

VIII SEMINÁRIO

Tema: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS DA FENILCETONÚRIA

Subtemas:

- Fenilalanina hidroxilase/biopterina
- Repercursos bioquímicos da hiperfenilalaninémia e fenilcetonúria
- Fenilcetonúria clássica

Intervenientes

- Docentes do Instituto de Bioquímica/FML:
 - Doutora Carlota Saldanha (Prof.^a Auxiliar)
 - Doutor J. Martins e Silva (Prof. Catedrático.)
 - Docente convidado
 - Dr. Aguinaldo Cabral (Especialista de Pediatria, HSM, Assist. Conv. Pediatria/FML)
-

**FENILALANINA HIDROXILASE/
/BIOPTERINA**

Carlota Saldanha

Após a descrição sumária do catabolismo de fenilalanina é apresentada a acção enzimática da fenilalanina hidroxilase (fenilalanina-4-mono-oxigenase E.C. 1.14.16.1), a função do cofactor tetrahydrobiopterina e as respectivas contribuições na homeostasia da fenilalanina.

Catabolismo da Fenilalanina

Dos vinte L-aminoácidos constituintes das proteínas oito são essenciais, isto é, devem fazer parte da dieta porque o organismo humano não tem capacidade de os sintetizar.

Considerando como exemplo a fenilalanina, obtém-se por hidroxilação deste aminoácido essencial outro não-essencial, a tirosina (Figura 1).

Posteriormente a transformação catabólica da tirosina (Figura 1) conduz à formação de fumarato, de acetato, da glicose “de novo” ou à obtenção de energia. A fenilalanina e a tirosina incluem-

-se no grupo dos aminoácidos cetogênicos e gliconeogênicos. A tirosina, após hidroxilação (Figura 1), pode originar mediadores químicos não proteicos com funções de neurotransmissor, as catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina).

Sequências catabólicas (Figura 2) alternativas à da hidroxilação da fenilalanina, originam compostos fenilcetonúricos (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato e ou fenilacetilglutamina), cujos valores de concentração elevada na urina (fenilcetonúria) contribuem para a suspeita de hiperfenilalaninemia (valores acima do normal de concentração de fenilalanina no plasma).

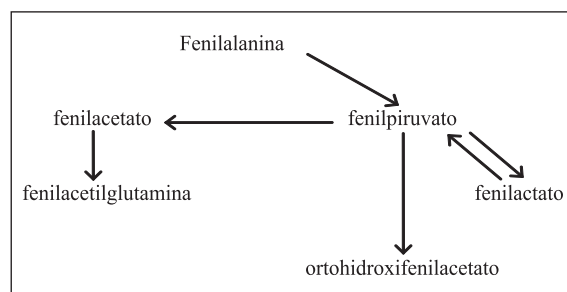


Fig. 2 – Esquema dos derivados cetoácidos obtidos nas vias catabólicas alternativas à hidroxilação da fenilalanina

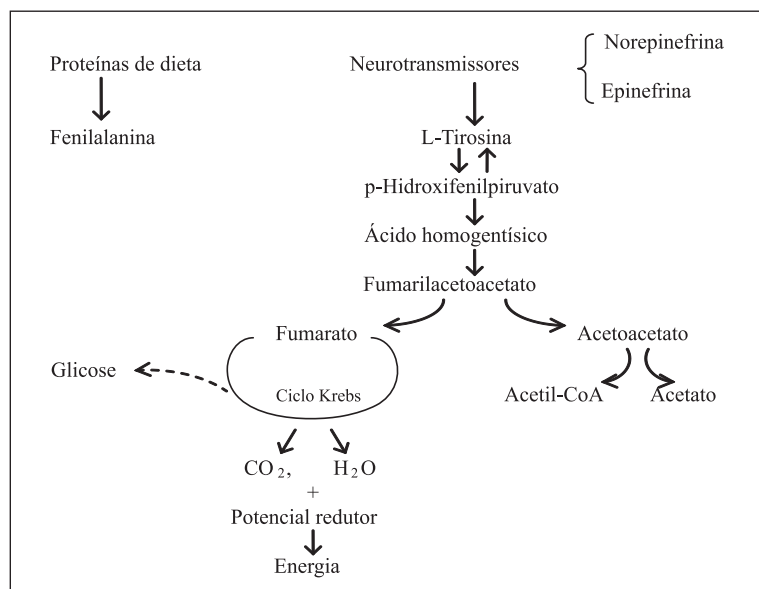


Fig. 1 – Esquema do catabolismo da fenilalanina e da tirosina (aminoácidos cetogénicos e gliconeogénicos).

Hidroxilação da Fenilalanina

A interconversão irreversível do aminoácido essencial fenilalanina no aminoácido (não-essencial) tirosina (Figura 3) ocorre na célula hepática na presença de:

- Fenilalanina hidroxilase (PAH)
- Tetrahidrobiopterina (BH_4)
- Oxigénio (O_2)

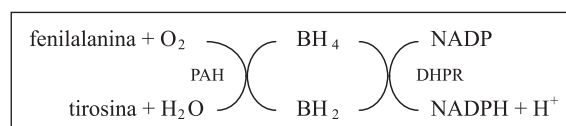


Fig. 3 – Representação esquemática da hidroxilação da fenilalanina.

- Dihidrobiopterina redutase (DHPR)
- Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-reduzido (NADPH)

Para a homeostasia da fenilalanina (manutenção dos valores normais) é necessário:

- Regeneração de BH_4 por redução de dihidrobiopterina (BH_2) formada
- Normal processamento da síntese de BH_4
- Ausência de mutação das enzimas DAH e DHPR e das enzimas intervenientes na síntese de BH_4
- Ausência de actividade deficiente das enzimas PAH e DHPR

A fenilalanina-hidroxilase (fenilalanina-4-monooxigenase, EC. 1.14.16.1; hepatócito humano) é uma metaloenzima (Fe) tetramérica, alostérica, com funções reguladoras, que apresenta cooperatividade para alguns efectores dependentes, ou não, de acção hormonal.

A regulação homotrópica positiva da actividade enzimática da PAH exercida pela fenilalanina (Figura 4) (i) mantém a concentração deste aminoácido essencial em valores fisiológicos, (ii) actua em sinergismo com a fosforilação das subunidades e (iii) induz alterações conformacionais na enzima conducentes a um estado activo.

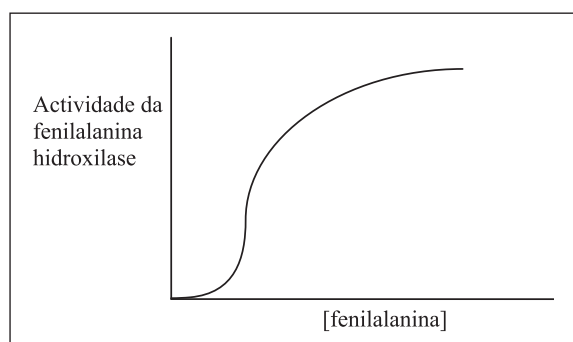


Fig. 4 – Representação do perfil sigmoide da variação da actividade enzimática da fenilalanina hidroxilase em função da concentração de fenilalanina.

Síntese da Tetrahydrobiopterina

O cofactor BH_4 reduz o Fe^{3+} de cada sub-unidade de PAH a Fe^{2+} ; é uma pterina não-conjugada (Figura 5) sintetizada no organismo a partir da hidrólise da guanosina-trifosfato (GTP) pela acção da GTP-ciclohidrolase (enzima regulada, por “feed-back”, pela concentração de BH_4) (Figura 6).

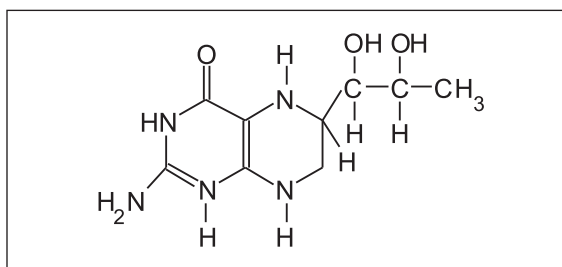


Fig. 5 – Estrutura da tetrahydrobiopterina (BH_4) 2-amino-4-hidroxi-6-(L eritro 1',2'-dihidroxipropil)-tetrahydropteridina.

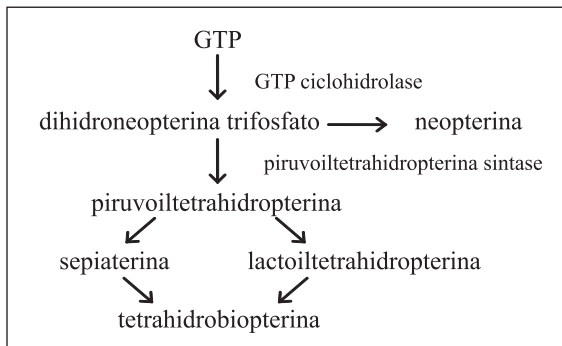


Fig. 6 – Representação em esquema da síntese da tetrahydrobiopterina

A oxidação não enzimática da dihidroneopterina trifosfato origina neopterina aquando do défice de piruviltetrahydropterina-sintase. Como consequência, a ausência de síntese de BH_4 aumenta a concentração de fenilalanina no plasma.

A ocorrência de hiperfenilalaninémia associada à inibição da síntese de BH_4 pode ainda resultar de deficiente acção enzimática da GTP ciclohidrolase; nesta situação não se forma neopterina.

No mecanismo de regeneração de BH_4 a partir de BH_2 , se não existir NADPH e/ou activida-

de catalítica (por mutação) de DHPR há acumulação de fenilalanina plasmática.

A acrescer a estas diferentes situações de hiperfenilalaninémia podem ocorrer alterações na síntese de fenilalanina hidroxilase ou a enzima apresentar actividade enzimática deficiente.

REPERCUSSÕES BIOQUÍMICAS DA HIPERFENILALANINÉMIA E FENILCETONÚRIA

J. Martins e Silva

A fenilalanina é um dos aminoácidos (AA) essenciais e, como tal deverá ser fornecido na dieta alimentar. Havendo deficiência alimentar em fenilalanina (ou qualquer dos outros nove AA essenciais, Quadro I) há balanço azotado negativo, isto é, o total proteico degradado excede o total sintetizado ou alimentar. Em condições normais, há equilíbrio entre o catabolismo e anabolismo proteicos.

Quadro I – Aminoácidos fundamentais (n = 20)

Essenciais (n = 9)	Não essenciais (n = 11)
histidina	alanina
isoleucina	arginina
leucina	asparagina
lisina	aspartato
metionina	cisteína
fenilalanina	glutamato
treonina	glutamina
triptofano	glicina
valina	prolina
	serina
	tirosina

A via catabólica da fenilalanina termina na formação de fumarato (intermediário do ciclo de Krebs) e do acetoacetato (um dos corpos cetónicos). Na primeira etapa, a fenilalanina é convertida em tirosina (também um aminoácido aromático) por uma mono-oxigenase (a fenilalanina-hidroxilase), na presença de oxigénio molecular e um redutor, a tetra-hidropterina. Em situação de deficiência to-

tal ou parcial daquela enzima ou de biopterina, a fenilalanina tende a acumular-se no sangue e em outros líquidos orgânicos, a par da escassa ou nula conversão em tirosina e subseqüentes produtos.

O bloqueio daquela etapa enzimática é detectado na infância. A não conversão da fenilalanina ou tirosina acompanha-se de manifestações clínicas diversas, com destaque para o atraso mental, perturbações neurológicas, descoloração da pele e pêlos, e eczema cutâneo. Estas repercussões clínicas resultam decerto da acumulação no organismo da fenilalanina e dos seus derivados em excesso, e da potencial diminuição dos produtos de degradação da tirosina (Figura 7):

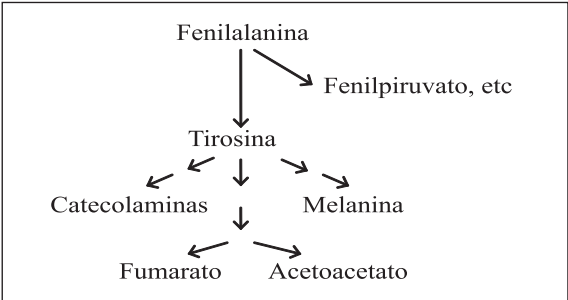


Fig. 7 – Principais derivados metabólicos e catabolismo da fenilalanina

Não está esclarecida a base bioquímica do atraso mental. A gravidade desta situação acentua-se com a demora na administração de uma dieta com baixo teor em fenilalanina. Entre outras causas potenciais o atraso mental poderá ser atribuído a efeitos tóxicos da fenilalanina, ao interferir no transporte e metabolismo de outros aminoácidos aromáticos (por exemplo: tirosina) pelo cérebro. A fenilalanina em excesso é convertida por transaminação em fenilpiruvato (que é uma fenilcetona, que confere a designação à doença) e deste em fenil-lactato, fenilacetato (e fenilacetilglutamina) e o orto-hidroxilfenilacetato (Figura 8).

A eliminação das fenilcetonas em excesso pela urina está na origem do odor característico e (desagradável) a môfo que provém dos doentes e seus pertences.

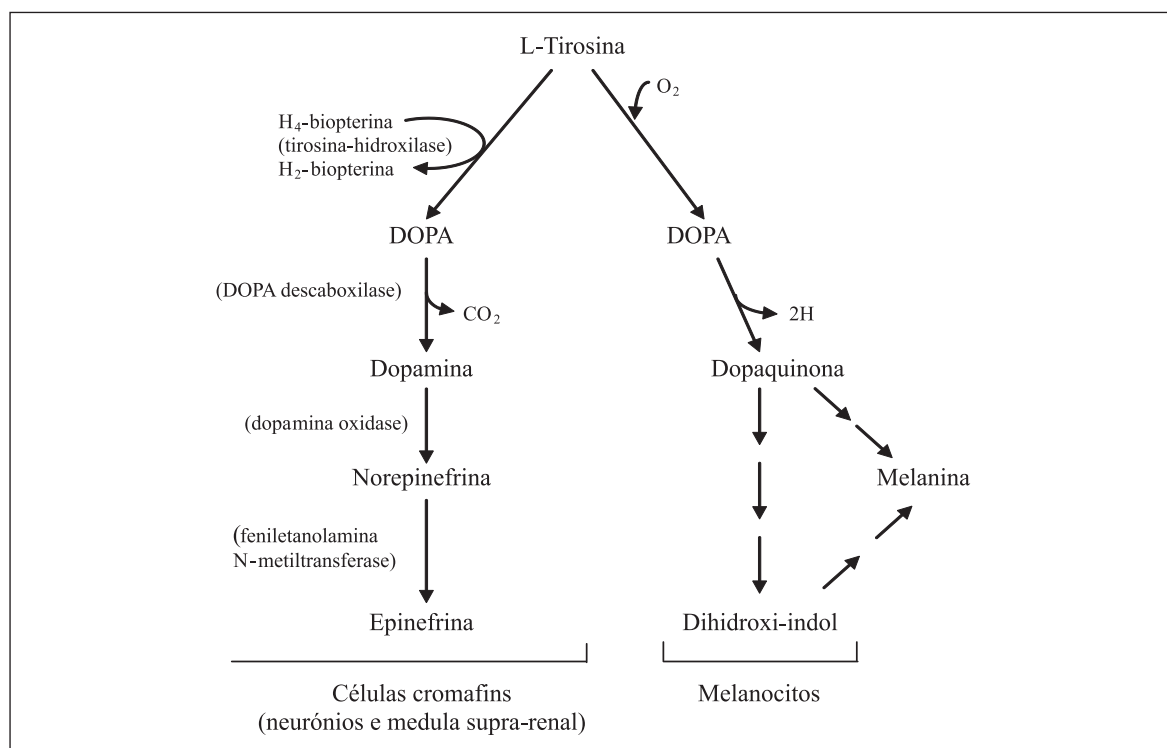


Fig. 8 – Formação das catecolaminas e melanina a partir da L-tirosina

A descoloração dos tegumentos e pêlos está relacionada com a menor formação de melanina. Esta substância é um pigmento negro que se acumula em grânulos nos melanosomas cutâneos (e também nas vísceras). A melanina é o produto final de uma das sequências enzimáticas secundárias da tirosina, iniciada pela respectiva conversão em dopa por uma oxidase. Esta reacção é inibida competitivamente pelo excesso de fenilalanina nos fenilcetonúricos. Em alternativa, a dopa é descarboxilada em dopamina num processo sequencial que conduz à formação das catecolaminas (Figura 8).

FENILCETONÚRIA CLÁSSICA

Aguinaldo Cabral

É apresentada a experiência da Unidade de Doenças Metabólicas (Clínica Universitária de

Pediatria, HSM/FML) em perto de seis dezenas de doentes PKU, diagnosticados e tratados entre 1972 e 1991.

São apresentados muitos casos clínicos, sua evolução ao longo de anos, sua avaliação mental e nutricional.

A fenilcetonúria clássica (PKU) é uma doença metabólica hereditária autossómica recessiva, devida a deficiência da fenilalanina-hidroxilase (PAH) hepática, enzima que catalisa a reacção irreversível fenilalanina (Phe) → tirosina (Tyr), em presença de um cofactor natural, a tetrahydrobiopterina (BH₄). É uma doença do metabolismo dos aminoácidos (AA), concretamente do catabolismo do AA aromático, a fenilalanina, que é essencial para os humanos e está presente em todas as proteínas naturais (4-6% do seu peso). A hidroxilação da Phe em Tyr constitui a via metabólica principal (Fig. 9). A deficiência enzimática determina um bloqueio com acumulação a montante de Phe (hiperfenilalaninémia), e depleção de Tyr a jusante.

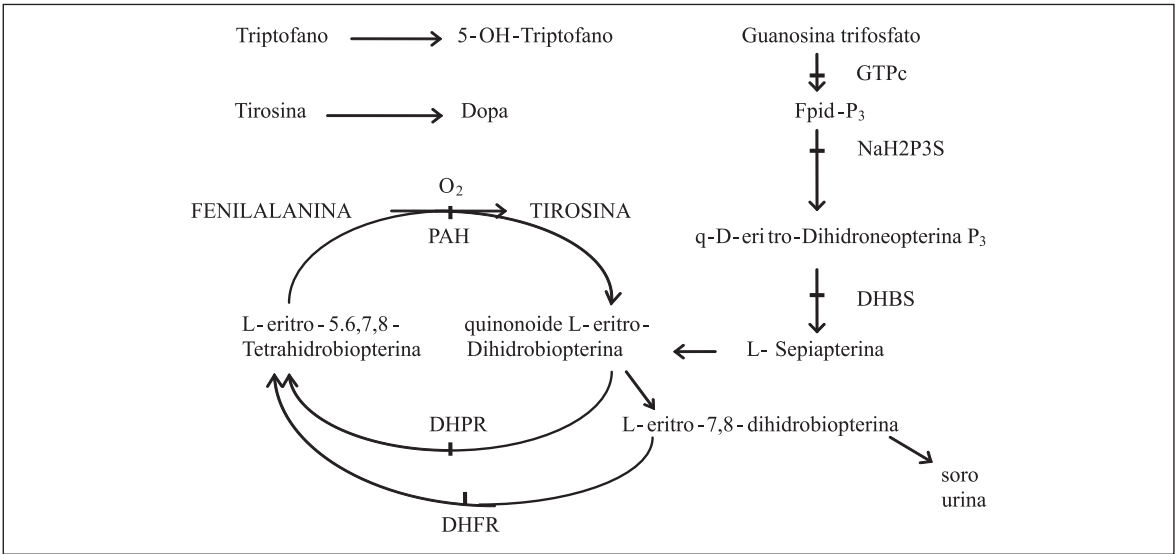


Fig. 9 – Interações metabólicas e derivados da fenilalanina

Contudo, hiperfenilalaninémia não é sinónimo de fenilcetonúria, pois pode ser provocada também por deficiência da síntese e regeneração da BH_4 , doenças hepáticas graves, drogas, excessivo aporte proteico, etc. A BH_4 é simultaneamente cofactor fundamental da hidroxilação da tirosina e do triptofano (Figura 10).

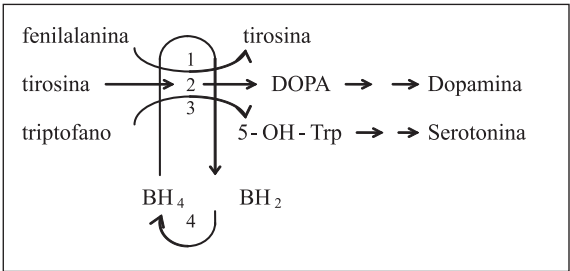


Fig. 10 – Participação das biopterinas na hidroxilação da tirosina e do triptofano.

Diferentes mutações no gene que codifica a PAH explicam os diferentes fenótipos da doença. Na realidade, a deficiência de PAH pode ser mais ou menos profunda, cabendo a definição de PKU clássica ao defeito profundo (<1% da actividade normal) da PAH. Se não for diagnosticada e tratada precocemente a doença origina grave e progressivo atraso mental.

O diagnóstico precoce é possível há várias décadas, estando em marcha técnicas mais simplificadas para detecção de heterozigotos e diagnóstico pré-natal.

A incidência da PKU é aproximadamente de 1/10.000 nascimentos, na Europa. Em Portugal é de 1/15.700.

Notas Históricas

- 1934 Asbjörn Folling: primeiros casos da doença a que chama “oligofrenia fenilpirúvica”.
- 1937 Penrose e Quastel: designação actual de fenilcetonúria.
- 1953 Udenfriend e Cooper: descrição do sistema enzimático da hidroxilação da Phe.
- 1953 Jervis: deficiência de PAH no fígado dos doentes.
- 1951-54 Bickel: dieta restritiva em Phe como tratamento da PKU.
- 1957 Kaufman: BH_4 como cofactor fundamental da PAH.
- 1961-63 Guthrie e Susi: teste de inibição microbiológica na detecção precoce da PKU (entre nós chamado Teste do pezinho).

- 1977-78 Cabalska; Smith: possibilidade de deterioração mental após interrupção da dieta entre 4-8 anos de idade.
- 1978-79 Mabry; Isabel Smith: embrio-fetopatia provocada pela hiperfenilalaninémia nas mães PKU não tratadas.
- 1978-80 Danks; Curtius; Kaufman: hiperfenilalaninémias malignas por deficiência de BH_4 .
- 1986 Woo e cols.: biologia molecular da PKU.
- 1986 Simpósio Internacional (Bruxelas): sugerida a importância da dieta para toda a vida.
- 1986-87 Woo e cols.: correlação entre os haplótipos DNA polimórficos no locus da PAH e os fenótipos clínicos da PKU. Importância para o aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e detecção de heterozigotos.

Em Portugal

- 1975 ML Levy, MJ Feijó, R Portela, H Gonçalves, MT Nunes, V Rebocho, A Guilherme: publicação dos primeiros casos portugueses.
- 1975 Criação da Unidade de Doenças Metabólicas no Serviço de Pediatria no HSM. Unidade pioneira no diagnóstico e tratamento das doenças do metabolismo.
- 1975 Oficialização do Centro de Metabolismo e Genética da Faculdade de Farmácia de Lisboa.
- 1979 Criação do Instituto de Genética Médica (Porto) por Jacinto de Magalhães.
- 1979-80 Introdução em Portugal de misturas de AA isentas de Phe.
- 1981 Implantação do Diagnóstico Precoce (teste do pezinho).
- 1981-83 A Cabral, R Portela, ML Levy, T Tasso, C Formozinho, C Silveira, A Guilherme: primeiro estudo retrospectivo sobre os defeitos da dieta prolongada nas crianças PKU.

- 1988 Introdução em Portugal de produtos hipoproteicos acessíveis aos PKU.
- 1990-91 A Cabral, R Portela, T Tasso, F Eusébio, IT Almeida, PP Leandro, FP Vieira, I Fernandes, C Silveira: primeiros casos de hiperfenilalaninémias malignas diagnosticadas em Portugal.

Patogénese

A deficiência de PAH determina um bloqueio na via metabólica principal do catabolismo da Phe, com acumulação a montante de Phe e seus metabolitos nos fluidos e tecidos orgânicos (incluindo o SNC), e moderada deficiência de Tyr a jusante. A hiperfenilalaninémia persistentemente mantida pode lesar de modo irreversível o cérebro humano, devido às profundas alterações do metabolismo cerebral, extremamente nocivas para este órgão do RN e lactente em curso de crescimento, desenvolvimento e mielinização. A hiperfenilalaninémia inibe a acção da PAH e condiciona, por interacção competitiva nos mecanismos de transporte de aminoácidos através da barreira hematoencefálica, um balanço negativo de determinados aminoácidos (valina, isoleucina, leucina, tirosina, triptofano) ao nível das células nervosas. Como consequência há diminuição da síntese proteica e lipoproteica cerebral, da síntese de neurotransmissores, da arborização dendrítica, da sinaptogénese e da mielinização. A inibição do transporte e entrada no cérebro de Tyr e Trp leva a deficiente síntese de dopamina e serotonina. A Phe e seus metabolitos acumulados (fenilpiruvato, fenil-lactato, fenilacetato, fenilacetil-glutamina, feniletilamina) podem ser detectados no sangue, urina e LCR. O papel patogénico dos referidos metabolitos no SNC ainda se discute. O envolvimento cerebral é seguramente multifactorial, parecendo contudo ser a Phe, *per se*, o “tóxico” principal em causa.

Clínica

Nos doentes **não tratados**, o atraso mental é inevitável (98% terão $QI < 50$), surgindo ainda: alterações graves do comportamento (agitação, agressividade, autismo, psicose), tremor e tiques, alterações do EEG (78-96%), convulsões (37-50%), eczema (25%), microcefalia, atraso de crescimento, hipertonia muscular, odor particular (a bafio, a rato), hipopigmentação da pele, cabelo e olhos.

Nos doentes **diagnosticados e tratados tardiamente**, tal facto não é sempre sinónimo de idiopatia fenilpirúvica, tudo dependendo da idade de início do tratamento, da actividade enzimática residual/ QI inicial e da qualidade do controlo dietético. Os que à partida têm um $QI < 40$, não chegam nunca à escola normal, são atrasados profundos, com personalidade psicótica, autismo gravíssimo, instáveis e agitados. Nestes doentes, a dieta e o apoio médico-psico-pedagógico melhoram apenas (mas importante) o comportamento, o autismo e a comunicação global com o exterior. Os que à partida têm $QI > 40$, vão tendo maiores possibilidades de chegar à escola normal; o tratamento determina progressos importantes (chegando alguns a ter QI normal), manifestando, contudo, frequentemente perturbações psicóticas, alterações da psicomotricidade, atraso da linguagem, ansiedade, dependência. São crianças que necessitam de apoio médico-psico-pedagógico e, por vezes, de apoios mais especializados: ortofónico e de psicomotricidade.

Quanto aos doentes **diagnosticados e tratados precocemente** (com menos de 120 dias de vida), chegam à escola normal e a um desenvolvimento mental normal desde que a dieta seja cumprida correctamente. Contudo, por vezes, sem correlação aparente com o QI , manifestam perturbações da organização temporo-espacial e da psicomotricidade fina, do grafismo e verbal. Têm frequentemente uma personalidade de fundo ansioso, por vezes com sintomas neuróticos; a oralidade pode estar perturbada. Com o tratamento continuado e correcto esta vulnerabilidade psico-afectiva atenua-se.

Os doentes que **interrompem a dieta**, na sua maioria sofrem deterioração intelectual e comportamental e anomalias de EEG, mostrando grande resistência à reintrodução e aceitação do regime, especialmente se o interregno for dilatado.

Deteção Precoce. Diagnóstico

O diagnóstico precoce da PKU é imperativo, um “rastreo” neonatal é pois fundamental. Este existe em Portugal desde 1981, sendo a taxa de cobertura actual de 94%. O “teste do pezinho”, como é conhecido entre nós, é um procedimento essencial na prevenção do atraso mental, por permitir rastrear situações de hiperfenilalaninémia e de hipotiroidismo.

Entre 5.º-10.º dia de vida, colhe-se sangue a **todos** os recém nascidos (RN) para um cartão (Cartão Guthrie), que é enviado para o Instituto de Genética Médica no Porto, onde, por método de inibição microbiológico (Teste de Guthrie), se referenciam os RN com hiperfenilalaninémia ($Phe > 2\text{mg/dL}$). Nestes casos, o teste é repetido e, se novamente positivo, é a criança enviada à nossa Unidade de Doenças Metabólicas (HSM), se for da Zona Sul ou das Ilhas. Nesta Unidade, em internamento, faz-se um cuidadoso diagnóstico diferencial das hiperfenilalaninémias, procurando separar as PKU das deficiências de BH_4 (hiperfenilalaninémias malignas) bem mais graves do que a PKU.

O diagnóstico bioquímico da PKU baseia-se no doseamento da Phe e Tyr plasmáticas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), em regime de dieta normal. Esta determinação é executada no Departamento de Bioquímica do Centro de Metabolismo e Genética (Faculdade de Farmácia de Lisboa). Na PKU clássica é habitual valores de Phe plasmática igual ou superiores a 20mg/dL , com tirosinémias inferiores a 5mg/dL .

Feito o diagnóstico de PKU, o doente é submetido de imediato ao tratamento, seguindo um protocolo rigoroso de avaliação bioquímica, neurológica, mental e nutricional.

Tratamento

Consiste num regime dietético, controlado, restritivo em Phe, de modo a fazer baixar o mais rapidamente possível os valores elevados, “tóxicos”, de Phe plasmática, mantendo-os inferiores a 8 mg/dL, se possível entre 2-4mg/dL, pelo menos até aos 10 anos de idade. Após essa idade, a dieta é liberalizada, **nunca interrompida**, procurando manter a Phe plasmática entre 10-12mg/dL até aos 15 anos, e entre 15-19,8mg/dL acima dos 15 anos. É fundamental evitar tanto os excessos de aporte como situações de carência de AA essencial.

As necessidades de Phe são fornecidas por alimentos naturais (leite, vegetais, frutos, produtos hipoproteicos), sendo o restante aporte proteico e calórico fornecido por misturas de aminoácidos isentas de Phe, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, fluor, ácido fólico e ferro.

O tratamento dietético deve ser mantido durante toda a vida.

Evolução. Prognóstico

Os factores preditivos fundamentais do desenvolvimento mental são: idade de início do tratamento, actividade enzimática residual, qualidade do controlo dietético, nível sócio-económico dos pais, QI dos pais (particularmente da mãe). **Quanto mais precoce for o diagnóstico e tratamento, melhor o prognóstico.** Se o **controlo dietético for rigoroso**, particularmente durante os primeiros 10 anos de vida, as crianças e adolescentes atingirão um desenvolvimento intelectual normal, muito embora, e

apesar de QI altos, poderem manifestar por vezes pequenas perturbações da organização temporo-espacial e da psicomotricidade fina, regredíveis.

Como toda a doença crónica a PKU tem repercussões psicológicas importantes sobre a família e doentes, sendo a adolescência o período mais crítico. O perigo de interrupção do regime, por inconformismo, é de temer no adolescente.

O problema das mães PKU

O cérebro humano em desenvolvimento é altamente sensível a danos estruturais, quando exposto *in utero* a níveis elevados e mantidos de Phe plasmática, como acontece nas mães PKU não tratadas. A hiperfenilalaninémia determina uma **embriofetopatia precoce** que compromete o crescimento do feto, origina malformações congénitas, microcefalia e atraso mental em mais de 90% dos seus filhos.

Assim, **antes da concepção**, deve a dieta ser seguida ou retomada, com muito maior rigor e vigilância, e mantida durante toda gravidez. Só deste modo poderão nascer crianças normais.

Genética

Os estudos clássicos de populações mostraram ser a PKU herdada de modo mendeliano (autosómico recessiva).

O gene da PAH está presente no cromossoma 12 (12q22 – q24).

O diagnóstico pré-natal é possível por várias combinações de análise do DNA.