

# Adolescentes e Adultos Fenilcetonúricos: Alterações da Substância Branca Cerebral, Níveis de Fenilalanina e Análise Mutacional

AGUINALDO CABRAL <sup>(1)</sup> LEONOR BASTOS GOMES <sup>(2)</sup> ISABEL RIVERA <sup>(3)</sup>, TERESA TASSO <sup>(1)</sup>, FILOMENA EUSÉBIO <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Unidade de Doenças Metabólicas. Serviço de Pediatria. Hospital de Santa Maria. Lisboa

<sup>(2)</sup> Serviço de Radiologia. Hospital de Santa Maria. Lisboa

<sup>(3)</sup> Centro de Metabolismos e Genética. Faculdade de Farmácia de Lisboa

## Resumo

São apresentados 22 doentes PKU, 10 do sexo masculino, 12 do feminino, com idades entre 10-41 A (média: 19,7), com diagnóstico e início da dieta tardios. A maioria (20/22) continuam com dieta, 85,7% dos quais há mais de 10 anos. As alterações da S. B. cerebral foram frequentes: 80,9% (RM), 47,6% (TAC), assim como a atrofia cortical: 33,3% (RM) e 28,6% (TAC).

Identificadas 65,9% das mutações. Mutações prevalentes: IVS10 (27,6%) no haplotipo 6.7, V388M (17,2%) no haplotipo 1.7.

As alterações da RM mostraram uma relação com significado estatístico com: idade de diagnóstico, idade do início da dieta, Phe no dia da RM, PRA e QI. Sem significado estatístico com: nível de Phe pré-tratamento, nos primeiros 8 anos de vida e no ano precedente à RM, idade, duração da interrupção da dieta, tolerância aos 5 A, qualidade do controlo, duração da dieta e quadro neurológico. Reforça-se a mensagem: diagnóstico e tratamento precoces, dieta toda a vida, níveis plasmáticos de PHe abaixo de 6-6,6 mg./dl., e aprofundamento do estudo mutacional, como contributo essencial para diagnóstico, tratamento e prognóstico correctos.

**Palavras-Chave:** Fenilcetonúria, Terapêutica Dietética, Substância Branca Cerebral, Neuroradiologia, Mutações.

## Summary

22 PKU patients, 10 male and 12 female, are presented, aged between 10 and 41 (mean: 19,7), with late diagnosis and diet. Most of them (20/22) are still on a diet and 85,7% have been on a diet for over 10 years. Changes in brain white matter were frequent: 80,9% (MRI), 47,6% (CAT), cortical atrophy was found in 33,3% (MRI), 28,6% (CAT).

65,9% mutations were identified. Prevalent mutations: IVS10 (27,6%) in the 6.7 haplotype, V388M (17,2%) in the 1.7 haplotype.

MRI changes were significantly correlated with age of diagnosis, age of beginning of diet, level of Phe on the day of MRI, PRA and IQ. No statistically significant with: level of Phe before treatment, in the first 8 years of life and in the year before MRI, age, duration of interruption of diet, tolerance at the age of 5, quality of control, duration of diet, neurological features. The need for early diagnosis and treatment is enhanced, as well as life-long diet, plasma levels of Phe below 6-6,6 mg./dl., and the mutational study in order to contribute to a correct diagnosis, treatment and prognosis.

**Key-Words:** Phenylketonuria, Dietetic Therapy, Cerebral White Matter, Neuroradiology, Mutations.

## Introdução

A Fenilcetonúria (PKU) representa um grupo heterogéneo de doenças autosómicas recessivas, causadas por um grande número de mutações no locus da fenilalanina-hidroxilase (PAH) <sup>(1-5)</sup>.

O rastreio neonatal e o tratamento dietético precoce vieram alterar de modo dramático a evolução e prognóstico dos doentes PKU <sup>(6-8)</sup>, evitando o severo atraso mental e a grave disfunção neurológica, característicos dos pacientes não tratados ou tratados tardiamente <sup>(6-9)</sup>.

A estratégia quanto à duração da dieta e aos valores «permitidos» de fenilalaninémia durante o tratamento sofreu alterações ao longo dos tempos, particularmente profundas na última década <sup>(10)</sup>, como consequência dos inúmeros estudos clínicos e da experimentação animal <sup>(8, 10-13)</sup>.

Entregue para publicação em 12/06/97.

Aceite para publicação em 14/07/97.

O advento das técnicas de neuro-imagem (TAC e RM) nos anos 80 e 90<sup>(6, 11, 13, 14)</sup> revelou importantes anomalias da substância branca (S. B.) cerebral nestes doentes, confirmando os estudos morfológicos dos anos 50 e 60<sup>(15, 16)</sup>, quanto às alterações da estrutura da mielina no cérebro dos doentes mais velhos e não tratados<sup>(15-17)</sup>. Observações posteriores mostraram que essas alterações eram também frequentes nos pacientes tratados, particularmente na adolescência e idade adulta precoce<sup>(6-9, 11, 18-21)</sup>, nos que interrompem a dieta<sup>(13, 18, 22)</sup>, mas igualmente naqueles em que o tratamento se iniciara precocemente<sup>(7, 8, 11, 12, 15, 17, 19, 21-23)</sup>. A natureza e o significado a longo prazo destas alterações da S. B. cerebral são ainda pouco claros<sup>(7, 11, 19, 21)</sup>.

Ainda que nos doentes tratados cedo seja mais rara a doença neurológica significativa, problemas neuropsicológicos novos poderão surgir na adolescência ou idade adulta<sup>(7-9, 19, 20, 24)</sup>, provavelmente relacionados com a qualidade do controlo dietético<sup>(7, 11, 19-21)</sup>.

Desde os anos 70 que se vêm acumulando os argumentos a favor do prolongamento da dieta restritiva para lá da infância, ganhando progressivamente consenso, após 1986, a estratégia da «dieta para toda a vida»<sup>(6, 10, 22)</sup>.

A correlação das alterações da S. B. cerebral com níveis de fenilalaninémia e outros factores tais como: idade, idade do início da dieta, qualidade do controlo dietético, interrupção da dieta e a sua duração, quadro neurológico, QI, mutações específicas, etc... continuam a merecer forte debate devido aos resultados contraditórios, por vezes encontrados<sup>(7, 8, 11-13, 17, 21, 25)</sup>.

É possível que o desenvolvimento tardio de doença neuropsicológica e das lesões mais graves da S. B. possam estar ligados, também, a factores genéticos específicos<sup>(1, 4, 5, 9)</sup> com relação directa entre genotipo e fenotipo<sup>(1, 3, 19)</sup>. Sabe-se que cada mutação do gene da PAH tem um efeito quantitativo particular sobre a actividade enzimática<sup>(1-3, 9, 26)</sup>.

A análise mutacional dos doentes PKU perfila-se como um valioso contributo para o diagnóstico preciso da hiperfenilalaninémia neonatal, permitindo estabelecer o plano terapêutico mais correcto e conhecer o prognóstico<sup>(1-5, 26)</sup>.

Com o objectivo de analisar a relação entre as alterações da S. B. cerebral e os diferentes factores referidos foram estudados 22 adolescentes e adultos PKU, em tratamento na Unidade de Doenças Metabólicas do Serviço de Pediatria do Hospital de Santa Maria (Lisboa).

### Doentes Estudados

Foram estudados 22 doentes, 10 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, todos de raça caucasiana, com idades compreendidas entre os 10 e os 41 anos (média: 19,7).

Em metade das famílias verificou-se a existência de deficiência mental noutros elementos do agregado, e consanguinidade em 3 casos. Apenas 2 doentes tiveram acesso ao rastreio neonatal. A idade do diagnóstico foi, consequentemente muito variável: um doente com menos de 1 mês de idade, 7 entre 1 M-12 M, 9 entre 12 e 48 M e 5 acima dos 48 M de vida.

Os doentes foram, de acordo com critérios internacionalmente aceites<sup>(7, 43)</sup>, classificados nos seguintes fenotipos: 16 Fenilcetonúrias Clássicas, 4 Moderadas e 2 Ligeiras.

O tratamento teve início em idades muito diversas, coincidentes com a idade do diagnóstico. Uma doente (diagnóstico aos 39 anos) nunca iniciou tratamento dietético.

Os regimes alimentares instituídos variaram muito ao longo dos tempos, consoante as disponibilidades terapêuticas existentes. Até 1981 utilizou-se exclusivamente hidrolizados de caseína, após essa data iniciou-se o emprego de misturas de amino-ácidos isentas de Phe a que se juntou, após 1989, o uso sistemático de alimentos hipoproteicos apropriados<sup>(27)</sup>.

O tratamento dietético foi cumprido por longo período: entre 10 e 15 anos em 6 casos, entre 15 e 20 anos em 7, e por mais de 20 anos em 5 doentes. Apenas 3 indivíduos tiveram uma duração do tratamento inferior a uma década.

Interromperam a dieta, por iniciativa própria, 4 doentes, 3 dos quais temporariamente. A duração da interrupção foi respectivamente: 18,5 anos (interrupção definitiva), 12 anos, 11 anos e 11 meses.

Durante a sua evolução 17 doentes foram escolarizáveis: 3 frequentaram o ensino primário, 14 o secundário. Seis indivíduos tiveram acesso a algum tipo de ocupação (emprego). Duas mulheres com idade actual de 29 e 41 anos constituíram família, tendo tido a mais velha (diagnóstico aos 39 anos) um filho, actualmente com 6 anos de idade, com atraso psicomotor e da linguagem.

### Métodos

A avaliação clinico-laboratorial, neuropsicológica e cognitiva foi feita segundo Protocolo da Unidade de Doenças Metabólicas, já anteriormente descrito<sup>(27)</sup>. A determinação dos níveis de fenilalaninémia foi executada, até 1985, por cromatografia monodimensional em papel<sup>(28)</sup>, e por High Performance Liquid Chromatography (HPLC)<sup>(29)</sup>, após essa data.

Foi calculada a média dos níveis plasmáticos de Phe nos primeiros 8 anos de vida e no ano precedente à realização do exame neuroradiológico, e registado o valor da fenilalaninémia no exacto dia do referido exame, assim como o nível pré-tratamento e, quando possível, a tole-

rância alimentar aos 5 anos de idade. A qualidade do controlo dietético, de acordo com os critérios terapêuticos seguidos pela Unidade <sup>(27)</sup>, foi avaliada em Boa, Satisfatória e Má. Vinte e um pacientes foram sujeitos a estudos de neuro-imagem (TAC e/ ou RM craneoencefálicos); vinte indivíduos realizaram ambas as técnicas. As TAC foram feitas sem contraste endovenoso, com equipamento Philips-TOMOSCAN 350 e TOMOSCAN LX, utilizando-se incidência axial com planos de 5-6 mm. de espessura, para apreciação da fossa posterior, e de 9-10 mm. para avaliação supratentorial. As RM foram realizadas com equipamento de 0,5 T (TOSHIBA) e de 1,5 T (G. E.). Utilizou-se em todos os doentes ponderações em DP e T2 em incidência axial, e ponderação T1 em incidência coronal. Em alguns pacientes foram realizados planos coronais em DP e T2.

As lesões da S. B. cerebral encontradas foram classificadas segundo os seguintes critérios: grau 0 (sem alteração, exame normal), grau 1 (alteração profunda da S. B. cerebral na região parieto-occipital), grau 2 (lesão anterior mais extensão à S. B. frontal) e grau 3 (lesões anteriores mais alterações da S. B. da transição cortico-subcortical).

O DNA genómico dos doentes foi preparado a partir de sangue periférico de acordo com métodos estandardizados. Os diferentes exões e respectivas zonas intrónicas adjacentes foram previamente amplificados por PCR, como descrito anteriormente <sup>(30)</sup>. Para a detecção de mutações já conhecidas recorreu-se a ensaios de digestão enzimática, utilizando sítios de restrição, quer naturais quer criados artificialmente por PCR. A pesquisa de novas mutações, como a confirmação das anteriores, foi realizada por sequenciação directa dos produtos da PCR por métodos enzimáticos <sup>(31)</sup>. A análise dos haplotipos foi efectuada por identificação de sete polimorfismos dialélicos: BgIII, PVuIIa, PVuIIb, Eco RI, MspI, XmnI, Eco RV, e por um sistema de VNTR (variable number of tandem repeats) em HindIII. Para a detecção dos polimorfismos em EcoRI e EcoRV utilizou-se a técnica de Southern blotting, em que a sonda de DNA «full-length», ph PAH247, foi marcada radioactivamente com [32P] dCTP, usando o método de «random priming» e hibridada segundo condições anteriormente propostas <sup>(32)</sup>. Os restantes polimorfismos intragénicos foram identificados por PCR seguido de digestão enzimática. A análise do sistema de VNTR em HindIII foi efectuada de acordo com Goltsov <sup>(33)</sup>.

Os haplotipos foram numerados segundo nomenclatura de Woo e Einsensmith <sup>(34,35)</sup>. A actividade enzimática residual previsível in vitro, PRA, foi calculada achando a média aritmética das actividades enzimáticas de ambos os alelos mutantes <sup>(26)</sup>.

A análise estatística da relação entre as alterações da S. B. cerebral, evidenciadas na RM craneoencefálica, e:

idade do diagnóstico, idade do início da dieta, qualidade do controlo dietético, fenotipo clínico, idade actual, nível de Phe nos primeiros 8 anos de vida, no ano precedente e no próprio dia da RM, duração da dieta, interrupção da dieta e a sua duração, quadro neurológico, QI, mutações e PRA foi feita utilizando o Teste Paramétrico ANOVA de Modelo I, análise de variância de efeitos fixos, e ainda o equivalente não paramétrico de coeficiente de correlação de Pearson, o coeficiente de correlação de Spearman, com 91% da eficiência daquele <sup>(36)</sup>.

## Resultados

Foram estudados 22 doentes PKU, adolescentes ou adultos, em que o fenotipo clínico predominante foi a Fenilcetonúria Clássica: 16/22 (72,7%).

A idade do diagnóstico e do início do tratamento foi tardia, isto é acima do mês de vida, respectivamente em 21/22 pacientes (95,5%) e 20/21 (95,2%). Uma doente nunca iniciou dieta, e 4 interromperam o tratamento, um definitivamente. A duração da interrupção foi de 18,5 anos, 12 anos, 11 anos e 11 meses.

Dezoito indivíduos (85,7%) têm actualmente mais de 10 anos de tratamento, cinco dos quais (23,8%) mais de duas décadas.

O nível de fenilalaninémia pré-tratamento, o valor médio nos primeiros 8 anos de vida, no ano precedente à realização do estudo neuroradiológico, e o nível do exacto dia do exame, constam do Quadro I.

**QUADRO I**  
Níveis de Fenilalaninémia (mg/dl)

		• PRÉ-TRATAMENTO			• PRIMEIROS ANOS DE VIDA					
Phe	n	≥6-15	≥15-20	≥20	<6	≥6-10	≥10-12	≥12-15	≥15	ND
		2	4	16	0	5	7	3	4	3
		• ANO PRECEDENTE À RM								
Phe	n	<6	≥6-10	≥10-12	≥12-15	≥15	ND			
		1	3	5	3	7	2			
		• DIA DA RM								
Phe	n	<6	≥6-10	≥10-12	≥12-15	≥15	ND			
		2	6	4	6	2	1			

A tolerância alimentar (mg Phe/Kg/dia), calculada aos 5 anos de idade, foi determinada com rigor apenas em 10 doentes: inferior a 20 mg./Kg. em 2 casos, 20-25 mg/Kg em 6, e superior a 25 mg./Kg. em 2 doentes; 2 indivíduos iniciaram tratamento em idades posteriores, e num caso nunca foi iniciado.

A qualidade do controlo dietético foi considerada Boa em 7/21 doentes (33,3%), Satisfatória em 6/21 (28,6%) e Má em 8/21 (38%).

Doze indivíduos (54,5%) apresentaram à data do estudo um  $QI \geq 80$  (um dos quais acima de 120), 5 (22,7%) um  $QI \geq 50-80$  e outros 5 abaixo de 50. Dezassete doentes (77,3%) foram escolarizáveis, e seis (27,3%) conseguiram assegurar algum tipo de emprego.

As manifestações neuropsicológicas (tremor, hiper-reflexia, convulsões, alterações da marcha, ansiedade e alterações da personalidade) estavam presentes em 9 doentes (40,9%).

Vinte e um doentes foram sujeitos a TAC craneoencefálica e 21 a RM, 20 pacientes realizaram ambas as técnicas. As lesões encontradas estão referidas no Quadro II. De destacar que 10/21 doentes (47,6%) tinham alterações da S. B. na TAC, e 17/21 (80,9%) na RM; as lesões mais graves (grau 2 e 3) foram encontradas em 38% na TAC e em 52,4% na RM. Também a atrofia cortical foi melhor identificada na RM (33,3%) do que na TAC (28,6%).

A análise mutacional e dos haplotipos permitiu o conhecimento do genótipo completo em 10 casos (45,5%), incompleto em 9, desconhecido em 3 indivíduos (13,6%). As mutações identificadas, os haplotipos e a PRA estão referidos no Quadro III. Apenas 29/44 mutações foram identificadas (65,9%). As mutações prevalentes foram: IVS10 (27,6%) no haplotipo 6.7; V388M (17,2%) no haplotipo 1.7; R408W, R261Q, R252W, P281L e L311P (6,9%) nos haplotipos 1.8 e 3.8.

Nos doentes com genótipo completo foi possível calcular a PRA em 9 indivíduos, verificando-se uma correlação PRA/fenótipo, ou seja genótipo/fenótipo em 6 deles. Nestes casos a mutação prevalente foi a IVS10; nas situações discordantes a mutação mais frequente foi a V388M.

A análise estatística da relação entre as lesões da S. B. cerebral (alterações da RM) e os diferentes factores estudados revelou uma relação positiva e significativa com a idade do diagnóstico ( $rs = 0.5459$ ,  $p < 0.05$ ), a idade do início da dieta ( $rs = 0.5169$ ,  $p < 0.05$ ) e uma tendência para relação positiva com o nível de Phe no dia da RM ( $rs = 0.4205$ ,  $p = 0.0668$ ). Verificou-se uma relação negativa e significativa com a PRA ( $rs = -0.5268$ ,  $p < 0.05$ ) e tendência para relação negativa com o QI ( $rs = -0.4069$ ,  $p = 0.0688$ ). Não se demonstrou associação com o nível de Phe pré-tratamento ( $rs = 0.3552$ , ns), idade actual ( $rs = -0.0822$ , ns), média de Phe nos primeiros 8 anos de vida ( $rs = 0.3496$ , ns) e no ano anterior à RM ( $rs = 0.3739$ , ns), duração da interrupção da dieta ( $rs = 0.2108$ , ns), tolerância aos 5 anos ( $rs = 0.0503$ , ns), qualidade do con-

trolo dietético (F2, 17 = 2.287, ns), duração da dieta (F3, 16 = 1.401, ns) e quadro neurológico (F1, 19 = 0.119, ns).

**QUADRO II**  
Estudos Neuroradiológicos

• TAC-CE					
Lesões (grau)	0	1	2	3	Atrofia Cortical
n	11	2	3	5	6
%	52,4		38		28,6
• RM-CE					
Lesões (grau)	0	1	2	3	Atrofia Cortical
n	4	6	7	4	7
%	19		52,4		33,3

**QUADRO III**  
Estudos Genéticos

N.º	HAPLOTIPO	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS	PRA
1	6.7/1.7	IVS10/V388M	21,5%
2	9.8/1.8	I65T/ ?	até 13%
3	6.7/7.8	IVS10/ ?	?
4	6.7/7.8	IVS10/ ?	?
5	1.7/1.8	V388M/ ?	até 21,5%
6	3.8/3.8	L311P/L311P	0%
7	1.8/1.8	R261Q/R408W	15%
8	1.8/1.8	R261Q/R408W	15%
9	? / ?	R270K/ ?	?
10	1.8/1.8	R252W/ ?	?
11	1.7/4.3	V388M/Y414C	46,5%
12	1.8/1.7	P281L/ ?	?
13	1.8/1.8	? / ?	?
14	1.8/1.8	? / ?	?
15	5.9/4.3	Y198SSde122/R158Q	?
16	1.8/9.8	? /L348V	até 12,5%
17	1.8/6.7	P281L/IVS10	0%
18	6.7/6.7	IVS10/IVS10	0%
19	1.8/1.7	R252W/V388M	21,5%
20	6.7/1.7	IVS10/V388M	21,5%
21	? / ?	IVS10/ ?	?
22	? / ?	? / ?	?

## Discussão

Os doentes PKU apresentados, adolescentes e adultos jovens, foram na sua grande maioria diagnosticados e tratados tardiamente. O rastreio neonatal para a PKU, que se iniciou nos anos 60 na Europa e E. U. A., foi introduzido em Portugal em 1979<sup>(37)</sup>. Actualmente recomenda-se que o diagnóstico e o início da terapêutica sejam feitos nos primeiros 21 dias de vida<sup>(50)</sup>.

Apesar de tardia, a dieta restritiva trouxe evidentes benefícios permitindo melhor inserção socio-familiar e a escolarização da maior parte dos pacientes, de acordo aliás com a experiência anterior da Unidade <sup>(27)</sup>. As capacidades cognitivas, durante os primeiros anos de vida, são menores nos doentes com mais elevados valores de fenilalaninémia <sup>(24)</sup>. Até aos 8-10 anos a relação do QI com os níveis de Phe é fortemente significativa <sup>(9, 15, 24)</sup>. A susceptibilidade do cérebro à hiperfenilalaninémia é maior na infância durante a fase de rápido crescimento e maturação do SNC <sup>(6)</sup>. A relativa estabilidade intelectual após os 10 anos de idade não significa que, na adolescência e idade adulta, não surjam problemas neuropsicológicos novos, por vezes graves, mesmo nos tratados precocemente <sup>(7, 15, 19, 23, 53)</sup>. O risco é maior nos mais velhos, com pior controlo dietético ou nos que interromperam a dieta <sup>(6, 13, 18, 20)</sup>.

Em muitos centros de tratamento europeus e americanos, em pleno anos 90, é comum os adolescentes e adultos estarem com dieta normal ou liberalizada <sup>(9)</sup>. Nunca foi essa a estratégia da Unidade <sup>(27)</sup> que nunca defendeu a interrupção da dieta. Apesar disso, 4 pacientes pararam, por iniciativa própria, o tratamento, 3 temporariamente e apenas 1 definitivamente. A maioria dos doentes (20/22) continuam há longos anos com dieta, 85,7% dos quais há mais de dez anos. Sabe-se que a cessação da dieta pode acarretar, com a idade, deterioração neurológica e disfunção cognitiva e emocional <sup>(6, 20, 47, 48)</sup>. As alterações do neurónio motor superior são comuns <sup>(6, 8, 9)</sup>. Nove doentes (40,9%) apresentaram perturbações neuropsicológicas significativas, 2 deles por interrupção longa da dieta, sete por mau controlo dietético.

A incidência de lesões da S. B. cerebral foi elevada, particularmente quando se utilizou a RM craneoencefálica (80,9%); essas alterações, assim como a atrofia cortical, foram melhor detectadas na RM do que na TAC, comprovando-se ser o método mais sensível no estudo da S. B. <sup>(6, 11, 18, 27)</sup>. Os estudos clínicos, neuropatológicos, bioquímicos, radiológicos e experimentais apontam para a existência de anomalias da mielina nos doentes não tratados ou tratados tardiamente mas também, por vezes, em indivíduos tratados precoce e correctamente sem deterioração neurológica ou mental <sup>(6-9, 11-13, 15-23, 27, 45)</sup>. As alterações são significativamente menos frequentes nas crianças, sujeitas a mais apertado controlo dietético, do que nos adolescentes <sup>(7, 19)</sup>, possivelmente devido à liberalização ou interrupção da dieta após os 8-10 anos, ou ao deficiente cumprimento do tratamento tão comum nestas idades. Num estudo sobre mais de 200 adolescentes e adultos PKU verificou-se que quase todos apresentavam anomalias da S. B. cerebral <sup>(25, 27)</sup>. As alterações correspondentes na RM são, pois, muito frequentes <sup>(8, 11, 21, 25, 27)</sup>.

A atrofia cerebral moderada é também relativamente comum, inclusivé em doentes bem controlados e tratados precocemente <sup>(9, 27)</sup>; a sua incidência pode ascender aos 50% <sup>(45)</sup>. No nosso estudo a incidência de atrofia cortical foi de 28,6% (TAC) e 33,3% (RM).

As lesões da S. B. são geralmente simétricas, raramente focais, periventriculares, especialmente na região parieto-occipital e peritrigonal <sup>(9, 11, 13, 18, 19, 21-23)</sup>. Nos casos mais graves as lesões podem estender-se à S. B. frontal e subcortical, corpo caloso e fibras de associação, ou mesmo à cápsula interna, pedúnculos e tronco cerebral, cerebelo e tálamo <sup>(11, 45)</sup>. RM normais existem predominantemente em doentes com fenilalaninémias abaixo de 360  $\mu\text{M}$  (6 mg/dl) <sup>(9, 11, 13, 19)</sup>. Valores persistentemente superiores influenciam negativamente as funções executivas de animais e crianças jovens com deficiência de PAH <sup>(44)</sup>. À medida que os níveis aumentam o conteúdo de água na S.B. do cérebro, com possível tradução na RM <sup>(6, 8, 11, 18, 19, 44, 46)</sup>. Níveis constantes acima de 700  $\mu\text{M}$  (11,6 mg/dl) provocam alterações na RM em quase todos os pacientes, mesmo tratados precocemente <sup>(44)</sup>.

Por toda estas razões, os valores de fenilalaninémia permitidos durante a terapêutica foram variando ao longo dos tempos, baixando progressivamente <sup>(10, 50, 51)</sup>. Níveis entre 6 e 10 mg/dl, considerados até há poucos anos bons indicadores de tratamento correcto, deixaram de o ser <sup>(46)</sup>. Na nossa Unidade o valor máximo permitido aos **adolescentes** foi de 19,8 mg/dl, depois 15 mg/dl em meados da década de 80, e 6mg/dl durante toda a vida, após 1993 <sup>(27, 50-52)</sup>.

A análise do Quadro I mostra que, mesmo tendo em conta as diferentes estratégias seguidas, alguns doentes apresentaram valores elevados de Phe, quer nos primeiros anos de vida, quer no ano precedente e no dia do exame neuroradiológico. É visível, contudo, a tendência para uma melhoria do controlo bioquímico, fruto do reforço da consciencialização dos doentes e familiares, após a radical mudança do tratamento da PKU proposta pelo European Society for PKU, em 1993 <sup>(51)</sup>.

A importância da exposição crónica ou recente a elevadas hiperfenilalaninémias continua em debate, a primeira talvez mais ligada à severidade da atrofia cerebral, a segunda à severidade das lesões da S.B. cerebral <sup>(13, 44, 45)</sup>.

No presente trabalho observou-se uma relação estatisticamente significativa entre as alterações da RM e a idade do diagnóstico e a idade do início da dieta, mostrando que quanto mais tardios foram esses eventos e mais longo o período de exposição a altos valores de Phe, mais frequentes e graves foram as alterações da S.B. cerebral. Sugere-se ainda uma relação directa com os níveis plasmáticos de Phe no dia da RM (exposição recente). Este parâmetro parece de grande importância na definição das lesões da S.B. <sup>(8, 11, 13, 22, 44, 45)</sup>, apontando

para uma desmielinização não permanente<sup>(25, 44, 45)</sup>. Assim se compreende a reversibilidade, pelo menos parcial, das lesões da S.B. e do quadro neurológico com a reintrodução da dieta restritiva rigorosa<sup>(6, 8, 9, 12, 20, 22, 25, 44, 45)</sup>, ou o achado de alterações discretas a moderadas da S. B. em doentes tratados tarde, com maior ou menor atraso mental e manifestações neurológicas significativas, mas com bom nível de Phe na altura da RM<sup>(11, 44, 45)</sup>. Estavam nessa situação, uma rapariga com diagnóstico aos 7 M, com QI de 80, hiper-reflexia, tremor, distonia e RM normal, e outra doente com diagnóstico aos 72 M, QI de 45, convulsões, hiper-reflexia, anomalias da marcha e discretas anomalias na RM.

As lesões mais severas encontram-se particularmente associadas a níveis recentes de Phe superiores a 15 e 20 mg/dl<sup>(11, 13, 23, 25)</sup>.

Não se demonstrou associação significativa entre as alterações da RM e os valores médios da fenilalaninémia nos primeiros 8 anos de vida e no ano precedente à RM, assim como com a duração da dieta, duração da interrupção da dieta e qualidade do controlo dietético, em concordância, aliás, com outros autores<sup>(7-9, 18)</sup>. A interrupção da dieta e sua duração não foram fundamentais neste trabalho, dado o pequeno número de doentes que interromperam o tratamento, apenas quatro. Contudo, é de assinalar que 2 desses pacientes apresentaram as lesões mais severas: uma rapariga com diagnóstico no primeiro mês de vida, dieta até aos 8 M e depois entre os 6 e 9 anos, seguido de interrupção definitiva com lesões do grau 2, e outra doente com diagnóstico aos 4 anos, dieta até aos 7, retomada depois dos 18 anos, com lesões do grau 3.

Não se verificou relação significativa com o nível de Phe pré-tratamento e a tolerância alimentar aos 5 anos, parâmetros que parecem relevantes na classificação fenotípica das hiperfenilalaninémias<sup>(2, 7, 43)</sup>. O valor inicial de Phe não é, contudo, seguro nessa diferenciação, particularmente, entre as PKU e as Hiperfenilalaninémias Moderadas<sup>(2, 43)</sup>. A tolerância alimentar aos 5 anos, difícil de calcular com rigor nos doentes mais antigos não contempla, por outro lado, a evolução dos critérios terapêuticos nas diferentes épocas.

Não se revelou significativa a relação das alterações da RM com o quadro neurológico. Apesar da sua frequência, as anomalias da S.B. nem sempre se acompanham de sintomas neurológicos evidentes<sup>(8, 9, 18, 23, 45)</sup> e apenas em casos muito severos com fenilalaninémias persistentemente acima de 20 mg/dl, a deterioração neurológica pode ser irreversível<sup>(7, 8, 23)</sup>.

Quanto à relação com o QI é sugerida uma associação negativa, como a apontada por outros autores<sup>(8, 18)</sup>, ou seja os indivíduos com lesões mais graves da S.B. têm tendência para terem valores de QI mais baixos.

É possível que o desenvolvimento tardio do quadro neuropsicológico e das mais graves alterações da S.B. possam estar ligados a múltiplos factores entre os quais factores genéticos específicos<sup>(1, 4, 5, 9)</sup>, numa relação directa entre genotipo e fenotipo<sup>(1, 3, 4, 9, 19)</sup>.

A variação fenotípica reflecte a multiplicidade de mutações no locus da PAH<sup>(1-5, 43)</sup>. Conhecem-se actualmente mais de 200 mutações no gene da PAH<sup>(3)</sup>. Cada mutação tem um efeito quantitativo particular sobre a actividade enzimática<sup>(1-3, 9, 26)</sup>, com distinto efeito fenotípico, dependente da combinação dos alelos mutantes<sup>(2)</sup>. Algumas mutações levam à completa abolição da actividade enzimática<sup>(3)</sup>, como a IVS10, R408W, L311P, P281L, outras causam sempre hiperfenilalaninémias moderadas qualquer que seja a mutação no segundo adelo<sup>(1, 43)</sup>, e outras ainda poderão exercer uma complementação negativa intra-alelica, como a R261Q<sup>(26)</sup>. Estas mutações ocorreram há muitas centenas ou milhares de anos atrás, difundindo-se depois pelas diferentes populações (founder effect)<sup>(1, 3, 39, 52)</sup>. Numa dada população existem algumas poucas mutações que são prevalentes, e um grande número de outras mais raras<sup>(3)</sup>.

Nos nossos doentes apenas foram identificadas 65,9% das mutações, genotipo completo em 10 pacientes e a PRA em 9 indivíduos. Não foi identificada, até ao momento, qualquer mutação em 3 doentes. Com os métodos actuais de análise é possível, contudo, conhecer mais de 85-90% das mutações<sup>(1)</sup>. As mutações mais frequentes foram a IVS10 no haplotipo 6 e a V388M no haplotipo 1 (Quadro III). A mutação IVS10 no haplotipo 6 é predominante na Europa do Sul<sup>(1, 52)</sup>. A V388M já havia sido referida na população portuguesa por um dos autores (I. R.)<sup>(41)</sup>, mas também nos espanhóis<sup>(40)</sup> e japoneses<sup>(42)</sup>.

A PRA, que representa a média aritmética da actividade enzimática residual dos dois alelos mutantes<sup>(26)</sup>, é um bom preditivo do fenotipo, tratamento e prognóstico<sup>(1, 2, 4, 26)</sup>. Nos 9 doentes com PRA conhecida, verificou-se boa correlação PRA/fenotipo em 6. A relação genotipo/fenotipo, apesar das presentes dificuldades, tem sido descrita<sup>(1, 3-5, 9, 19)</sup>. Verificou-se nos doentes apresentados uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as alterações da RM e a PRA, isto é quanto menor for a actividade enzimática da PAH, mais frequentes e graves as alterações da S.B. cerebral.

A análise mutacional traz evidentes vantagens, podendo contribuir para o diagnóstico rigoroso e precoce das hiperfenilalaninémias neonatais, com decisivas implicações no tratamento e prognóstico<sup>(1, 2, 4, 5, 43)</sup>.

Outros factores bioquímicos e genéticos estarão, certamente, envolvidos na severidade do quadro clínico<sup>(1, 9, 11, 19)</sup>.

Persistem muitas incógnitas quanto ao prognóstico dos adolescentes e adultos PKU<sup>(9)</sup>. A Fenilcetonúria será, segu-

ramente, uma das primeiras candidatas à terapia génica somática<sup>(49)</sup>.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. The Hyperphenylalaninemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic Molecular Bases Inherited Dis*. Seven edition. McGraw-Hill, 1995: 1015-75.
2. Guldberg P, Levy HL, Koch R, Berlin JrCM, François B, Henriksen KF, Guttler F. Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency. Inheritance and Expression of the hyperphenylalaninaemias. *J Inher Metab Dis* 1994; 17: 645-51.
3. Guttler F, Guldberg P. The influence of mutations in enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155: S6-S10.
4. Okano Y, Eisensmith RC, Guttler F, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dosovich M, Wang T, Henriksen K, Lou H, Woo SLC. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl Med* 1991; 324: (18): 1232-8.
5. Svensson E, vonDöbeln U, Eisensmith RC, Hagenfeldt L, Woo SLC. Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninemia patients. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 132-9.
6. Thompson AJ, Smith I, Brenton D, Youl BD, Rylance G, Davidson DC, Kendall B, Lees AJ. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1990; 336: 602-5.
7. Toft PB, Lou HC, Krägeloh-Mann I, Andresen J, Guttler F, Guldberg P, Henriksen O. Brain Magnetic Resonance imaging in children with optimally controlled hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis* 1994; 17: 575-83.
8. Thompson AJ, Tillotson S, Smith I, Kendall B, Moore SG, Brenton DP. Brain MRI changes in phenylketonuric-associations with dietary status. *Brain* 1993; 116: 811-21.
9. Walter JH, Tyfield LA, Holton JB, Johnson C. Biochemical control, genetic analysis and magnetic resonance imaging in patients with Phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 822-7.
10. Endres W. The reasons for a "Diet-For-life". *Eur PKU News* 1996; 10 (2): 5-8.
11. Bick U, Ullrich K, Stöber U, Möller H, Schuierer G, Ludolph AC, Oberwittler C, Weglage J, Wendel U. White matter abnormalities in patients with treated hyperphenylalaninaemia: magnetic resonance relaxometry and proton spectroscopy findings. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 1012-20.
12. Weglage J, Schuierer G, Kurlmann G, Bick R, Ullrich K. Different degrees of white matter abnormalities in untreated phenylketonurics: findings in magnetic resonance imaging. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 1047-8.
13. Lenzi V, Trasimeni G, Gualdi GF, Antonozzi I. Biochemical, clinical and neuroradiological (MRI) correlations on late-detected PKU patients. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 624-34.
14. Behbehani AW. Cranial computerized tomography in Phenylketonuria. *Neuropediatrics* 1981; 12: 4: 295-302.
15. Smith I, Beasley MG, Ades AE. Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990; 65: 311-6.
16. Malamud N. Neuropathology of phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1966; 25: 254-68.
17. Levy HL, Lobbregt D, Barnes PD, Poussaint TY. Maternal phenylketonuria: magnetic resonance imaging of the brain in offspring. *J Pediatr* 1996; 128: 6: 770-5.
18. Bick U, Fahrenndorf G, Ludolph AC, Vassallo P, Weglage J, Ullrich K. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 185-8.
19. Lou HC, Toft PB, Andresen J, Mikkelsen I, Olsen B, Guttler F, Wieslander S, Henriksen O. An occipito-temporal syndrome in Adolescents with optimally controlled hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 687-95.
20. McCombe PA, McLanghlin DB, Chalk JB, Brown NN, McGill JJ, Pender MP. Spasticity and white matter abnormalities in adult phenylketonuria. *J Neurol Neuros Psych* 1992; 55: 359-61.
21. Pietz J, Meyding-Lamadé UK, Schmidt H. Magnetic Resonance imaging of the brain in adolescents with phenylketonuria and in one case of 6-pyruvoyltetrahydropteridine synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; S69-S73.
22. Cleary MA, Walter JH, Wraith JE, White F, Tyler K, Jenkins JPR. Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change. *J Pediatr* 1995; 127: 2: 251-5.
23. Thompson AJ, Smith I, Kendall BE, Youl BD, Brenton D. Magnetic resonance imaging changes in early treated patients with phenylketonuria. *Lancet* 1991; 337: 1224.
24. Smith I, Beasley MG, Ades AE. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990; 65: 472-8.
25. Ullrich K, Weglage J, Schuierer G, Fünders B, Pietsch M, Koch HG, Hahn-Ullrich H. Cranial MRI in PKU: evaluation of a critical threshold for blood phenylalanine. *Neuropediatrics* 1994; 25: 278-9.
26. Burgard P, Rupp A, Konecki DS, Trefz FK, Schmidt H, Lichter-Konecki U. Phenylalanine hydroxylase genotypes, predicted residual enzyme activity and phenotyping parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; S11-S15.
27. Cabral A, Portela R, Tasso T, Eusébio F, Celeste MFM, Almeida IT, Silveira C. Tratamento de crianças Fenilcetonúricas (27 anos de experiência do Serviço de Pediatria do HSM). *Rev Port Pediatr* 1993; 24: 55-9.
28. Silveira C, Fernandes MCF. Aminoacidopatias-perspectivas analíticas para a sua detecção. *Rev Port Farm* 1978; 28: 181-9.
29. Almeida IT, Leandro PP, Rivera IC, Silveira C, Duran M, Wadman SK. Development of methodology by reversed-phase high performance liquid chromatography applicable to the differential diagnosis of aminoacidopathies. *AminoAcid Analogues*. 2nd International Congress. Viena, Austria, 1991.
30. Leandro P, Rivera I, Ribeiro V, Almeida IT, Lechner MC. Mutation analysis in South and Central Portugal: prevalence of V388M mutation. *Hum Mut* 1995; 6: 192-4.
31. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 75: 5463-7.
32. Chuerch GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1991-5.
33. Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC. Association between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 627-36.
34. Woo SLC. Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 781-3.
35. Eisensmith RC, Woo SLC. Update listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet* 1988; 51: 1445-8.
36. Zar JH. Biostatistical Analysis. *Prentice-Hall* (2nd ed.). International Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 1984; 176-9.
37. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce-Centro de Diagnóstico Pré-natal. Relatório de Actividades em 1988. Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães (Porto), 1988: 34.
38. Scriver CR. Science, medicine and phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 11-8.
39. Eisensmith RC, Woo SLC. Population genetics of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 19-26.
40. Pérez B, Desviat LR, DeLucca M, Ugarte M. Spectrum and origin of phenylketonuric mutations in Spain. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407:34-6.
41. Rivera I, Leandro P, Vilarinho L, Tavares Almeida I, Lechner MC. Screening of V388M PKU mutation in Portugal. *Symposium on Phenylketonuria: Past, present and future*. Elsingare, Denmark, 1994.
42. Takahashi K, Kure S, Matsubara Y, Narisawa K. Novel phenylketonuria mutation detected by analysis of ectopically transcribed phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblast. *Lancet* 1992; 340: 1473-5.
43. Guttler F, Guldberg P. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 49-56.
44. Smith I. Treatment of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 60-5.
45. Ullrich K, Möller H, Weglage J, Schuierer G, Bick U, Ludolph A, Koch HG. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 78-82.

46. Diamond A. Phenylalanine levels of 6-10 mg/dl may not be as benign as once thought. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 89-91.
47. Levy HL, Waisbren SE. PKU adolescents: rationale and psychosocial factors in diet continuation. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 92-7.
48. Waisbren SE, Brown MJ, Sonnevile LMJ, Levy HL. Review of neuropsychological functioning in treated phenylketonuria: an information processing approach. *Acta Paediatr* 1994; 407: 98-103.
49. Eisensmith RC, Woo SLC. Gene therapy for phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 124-9.
50. Smith I. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. *Arch Dis Childhood* 1993; 68: 426-7.
51. Güttler F. Minutes of The Annual Meeting of The Scientific Committee of E.S.PKU. Kiekrz. Poznan. Poland, October 1992.
52. Scriver CR. Whatever happened to PKU? *Clinical Biochemistry* 1995; 28: 2: 137-44.
53. Zetterström R. Editorial Comment on Phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1995; 84: 716-8.

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS:

- PKU: Fenilcetonúria/Phenylketonuria;  
PAH: Fenilalanina-hidroxilase/Phenylalanine hydroxylase;  
Phe: Fenilalanina/Phenylalanine  
S.B.: Substância Branca/White Matter  
PRA: Actividade enzimática residual previsível in vitro/Predicted in vitro residual enzyme activity

*Correspondência:* Aguinaldo Cabral  
Serviço de Pediatria  
Hospital de Santa Maria  
Av. Prof. Egas Moniz  
1699 Lisboa Codex