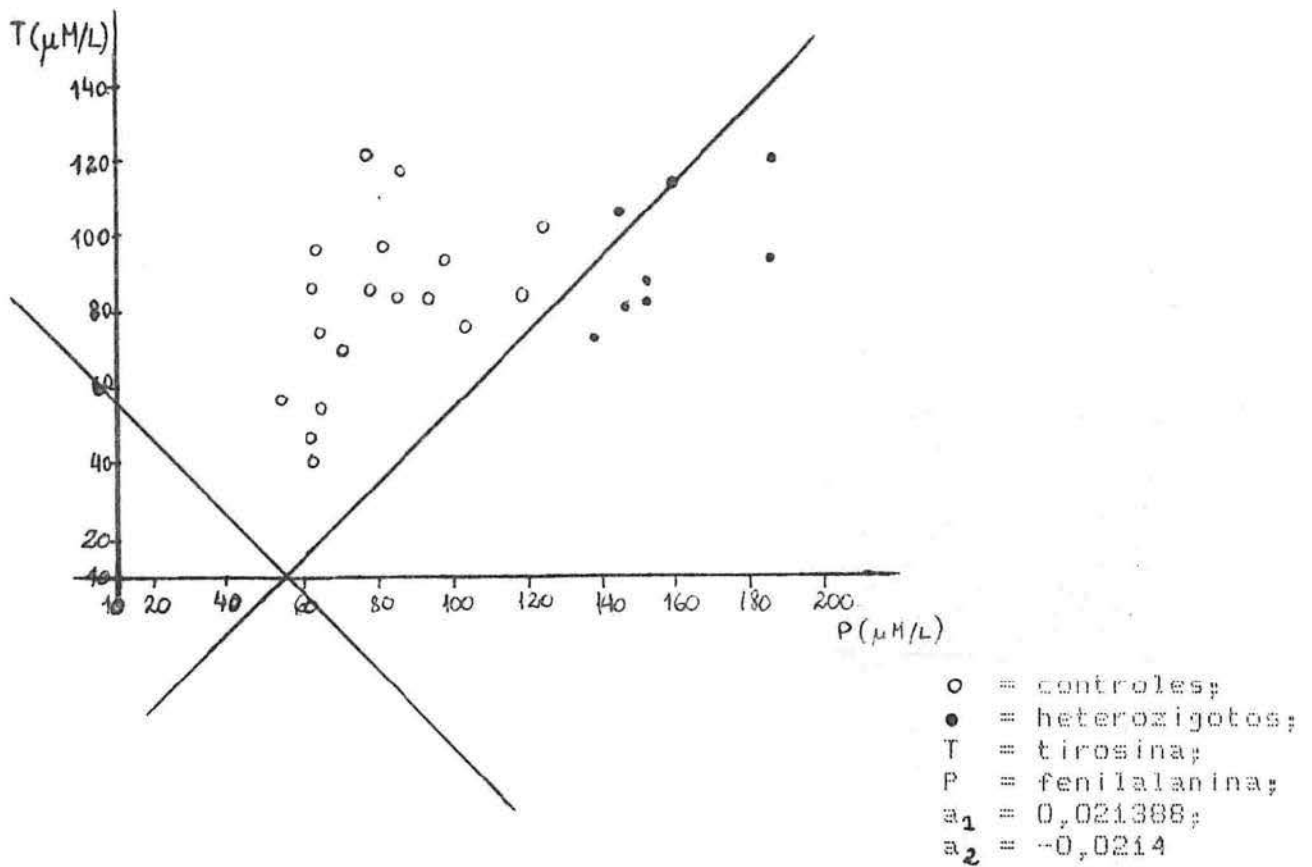


Figura III.4: Comparação entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de síntese de BH2 através da função discriminante.

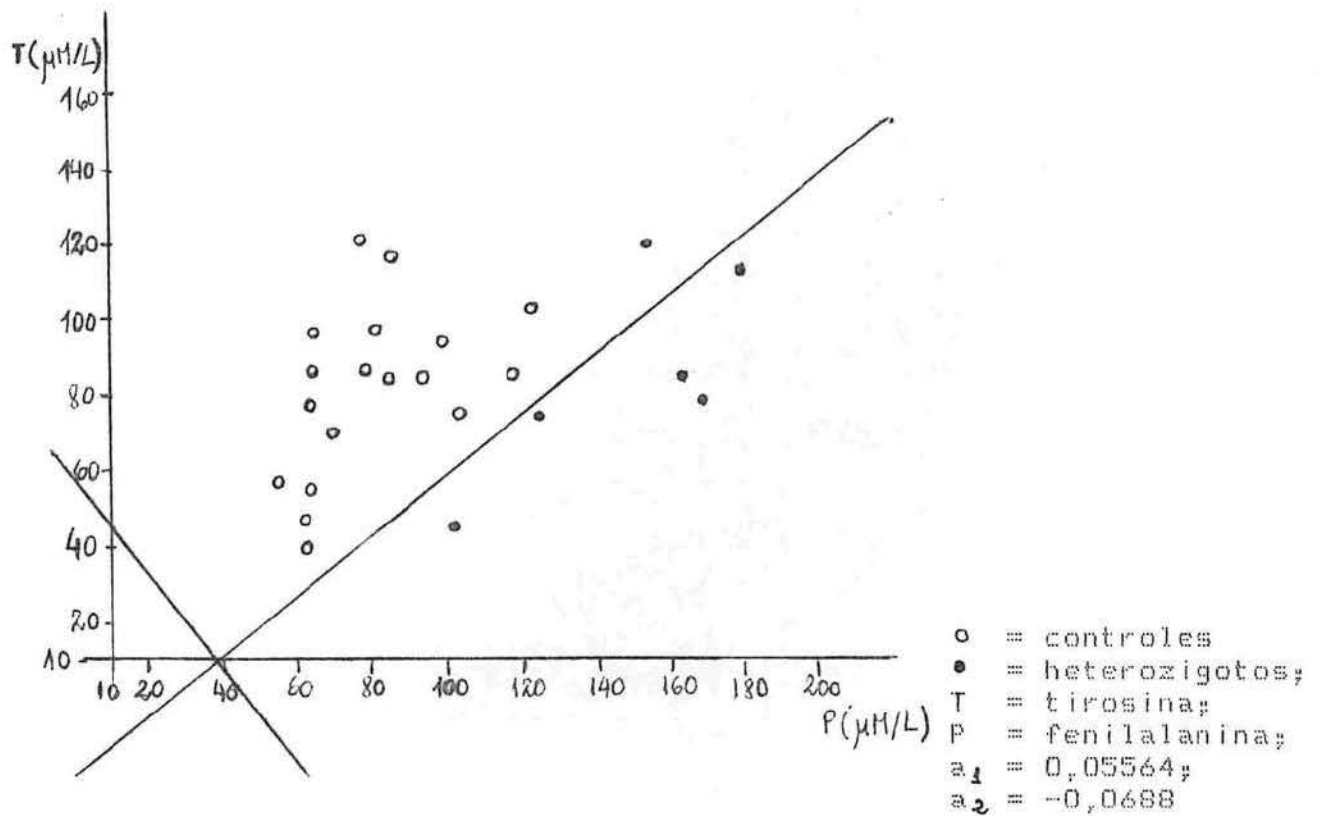
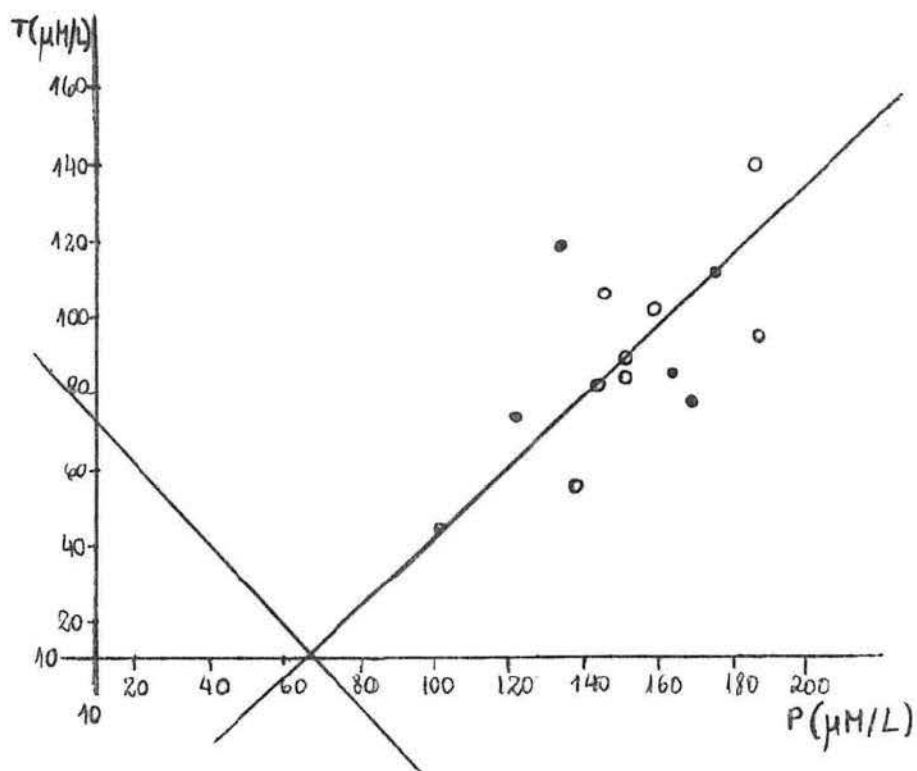


Figura III.5: Comparação entre heterozigotos para fenilcetonúria clássica e por deficiência de síntese de BH2 através da função discriminante.



- = heterozigotos para PKU clássica;
- = heterozigotos para PKU por def. de síntese de BH2;
- T = tirosina;
- P = fenilalanina;
- $a_1 = 0,021672$;
- $a_2 = -0,02302$

IV Discussão

Gravidez e uso de contraceptivos orais, são dois fatores que podem levar, a diferenças sexuais nos níveis de P e T.

Jackson e cols. (1971), referem que mulheres tomando contraceptivos orais apresentam a relação P/T significativamente mais alta, mas os valores voltam ao nível normal sete dias após a interrupção do medicamento. Rose e Cramp (1970), já haviam referido que os contraceptivos orais diminuem a concentração de tirosina plasmática aumentando assim a taxa P/T. Resultados semelhantes foram obtidos por Jagenburg e cols. (1970).

Cabalska e cols. (1982) verificaram que as concentrações de fenilalanina nas mulheres grávidas são equivalentes aos valores obtidos para heterozigotos para PKU.

Na amostra controle procurou-se excluir as mulheres grávidas, mas não se obteve informação quanto ao uso ou não de contraceptivos orais. No entanto as concentrações de P, T e as relações P/T e P^2/T , são semelhantes entre homens e mulheres, sugerindo que este fator, se existiu, não influenciou nos resultados.

Estes dados confirmam aqueles obtidos por Knox e

Messinger (1958), Rampini e cols. (1969) e Griffin e cols. (1973), que também analisaram diferenças sexuais quanto a concentração de P e T em controles testados após jejum de uma noite. Jagenburg e cols. (1970), medindo os níveis plasmáticos de P e T após infusão intravenosa de fenilalanina, também não notaram diferenças significativas entre os sexos. Griffin e Elsas (1975), comparando controles femininos com masculinos, observaram uma concentração média de fenilalanina significativamente menor ($p < 0,05$) nas mulheres, mas não houve diferenças entre os sexos para a concentração de tirosina.

Griffin e cols. (1973), não observaram diferenças significativas entre os sexos quanto aos valores das relações P/T e P^2/T , o que confirma os dados obtidos no presente trabalho. Griffin e Elsas (1975) referem, no entanto, que as mulheres apresentavam valores significativamente menores ($p < 0,01$) para ambas as proporções. Essa diminuição, no entanto, seria consequência dos menores valores de fenilalanina observados nas mulheres, por estes autores.

No presente trabalho, o grupo de heterozigotos foi composto por dois sub-grupos, o de portadores do gene para PKU clássica e aqueles para PKU por deficiência de síntese de BH₂. Em nenhum dos sub-grupos foram encontradas diferenças sexuais quanto às medidas estudadas. Estudos realizados com heterozigotos para o tipo clássico mostraram resultados semelhantes: Knox e Messinger (1958) e Rampini e cols. (1969) analisando as concentrações de P e T e Griffin e cols. (1973) e Griffin e Elsas (1975) testando,

além desses valores, as relações P/T e P^2/T .

Os heterozigotos para PKU clássica apresentaram uma concentração de fenilalanina significativamente mais alta que os controles. Isto confirma os dados anteriormente obtidos (Knox e Messinger, 1958; Rampini e cols., 1969; Griffin e cols., 1973; Griffin e Elsas, 1975; Westwood e Raine, 1975 e Tenenholz e col., 1983). Nesses estudos, embora os níveis de fenilalanina tenham sido significativamente maior nos heterozigotos que nos controles, uma zona de sobreposição entre os dois grupos foi sempre observada, o que não ocorreu no presente trabalho.

Das investigações citadas anteriormente, a única metodologicamente semelhante a esta é a de Tenenholz e cols. (1983) que dosaram P e T fluorimetricamente em sangue, após jejum de 12 horas. Estes autores observaram uma zona de sobreposição entre os grupos, quanto à concentração de P, mas concluem, apesar disto, que esta medida teria 85% de precisão na separação dos mesmos. Os autores não fazem referência quanto a presença ou não de gravidez no grupo controle o que poderia elevar o nível de fenilalanina entre as mulheres.

Quanto aos heterozigotos para PKU por deficiência de síntese de BH2 também foi notada uma concentração significativamente maior de fenilalanina que nos controles, havendo, no entanto, uma zona de superposição entre os dois grupos. Estes dados não podem ser comparados com a literatura, pois desconhecemos trabalhos realizados especificamente com este tipo de heterozigotos. A classificação das HFA empregada no

presente trabalho é muito recente, (1983). Até anos atrás, muitos pesquisadores ao estudarem PKU clássica poderiam estar considerando outros tipos de hiperfenilalaninemias, uma vez que a primeira referência à deficiência de BH4 é de 1975 (Kaufman e cols.). Tal fato poderia explicar a sobreposição encontrada entre controles e heterozigotos pela maioria das outras investigações.

No presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas entre os controles e os heterozigotos quanto ao nível de tirosina. Estes dados confirmam os de Knox e Messinger (1958), Rampini e cols. (1969), Griffin e Elsas (1975), Westwood e Raine (1975) e Tenenholz e cols. (1983), que também dosaram tirosina de sangue em jejum, não encontrando diferenças significativas entre controles e heterozigotos. Griffin e cols. (1973), no entanto, referem valores mais baixos deste aminoácido entre os heterozigotos ($p < 0,05$).

Jervis (1960), observou diferenças significativas entre controles e heterozigotos quanto à concentração de tirosina dosada em sangue colhido após sobrecarga oral de fenilalanina, mas as mesmas não ocorreram quando foi utilizado sangue em jejum para a dosagem.

Em 1969, Rampini e cols., sugeriram a relação P/T obtida após sobrecarga oral de fenilalanina, para melhor distinguir heterozigotos de controles. Esta relação permitiu separar os dois grupos com um erro de classificação de 18,9%.

Jackson e cols. (1971), Griffin e cols. (1973),

Griffin e Elsas (1975), Westwood e Raine (1975), Guttler e Hansen (1977) e Tenenholz e cols. (1983), utilizaram a mesma relação obtida após dosagens em sangue em jejum de pelo menos 3 horas. Todos os autores concordam não ser a relação P/T um bom discriminante, uma vez que todos encontraram uma zona de sobreposição entre os grupos. Neste trabalho foram confirmadas as conclusões desses autores. A relação P/T não foi um bom discriminante, havendo superposição tanto entre controles e heterozigotos para PKU clássica quanto entre aqueles e portadores para a deficiência de síntese de BH₂.

Griffin e cols. (1973), Griffin e Elsas (1975) sugeriram, então, a relação P^2/T . Segundo estes autores esta medida distinguia completamente controles de heterozigotos. Tenenholz e cols. (1983), referem que esta relação seria capaz de identificar heterozigotos com 80% de precisão. Conforme estes autores, esta relação só seria superada, na distinção entre os dois grupos, por funções discriminantes.

Neste estudo, a proporção P^2/T foi significativamente mais elevada nos heterozigotos, permitindo a completa separação entre os grupos, tanto no que se refere aos portadores para o tipo clássico quanto aqueles para a deficiência de síntese de BH₂, tendo se mostrado, assim, um ótimo discriminante.

Rampini e cols. (1969), introduziram o uso de funções discriminantes para distinguir controles de heterozigotos. Este método foi posteriormente utilizado por

Griffin e cols. (1973), Griffin e Elsas (1975), Westwood e Raine (1975), Guttler e Hansen (1977), Paul e cols. (1978) e Tenenholz e cols. (1983). Apenas 3 dessas investigações não observaram zona de superposição entre os grupos (Griffin e cols., 1973; Griffin e Elsas, 1975 e Tenenholz e cols., 1983).

No presente trabalho, a função discriminante empregada foi a mesma utilizada por Griffin e cols. (1973) e Griffin e Elsas (1975). Ambos os autores referem um alto grau de discriminação ($p < 0,01$).

No presente trabalho obtiveram-se diferenças significativas entre os dois tipos de heterozigotos e a amostra controle ($p < 0,001$), confirmando os dados daqueles autores. A pequena sobreposição encontrada, que também havia sido observada por aqueles pesquisadores, bem como o fato de alguns heterozigotos apresentarem o valor da função discriminante inferior a z, pode ser decorrente do pequeno número de portadores examinados.

Quanto às comparações entre os dois tipos de heterozigotos, nenhum dos parâmetros utilizados mostrou ser um bom discriminante, já que todos apresentaram grande sobreposição entre os resultados. É possível que isso seja devido ao pequeno tamanho amostral, mas não se pode descartar a hipótese de que essas técnicas não sejam realmente adequadas para a identificação destes portadores.

V Resumo e conclusões

Foram analisados 14 heterozigotos obrigatórios para dois tipos de hiperfenilalaninemias (HFA tipo I e V) e 41 homozigotos normais, quanto aos níveis de fenilalanina (P), tirosina (T), às relações P/T e P^2/T e à função discriminante proposta por Griffin e Elsas (1975), com os seguintes objetivos:

1 - Estudar, na população de Porto Alegre, indivíduos normais e heterozigotos comprovados para dois tipos de hiperfenilalaninemias (tipo I e V) quanto a cinco medidas: a) níveis séricos de fenilalanina em jejum de 12 horas; b) níveis séricos de tirosina em jejum de 12 horas; c) relação P/T ; d) relação P^2/T e e) função discriminante por análise de regressão multilinear proposta por Griffin e Elsas (1975);

2 - Verificar se há diferença sexual em cada grupo quanto a esses valores;

3 - Selecionar entre os cinco índices estudados, o que melhor separa heterozigotos de indivíduos normais; e

4 - Verificar a possibilidade de distinguir os dois tipos de heterozigotos.

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1 - As taxas de fenilalanina e as relações P/T e P^2/T estão significativamente aumentadas nos dois tipos de heterozigotos. Não houve sobreposição entre controles e heterozigotos para fenilcetonúria clássica quanto à concentração de fenilalanina e entre controles e os dois tipos de heterozigotos quanto à relação P^2/T ;

2 - Os níveis de tirosina são semelhantes entre controles e heterozigotos;

3 - Não há diferenças sexuais em nenhum dos grupos analisados quanto aos níveis de P, T e às relações P/T e P^2/T ;

4 - Os parâmetros que melhor separaram controles e heterozigotos foram a relação P^2/T e a função discriminante; e

5 - Nenhum dos parâmetros estudados permitiu distinguir os dois tipos de heterozigotos.

UI Referências bibliográficas

- ARAÚJO, A. M. Estrutura populacional e malformações congênitas na população de Porto Alegre. Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1973.
- BARTHOLOMÉ, K.; BYRD, D. J.; KAUFMAN, S.; MILSTEIN, S. Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity "in vitro". Pediatrics, 59:757-761, 1977.
- BICKEL, H.; GERRARD, J.; HICKMANS, E. M. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. Lancet, 2:812, 1953.
- BLAU, K.; SUMMER, G. K.; NEWSOME, H. C.; EDWARDS, C. H. Phenylalanine loading and aromatic acid excretion in normal subjects and heterozygotes for phenylketonuria. Clin. Chim. Acta, 45:197-205, 1973.
- BORATTO, F. Basic para engenheiros e cientistas. Rio de Janeiro, Livros técnicos e científicos editora S. A., 1984. pp. 98-103.
- CABALSKA, B.; NOWACZEWSKA, J.; DUCZYNSKA, H. Plasma amino acid pattern in phenylketonuric heterozygotes during pregnancy.

Biochem. Med., 27:269-277, 1982.

CURTIUS, H-Ch.; NIÉDERWIESER, A.; VISCONTINI, M.; OTTEN, A.;
SHAUB, J.; SCHEIBENREITER, S.; SCHMIDT, H. Atypical
phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency.
Diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin,
dihydrobiopterin and sepiapterin. Clin. Chim. Acta,
93:251-262, 1979.

DANKS, D. M.; BARTHOLOMÉ, K; CLAYTON, B. E.; CURTIUS, H.; GROBE,
H.; KAUFMAN, S.; LEEMING, R. J.; PFFLEIDERER, W.; REMBOLD, H.;
REY, F. Malignant hyperphenylalaninemia: current status (June
1977). J. Inher. Metab. Dis., 1:49-53, 1978.

DHONDT, J. L. Tetrahydrobiopterin deficiencies: preliminary
analysis from an international survey. J. Pediat.,
104:501-508, 1984.

FØLLING, A. Über ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den
Harn als stoffwechselanomalie in Verbindung mit imbezillität.
Z. Physiol. Chem., 227:169-176, 1934.

GIUGLIANI, R.; COSTA, J. C.; DUTRA-FILHO, C. S.; NIEDERWIESER, A.
Tetrahydrobiopterin deficiency in two patients with
phenylketonuria who do not respond adequately to dietary
treatment. Rev. Brasil. Genet., 6:557-564, 1983.

GRIFFIN, R. F. & ELSAS, L. J. Classic phenylketonuria: diagnosis
through heterozygote detection. J. Pediatrics, 86:512-517,
1975.

GRIFFIN, R. F.; HUMIENNY, M. E.; HALL, E. C.; ELSAS, L. J.

Classic phenylketonuria: heterozygote detection during pregnancy. Am. J. Hum. Genet., 25:646-654, 1973.

GUTTLER, F. & HANSEN, G. Heterozygote detection in

phenylketonuria. Clin. Genet., 11:137-146, 1977.

HSIA, D. Y. Y.; DRISCOLL, K. U.; TROLL, U.; KNOX, W. E. Detection

by phenylalanine tolerance tests of heterozygous carrier of phenylketonuria. Nature, 178:1239-1240, 1956.

JACKSON, S. H.; HANLEY, W. B.; GERD, T.; GOSSE, G. D. Detection

of phenylketonuric heterozygotes. Clin. Chem., 17:538-543, 1971.

JAGENBURG, R.; REGARDH, C-G.; RODJER, S. Detection of

heterozygotes for phenylketonuria. Total body phenylalanine clearance and concentrations of phenylalanine and tyrosine in the plasma of fasting subjects compared. Clin. Chem., 23:1654-1660, 1977.

JAGENBURG, R. & RODJER, S. Detection of heterozygotes for

phenylketonuria by constant intravenous infusion of L-phenylalanine. Clin. Chem., 23:1661-1665, 1977.

JERVIS, G. A. Detection of heterozygotes for phenylketonuria.

Clin. Chim. Acta, 5:471-476, 1960.

KAUFMAN, S.; BERLOW, S.; SUMMER, G. K.; MILSTEIN, S.; SHULMAN, J.

D.; ORLOFF, S.; SPEILBERG, S.; PUESCHEL, S. Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. A variant form of

- phenylketonuria. N. Engl. J. Med., 299:673, 1978.
- KAUFMAN, S.; HOLTZMAN, N. A.; MILSTEIN, S.; BUTLER, I. J.;
KRUMHOLZ, A. Phenylketonuria due to a deficiency of
dihydropteridine reductase. N. Engl. J. Med., 293:789, 1975.
- KNOX, W. E. & MESSINGER, E. C. The detection in the heterozygote
of the metabolic effect of the recessive gene for
phenylketonuria. Am. J. Hum. Genet., 10:53-60, 1958.
- KOEPP, P. & HOFFMANN, B. Detection of heterozygotes for
phenylketonuria and hyperphenylalaninemia by gas -
chromatographic analysis of aromatic acid excretion in urine.
Clin. Chim. Acta, 58:215-221, 1975.
- LEHMANN, U. O.; THEOBALD, N.; HEINRICH, H. C.; CLEMENS, P.;
GRUTTNER, R. Detection of heterozygous carriers for
phenylketonuria by a L-[²H₅] phenylalanine stable isotope
loading test. Clin. Chim. Acta, 138:59-71, 1984.
- MCCAMAN, M. W. & ROBINS, E. Fluorimetric method for the
determination of phenylalanine in serum. J. Lab. Clin. Med.,
59:885-890, 1962.
- NIEDERWIESER, A.; CURTIUS, H-C.; BETTONI, O.; BIERI, J.;
SCHIRCKS, B.; VISCONTINI, M.; SHRAUB, J. Atypical
phenylketonuria caused by 7,8-dihydrobiopterin synthetase
deficiency. Lancet, 1:131-133, 1979.
- NIEDERWIESER, A.; CURTIUS, H-C.; GITZELMANN, R.; OTTEN, A.;
BAERLDCHER, K.; BLEHOVA, B.; BERLOU, S.; GROBE, H.; REY, F.;

- SHAUB, J.; SCHEIBENREITER, S.; SCHMIDT, H.; VISCONTINI, M.
Excretion of pterins in phenylketonuria and phenylketonuria
variants. Helv. Paediat. Acta, 35:335-342, 1980.
- NYHAN, W. L. Phenylketonuria. In: BERGSMAN, D. Birth defects
compendium, 2a. ed., New York, Alan R. Liss Inc., 1979. pp.
866-867.
- OLEK, K.; OYANAGI, K.; WARDENBACH, P. Quantitative analysis of
phenylalanine metabolites in urine to detect heterozygotes of
phenylketonuria. Humangenetik, 22:85-88, 1974.
- PAUL, T. D.; BRANDT, I. K.; ELSAS, L. J.; JACKSON, C. E.;
MAMUNES, P.; NANCE, C. S.; NANCE, W.E. Phenylketonuria
heterozygote detection in families with affected children. Am.
J. Hum. Genet., 30:293-301, 1978.
- PHILIPPS, R. E. Tyrosine in serum. In: TURNER, G. K. Manual
of fluorimetric clinical procedures. Palo Alto, G. K. Turner
Associates, 1967.
- RAMPINI, S.; ANDERS, P. U.; CURTIUS, H-C.; MARTHALER, Th.
Detection of heterozygotes for phenylketonuria by column
chromatography and discriminatory analysis. Pediat. Res.,
3:287-297, 1969.
- REY, F.; HARPEY, J. P.; LEEMING, R. J.; BLAIR, J. A.; RICARDI,
J.; REY, J. Les hyperphenylalaninemies avec activities
normale de la phenylalanine hydroxylase. Arch. Fr. Pediatr.,
(Suppl) 34:109-120, 1977.

- ROSE, D. P. & CRAMP, D. G. Reduction of plasma tyrosine by oral contraceptives and oestrogens: a possible consequence of tyrosine aminotransferase induction. Clin. Chim. Acta, 29:49-53, 1970.
- SCRIVER, C. R. & CLOW, C. L. Phenylketonuria and other phenylalanine hydroxylation in man. Ann. Rev. Genet., 14:179-202, 1980.
- SHIELDS, W. & HEELER, R. M. Analysis of contingency tables with sparse values. J. Mark. Res., 16:382-386, 1979.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. Statistical methods. 6a. ed. Iowa, The Iowa state university press, 1967. pp. 381-418.
- TENENHOLZ, B.; WENGER, S. L.; BRECK, J.; STEELE, M. W. A simplified PKU gene carrier detection test using fasting blood. Clin. Genet., 23:115-119, 1983.
- THALHAMMER, O. Frequency of inborn errors of metabolism, especially PKU, in some representative newborn screening centers around the world. Humangenetik, 30:273-286, 1975.
- THALHAMMER, O.; LUBEC, G.; KONIGSHOFER, H. Intracellular phenylalanine and tyrosine concentrations in 19 heterozygotes for phenylketonuria (PKU) and 26 normals. Hum. Genet., 49:333-336, 1979.
- THALHAMMER, O.; LUBEC, G.; KONIGSHOFER, H.; SCHEIBENREITER, S.; CORADELLO, H. Intracellular phenylalanine and tyrosine concentration in homozygotes and heterozygotes for

phenylketonuria (PKU) and hyperphenylalaninemia compared with normals. Hum. Genet., 60:320-321, 1982.

THALHAMMER, O.; POLLAK, A.; LUBEC, G.; KONIGSHOFER, H.

Intracellular concentrations of phenylalanine, tyrosine and α -aminobutyric acid in 13 homozygotes and 19 heterozygotes for phenylketonuria compared with 26 normals. J. Inher. Metab. Dis., 4:73-74, 1981.

TOURIAN, A. & SIDBURY, J. B. Phenylketonuria and

hyperphenylalaninemia. In: STAMBURY, J. B. et alii. The metabolic basis of inherited disease. 5a. ed., New York, Mc Graw Hill, 1983. pp. 270-286.

WANNMACHER, C. M. D. Distúrbios metabólicos na deficiência mental. Tese de mestrado. Curso de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1973.

WEIMER, T. A. Isozimas eritrocitárias e tipos de hemoglobina na população de Porto Alegre e em três tribos indígenas. Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1979.

WESTWOOD, A. & RAINE, D. N. Heterozygote detection in

phenylketonuria. Measurement of discriminatory ability and interpretation of the phenylalanine loading test by determination of the heterozygote Likelihood ratio. J. Med. Genet., 12:327-333, 1975.

VII Apêndice

VII.1 Valores de P, T, e das relações P/T e P^2/T na amostra controle.

VII.1.1 Sexo feminino

Número	P	T	P/T	P^2/T
01	99,8	124,7	0,8	79,8
02	81,7	98,7	0,8	67,6
03	77,1	121,3	0,6	49,0
04	85,1	85,5	0,9	84,7
05	98,5	93,2	1,0	104,1
06	67,1	67,3	0,9	66,9
07	87,1	77,8	1,1	97,5
08	103,0	103,7	0,9	102,3
09	100,0	91,9	1,0	108,8
10	118,4	85,5	1,3	163,9
11	93,3	83,3	1,1	104,5
12	89,5	88,3	1,0	90,7
13	93,9	83,3	1,1	105,8
14	80,5	81,6	0,9	79,4

Número	P	T	P/T	P ² /T
15	61,7	48,5	1,2	78,4
16	70,2	113,3	0,6	43,4
17	64,1	77,8	0,8	52,8
18	82,9	117,5	0,7	58,4
19	105,3	122,5	0,8	90,5
20	64,1	55,1	1,1	74,5
21	65,9	77,8	0,8	55,8
22	70,2	96,8	0,7	50,9
23	70,2	87,7	0,8	56,2

VIII.1.2 Sexo masculino

Número	P	T	P/T	P ² /T
01	63,5	70,0	0,9	57,6
02	86,2	118,6	0,7	62,6
03	103,0	76,1	1,3	139,4
04	100,0	89,9	1,1	111,2
05	78,9	96,0	0,8	64,8
06	123,5	101,5	1,2	150,2
07	86,5	84,9	1,0	88,1
08	65,3	97,6	0,6	43,6
09	59,9	70,6	0,8	50,8
10	62,3	87,1	0,7	44,5
11	73,2	114,2	0,6	46,9
12	81,1	103,2	0,7	63,7

Número	P	T	P/T	P ² /T
13	83,5	87,1	0,9	80,4
14	54,4	59,6	0,9	49,6
15	54,4	70,6	0,7	41,9
16	70,2	70,6	0,9	69,8
17	78,1	87,1	0,8	69,9
18	62,3	40,8	1,5	95,1

VII.2 Valores de P, T e das relações P/T e P²/T nos heterozigotos para fenilcetonúria clássica

VII.2.1 Sexo feminino

Número	P	T	P/T	P ² /T
01	146,4	82,7	1,7	258,9
02	138,6	55,0	2,5	349,2
03	187,6	141,5	1,3	248,7
04	151,3	89,1	1,6	256,9

VII.2.2 Sexo masculino

Número	P	T	P/T	P ² /T
01	159,2	116,9	1,3	216,8
02	187,6	94,3	1,9	373,2

Número	P	T	P/T	P ² /T
03	146,4	107,4	1,3	199,5
04	151,3	96,5	1,7	264,6

VII.3 Valores de P, T e das relações P/T e P²/T nos heterozigotos para fenilcetonúria por deficiência de BH2

VII.3.1 Sexo feminino

Número	P	T	P/T	P ² /T
01	102,9	44,5	2,3	237,9
02	164,6	83,8	1,9	323,3
03	123,4	73,3	1,6	207,7

VII.3.2 Sexo masculino

Número	P	T	P/T	P ² /T
01	174,9	112,6	1,5	271,6
02	169,7	78,6	2,1	366,3
03	154,3	120,5	1,2	197,5