

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

Roseani da Silva Andrade

**Avaliação de um Teste Bioquímico de Triagem para a Detecção de
Indivíduos Heterozigotos para a Fenilcetonúria**

**Belém
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

Roseani da Silva Andrade

**Avaliação de um Teste Bioquímico de Triagem para a Detecção de
Indivíduos Heterozigotos para a Fenilcetonúria**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular com ênfase em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

**Belém
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

Roseani da Silva Andrade

**Avaliação de um Teste Bioquímico de Triagem para a Detecção de
Indivíduos Heterozigotos para a Fenilcetonúria**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau Mestre em Neurociências e Biologia Celular

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Liliane Maria Messias Machado

Prof^ª. Dra. Marília de Souza Araújo

Prof^ª Dra. Rita de Cássia Mousinho Ribeiro

Aos meus Pais Joaquim e Valdira com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sempre me guiar e iluminar meu caminho;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Santana da Silva pelo estímulo, oportunidade e orientação;

À amiga Vaneisse que teve uma grande participação em todas as etapas deste trabalho;

Aos amigos Clebinho, e Carlinha pela grande colaboração para a realização deste trabalho;

A Juliana por ser voluntária para a determinação da dosagem de Phe a ser utilizada;

À amiga Manu pela sua enorme paciência na tradução de artigos científicos;

Às minhas amigas da Santa Casa que de forma direta ou indireta contribuíram muito para a realização desta dissertação.

A amiga Karina pela finalização deste trabalho

Aos participantes voluntários da pesquisa;

A todos que participaram de alguma forma para a realização desta pesquisa.

“Destino não é uma questão de sorte, mas uma questão de escolha; não é uma coisa que se espera, mas que se busca”.

William Jennings Bryan

SUMÁRIO

	P.
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 FENILCETONÚRIA.....	21
2.1.1 PKU por deficiência de PAH.....	21
2.1.2 PKU por deficiência de BH ₄	22
2.1.3 Metabolismo da Phe.....	22
2.1.4 Metabolismo da Tetrahydrobiopterina (BH ₄).....	24
2.1.5 Aspectos Clínicos.....	25
2.1.6 Incidência.....	26
2.1.7 Programa de Triagem Neonatal.....	26
2.1.8 Diagnóstico.....	27
2.1.8.1 Triagem Neonatal – Teste do Pezinho.....	27
2.1.8.2 Diagnóstico Laboratorial.....	28
2.1.9 Tratamento.....	29
2.2 IDENTIFICAÇÃO DE HETEROZIGOTOS PARA PKU: TESTES BIOQUÍMICOS QUANTITATIVOS.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 GERAL.....	33
3.2 ESPECÍFICOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	34
4.1.1 Tipo de estudo.....	34
4.1.2 Caracterização da amostra.....	34
4.2 PROTOCOLO EMPREGADO.....	35
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	35
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	36
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 VARIÁVEL PHE.....	40

5.1.1 Análise longitudinal.....	40
5.1.2 Análise transversal.....	41
5.1.3 Análise longitudinal x Análise transversal.....	42
5.2 VARIÁVEL TYR.....	43
5.2.1 Análise longitudinal.....	43
5.2.2 Análise transversal.....	44
5.2.3 Análise longitudinal x análise transversal.....	45
5.3 VARIÁVEL PHE/TYR.....	46
5.3.1 Análise longitudinal.....	46
5.3.2 Análise transversal.....	46
5.3.3 Análise longitudinal x análise transversal.....	47
5.4 VARIÁVEL PHE ² /TYR.....	48
5.4.1 Análise longitudinal.....	48
5.4.2 Análise transversal.....	49
5.4.3 Análise longitudinal x análise transversal.....	50
5.5 VALORES UTILIZADOS NA ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS DISCRIMINATÓRIOS (GRUPO CONTROLE X GRUPO DE HETEROZIGOTOS).....	51
5.6 CURVA ROC PARA A VARIÁVEL PHE.....	52
5.7 CURVA ROC PARA A VARIÁVEL TYR.....	53
5.8 CURVA ROC PARA A VARIÁVEL PHE/TYR.....	54
5.9 CURVA ROC PARA A VARIÁVEL PHE ² /TYR.....	55
5.10 VALORES PREDITIVOS.....	55
5.11 CURVA ROC PARA OS TRÊS MELHORES PARÂMETROS.....	56
5.12 ANÁLISE DISCRIMINANTE DAS TRÊS MELHORES VARIÁVEIS (PHE T45, PHE T90 E PHE ² /TYR T90).....	57
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	74
APÊNDICES.....	78

LISTA DE TABELAS

P.

- Tabela 1:** Valores dos níveis de Phe (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90..... **42**
- Tabela 2:** Valores dos níveis da variável Tyr (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....**44**
- Tabela 3:** Valores da variável Phe/Tyr nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....**47**
- Tabela 4:** Valores da variável Phe^2/Tyr nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....**49**
- Tabela 5:** Sensibilidade, Especificidade e Ponto de Corte das variáveis Phe (mg/dL), Tyr(mg/dL), Phe/Tyr e Phe^2/Tyr**51**
- Tabela 6:** Valores preditivos das variáveis Phe T45, Phe T90 e Phe^2/Tyr T90.....**56**
- Tabela 7:** Valores mínimos e máximos das três melhores variáveis que discriminam indivíduos normais de heterozigotos**59**

LISTA DE QUADROS

	P.
Quadro 1 - Quantidade de Phe sérica x Phe na dieta oferecida.....	30
Quadro 2: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Phe nos tempos testados....	42
Quadro 3: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Tyr nos tempos testados....	45
Quadro 4: Comparação estatística intragrupo entre os valores da relação Phe/Tyr nos tempos testados.....	47
Quadro 5: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Phe^2/Tyr nos tempos testados.....	50
Quadro 06 - Classificação dos indivíduos a partir da aplicação das equações discriminante.	58

LISTA DE FIGURAS

	P.
Figura 1 - Metabolismo da Phe.....	23
Figura 2 – Sistema de Hidroxilação da Phe.....	25
Figura 3: Média e Erro padrão da variável Phe (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....	43
Figura 4: Média e Erro padrão da variável Tyr (mg/dL) nos grupos controle (n=27) e de heterozigotos (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....	45
Figura 5: Média e Erro padrão da variável Phe/Tyr nos grupos controle (n=27) e heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....	48
Figura 6: Média e Erro padrão da variável Phe^2/Tyr nos grupos controle (n=27) e heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.....	50
Figura 7: Curva ROC da variável Phe para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.....	52
Figura 8: Curva ROC da variável Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.....	53
Figura 9: Curva ROC da variável Phe/Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.....	54
Figura 10: Curva ROC da variável Phe^2/Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.....	55
Figura 11: Curva ROC das três melhores variáveis (PheT45, PheT90 e $Phe^2/TyrT90$) para determinar o melhor ponto de corte que discrimine indivíduos heterozigotos de indivíduos normais.....	57
Figura 12: Diagrama de classificação dos indivíduos do grupo de heterozigotos e do grupo controle.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PKU	Fenilcetonúria
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
Phe	Fenilalanina
Tyr	Tirosina
HPA	Hiperfenilalaninemia
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
TCA	Ácido Tricloroacético

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença metabólica hereditária resultante da deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) que converte o aminoácido fenilalanina em tirosina. O presente estudo teve como objetivo investigar o metabolismo dos aminoácidos fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) em heterozigotos para PKU, nas condições de jejum e após uma sobrecarga oral de Phe (25 mg/Kg), aplicando diferentes parâmetros bioquímicos (níveis de Phe e Tyr e as relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr), a fim de identificar a melhor variável que discrimine heterozigotos para a PKU de indivíduos normais. O protocolo empregado foi a dosagem de Phe e Tyr plasmática nas situações de jejum, 30, 45, 60 e 90 minutos após a sobrecarga de Phe na dose de 25mg/kg. A amostra foi composta de 50 indivíduos: 23 heterozigotos obrigatórios (10 homens e 13 mulheres) e um grupo controle de 27 indivíduos hígidos (13 homens e 14 mulheres), obedecendo a critérios de pareamento: gênero e faixa etária (18 a 44 anos). Para analisar o efeito da sobrecarga oral de Phe em cada grupo, os resultados dos parâmetros Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr após a sobrecarga foram comparados com os observados na situação de jejum. Foram realizadas inferências estatísticas entre os grupos nos aspectos longitudinal e transversal e aplicados os testes t de Student, teste de Wilcoxon, teste t de Student e o seu equivalente não paramétrico e teste U de Mann-Whitney. Na avaliação da Curva ROC das variáveis utilizadas, os três melhores parâmetros para classificar indivíduos heterozigotos de normais foram: a dosagem da Phe a 45 e 90 minutos, assim como o resultado da fração micromolar Phe^2/Tyr após 90 minutos da sobrecarga. A função discriminante revelou 86% de acurácia e uma classificação correta de 94,4% dos indivíduos heterozigotos para PKU.

Palavras chaves: fenilcetonúria, heterozigotos, fenilalanina, sobrecarga

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an inherited metabolic disease resulting from deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH) that converts the amino acid phenylalanine into tyrosine. This study aimed to investigate the metabolism of amino acids phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr) in heterozygotes for PKU, in fasting and after an overload of Phe (25 mg / kg) using different biochemical parameters (levels of Phe and Tyr and relations Phe / Tyr and $\text{Phe}^2 / \text{Tyr}$), to identify the best variable to discriminate heterozygotes for PKU and normal subjects. The protocol used was the measurement of plasma Phe and Tyr in the case of fasting, 30, 45, 60 and 90 minutes after the overload of Phe at a dose of 25mg/kg. The sample consisted of 50 individuals, 23 binding heterozygotes (10 men and 13 women) and a control group of 27 healthy individuals (13 men and 14 women), according to the matching criteria: gender and age (18 to 44 years) . To analyze the effect of an overload of Phe in each group, the results of the parameters Phe, Tyr, Phe / Tyr and Phe^2/Tyr after overload were compared with those observed in the fasting state. Statistical inferences were performed between groups in longitudinal and transverse aspects and applied the Student t test, Wilcoxon test, Student t test and its equivalent nonparametric test and the Mann-Whitney test. Evaluating the ROC curve of the variables used, the three best parameters to classify heterozygous and normal subjects were: the dosage of Phe 45 and 90 minutes, as well as the result of micromolar Phe^2/Tyr fraction after 90 minutes of overload. The discriminant function showed 86% accuracy and a correct classification of 94.4% of individuals heterozygous for PKU.

Keywords: phenylketonuria, heterozygotes, phenylalanine, overload

1. Introdução

A Fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência parcial ou total da enzima da fenilalanina-hidroxilase (PAH) levando a um bloqueio na conversão do aminoácido fenilalanina (Phe) no aminoácido tirosina (Tyr). Como resultado, a Phe acumula no sangue e outros tecidos. A Phe é um aminoácido essencial, não somente para a síntese de proteína, mas também como precursor de Tyr e seus derivados. Na ausência da PAH, a Tyr se torna um aminoácido essencial (Scriver and Kaufman, 2001; Baulny, H.O. *et al*, 2007).

A PAH consiste em dois componentes protéicos, um lábil encontrado no fígado e outro estável, observado em outros tecidos. O componente lábil desse sistema enzimático é o que não é afetado na PKU (Martins, A.M. *et al*, 2006).

A PAH é instável e sua atividade no fígado humano é rapidamente perdida após a morte (Savio L. *et al*, 1974). Portanto, a análise da atividade enzimática direta de PAH não é possível para a investigação de pacientes com PKU e heterozigotos, devido a processos considerados invasivos (biópsia hepática) para a determinação desta atividade. Há uma grande heterogeneidade molecular de mutações no gene da PAH, tornando difícil usar as ferramentas moleculares para a investigação de heterozigotos.

Frente a estas limitações, surge a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens para a discriminação de indivíduos heterozigotos de indivíduos normais. Estas abordagens podem ser aplicadas no rastreio de heterozigotos para a PKU, principalmente em parentes de pacientes com PKU.

Este trabalho apresenta como objetivo principal avaliar o metabolismo dos aminoácidos Phe e Tyr em heterozigotos para PKU, nas condições de jejum e após uma

sobrecarga oral de Phe (dose de 25 mg/Kg de peso), aplicando diferentes parâmetros bioquímicos (concentrações plasmática de Phe e Tyr e as relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr), a fim de identificar o parâmetro de expressão dos resultados que melhor discrimina heterozigotos de indivíduos normais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fenilcetonúria

A Fenilcetonúria (PKU) é o mais comum erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos, sendo uma doença com padrão de herança autossômica recessiva. A maioria dos casos de PKU é causada por mutações no gene da fenilalanina-hidroxilase (PAH), enzima que converte o aminoácido fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). A deficiência da enzima PAH leva ao acúmulo da Phe nos tecidos e plasma de pacientes. Elevados níveis de Phe interferem na produção de neurotransmissores dopamina e noradrenalina (MacLeod, E.L. *et al*, 2009; Sirtori, L.R. *et al*, 2005).

2.1.1. PKU por deficiência de PAH

A PKU é o termo genérico que designa um fenótipo no qual se verifica um aumento de fenilalanina (Phe) causado pela deficiente hidroxilação hepática deste aminoácido. Na hidroxilação da Phe em Tyr, há a intervenção da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) e da coenzima tetrahydrobiopterina (BH₄) (Scriver *et al*, 2001)

A PKU por deficiência de PAH são EIM apresentam aumento na concentração de Phe e seus subprodutos (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato e fenilacetilglutamina) no sangue e na urina, com formação reduzida de Tyr (Figueiró-Filho E.A.,2004).

O gene que codifica a PAH está localizado no cromossomo 12q23.2, contém 13 *exons* (Woo *et al*, 1983). A PKU, além de ser caracterizada por uma heterogeneidade fenotípica, também apresenta heterogeneidade molecular, com cerca de 600 mutações já descritas no gene da PAH (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

2.1.2. PKU por deficiência do cofator BH₄

A deficiência da tetrahydrobiopterina (BH₄) surge por mutações nos genes que codificam as enzimas necessárias para a sua síntese (guanosinatrifosfato ciclodrolase [GTPCH]) e 6-piruviltetrahydrobiopterina sintetase (PTPS) ou para regeneração (dihidropterina redutase [DHPR] e pterina-4 α -carbinolamina desidratase) (Sanford M. *et al*, 2009).

A incidência da deficiência de BH₄ é de 1 em 1.000.000. O Tratamento das deficiências BH₄ consiste na suplementação de BH₄ (2-20 mg / kg / dia) e dieta para controlar a concentração de fenilalanina no sangue e terapia de reposição com neurotransmissores (L-dopa, carbildopa e 5-hidroxitriptofano) e suplementos de ácido folínico (Shintaku H., 2002).

2.1.3. Metabolismo da Phe

A Phe existe como enantiômeros D e L. A L-Phe é um aminoácido essencial necessário para síntese protéica em seres humanos. A figura 1 mostra os processos que

contribuem para o fluxo da L-Phe em seres humanos. Como acontece com muitos outros metabólitos, as concentrações de Phe são reguladas para permanecerem com os níveis estáveis de entrada e saída de fluxo. O distúrbio persistente do fluxo pode eventualmente resultar na alteração na concentração deste aminoácido. A ingestão de Phe juntamente com a reciclagem endógena de aminoácidos são as principais fontes de Phe (Williams R.A. *et al*, 2008).

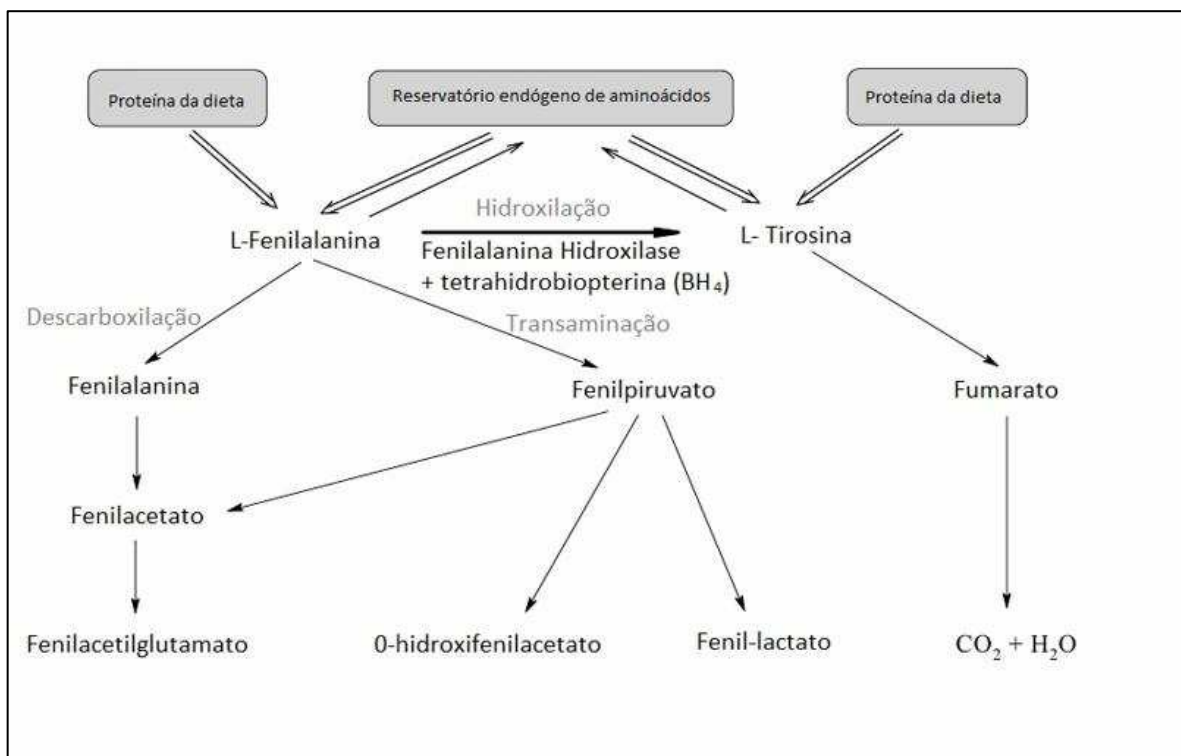


Figura 1 - Metabolismo da Phe. A ingestão de Phe através da dieta é reciclado por meio de *pools* de aminoácidos. A hidroxilação da Phe pela fenilalanina-hidroxilase (PAH) juntamente com o cofator BH₄ produzindo L-Tyr. E uma rota alternativa de metabolismo da Phe por descarboxilação ou transaminação produzindo metabólitos que são excretados na urina (Fenilacetato, Fenilpiruvato e Fenil-lactato). (Adaptado de Williams, R.A., 2008)

A Phe é um aminoácido essencial, hidroxilado em Tyr por ação da enzima PAH, que é um tetrâmero composto por quatro subunidades iguais e é regulada através da fosforilação oxidativa destas subunidades, sendo ativada pelo substrato Phe e inibida pelo cofator BH₄ (figura 2). A diminuição da conversão enzimática do aminoácido Phe em Tyr pode ser causada por mutações no gene da PAH ou por defeitos na síntese ou reciclagem das

biopterinas, uma vez que esta reação necessita simultaneamente da enzima PAH e do cofator BH_4 . A via alternativa de metabolização da Phe é ativada quando a via principal está parcialmente bloqueada. A via secundária consiste na transaminação da Phe a fenilpiruvato; seguidamente, a descarboxilação deste metabólito originando fenilacetato, enquanto sua redução leva a produção de fenilacetato. O fenilacetato poderá posteriormente ser conjugado com a glutamina e produzir fenilacetilglutamina (Vilarinho, L *et al*, 2006).

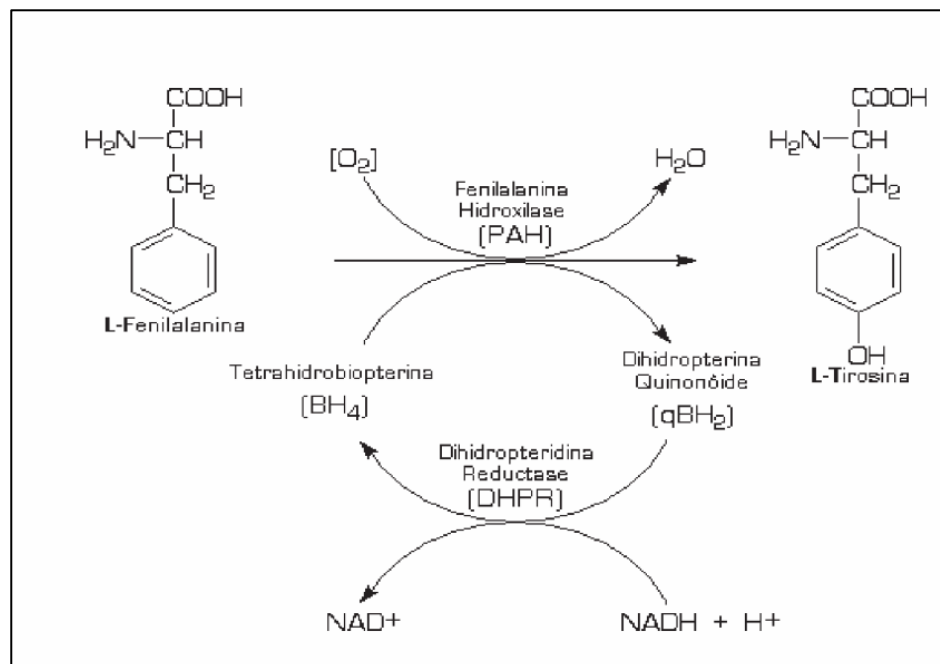


Figura 2 – Sistema de Hidroxilação da Phe

2.1.4. Metabolismo da Tetrahydrobiopterina (BH_4)

A BH_4 é conhecida como cofator não protéico para catabolismo de aminoácidos aromáticos. Portanto, é fundamental para a hidroxilação da Tyr à L-dopa que origina

dopamina, e para hidroxilação do Triptofano (Trp) a 5-hidroxitriptofano, necessário para a síntese de serotonina (figura 2). A biossíntese de novo BH₄ envolve as enzimas guanositri-fosfato ciclodrolase I (GTPCH I), 6-piruvoil tetrahydropterina sintase (PTPS), 6-piruvoiltetrahydropterina 2 – redutase (PTPR), e seapterina redutase (SPR). A BH₄ forma-se a partir de Guanositri-fostato (GTP) ou a partir da reciclagem de BH₂) pela enzima dihidropteridina redutase (DHPR) (Vilarinho, L *et al*, 2006).

2.1.5. Aspectos Clínicos

A PKU não tratada é associada com um fenótipo anormal incluindo falha no crescimento, microcefalia, deficiência mental causada pelo efeito tóxico de produtos do metabolismo da Phe (Williams, R.A *et al*, 2008).

O aumento da Phe e seus metabólitos no sangue e tecidos levam aos principais sinais e sintomas da doença que podem se manifestar em maior ou menor intensidade: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hiperatividade, convulsões alterações cutâneas, comportamento agressivo (auto e heteroagressão) ou tipo autista, hipotonicidade muscular, tremores, microcefalia, hipoplasia dentária, descalcificação de ossos longos, retardo de crescimento, anormalidades no eletroencefalograma (tipo hipsarritmia), odor característico na urina e suor e sinais extrapiramidais (Martins, A. M., apud Jervis,1937; Fois *et al.*, 1955; Paine, 1957; Nyhan, 1979; Pietz *et al.*, 1993; Scriver, 1995).

2.1.6. Incidência

A da PKU é variável, sendo alta na Turquia, cerca de 1 indivíduo afetado em 2600 nascidos vivos e baixa no Japão, onde ocorre 1 caso em 125.000 nascimentos. A frequência da PKU em populações caucasóides é de aproximadamente 1:10.000, com uma frequência de heterozigotos entre 1:50 e 1:70 (Scriver *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003). No Brasil, a incidência da fenilcetonúria varia nos diversos estados e regiões, de 1:21.000 a 1:13.500 nascidos vivos. (Leão *et al.*, 2008).

2.1.7. Programa Nacional de Triagem Neonatal

O rastreamento neonatal para a PKU teve início ainda na década de 60 (Guthrie *et al.*, 1963). No Brasil este rastreamento começou na década de 70, em São Paulo na Associação de Pais e Amigos de Excepcionais (APAE), conhecido popularmente como o “Teste do Pezinho”, devido ao procedimento da coleta de sangue, que é feita por punção no calcanhar (Amorin *et al.*, 2005).

O Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi instituído pela portaria Ministerial nº 822 de 06 de junho de 2001, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), executado de forma articulada pelo Ministério da Saúde e pelas Secretarias Estaduais de Saúde, Distrito Federal e municípios através de uma Rede Estadual de Triagem Neonatal, tendo como unidade central os Serviços de Referência de Triagem Neonatal (SRTN).

O PNTN tem por objetivo o desenvolvimento de ações de triagem neonatal em fase pré-sintomática, acompanhamento e tratamento das doenças congênitas detectadas inseridas no Programa em todos nascidos vivos: Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Fibrose Cística e Doenças Falciformes e outras Hemoglobinopatias (Manual de Triagem Neonatal, SESP/ARTN-UREMIA, 2009).

2.1.8. Diagnóstico

2.1.8.1. Triagem Neonatal – Teste do Pezinho

O termo “triagem” significa seleção, separação de um grupo, escolha entre inúmeros elementos, e em saúde pública, define-se como a ação primária dos programas de triagem, ou seja, a detecção através de testes aplicados numa população com probabilidade de apresentarem determinadas patologias. O teste triagem neonatal é realizado através do Teste do Pezinho, o qual se utiliza gotas de sangue colhidas em papel filtro especial, para detectar precocemente patologias que irão interferir na qualidade de vida do indivíduo. Este teste de preferência deverá ser realizado entre o 3º e 5º dia de vida, quando a criança já foi alimentada com leite materno ou artificial (Manual de Triagem Neonatal, SESP/ARTN-UREMIA, 2009).

2.1.8.2. Diagnóstico Laboratorial

Os estudos moleculares de identificação e caracterização do gene da PAH em pacientes com PKU proporcionaram informações valiosas que podem ser usadas no diagnóstico pré-natal e na detecção de heterozigotos para a deficiência de PAH, além de sua importância e utilidade no aconselhamento genético e na determinação do prognóstico da doença (Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003).

As PKU são acompanhadas de uma ampla heterogeneidade fenotípica, variando desde as formas mais graves (PKU clássica), que apresentam deficiência mental grave quando na ausência da terapia dietética adequada, até formas mais leves e HPA não-PKU (forma permanente), sendo esta última geralmente benigna, permitindo um desenvolvimento intelectual normal sem necessidade de dieta. Esta heterogeneidade fenotípica pode estar associada ao grande número de mutações patogênicas (cerca de 600) no gene que codifica a PAH (Silva *et al.*, 2003).

A definição da metodologia e dos parâmetros aplicados para distinguir os diferentes fenótipos observados é essencial para o estabelecimento do diagnóstico diferencial entre as formas de PKU. De acordo com as normas do PNTN (Portaria 822, 6 de junho de 2001- MS) duas propostas podem ser utilizadas para definir as diferentes formas de PKU: A atividade enzimática de PAH (%) e os níveis de Phe no momento do diagnóstico (mg/dL): (1) forma clássica, o percentual de atividade da enzima PAH é praticamente inexistente (menor que 1%), e os níveis plasmáticos encontrados de Phe são maiores que 20 mg/dL; (2) forma leve apresenta atividade enzimática entre 1 e 3 % e os níveis plasmáticos de Phe, entre 10 e 20 mg/dL; (3) PKU permanente apresenta o percentual de atividade enzimática acima de 3 %, e os níveis plasmáticos entre 4 e 10 mg/dL.

2.1.9. Tratamento

A dieta adotada é hipoproteica suplementada principalmente por uma fórmula de aminoácidos isenta de Phe, a qual atua na reposição dos aminoácidos essenciais (todos com exceção da Phe). Apesar da importante restrição dietética que será imposta ao paciente, essa fórmula de aminoácidos permite a manutenção do desenvolvimento somático e neurológico adequado (Martins *et al.*, 2006).

Os alimentos proibidos na PKU são os que possuem elevado teor de Phe: leite e derivados, carnes e derivados, feijão, ervilha, soja, grão de bico, lentilha, amendoim, nozes, gelatinas, farinha de trigo, alimentos industrializados com altos teores de Phe, pães em geral, biscoitos, e alimentos para fins especiais contendo adoçante a base de aspartame (ácido aspártico, fenilalanina e metanol) (Monteiro *et al.*, 2006)

Os alimentos com médio teor de Phe (10 – 200mg Phe/100g do alimento) podem ser consumidos de acordo com a prescrição desse aminoácido. Sendo as quantidades determinadas pela idade, tolerância individual e níveis séricos apresentados periodicamente. Dentre estes alimentos estão: massas feitas sem ovos e com farinha de trigo com baixo teor de proteína, arroz, batata-inglesa, batata-doce, batata-salsa, mandioca, acará, abóbora, abobrinha, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, chuchu, couve-flor, jiló, quiabo, repolho, vagem, tomate, pepino, pimentão, pimentão, cebola, folhosos, e frutas em geral (Monteiro *et al.*, 2006)

O substituto de proteína isenta de Phe é fundamental na dieta de pacientes com PKU. Esta dieta é baseada em L-aminoácidos, suplementada com Tyr e pode conter adição de carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais. Na PKU este substituto fornece 80-85% do requerimento protéico (MacDonald A. *et al.*, 2006).

Segundo Acosta e Yanniceli (1998), a quantidade de Phe oferecida na dieta está de acordo com os níveis séricos deste aminoácido (quadro 1).

Quadro 1 - Quantidade de Phe sérica x Phe na dieta oferecida

Phe sérica		Phe na dieta
(μM/l)	(mg/dL)	(mg/Kg)peso/dia
≤ 605	≤ 10	70
$>605 \leq 1.210$	$>10 \leq 20$	55
$>1.210 \leq 1.815$	$>20 \leq 30$	45
$>1.815 \leq 2.420$	$> 30 \leq 40$	35
> 2.420	> 40	25

2.2. Identificação de heterozigotos para PKU: testes bioquímicos quantitativos

Vários métodos bioquímicos foram desenvolvidos para a detecção de heterozigotos para PKU. A enzima PAH está localizada principalmente no fígado, fato este que dificulta sua investigação direta. Deste modo, as técnicas bioquímicas existentes são indiretas e realizadas através da dosagem de Phe e Tyr plasmáticas (Silva *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que a sobrecarga oral de Phe poderia permitir a detecção de heterozigotos na população através de diferenças existentes nas concentrações de Phe e Tyr entre heterozigotos e indivíduos normais. Após a sobrecarga de Phe (100 mg/kg), os níveis plasmáticos deste aminoácido foram duas vezes mais altos em heterozigotos que no grupo controle. Estes achados estão de acordo com a relativa atividade reduzida da PAH em heterozigotos (Hsia *et al.*, 1956).

Estas investigações basicamente deram início a outros estudos bioquímicos utilizados na detecção de heterozigotos para PKU. A maioria dos métodos empregados, como um meio de classificar indivíduos normais e heterozigotos para PKU, é baseada na avaliação dos níveis

sanguíneos de Phe e Tyr, após sobrecarga oral (Hsia e Driscoll, 1956; Rampini, 1969; Gutter e Hansen, 1977) ou intravenosa (Jagenburg *et al.*, 1977) ou ainda após a administração de Phe marcada com deutério (Lehmann *et al.*, 1984). No entanto, a consideração de uma única variável (Phe) não oferece a correta discriminação entre os dois grupos de indivíduos (Sartório *et al.*, 1988). Sendo assim, combinações multivariadas de variedades distintas tais como os níveis de Phe e Tyr, as relações micromolares Phe/Tyr e Phe^2/Tyr , têm sido analisadas por funções discriminantes e com pequenos erros de classificação. Os gráficos das relações micromolares também são recomendados para uma maior precisão na detecção de heterozigotos (Rampini *et al.*, 1969; Griffin e Elsas, 1975; Guttler e Hansen, 1977; Tenenholz *et al.*, 1983; Freehauf *et al.*, 1984; Sartório *et al.*, 1988; Guncral *et al.*, 1991).

Muitos fatores biológicos influenciam no metabolismo da Phe e da Tyr, fato que torna difícil a detecção de heterozigotos. Entre estes fatores estão a gravidez, contraceptivos orais, idade, sexo, obesidade, anemia com deficiência de ferro, cirrose hepática, desnutrição, doença renal, leucemia e infecções. Por diferentes mecanismos, todas estas condições resultam no aumento da relação Phe/Tyr, tanto em jejum como após a sobrecarga de Phe. Deste modo, ocorre a possibilidade de classificar um indivíduo normal como heterozigoto para PKU, mas o contrário não é verdadeiro. Os fatores que mais contribuem para o erro de classificação são os contraceptivos orais e a anemia com deficiência de ferro (Blitzer *et al.*, 1986; Lehmann, 1989; Silva *et al.*, 2000).

Durante os primeiros anos de pesquisas direcionadas à detecção de heterozigotos para PKU, os erros de classificação ficaram entre 5% e 30%. Nos últimos anos a proporção se encontra entre 3% e 15%. O aperfeiçoamento de métodos bioquímicos e a descoberta de novas técnicas e equipamentos contribuíram para a diminuição dos erros de classificação. No entanto, persiste a dúvida de saber qual o melhor método bioquímico e estatístico para

detecção de heterozigotos, uma vez que diferentes grupos usam diferentes análises estatísticas (Lehmann, 1989, Silva *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000).

Vários métodos bioquímicos foram desenvolvidos para a detecção de heterozigotos para PKU, baseados principalmente nas dosagens dos aminoácidos Phe e Tyr no plasma (com ou sem sobrecarga de Phe) e na análise dos resultados com cálculo das relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr e de funções discriminantes. O uso destes métodos, simples e de baixo custo, é justificado pela alta frequência de heterozigotos na população (1:50 a 1:70) e pelo potencial preventivo, ao permitir o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal (Silva *et al.*, 1997).

Para identificação de heterozigotos, Silva *et al.*, 1997, realizaram um estudo com 22 heterozigotos obrigatórios e 27 controles. Duas amostras sanguíneas foram coletadas nas condições de jejum e 30 minutos após uma sobrecarga de 100mg/kg de aspartame (ácido aspártico, Phe e metanol) para a quantificação das concentrações plasmáticas dos aminoácidos Phe e Tyr. Os valores de Phe, Phe/Tyr, Phe^2/Tyr foram superiores em heterozigotos, enquanto a Tyr foi superior em controles em ambas situações de investigação. A função linear discriminante foi considerada o melhor parâmetro para discriminar indivíduos normais de heterozigotos para PKU, tanto na situação de jejum como após a sobrecarga de aspartame

Silva *et al.*, (2000), concluíram que as relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr tanto antes como após uma sobrecarga oral de aspartame (100 mg/kg) parecem ser a mensuração mais confiável para discriminar heterozigotos para PKU de indivíduos normais.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Este estudo busca investigar o metabolismo dos aminoácidos Phe e Tyr em heterozigotos para a PKU, nas condições de jejum e após uma sobrecarga oral de Phe (dose de 25 mg/Kg de peso).

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar na condição de jejum o metabolismo da Phe e Tyr em indivíduos controle e heterozigotos para a PKU, aplicando diferentes parâmetros bioquímicos (Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr).
- Avaliar após sobrecarga oral de Phe o metabolismo da Phe e Tyr em indivíduos controle e heterozigotos para a PKU, aplicando diferentes parâmetros bioquímicos (Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr).
- Identificar o parâmetro de expressão dos resultados que melhor discrimina heterozigotos de indivíduos normais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

4.1.1. Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de delineamento transversal através de coletas de sangue e posterior análise para dosagem dos aminoácidos Phe e Tyr no período de julho de 2008 a junho de 2009.

4.1.2. Caracterização da amostra

A amostra foi composta de 23 heterozigotos obrigatórios na faixa etária de 18 a 45 anos (10 homens e 13 mulheres), pais de pacientes com PKU, residentes nos municípios de Belém, Curralinho, São Miguel do Guamá, Monte Alegre, São Félix do Xingú, Oriximiná, Santa Bárbara e Castanhal. O grupo controle foi constituído por 27 indivíduos (13 homens e 14 mulheres), obedecendo a critérios de pareamento: gênero e faixa etária (18 a 44 anos), todos residentes no município de Belém.

4.2. Protocolo empregado

Todos os indivíduos participantes estavam em jejum de pelo menos 10 (dez) horas antes da colheita de sangue. Foram feitas cinco colheitas de sangue (3mL cada uma) em tubo heparinizado com auxílio de um escalpe. A primeira colheita foi feita na condição de jejum, e logo em seguida foi administrada via oral o aminoácido Phe na dose de 25mg/kg de peso, diluído em água. Foram realizadas mais 04 colheitas de sangue (30, 45, 60 e 90 minutos após a sobrecarga oral de Phe).

O peso foi aferido em quilos e gramas, em balança Welmy do tipo plataforma, com precisão de 100g, com o indivíduo trajando roupas leves e descalço. As colheitas de sangue e todos os demais procedimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão

Como critério de inclusão dos heterozigotos foi considerado a condição dos mesmos serem pais biológicos dos pacientes com PKU. Os critérios de exclusão adotados foram: gravidez, anemia, uso de anticoncepcional e menstruação. Nestas condições, o metabolismo dos aminoácidos se encontra alterado (Silva *et al.*, 1997).

4.4. Análise Bioquímica

O plasma foi separado após as colheitas e congelado a -20° C até o momento da análise quantitativa dos aminoácidos Phe e Tyr. As dosagens de Phe e Tyr foram feitas em duplicatas e conforme os métodos fluorimétricos de McCaman e Robins (1962) e Philips (1967), respectivamente.

A dosagem de Phe foi realizada conforme o protocolo abaixo:

- Adicionar uma alíquota de 200 μ L de plasma a um volume igual de TCA 0,6 N e centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm para completa desproteinização da amostra;
- Retirar uma alíquota de 25 μ L de plasma desproteinizado e adicionar a 400 μ L de uma mistura reagente contendo tampão succinato 0,3M pH 5,8; ninhidrina 30mM e L-leucil-L-alanina 5mM;
- Incubar os tubos contendo a amostra e a mistura acima em banho Maria a 60° C por 2 horas;
- Resfriar os tubos em banho de água corrente por 5 minutos;
- Adicionar 2,5 mL de reagente cúprico e manter os tubos por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Fazer a leitura da fluorescência das amostras em espectrofluorímetro, usando os comprimentos de onda de 365 nm (excitação) e 455 nm (emissão);
- Calcular as concentrações plasmáticas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de Phe.

A dosagem de Tyr foi realizada conforme o protocolo abaixo:

- Adicionar uma alíquota de 200 μ L de plasma a um volume igual de TCA 0,6 N e centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm para completa desproteinização da amostra

- Retirar uma alíquota de 20 μ L de plasma desproteínezado e adicionar a 500 μ L de uma mistura reagente contendo 1-nitroso-2-naftol a 0,1 %; ácido nítrico 0,3 N.
- Incubar os tubos contendo a amostra e a mistura acima em banho Maria a 100° C por 10 minutos;
- Adicionar 3,0 mL de água destilada;
- Proceder a leitura da fluorescência das amostras em espectrofluorímetro, usando os comprimentos de onda de 436 nm (excitação) e 535 nm (emissão);
- Calcular as concentrações plasmáticas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de Tyr.

4.5. Análise Estatística

Foram realizadas inferências estatísticas entre os grupos de heterozigotos (n=23) e controle (n=27). A análise longitudinal (intragrupo) constou de aplicação de testes para amostras pareadas. Foram aplicados os testes t de *Student* e o teste de *Wilcoxon* conforme recomenda Ayres *et al*, (2007, p147). A análise transversal (intergrupo) contou com a aplicação do teste t de *Student* e o seu equivalente não paramétrico, teste U de *Mann-Whitney*.

A avaliação do desempenho operacional dos aminoácidos foi realizada pelo método da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), a qual foi elaborada com base nos valores preditivos, os quais foram calculados conforme descrito em Ayres *et al*, (2007, p107).

Além da especificidade e da sensibilidade, foram calculados os valores preditivos (Falsos Positivos, Falsos Negativos, Valor Preditivo do Teste Positivo, Valor Preditivo do Teste Negativo, acurácia, *Likelihood Ratio* Positiva e *Likelihood Ratio* Negativa)

As variáveis que obtiveram melhores desempenhos operacionais (Curva ROC) foram submetidas ao modelo de análise discriminante para validar, finalmente, a eficiência do modelo.

Todos os testes de hipótese foram avaliados sob o nível de significância $p < 0,05$. O processamento estatístico foi suportado pelo software Bioestat versão 5.3.

4.6. Aspectos Éticos

De acordo com a resolução 196/96 (MS), o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, Protocolo nº088/08 (Anexo A).

Os indivíduos do grupo controle e os heterozigotos foram convidados por contato pessoal para participar desta pesquisa. Nesta ocasião, os objetivos e a metodologia do estudo foram detalhadamente esclarecidos aos participantes.

Os indivíduos do grupo heterozigoto são pais de pacientes PKU, os quais fazem acompanhamento com equipe multidisciplinar do Serviço de Referência de Triagem Neonatal do Estado do Pará e foram convidados a participar da pesquisa, no momento da consulta do filho(a).

As pessoas que aceitaram a participar deste estudo e que concordaram com os objetivos e metodologia, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

O estudo não proporcionou desconfortos adicionais aos heterozigotos e indivíduos do grupo controle, uma vez que não se tratou de um procedimento invasivo de caráter cirúrgico.

As colheitas de sangue são rotineiramente realizadas e a quantidade de sangue obtida não interferiu na homeostase dos indivíduos.

5. RESULTADOS

Testes estatísticos foram aplicados para avaliar o potencial discriminatório das variáveis Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr entre indivíduos heterozigotos para PKU e controles. Em todas as variáveis foram realizadas análises longitudinais e transversais. A análise longitudinal teve a finalidade, em cada grupo, de realizar comparações dos valores na condição de jejum (T0) e após a sobrecarga de Phe (25mg/kg): T30 (30 minutos), T45 (45 minutos), T60 (60 minutos) e T90 (90 minutos). A análise transversal foi realizada para comparar os dois grupos, considerando T0 (condição de jejum) e T30, T45, T60 e T90 (após a sobrecarga de Phe).

5.1. Variável Phe

5.1.1. Análise longitudinal

Na análise longitudinal da Phe no grupo controle foi observado em T0 valores de Phe de $1,23 \pm 0,31$ mg/dL. Estes valores subiram significativamente ($p < 0,01$) até atingir o ponto máximo de $3,29 \pm 1,20$ mg/dL no tempo de 30 minutos (Tabela 1). Todos os valores observados após a sobrecarga de Phe foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do valor evidenciado no jejum. A média desta variável em T60 ($2,53 \pm 0,60$ mg/dL) foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em relação a T45 ($2,97 \pm 0,76$ mg/dL) e T30 ($3,29 \pm 1,20$ mg/dL). O valor da Phe obtido

em T90 ($2,18 \pm 0,48 \text{mg/dL}$) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) de T60 ($2,53 \pm 0,60 \text{mg/dL}$), T45 ($2,97 \pm 0,76 \text{mg/dL}$) e T30 ($3,29 \pm 1,20 \text{mg/dL}$) (Quadro 2);(Tabela 1).

No grupo de heterozigotos, o valor médio de Phe em T0 foi $1,61 \pm 0,46 \text{mg/dL}$ e elevou-se significativamente ($p < 0,01$) até atingir $4,38 \pm 1,24 \text{mg/dL}$ em T45. Todos os valores desta variável após a sobrecarga do aminoácido Phe foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) de T0, assim como, T90 ($3,45 \pm 0,86 \text{mg/dL}$) diferiu de T45 ($4,38 \pm 1,24 \text{mg/dL}$) e T60 ($4,32 \pm 1,29 \text{mg/dL}$) (Quadro 2);(Tabela 1).

5.1.2. Análise transversal

A avaliação da diferença dos níveis séricos de Phe entre os grupos de heterozigotos ($n=23$) e controle ($n=27$) mostrou que em quatro tempos (T0, T45, T60 e T90) os grupos apresentaram comportamento significativamente diferente ($p < 0,001$). Nestes tempos o grupo de heterozigotos apresentou valores maiores que o grupo controle. Em T60 ocorreu a maior diferença ($1,79 \text{ mg/dL}$) entre heterozigoto ($4,32 \pm 1,29 \text{ mg/dL}$) e controles ($2,53 \pm 0,60 \text{ mg/dL}$). A avaliação dessa diferença através do teste “t” de *Student* foi muito significativa ($p < 0,001$).

Tabela 1: Valores dos níveis de Phe (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90

	Controle					Heterozigoto				
	Tempo (minutos)					Tempo (minutos)				
	0	30	45	60	90	0	30	45	60	90
Mínimo	0,78	0,88	1,56	1,25	1,41	0,74	1,16	1,34	1,77	1,95
Máximo	1,95	5,22	5,28	3,91	3,26	2,60	6,53	6,56	6,64	5,08
Amplitude	1,17	4,34	3,72	2,66	1,85	1,86	5,37	5,22	4,87	3,13
Média Aritmética	1,23	3,29	2,97	2,53	2,18	1,61	3,85	4,38	4,32	3,45
Desvio Padrão	0,31	1,20	0,76	0,60	0,48	0,46	1,47	1,24	1,29	0,86

p-valor intergrupo: T0<0,001; T45<0,001; T60<0,001 e T90<0,001

Quadro 2: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Phe nos tempos testados

Heterozigoto		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,0544	0,1852	0,1713
	T45	-	-	-	0,7884	<0,0001
	T60	-	-	-	-	<0,0001
	T90	-	-	-	-	-
Controle		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,0537	0,0011	<0,0001
	T45	-	-	-	<0,0001	<0,0001
	T60	-	-	-	-	<0,0001
	T90	-	-	-	-	-

5.1.3. Análise longitudinal x Análise transversal

A figura 3 resume as análises (longitudinal e transversal) da variável Phe nos dois grupos testados.

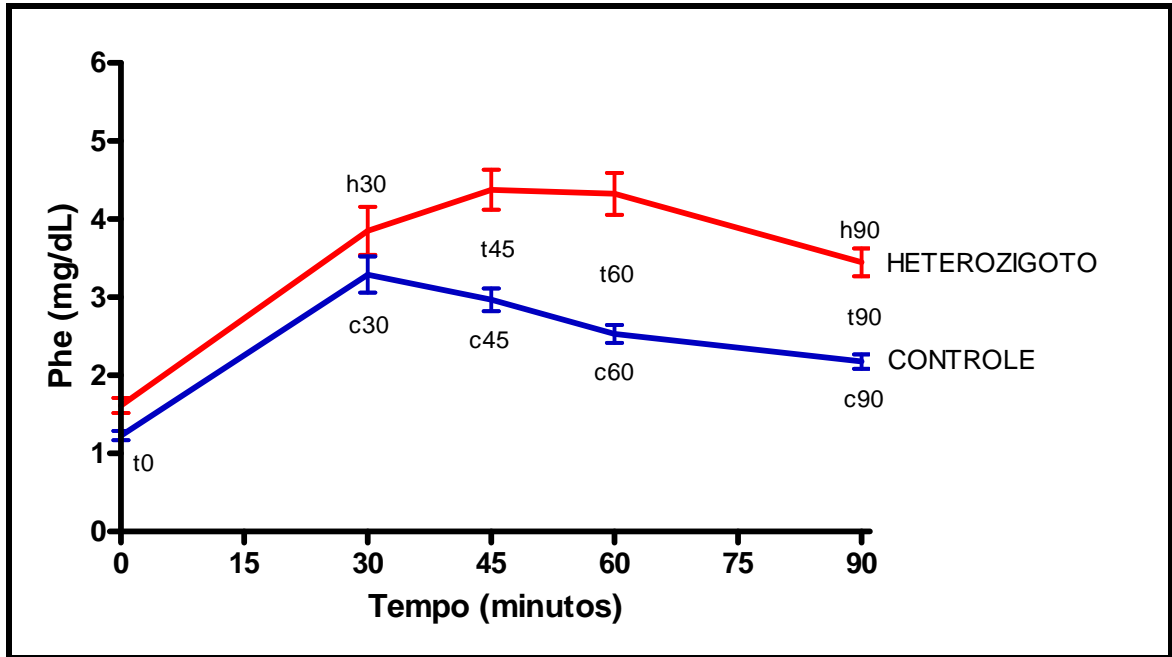


Figura 3: Média e Erro padrão da variável Phe (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

5.2. Variável Tyr

5.2.1. Análise longitudinal

O grupo controle apresentou em T0 níveis médios de Tyr de $1,14 \pm 0,32$ mg/dL, atingindo valores significativamente maiores em T30 de $1,74 \pm 0,95$ mg/dL ($p < 0,001$) (Tabela 02). Os valores médios de Tyr observados após a sobrecarga do aminoácido Phe foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) do valor observado em T0. A média das concentrações plasmáticas de Tyr em T90 ($1,40 \pm 0,33$ mg/dL) foi menor que a observada em T30 ($1,74 \pm 0,95$ mg/dL), T45 ($1,61 \pm 0,54$ mg/dL) e T60 ($1,54 \pm 0,49$ mg/dL) (Quadro 3);(Tabela 2).

No grupo de heterozigotos foi observado valores médios de Tyr em T0 de $1,02\pm 0,23$ mg/dL, atingindo valores máximos em T60 ($1,38\pm 0,55$ mg/dL) (Tabela 2). Após a sobrecarga de Phe, foi observado que os níveis de Tyr foram diferentes estatisticamente ($p < 0,01$) de T0 somente em T45 ($1,24\pm 0,48$ mg/dL) e T60. Em T90 ($1,13\pm 0,33$ mg/dL) o valor observado deste aminoácido diferiu significativamente ($p < 0,05$) de T60 e este foi diferente de T30 (Quadro 3);(Tabela 2).

5.2.2. Análise transversal

O grupo controle apresentou valores médios de Tyr em T30, T45 e T90 maiores que os observados no grupo de heterozigotos. Em T30 ocorreu a maior diferença (0,64 mg/dL) entre heterozigoto ($1,10\pm 0,38$ mg/dL) e controle ($1,74\pm 0,95$ mg/dL) ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores dos níveis da variável Tyr (mg/dL) nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

	Controle					Heterozigoto				
	Tempo (minutos)					Tempo (minutos)				
	0	30	45	60	90	0	30	45	60	90
Mínimo	0,52	0,73	0,97	0,80	0,71	0,48	0,47	0,76	0,73	0,53
Máximo	1,96	5,73	3,50	2,94	2,52	1,41	2,27	2,82	2,60	1,99
Amplitude	1,44	5,00	2,53	2,14	1,81	0,93	1,80	2,06	1,87	1,46
Média Aritmética	1,14	1,74	1,61	1,54	1,40	1,02	1,10	1,24	1,38	1,13
Desvio Padrão	0,32	0,95	0,54	0,49	0,33	0,23	0,38	0,48	0,55	0,33

p-valor intergrupo: T30<0,0001 ; T45=0,0016 e T90=0,0020

Quadro 3: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Tyr nos tempos testados

Heterozigoto		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	0,1511	0,0396	0,0018	0,1658
	T30	-	-	0,1578	0,0088	0,7363
	T45	-	-	-	0,0612	0,1566
	T60	-	-	-	-	0,0049
	T90	-	-	-	-	-
Controle		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,3805	0,0716	0,0011
	T45	-	-	-	0,1742	0,0031
	T60	-	-	-	-	0,0107
	T90	-	-	-	-	-

5.2.3. Análise longitudinal x análise transversal

A figura 4 mostra as análises (longitudinal e transversal) da variável Tyr nos dois grupos testados.

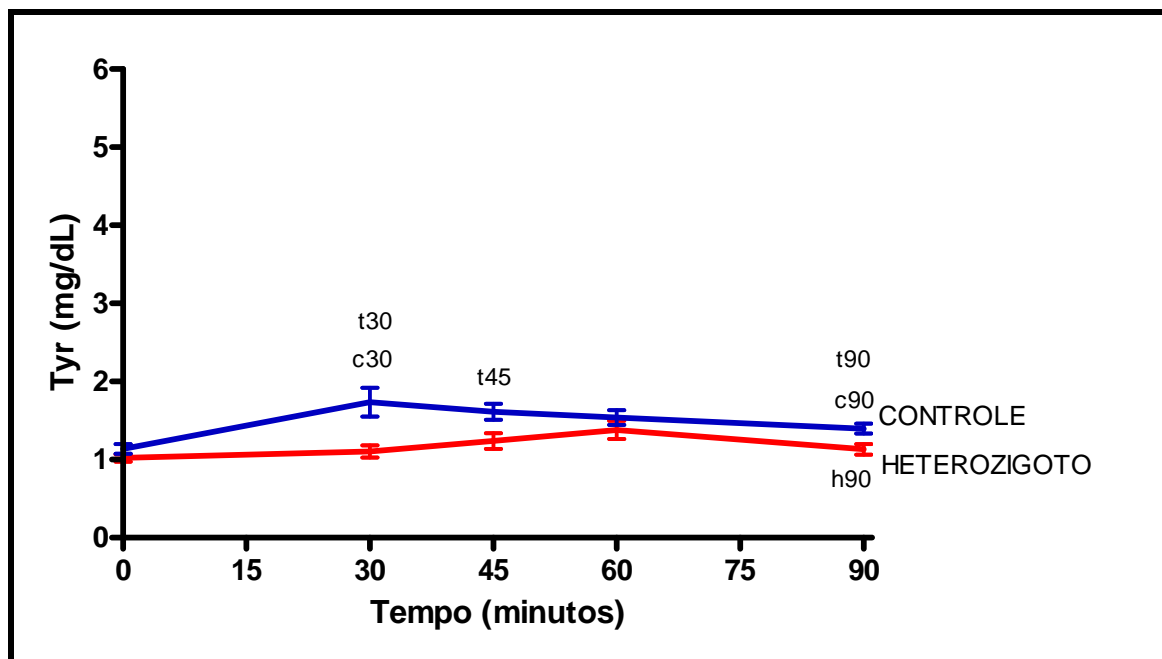


Figura 4: Média e Erro padrão da variável Tyr (mg/dL) nos grupos controle (n=27) e de heterozigotos (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

5.3. Variável Phe/ Tyr

5.3.1. Análise longitudinal

Em relação à variável Phe/Tyr foi observado no grupo controle em T0 o valor médio de $1,16 \pm 0,42$. O valor máximo encontrado para esta relação foi em T30 ($2,17 \pm 1,02$) (Tabela 03). Todos os valores após a sobrecarga de Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$). O valor observado em T90 foi menor que os encontrados em T45 e T30 ($p < 0,05$). Assim como T60 diferiu de T45 e T30 (Quadro 4);(Tabela 3).

A relação Phe/Tyr no grupo de heterozigotos em T0 foi de $1,66 \pm 0,61$, atingindo o valor máximo em T45 ($3,86 \pm 1,58$). Todos os valores observados após a sobrecarga foram maiores que os encontrados em T0 ($p < 0,05$). O valor médio observado em T90 foi significativamente menor que o verificado em T45 ($p < 0,05$) (Quadro 4);(Tabela 3).

5.3.2. Análise transversal

Quando os dois grupos foram comparados, os valores apresentados pela relação Phe/Tyr foram significativamente maiores em todos os tempos testados no grupo de heterozigotos ($p < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3: Valores da variável Phe/Tyr nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

	Controle					Heterozigoto				
	Tempo (minutos)					Tempo (minutos)				
	0	30	45	60	90	0	30	45	60	90
Mínimo	0,49	0,38	0,87	0,68	0,82	0,61	1,43	1,48	1,78	1,62
Máximo	1,68	4,83	2,91	2,81	2,52	2,56	9,20	6,41	4,91	6,20
Amplitude	2,17	5,21	3,78	3,49	3,34	3,17	10,63	7,89	6,69	7,82
Média Aritmética	1,16	2,17	1,99	1,78	1,65	1,66	3,77	3,86	3,51	3,28
Desvio Padrão	0,42	1,02	0,72	0,63	0,59	0,61	2,03	1,58	1,57	1,31

p-valor intergrupo: T0=0,0019 ;T30=0,0019 ;T45<0,0001 ; T60<0,0001 e T90<0,0001

Quadro 4: Comparação estatística intragrupo entre os valores da relação Phe/Tyr nos tempos testados.

		T0	T30	T45	T60	T90
		Heterozigoto	T0	-	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,4115	0,5034	0,1961
	T45	-	-	-	0,0516	0,0431
	T60	-	-	-	-	0,5320
	T90	-	-	-	-	-
Controle		Jejum	30 min	45 min	60 min	90 min
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,2887	0,0484	0,0102
	T45	-	-	-	0,0134	0,0010
	T60	-	-	-	-	0,0817
	T90	-	-	-	-	-

5.3.3. Análise longitudinal x Análise transversal

A figura 5 mostra as análises (longitudinal e transversal) da variável Phe/Tyr nos dois grupos testados.

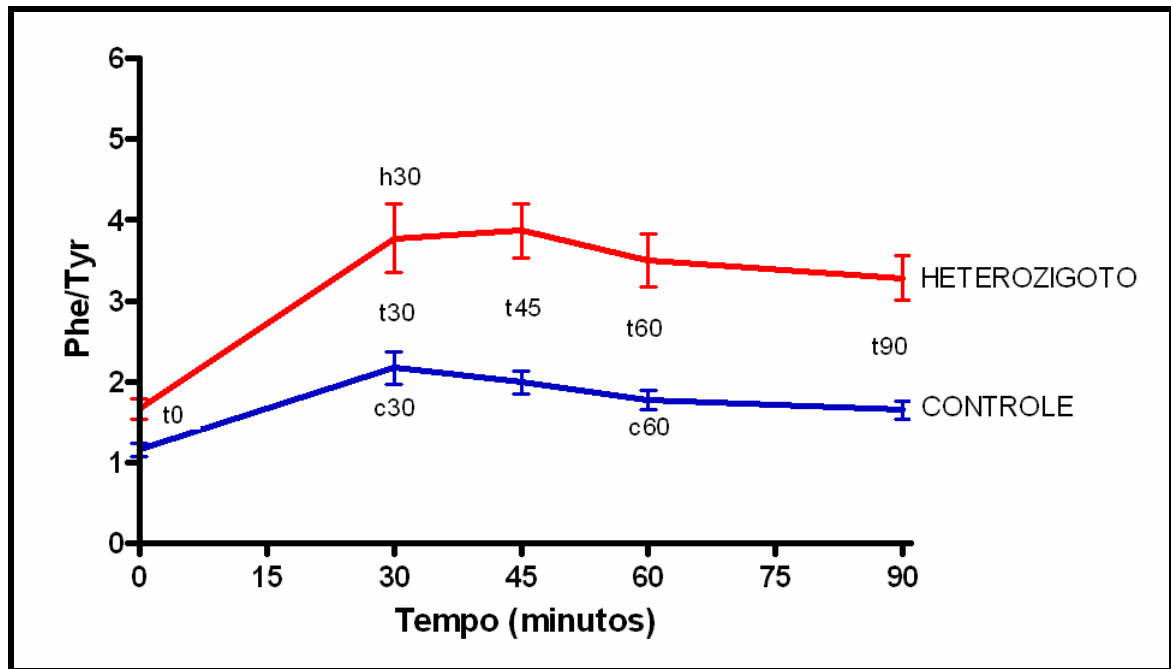


Figura 5: Média e Erro padrão da variável Phe/Tyr nos grupos controle (n=27) e heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

5.4. Variável Phe^2/Tyr

5.4.1. Análise longitudinal

Em relação à variável Phe^2/Tyr , o grupo controle em T0 apresentou valor igual a $1,49 \pm 0,80$ mg/dL com elevação máxima em T30 ($7,75 \pm 4,90$ mg/dL). A partir deste tempo, a variável começou a declinar (Tabela 4). Todos os valores desta variável após a sobrecarga do aminoácido Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$). Outras diferenças significativas também foram observadas: T45 ($6,25 \pm 3,71$ mg/dL) em relação a T30 ($7,75 \pm 4,90$ mg/dL); T60 ($4,73 \pm 2,40$ mg/dL) em relação a T30 e de T45; T90 ($3,78 \pm 1,99$ mg/dL) em relação ao T0, T30, T45 e T60 (Quadro 5);(Tabela 4).

No grupo de heterozigotos a relação Phe^2/Tyr em T0 foi de $2,87 \pm 1,74$ mg/dL, atingindo o seu valor máximo em T45 ($18,22 \pm 11,32$ mg/dL) (Tabela 4). Todos os valores após a sobrecarga de Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$). O valor médio encontrado para esta variável em T90 ($11,85 \pm 6,64$ mg/dL) foi menor que os valores encontrados em T45 ($18,22 \pm 11,32$ mg/dL) e T60 ($16,23 \pm 10,09$ mg/dL) ($p < 0,05$) (Quadro 05);(Tabela 4).

5.4.2. Análise transversal

Quando o dois grupos foram comparados, os valores apresentados pela variável Phe^2/Tyr foram significativamente maiores em todos os tempos testados no grupo de heterozigotos ($p < 0,01$).

Tabela 4: Valores da variável Phe^2/Tyr nos grupos Controle (n=27) e Heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

	Grupo controle					Grupo de heterozigoto				
	Tempo (minutos)					Tempo (minutos)				
	0	30	45	60	90	0	30	45	60	90
Mínimo	0,47	0,43	2,05	1,00	1,25	0,45	1,72	1,98	3,45	3,96
Máximo	3,67	21,13	16,11	9,73	8,37	7,28	53,55	47,55	35,02	32,45
Amplitude	3,20	20,70	14,06	8,73	7,12	6,83	51,83	45,57	31,57	28,49
Mediana	1,46	7,92	5,36	4,31	3,26	2,55	14,29	14,58	12,29	10,37
Média Aritmética	1,49	7,75	6,25	4,73	3,78	2,87	16,19	18,22	16,23	11,85
Desvio Padrão	0,80	4,90	3,71	2,40	1,99	1,74	13,23	11,32	10,09	6,64

p-valor intergrupo: T0=0,0007 ; T30=0,0042 ; T45<0,0001 ; T60<0,0001 e T90<0,0001

Quadro 5: Comparação estatística intragrupo entre os níveis de Phe²/Tyr nos tempos testados.

Heterozigoto		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,2735	0,9515	0,2478
	T45	-	-	-	0,1618	0,0021
	T60	-	-	-	-	0,0116
	T90	-	-	-	-	-
Controle		T0	T30	T45	T60	T90
	T0	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T30	-	-	0,0488	0,0012	0,0004
	T45	-	-	-	0,0031	<0,0001
	T60	-	-	-	-	0,0035
	T90	-	-	-	-	-

5.4.3. Análise longitudinal x Análise transversal

A Figura 06 mostra as análises (longitudinal e transversal) da variável Phe²/Tyr nos dois grupos testados.

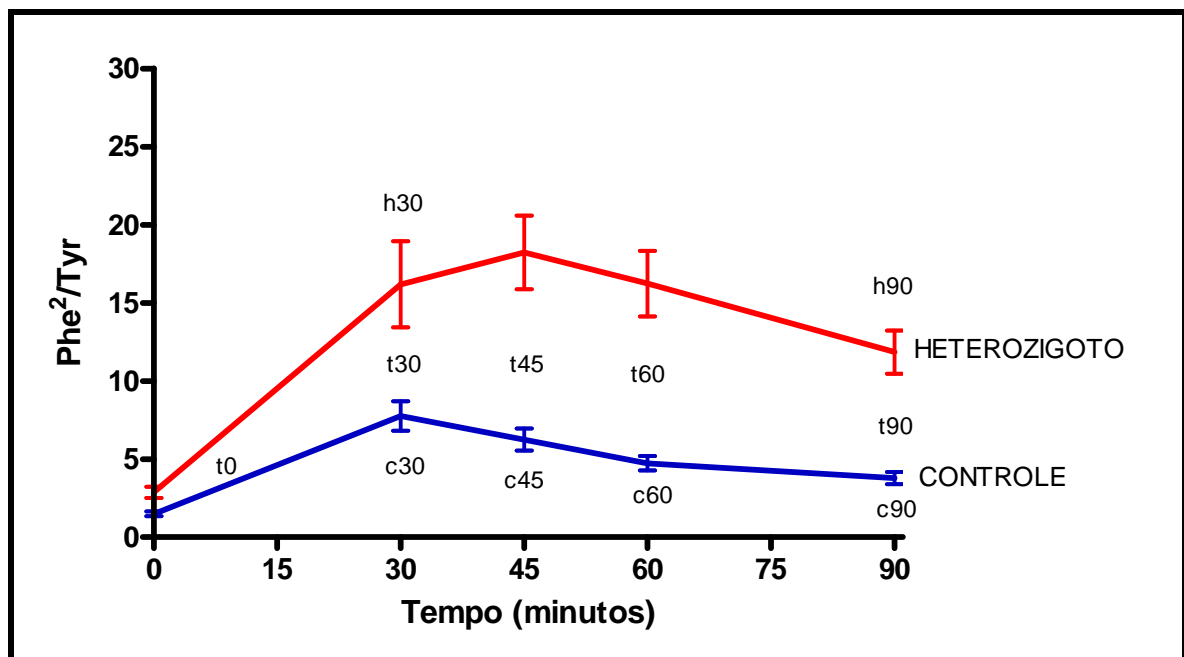


Figura 6: Média e Erro padrão da variável Phe²/Tyr nos grupos controle (n=27) e heterozigoto (n=23), nos tempos T0, T30, T45, T60 e T90.

5.5. Valores utilizados na análise do desempenho dos métodos discriminatórios (grupo controle x grupo de heterozigotos)

Os parâmetros (Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr) para distinguir indivíduos heterozigotos de controles foram selecionados a partir dos valores de sensibilidade e especificidade. Esses indicadores foram utilizados para construir a análise do desempenho dos métodos diagnósticos, os quais foram plotados na Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*). A tabela 5 mostra os valores obtidos que serviram de base para construção das figuras 7, 8, 9 e 10.

Tabela 5: Sensibilidade, Especificidade e Ponto de Corte das variáveis Phe (mg/dL), Tyr(mg/dL), Phe/Tyr e Phe²/Tyr.

		Sensibilidade	Especificidade	Distância	Ponto de Corte
Phe	T45	0,869	0,926	0,150	3,960
	T60	0,782	0,926	0,230	3,240
	T90	0,869	0,852	0,197	2,710
Tyr	T30	0,815	0,783	0,286	1,290
	T45	0,778	0,689	0,377	1,220
	T90	0,825	0,652	0,378	1,150
Phe/Tyr	T0	0,738	0,778	0,343	1,340
	T30	0,739	0,815	0,320	2,650
	T45	0,826	0,815	0,254	2,480
	T60	0,957	0,630	0,373	1,910
	T90	0,913	0,778	0,239	2,030
Phe ² /Tyr	T0	0,783	0,815	0,286	1,810
	T30	0,565	0,926	0,441	14,080
	T45	0,913	0,778	0,239	7,300
	T60	0,739	0,963	0,263	9,500
	T90	0,826	0,889	0,206	6,220

Fonte: Protocolo da pesquisa.

5.6. Curva ROC para a variável Phe

A figura 7 mostra característica operacional da variável Phe (mg/dL). Os valores de sensibilidade e especificidade para o parâmetro Phe nos momentos T45, T60 e T90 são apresentados no diagrama o qual destaca as respectivas distâncias até o padrão ouro (Golden Standard, Sensibilidade = 1 e Especificidade = 1). Na Curva ROC a linha tracejada (d) indica que a Phe (mg/dL) no instante T45 foi o ponto que mais se aproximou do padrão ouro, logo, apresentou os melhores valores de sensibilidade (0,869) e especificidade (0,926). Desta forma, foi em T45 que o aminoácido Phe (mg/dL) apresentou maior potencial de distinção entre os grupos de heterozigoto e controles.

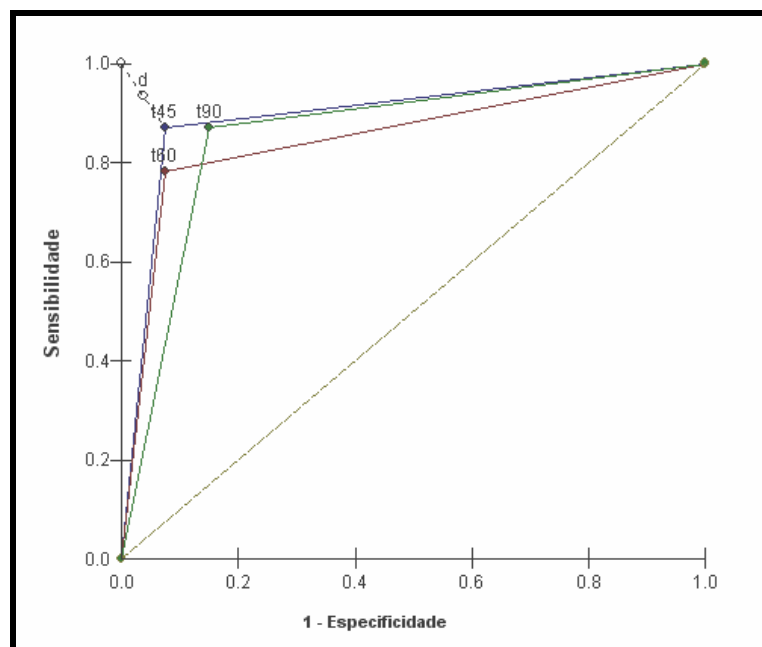


Figura 7: Curva ROC da variável Phe para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.

5.7. Curva ROC para a variável Tyr

A figura 8 mostra a característica operacional da variável Tyr (mg/dL). Os valores de sensibilidade e especificidade para Tyr (mg/dL) nos momentos T30, T45 e T90 são os que apresentaram a menor distância em relação ao padrão ouro. Porém, o melhor resultado da variável Tyr ocorreu em T30, o qual obteve sensibilidade de 0,815 e especificidade de 0,783. Entretanto, a variável Tyr isoladamente não esteve entre os resultados que mais se aproximaram do padrão ouro.

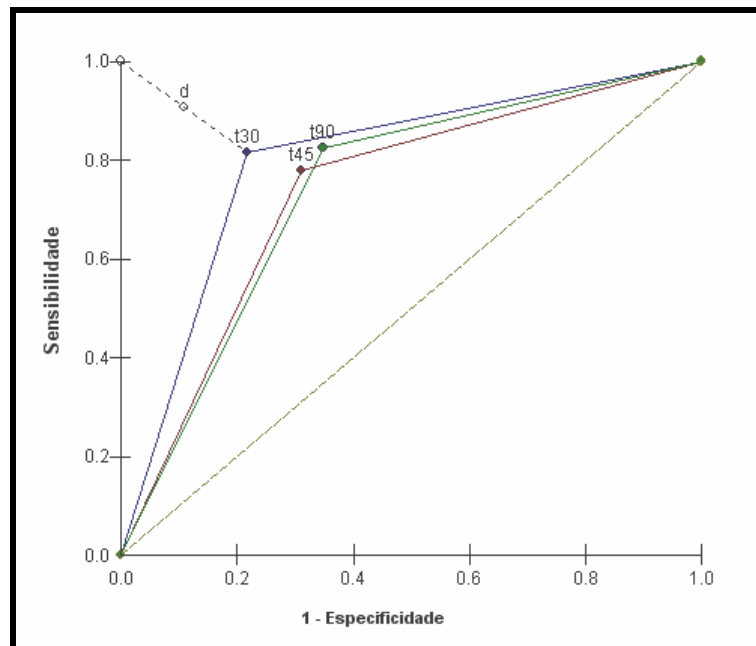


Figura 8: Curva ROC da variável Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.

5.8. Curva ROC para a variável Phe/Tyr

A figura 9 mostra o desempenho da variável Phe/Tyr em T30, T45 e T90. Estes tempos para Phe/Tyr são os que apresentaram a menor distância em relação ao padrão ouro. O melhor resultado para esta variável ocorreu em T90, o qual obteve sensibilidade de 0,913 e especificidade de 0,778. No entanto, a variável Phe/Tyr não esteve entre os resultados que mais se aproximaram do padrão ouro.

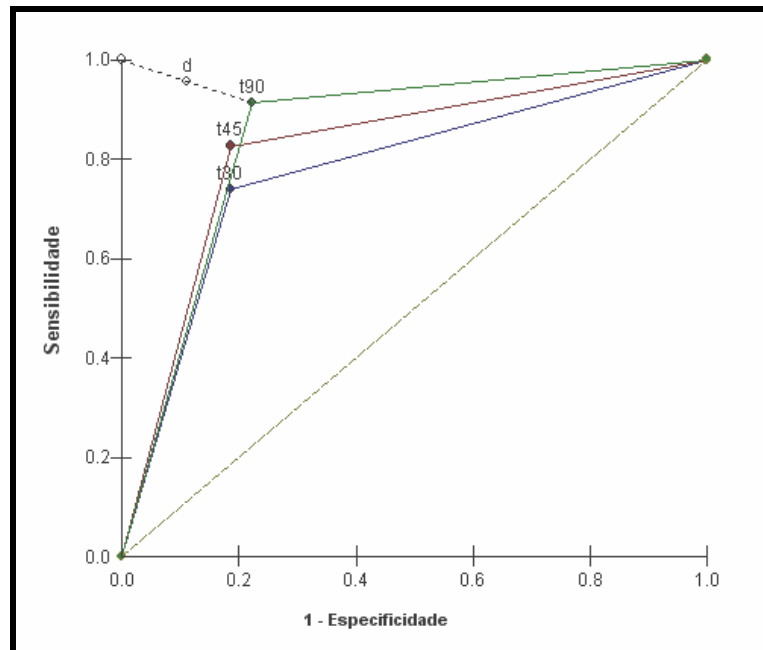


Figura 9: Curva ROC da variável Phe/Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.

5.9. Curva ROC para a variável Phe^2/Tyr .

A figura 10 mostra o desempenho da variável Phe^2/Tyr nos momentos T45, T60 e T90, os quais apresentaram a menor distância em relação ao padrão ouro. Foi observado que T90 apresentou um dos melhores valores de sensibilidade (0,826) e especificidade (0,889).

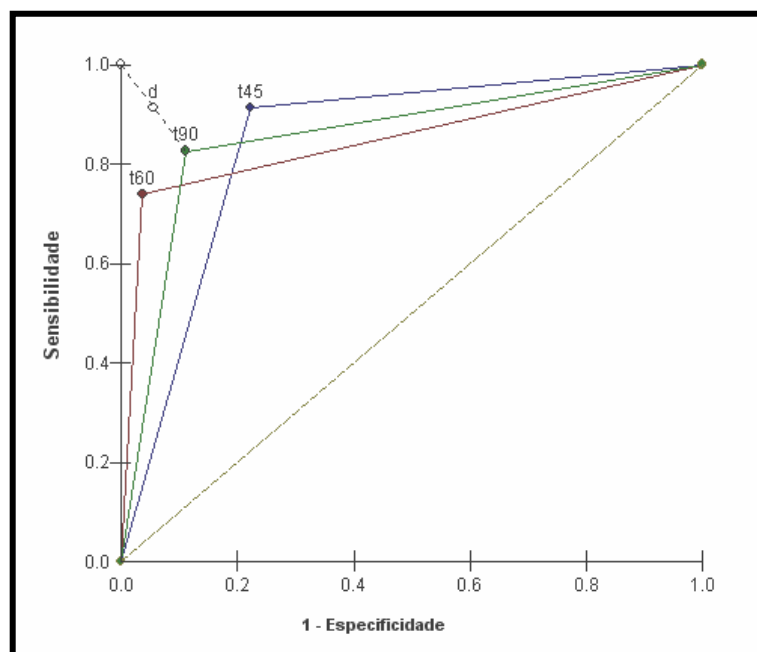


Figura 10: Curva ROC da variável Phe^2/Tyr para determinar o melhor ponto de corte que discrimine heterozigotos de indivíduos normais.

5.10. Valores Preditivos

A tabela 6 apresenta o conjunto completo dos valores preditivos das três melhores variáveis (Phe T45, Phe T90 e Phe^2/Tyr T90) observadas na Curva ROC. Esses valores permitem uma abordagem analítica do desempenho dos testes.

Tabela 6: valores preditivos das variáveis Phe T45, Phe T90 e Phe²/Tyr T90.

	Phe 45	Phe 90	Phe²/Tyr 90
Sensibilidade	0,869	0,869	0,826
Especificidade	0,926	0,852	0,889
Ponto de Corte	3,96	2,71	6,220
Falsos Positivos	7,41%	14,81%	11,11%
Falsos Negativos	13,04%	13,04%	17,39%
Valor Preditivo do teste Positivo	90,91%	83,33%	86,36%
Valor Preditivo do teste Negativo	89,29%	88,46%	85,71%
Acurácia	90,00%	86,00%	86,00%
+LR (Likelihood Ratio) Positiva	11,74	5,87	7,43
-LR (Likelihood Ratio) Negativa	0,14	0,15	0,20

Fonte: Protocolo de Pesquisa

5.11. Curva ROC para os três melhores parâmetros

A figura 11 apresenta a curva ROC usada na comparação entre os três melhores resultados (Phe T45, Phe T90 e Phe²/Tyr T90). O diagrama mostra a distância observada entre a curva e o padrão ouro: Phe T45 (distância = 0,15), Phe T90 (distância = 0,197) e Phe²/Tyr T90 (distância = 0,206). Essas variáveis são as que melhor expressaram a diferença entre indivíduos heterozigotos e o grupo controle. Portanto, foram selecionadas para compor o modelo multivariado (análise discriminante).

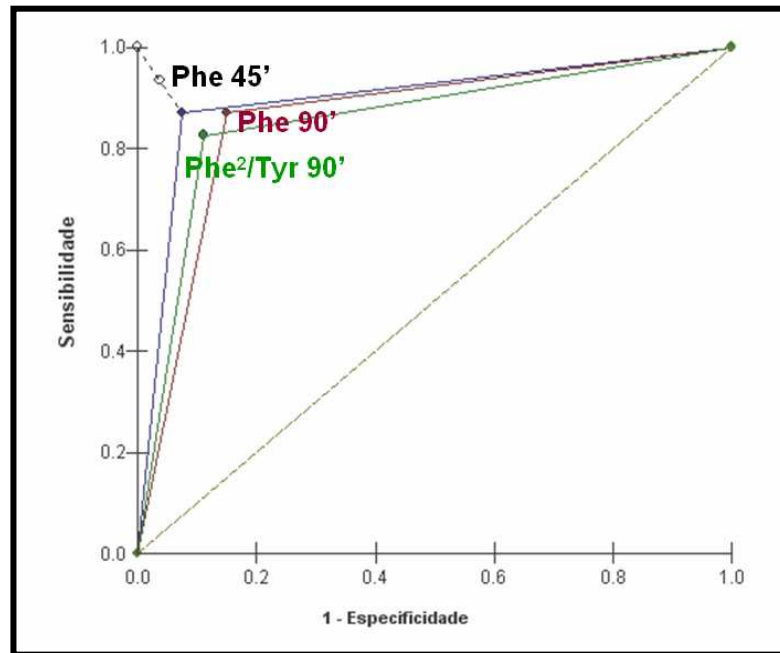


Figura 11: Curva ROC das três melhores variáveis (PheT45, PheT90 e Phe²/TyrT90) para determinar o melhor ponto de corte que discrimine indivíduos heterozigotos de indivíduos normais.

5.12. Análise Discriminante das três melhores variáveis (Phe T45, Phe T90 e Phe²/Tyr T90)

A análise discriminante apresentou as funções: $Y' = -0.0996 X1 + 0.9928 X2 + 0.0668 X3$ e $Y'' = 0.1000 X1 + 0.9801 X2 - 0.1717 X3$. A partir destas funções foi elaborado um diagrama que auxiliou na classificação de cada indivíduo do grupo de heterozigotos e do grupo de controle, conforme os valores apresentados nas três variáveis preditivas (Figura 12), onde:

- X1 → Phe T45
- X2 → Phe T90
- X3 → Phe²/Tyr T90

O quadro 6 apresenta a classificação dos indivíduos dos dois grupos testados a partir da aplicação das equações discriminantes.

Quadro 06 - Classificação dos indivíduos a partir da aplicação das equações discriminantes

Sensibilidade	73,91%
Especificidade	88,89%
Falso-positivos (Erro Tipo I)	11,11%
Falso-negativo (Erro Tipo II)	26,09%
Prevalência	0,460 ou 46%
Valor preditivo do teste positivo	94,4%
Valor preditivo do teste negativo	81,25%
Acurácia	0,86 ou 86%
+LR (Likelihood Ratio) Positiva	19,96
-LR (Likelihood Ratio) Negativa	0,27

Fonte: Protocolo da Pesquisa

A figura 12 mostra 06 indivíduos pertencentes ao grupo de heterozigotos que após a sobrecarga de Phe apresentaram valores abaixo dos esperados para homozigotos normais para PKU (falso negativos) e 03 indivíduos do grupo controle que se comportaram como se pertencessem ao grupo de heterozigotos (falso positivos) (figura 1 e tabela 7).

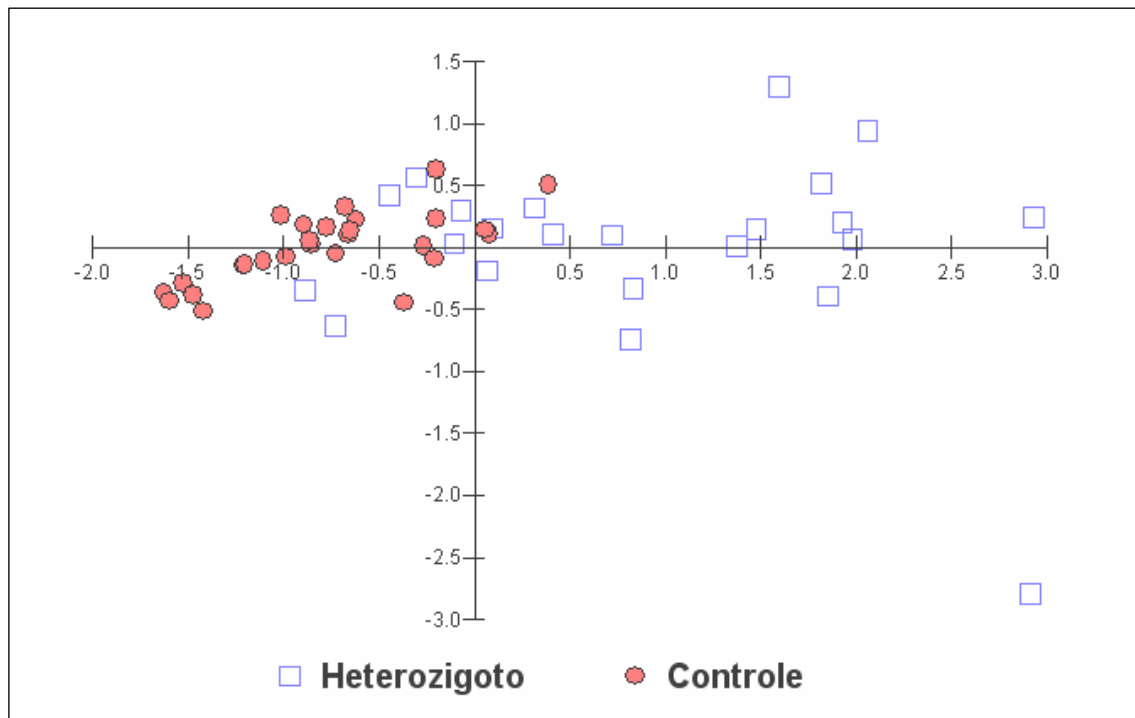


Figura 12: Diagrama de classificação dos indivíduos do grupo de heterozigotos e do grupo controle

A tabela 7 ilustra valores mínimos e máximos de Phe (mg/dL) das três melhores variáveis utilizadas para distinguir indivíduos heterozigotos de normais (PheT45, PheT90 e Phe²/TyrT90).

Tabela 7: Valores mínimos e máximos das três melhores variáveis que discriminam indivíduos normais de heterozigotos

GRUPOS	Phe T45 (mg/dL)		Phe T90 (mg/dL)		Phe ² /Tyr T90 (mg/dL)	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.
Grupo Heterozigoto	1,34	5,56	1,95	5,08	3,96	32,45
Falsos Positivos (03)	2,48	5,28	2,79	3,26	6,18	8,37
Grupo controle	1,56	5,28	1,41	3,26	1,25	8,37
Falsos Negativos (06)	1,34	4,31	1,95	2,81	3,96	7,23

Fonte: Protocolo da Pesquisa

6. DISCUSSÃO

A ausência de técnicas adequadas para o ensaio da enzima fenilalanina hidroxilase para a detecção de heterozigotos para PKU e também a dificuldade de análise molecular no gene da PAH devido ao grande número de mutações têm contribuído para implantação de testes bioquímicos confiáveis que sejam utilizados em procedimentos de discriminação entre heterozigotos para a PKU e indivíduos normais.

O presente estudo analisa quais dos diferentes parâmetros (Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe^2/Tyr) possuem a propriedade de discriminar indivíduos normais de heterozigotos para a PKU. Para tanto, foram comparados valores destas variáveis na condição de jejum (T0) e após a sobrecarga de Phe (25mg/kg): T30 (30 minutos), T45 (45 minutos), T60 (60 minutos) e T90 (90 minutos). A ingesta diária de Phe para um indivíduo normal é de 2500mg/dia (Scriver, 2001). A FAO/OMS/ONU (1985) preconiza 14mg/Kg/dia deste aminoácido.

Os parâmetros utilizados neste estudo se baseiam nos seguintes fatos: a taxa esperada de hidroxilação da Phe em Tyr é menor que nos heterozigotos quando comparada com a de indivíduos normais; é esperado que o aminoácido Tyr apresente níveis plasmáticos maiores em indivíduos normais; considerando que os heterozigotos apresentam níveis mais elevados de Phe e menores de Tyr, é esperado que as relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr sejam usadas para aumentar o grau de discriminação entre os heterozigotos para PKU e indivíduos normais. Apesar dos estudos descreverem importantes zonas de sobreposição quanto estes parâmetros são usados (Silva *et al*, 2000; Guldborg, 1998).

No grupo controle todos os valores de Phe observados após a sobrecarga deste aminoácido foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do valor encontrado em T0. Esses achados estão de acordo com outros trabalhos (Alós *et al*, 1993). Esta variável elevou-se

significativamente ($p < 0,01$) até atingir o ponto máximo em T30, sugerindo que este aminoácido está sendo rapidamente metabolizado em Tyr.

A variável Tyr atingiu valores significativamente maiores em T30 ($p < 0,001$), sugerindo da mesma forma que, na análise da variável Phe, o substrato Phe está sendo rapidamente desdobrado em Tyr.

Para as variáveis Phe/Tyr e Phe^2/Tyr , o valor máximo encontrado para estas relações foi em T30 e todos os valores após a sobrecarga de Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$). Esses achados foram obtidos em outros trabalhos (Hilton *et al*, 1986; Silva 1997)

No grupo de heterozigotos o valor médio de Phe e as relações Phe/Tyr e Phe^2/Tyr atingiram o valor máximo em T45, sugerindo que o desdobramento deste aminoácido em Tyr está mais lento, comparado com o grupo controle. Na análise da variável Tyr, observou-se que esta atingiu valor máximo em T60. Ratificando a lenta hidroxilação da Phe em Tyr. Estes resultados foram encontrados por Silva e colaboradores (2000).

Quando foi feita a comparação entre os dois grupos na condição de jejum e após a sobrecarga, os níveis séricos de Phe entre os dois grupos apresentaram comportamento significativamente diferente ($p < 0,001$). O grupo de heterozigotos apresentou valores maiores que o grupo controle. Este achado está de acordo com dados da literatura (Verduci, 2002, Silva, 2000). Em T60 ocorreu a maior diferença entre heterozigoto e controles ($p < 0,001$). Garcia *et al* (1993) observou em seu estudo que o grupo de heterozigotos apresentou o dobro da concentração deste aminoácido em relação ao grupo controle e em 60 minutos ocorria a maior diferença.

Em relação à variável Tyr, o grupo controle apresentou valores médios de Tyr em T30, T45 e T90 maiores que os observados no grupo de heterozigotos. Em T30 ocorreu a

maior diferença entre heterozigoto e controle ($p < 0,001$). Esses achados estão de acordo com Spada *et al* (1998) e Guldborg (1998).

As variáveis Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram significativamente maiores no grupo de heterozigotos em todos os tempos testados ($p < 0,01$). Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Silva *et al*, (1997); Song *et al*, (2001); Abdalla *et al*, (2008).

O uso da curva ROC para selecionar o melhor parâmetro que discrimine heterozigotos para PKU de indivíduos normais e com a menor taxa de sobreposição possível foi encontrado apenas no trabalho de Abdalla *et al* (2008). Neste trabalho foram comparados 20 heterozigotos obrigatórios para a PKU com 45 indivíduos presumivelmente normais. As concentrações plasmáticas de Phe e Tyr, além de razões Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram determinadas e análise estatística da diferença entre os dois grupos foi feita pelo teste t de Student. Os valores médios para os valores de Phe, Phe/Tyr e Phe²/Tyr foram significativamente maiores em heterozigotos PKU que nos indivíduos controle. A análise da curva ROC foi realizada para as mesmas quatro variáveis bioquímicas. O valor da área sob a curva (ROC) foi obtido para cada parâmetro. A relação Phe²/Tyr apresentou uma área correspondente a 1, o que significa que esta relação apresentou discriminação dos grupos sem sobreposição (Abdalla *et al.*, 2008).

Este procedimento também foi realizado em 20 membros de famílias em situação de risco para PKU e foram encontrados 9 heterozigotos para PKU, indicando um método com alto grau de precisão, simples, confiável e podendo ser útil no rastreamento de heterozigotos para PKU (Abdalla *et al.*, 2008).

Em relação ao presente estudo, a curva ROC da variável Phe (mg/dL) no instante T45 foi o ponto que mais se aproximou do padrão ouro (melhores valores de sensibilidade e especificidade do teste). A variável Tyr (mg/dL) apresentou o melhor desempenho em T30 e as variáveis Phe/Tyr e Phe²/Tyr apresentaram o melhor resultado em T90.

Os três melhores parâmetros para distinção entre indivíduos heterozigotos de normais foram, na ordem, Phe T45, Phe T90 e Phe²/Tyr T90, sendo que esta última variável apresentou o melhor desempenho no estudo de Abdalla *et al.*, 2008.

A taxa de falso-negativos para as três melhores variáveis (Phe 45, Phe 90 e Phe²/Tyr T90) foi de 13,04%, 13,04% e 17,39%, respectivamente. A taxa de falso-positivos foi de 7,41% para Phe 45, 11,11% para Phe²/Tyr 90 e 14,81% para Phe 90. A variável Phe 45 apresentou a menor taxa de falso-positivos, indicando uma discriminação correta de 92,59% dos indivíduos do grupo controle.

Neste trabalho foram observados 6 indivíduos pertencentes ao grupo de heterozigotos que após a sobrecarga de Phe apresentaram valores abaixo dos esperados para homozigotos normais e 03 indivíduos do grupo controle que se comportaram como se pertencessem ao grupo de heterozigotos. No trabalho de Silva *et al*, 1997, após uma sobrecarga do adoçante aspartame (100 mg/kg, o qual contem 56 mg/kg de Phe), 03 indivíduos (mulheres) do grupo controle apresentaram valores de Phe acima dos esperados para indivíduos normais e 01 heterozigoto para PKU apresentou valores menores que o esperado para esta condição.

A curva ROC demonstrou que os melhores parâmetros para discriminar heterozigotos de indivíduos controles foram Phe T45, Phe T90 e Phe²/Tyr90. A partir desses achados, foi possível identificar a acurácia desses parâmetros: 90,00%, 86,00% e 86,00%, respectivamente. A acurácia corresponde à proporção dos indivíduos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos em relação a todos os resultados possíveis para o teste em questão. O valor preditivo positivo expressa a probabilidade de um heterozigoto ser de fato um heterozigoto para PKU. O valor preditivo positivo das melhores variáveis foram respectivamente: 90,91%, 83,33% e 86,36%. O valor preditivo negativo expressa a probabilidade de um indivíduo do grupo controle não ser heterozigoto para PKU. O valor preditivo negativo foram respectivamente: 89,29%, 88,46% e 85,71% (tabela 6).

A Razão de Probabilidade Positiva (+LR, *Likelihood Ratio*) refere-se à razão entre a probabilidade de um teste ser positivo em heterozigotos e a probabilidade do mesmo teste ser positivo em indivíduos controle (falso-positivos). Expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em heterozigotos quando comparado com indivíduos controle. Os resultados deste teste para as três melhores variáveis foram: Phe 45 (11,74), Phe 90 (5,87) e Phe²/Tyr 90 (7,43).

A Razão de Probabilidade Negativa (-LR, *Likelihood Ratio*) refere-se à razão entre a probabilidade de um teste ser negativo em heterozigotos para PKU (falso-negativos) e a probabilidade do mesmo teste ser negativo em indivíduos controle. Expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em heterozigotos para PKU quando comparado com não portadores. Os resultados deste teste para as três melhores variáveis foram: Phe 45 (0,14), Phe 90 (0,15) e Phe²/Tyr 90 (0,20).

Com o objetivo de aumentar o grau de discriminação entre os dois grupos aqui analisados foram elaboradas funções discriminantes a partir dos três melhores parâmetros.

Foi possível identificar uma sensibilidade de 73,91% e uma especificidade de 88,89%. A taxa de falso positivos e falso negativos foi respectivamente 11,11% e 26,09%. O valor preditivo do teste positivo foi de 94,4% e o valor preditivo do teste negativo foi de 81,25%.

A especificidade expressa a porcentagem de pacientes sem a doença, cujos resultados do exame foram negativos. Se o teste apresentar alta especificidade raramente classificará como doente um indivíduo sem a doença. Por outro lado, se o teste não é específico ele indicará erroneamente a presença da doença em alguns indivíduos não doentes que significará a taxa de erro falso-positivo (Fontelles, 2010).

A sensibilidade expressa a porcentagem dos pacientes com a doença cujos resultados dos exames foram positivos. Se o teste não é sensível ele não detectará a doença em alguns

dos indivíduos doentes. A proporção destes indivíduos é chamada de taxa de erro falso-negativo (Fontelles, 2010).

No trabalho de Silva *et al* (1997) a função discriminante aplicada na situação de jejum mostrou-se mais eficaz que a utilizada após a sobrecarga de aspartame, classificando corretamente 98% dos indivíduos testados com 97% de precisão. Apenas um indivíduo heterozigoto por apresentar valores abaixo de 2 desvios padrões da média, foi erroneamente classificado e considerado falso negativo. Por outro lado, a função discriminante após a sobrecarga classificou corretamente apenas 91,8% dos indivíduos com 96% de precisão. Novamente, um indivíduo heterozigoto foi considerado falso negativo. Contudo três mulheres do grupo controle apresentaram valores acima dos esperados para homozigotos normais e apresentaram uma probabilidade significativa de pertencerem ao grupo de heterozigotos (Silva *et al*, 1997).

Neste estudo, após a aplicação da função discriminante, foram identificados 6 indivíduos falso negativos no grupo de heterozigotos (26,09%), sendo quatro do sexo masculino e dois do sexo feminino e 3 indivíduos falso positivos no grupo controle (11,11%), dois do sexo masculino e um do sexo feminino. É preciso ressaltar que foram determinados previamente nesse estudo critérios de exclusão, dentre eles o uso de anticoncepcionais orais, período menstrual e gravidez. Fatores que podem interferir no metabolismo da Phe e classificar um indivíduo controle como um heterozigoto para PKU. Dentre estes fatores, os que mais contribuem para erro de classificação são os contraceptivos orais, porém a anemia por deficiência de ferro também é um fator a ser considerado. Não se pode descartar também a pequena possibilidade da presença de heterozigotos no grupo controle, uma vez que a frequência de heterozigotos na população varia de 1:50 a 1:70 (Blitzer *et al*, 1986: Lehman, 1989: Silva *et al*, 2000).

Este trabalho é original quanto a dosagem de Phe utilizada na sobrecarga (25 mg/Kg) e os diferentes tempos testados para avaliar o metabolismo dos aminoácidos Phe e Tyr. Dentre os outros trabalhos analisados a utilização da Curva ROC foi verificada apenas no trabalho de Abdalla *et al* (2008).

7. CONCLUSÃO

1. Em relação ao grupo controle todos os valores observados após a sobrecarga de Phe foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do valor evidenciado em T0. Esta variável elevou-se significativamente ($p < 0,01$) até atingir o ponto máximo em T30. Os valores médios de Tyr observados após a sobrecarga do aminoácido Phe foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) do valor observado em T0. As variáveis Phe/Tyr e Phe^2/Tyr apresentam elevação máxima em T30 e todos os valores após a sobrecarga de Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$).

2. Em relação ao grupo de heterozigotos para PKU a variável Phe elevou-se significativamente ($p < 0,01$) até T45. Todos os valores desta variável após a sobrecarga do aminoácido Phe foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) de T0. A variável Tyr atingiu valor máximo em T60. Após a sobrecarga de Phe, foi observado que os níveis de Tyr foram diferentes estatisticamente ($p < 0,01$) de T0 somente em T45 e T60. As variáveis Phe/Tyr e Phe^2/Tyr apresentam elevação máxima em T45 e todos os valores após a sobrecarga de Phe foram maiores que os observados em T0 ($p < 0,05$).

3. Quando os dois grupos foram comparados na condição de jejum e após a sobrecarga, os níveis séricos de Phe entre os dois grupos apresentaram comportamento significativamente diferente ($p < 0,001$). O grupo de heterozigotos apresentou valores maiores que o grupo controle. Em T60 ocorreu a maior diferença entre heterozigoto e controles ($p < 0,001$). A variável Tyr após a sobrecarga, no grupo controle apresentou valores médios maiores que os observados no grupo de heterozigotos. Em T30 ocorreu a maior diferença

entre heterozigoto e controle ($p < 0,001$). As variáveis Phe/Tyr e Phe^2/Tyr foram significativamente maiores no grupo de heterozigotos em todos os tempos testados ($p < 0,01$).

4. A curva ROC demonstrou que as variáveis Phe T45, Phe T90 e Phe^2/Tyr 90 foram os melhores parâmetros para discriminar indivíduos heterozigotos para PKU de indivíduos normais. Em função desses resultados foi observado que após 45 minutos da sobrecarga do aminoácido Phe houve um maior faixa de distinção entre os grupos de heterozigoto e controles.

5. Após a análise discriminante foi observada uma taxa de 86% de acurácia e classificação correta de 94,4% dos indivíduos heterozigotos para PKU.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, E. M. Detection of Heterozygous Carriers of PKU in Egypt: Successful Application of a Simple Biochemical Method. **J Egypt Public Health Assoc.** v 83, p. 239-54, 2008.

ACOSTA P. B.; YANNICELI, S. Nutrient intakes and growth of infants with phenylketonuria undergoing therapy. **J Pediatric Gastroenterol Nutrition.** v. 27, p. 287-291, 1998.

ALÓS, T.; BEL, Y.; CABELLO, M. L.; CATALÁ, J. L.; DALMAU, J.; FERRÉ, J.; GARCIA, A. M.; RUIZ-VÁZQUEZ, P. Improved Identification of Heterozygotes for Phenylketonuria Using Blood Neopterin. **J Inher. Metab. Dis.** n 16, p. 457-462, 1993.

AMORIM, T.; GATTO, S. P. P.; BOASORTE, N.; LEITE, M. E. Q.; FONTES, M. I. M. M.; BARRETO, J.; ACOSTA, A. X. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** Recife, v. 5, n. 4, p. 457-462, out. /dez., 2005.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. Bioestat 5.3. Aplicações Estatísticas nas Ares das Ciências Biológicas e Médicas. P. 107 – 147, 2007.

BAULNY, H. O.; ABADIE, FRANCOIS, F.; PASCAU, L. Management of Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia. **The Journal of Nutrition**, p. 1561S-1563S, 2007. Disponível em: <jn.nutrition.org>. Acesso em: 12 mar. 2010.

BLITZER, M.G.; BAILEY-WILSON, J.E.; SHAPIRA, E. Discrimination of heterozygotes for phenylketonuria, persistent hyperphenylalaninemia and controls by phenylalanine loading. **Clin. Chim. Acta.** v. 161, p. 347 - 352, 1986

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 822, de 6 de junho de 2001. Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). {s.n.t.}. 26 p.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; SENEFONTE, F. R. A.; SOUZA, V. G.; BOTELHO, C. A.; DUARTE, G. Fenilcetonúria Materna: Relato de Caso. **RBGO**, v. 26, n. 10, p. 813-817, 2004.

FONTENELLES, M.J. **Bioestatística aplicada à pesquisa experimental.** Belém: M. Fontelles, 2010. V.2.

FREEHAUF, C. L.; LEZOTTE, D.; GOODMAN, S. I.; McCABE, E. R. B. Carrier screening for phenylketonuria; Comparison of two discriminant analysis procedures. **Am. J. Hum. Genet.** v. 36, p. 1180-1189, 1984.

GRIFFIN, R. F.; ELSAS, L. J. Classic Phenylketonuria: Diagnosis through heterozygote detection. **J. Pediatr.** v. 86, p. 512 - 517, 1975.

GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K. F.; LOU, H. C.; GÜTTLER, F. Aberrant phenylalanine metabolism in phenylketonuria heterozygotes. **J. Inher. Metab. Dis.** n. 21, p. 365-372, 1998.

GULDBERG, P.; REY, F.; ZSCHOCKE, J.; ROMANO, V.; FRANÇOIS, B.; MICHIELS, L.; ULLRICH, K.; HOFFMANN, G. F.; BUNGARD, P.; HILDGUND, S.; MELI, C.; RIVA, E.; DIANZANI, I.; PONZONE, A.; REY, J. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Basead Prediction of Metabolic Phenotype. **Am. J. Hum. Genet.** v. 63, p. 63-71, 1998.

GUNERAL, F.; OZALP, I.; TATLIDIL, H. Heterozygous carriers of classical phenylketonuria in a sample of the Turkish population: Detection by a spectrofluorimetric method. **J. Inher. Metab. Dis.** n. 14, p. 741 - 748, 1991.

GARCIA, E. G.; GARCIA, B. B.; GONZÁLEZ, J. M.; FERNANDEZ, P. E.; ROSELLI, E. D.; LOTTI, F. A. Estudio de portadores de fenilcetonuria y otras hiperfenilalaninemias por prueba de tolerancia a la fenilalanina. **Rev. Cubana Pediatr.** v. 65, n. 2, p. 88-92, maio – ago. 1993.

GUTTER, F.; HANSEN, G. Heterozygote detection in phenylketonuria. **Clin Genet.** n. 11, p. 137 - 146, 1977.

HSIA, D.Y.Y.; DRISCOLL, K.U.; TROLL, W.; KNOX, W.E. Detection by phenylalanine tolerance test of heterozygous carrier of phenylketonuria. **Nature**, n. 178, p. 1239 – 1240, 1956.

JAGENBURG, R.; RODGER, S. Detection of heterozygotes for phenylketonuria by constant intravenous infusion of L-phenylalanine. **Clin. Chem.** v. 23, p. 1661-1665, 1977.

LEHMANN, W. D.; THEOBALD, N.; HEINRICH, H. C.; CLEMENS, P.; GRUTTNER, R. Detection of heterozygous carriers for phenylketonuria by a L- $\{^2\text{H}_5\}$ phenylalanine stable isotope loading test. **Clinica Chimica Acta**, v. 138, 1984.

LEHMANN, W. D. Progress in the identification of the heterozygote in phenylketonuria. **The Journal of Pedriatric**, v. 114, n. 6, p. 915-924, jun. 1989.

MACDONALD, A.; CHAKRAPANI, A.; HENDRIKSZ, C.; DALY, A.; DAVIES, P.; ASPLIN, D.; HALL, K.; BOOTH, I. W. Protein substitute dosage in PKU: how much do young patients need? **Arch Dis Child**, n. 91, p. 588 – 593, 2006.

MACLEOD, E.; GLEASON, S. T.; CALCAR, S. C.; NEY, D. M. Reassessment of phenylalanine tolerance in adults with phenylketonuria is needed as body mass changes. **Molecular Genetics and Metabolism**, n. 98, p. 331-337, July, 2009.

Manual de Triagem Neonatal. **Programa estadual de triagem neonatal: teste do pezinho**. Belém, 2009.

MARTINS, A. M.; FRANGIPANI, B. J.; MICHELETTI, C.; OLIVEIRA, R. B. **Protocolo brasileiro de dietas: erros Inatos do metabolismo**. São Paulo: Segmento Farma, 2006.

McCAMAN, M.; ROBINS, E. Fluometric method for the determination of phenylalanine in serum. **J. Lab. Clin. Med.** v. 59:, p. 885 - 890, 1962

MONTEIRO, L. T. B.; CÂNDIDO, L. M. B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Ver. Nutr.**, Campinas, v. 19, n. 3 p. 381-387, maio/ jun., 2006.

Pará. Coordenação Estadual de Saúde da Criança. **Manual de triagem neonatal / Programa Estadual de Triagem Neonatal: teste do pezinho**. Belém, SESPA, 2009.

RAMPINI, S.; ANDERS, P.W.; CURTIUS, H. Ch.; MARTHALER, Th. Detection of heterozygotes for phenylketonuria by column chromatography and discriminatory analysis. **Pediatr. Rev.**, v. 3, p. 287 - 297, 1969.

SANFORD, M.; KEATING, G. M. Sapropterin: A Review of its Use in the Treatment of Primary Hyperphenylalaninaemia. **Drugs**, v. 69, n. 4, p. 462-471, 2009.

SCRIVER C. R.; KAUFMAN S.; EISENSMITH R. C.; WOO S. L. C. THE HYPERPHENYLALANINEMIAS. IN: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D (EDS). The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th Ed McGraw Hill, New York 2001, pp 1667-1724.

SCRIVER C. R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. The hyperphenylalaninaemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. v. 2, p. 1015-1075, 1995.

SHINTAKU, H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. **Curr Drug Metab**, v.3. n.2, p. 123 - 31, 2002.

SILVA, L. C. S.; CARVALHO, T. S.; SILVA, F. B.; PIRES, R. F.; GIUGLIANI, R.; PEREIRA, M. L. S. Aspartame loading test in PKU heterozygous individuals bearing severe and moderate mutations. **Clin Genet**. 2000.

SILVA, L. C. S. Avaliação de um Teste de Sobrecarga de Aspartame para detecção de Heterozigotos para Fenilcetonúria. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade do Rio Grande do Sul**, 1995.

SILVA, L. C. S. ; PIRES, R. F.; COELHO, J. C. JARDIM, L. B.; GIUGLIANI, R. Evaluation of an aspartame loading test for the detection of heterozygotes for classical phenylketonuria. **Clin Genet**, p. 1 – 5, 1997.

SILVA, L. C. S.; CARVALHO, T. S.; SILVA, F. B.; MORALI, L.; FACHEL, A. A.; PIRES, R.; REFOSCO, L. F.; DESNICK, R. J.; GIUGLIANI, R. Molecular Analysis of Phenylketonuria in South Brazil. **Molecular Genetics And Metabolism**, n. 16, p. 140-149, 2003.

SIRTORI, L. R.; DUTRA-FILHO, C. S.; FITARELLE, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A. G.; WAJNER, M.; COELHO, D. M.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C. R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.20, 2005.

SITTA, A.; BARSCHAK, A. G.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; BIANCINI, G. B.; VARGAS, P. R.; SOUZA, C. F.; NETTO, C.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidate damage in phenylketonuric patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, p. 243-247, 2009.

SONG, L.; XU, F.; MENG, Y.; WANG, X. ; LIU, C. ; GAO, W. ; SHAN, Z. ; LIU, C.; DING, Z. A Study of Phenylketonuria Heterozygotes Screenin. **Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 18, n. 1, p. 56 – 58, fev. 2001.

SPADA, M.; DIANZANI, I.; BONETTI, G.; BIONDI, A.; LEONE, L.; GIANNATTASIO, S.; PONZONE, A. Phenylalanine and tyrosine metabolism in phenylketonuria heterozygotes: Influence of different phenylalanine hydroxylase mutations. **J. Inher Metab. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 236-239, 1998.

VERDUCI, E. ; RIVA, E. ; AGOSTINI, C.; LEVITI, S.; FIORI, L.; LAMMARDO, A. M.; BIONDI, M. L.; GIOVANNINI, M. Phenylalanine hydroxilase mutations and phenylalanine-

tyrosine metabolism in heterozygotes for phenylalanine hydroxylase deficiency. **Acta Paediatr**, n. 91, p. 805-810, 2002.

VILARINHO, L.; QUEIRÓS. A.; LEANDRO, P.; ALMEIDA, I. T.; RIVIERA, I. Fenilcetonúria revisitada. **Arquivos de Medicina**. v. 20, n. 5/6, p. 161-172, 2006.

WILLIAMS, R. A.; MAMOTTE, C. D. S.; BURNETT, John R. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. **Clin Biochem Rev**, v. 29, p. 31-41, febr. 2008.

WOO, S. L. C.; GILLAN, Shirley Su; WOOLF, Louis I. The Isolation and Properties of Phenylalanine Hydroxylase from Hum Liver. **Biochem J.**, n. 139, p. 741-749, 1974.

WOO, S.L.C.; LIDSKY, A. S.; GUTTLER, F.; CHANDRA, T.; ROBSON, K. J. H.. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature**. n. 306, p. 151 – 155, 1983.

Anexos:

- (A) Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa
- (B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 (Baseado na Resolução N° 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa: “**METABOLISMO DA FENILALANINA E TIROSINA EM HETEROZIGOTOS PARA A FENILCETONÚRIA**”, que é desenvolvida pela Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará). Para que você decida participar ou não da pesquisa lhe serão prestadas as seguintes informações:

- Título do projeto: “Metabolismo da Fenilalanina e Tirosina em Heterozigotos para a Fenilcetonúria”
- Pesquisadores responsáveis: Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular Roseani da Silva Andrade e seu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva.
- Esta é uma pesquisa sigilosa e garantido o total anonimato dos participantes do estudo, isto significa que, somente os pesquisadores terão acesso aos resultados.
- Os riscos associados a esse procedimento são mínimos por que os métodos e práticas são de uso rotineiro, podendo ocorrer dor e (equimoses) manchas roxas no local da coleta.
- Serão utilizados materiais descartáveis como luvas, agulhas e seringas e escalpe.
- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- Não haverá nenhum tipo de despesa para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.

Assinatura do Pesquisador Responsável
 Nome: Roseani da Silva Andrade
 End: Av. Alcindo Cacela, 943 – Umarizal
 Fone: (91) 3246-2229 (residência)
 (91) 3201-8030 (LEIM)

Assinatura do Pesquisador Responsável
 Nome: Luiz Carlos Santana da Silva
 End.: Rua Caripunas, 3660, Apto. 201 (Guamá)
 09132018030

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material.

Belém, ____/____/____

Assinatura do Participante

Comitê de ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) – Complexo de Sala de Aula/ CCS – Sala 13 – Campus Universitário, n 01, Guamá – CEP: 66075-110 – Belém-Pará. Tel/Fax 3201-7735. E-mail: cepccs@ufpa.br

Apêndices:

- (A) Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo heterozigoto
- (B) Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo controle

Apêndice A

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo de heterozigotos em jejum (J); 30 e 45 minutos após a sobrecarga de Phe

	J-Phe	J-Tyr	J-Phe/Tyr	J-Phe ² /Tyr	30'-Phe	30'-Tyr	30'-Phe/Tyr	30'-Phe ² /Tyr	45'-Phe	45'-Tyr	45'-Phe/Tyr	45'-Phe ² /Tyr
H001	2,03	1,01	2,02	4,09	5,72	1,19	4,81	27,52	6,56	1,17	5,61	36,77
H002	1,60	0,82	1,94	3,10	3,69	0,80	4,59	16,91	5,41	0,99	5,46	29,55
H003	1,21	1,16	1,04	1,26	5,75	1,64	3,51	20,18	4,31	1,66	2,60	11,19
H004	2,19	1,41	1,56	3,41	4,75	1,51	3,15	14,94	5,26	1,47	3,57	18,75
H005	1,52	0,91	1,67	2,55	3,62	0,93	3,89	14,08	4,94	1,04	4,75	23,46
H006	2,13	0,79	2,69	5,72	4,40	0,93	4,75	20,87	4,54	2,82	1,61	7,30
H007	1,33	0,93	1,43	1,90	2,66	1,00	2,65	7,05	3,98	1,10	3,61	14,40
H008	0,98	0,48	2,03	1,99	1,16	0,78	1,48	1,72	2,08	0,84	2,48	5,15
H009	1,69	1,26	1,34	2,26	2,75	1,22	2,25	6,20	6,24	1,30	4,82	30,07
H010	1,79	0,88	2,03	3,65	6,53	0,83	7,84	51,14	5,74	0,93	6,16	35,36
H011	1,47	0,99	1,48	2,18	4,08	1,04	3,92	15,99	4,36	1,17	3,73	16,28
H012	1,76	1,12	1,58	2,78	5,04	1,21	4,16	20,96	4,13	0,87	4,73	19,54

Apêndice A

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo de heterozigotos em jejum (J); 30 e 45 minutos após a sobrecarga de Phe

	J-Phe	J-Tyr	J-Phe/Tyr	J-Phe ² /Tyr	30'-Phe	30'-Tyr	30'-Phe/Tyr	30'-Phe ² /Tyr	45'-Phe	45'-Tyr	45'-Phe/Tyr	45'-Phe ² /Tyr
H013	1,53	1,07	1,42	2,17	1,59	1,11	1,43	2,26	1,34	0,91	1,48	1,98
H014	0,74	1,22	0,61	0,45	5,32	1,36	3,92	20,84	3,96	1,13	3,51	13,89
H015	1,84	1,05	1,75	3,21	2,68	1,08	2,48	6,64	4,09	1,15	3,56	14,58
H016	2,09	0,66	3,17	6,62	5,04	0,47	10,63	53,55	6,02	0,76	7,89	47,55
H017	1,59	1,40	1,14	1,81	3,29	1,37	2,40	7,90	4,45	1,56	2,86	12,70
H018	1,21	1,18	1,03	1,24	6,04	2,27	2,66	16,09	4,17	1,98	2,11	8,80
H019	0,93	0,78	1,20	1,11	2,32	0,71	3,29	7,65	4,25	0,86	4,93	20,97
H020	1,98	1,26	1,58	3,13	3,00	1,26	2,37	7,12	4,02	1,20	3,35	13,45
H021	1,05	1,10	0,95	1,00	2,48	0,90	2,77	6,87	2,54	0,86	2,95	7,49
H022	2,60	0,93	2,80	7,28	3,06	0,66	4,66	14,29	4,29	0,86	4,98	21,35
H023	1,85	1,07	1,73	3,20	3,62	1,14	3,18	11,51	3,99	1,87	2,14	8,53

Apêndice A

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo de heterozigotos em e 60 e 90 minutos após a sobrecarga de Phe

	60'-Phe	60'-Tyr	60'-Phe/Tyr	60'-Phe ² /Tyr	90'-Phe	90'-Tyr	90'-Phe/Tyr	90'-Phe ² /Tyr
H001	5,72	1,21	4,73	27,06	4,35	1,11	3,93	17,09
H002	5,22	1,01	5,17	27,01	4,30	1,09	3,94	16,94
H003	4,97	2,48	2,00	9,95	2,73	1,68	1,62	4,42
H004	4,97	2,48	2,00	9,94	4,60	1,57	2,92	13,44
H005	5,86	0,98	5,98	35,02	4,15	0,53	7,82	32,45
H006	4,97	2,60	1,91	9,50	4,33	1,99	2,17	9,41
H007	3,98	0,73	5,42	21,60	2,71	1,02	2,66	7,23
H008	1,77	0,91	1,95	3,45	1,95	0,96	2,03	3,96
H009	5,29	1,67	3,17	16,75	5,08	1,24	4,10	20,83
H010	4,52	0,80	5,65	25,51	4,09	0,90	4,55	18,60
H011	3,85	1,28	3,01	11,57	3,91	1,12	3,49	13,62
H012	4,49	1,24	3,63	16,33	4,25	1,36	3,13	13,29

Apêndice A

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo de heterozigotos em 60 e 90 minutos após a sobrecarga de Phe

	60'-Phe	60'-Tyr	60'-Phe/Tyr	60'-Phe ² /Tyr	90'-Phe	90'-Tyr	90'-Phe/Tyr	90'-Phe ² /Tyr
H013	1,95	0,99	1,97	3,85	1,95	0,73	2,68	5,24
H014	2,72	1,37	1,99	5,41	2,81	1,27	2,21	6,22
H015	3,73	1,13	3,30	12,29	3,10	1,22	2,54	7,86
H016	5,10	0,76	6,69	34,11	3,87	0,99	3,91	15,14
H017	5,92	1,87	3,16	18,73	3,18	0,69	4,63	14,71
H018	3,24	1,82	1,78	5,76	2,58	1,53	1,68	4,35
H019	6,64	1,36	4,90	32,52	3,12	1,05	2,97	9,27
H020	2,68	1,11	2,42	6,49	2,89	1,11	2,61	7,57
H021	3,04	1,47	2,07	6,28	2,71	0,95	2,84	7,68
H022	4,40	0,88	4,99	21,97	3,30	0,84	3,91	12,91
H023	4,43	1,61	2,75	12,19	3,33	1,07	3,12	10,37

Apêndice B

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo controle em jejum (J); 30 e 45 minutos após a sobrecarga de Phe

	J-Phe	J-Tyr	J-Phe/Tyr	J-Phe ² /Tyr	30'-Phe	30'-Tyr	30'-Phe/Tyr	30'-Phe ² /Tyr	45'-Phe	45'-Tyr	45'-Phe/Tyr	45'-Phe ² /Tyr
C001	0,88	1,15	0,77	0,67	3,80	1,47	2,59	9,82	2,85	1,43	1,99	5,68
C002	0,88	1,10	0,80	0,70	0,88	1,10	0,80	0,70	2,69	1,54	1,75	4,70
C003	1,53	1,35	1,14	1,75	2,09	1,60	1,31	2,73	2,02	1,30	1,55	3,14
C004	1,53	0,71	2,17	3,33	4,22	1,29	3,27	13,80	3,87	1,31	2,95	11,43
C005	1,95	1,04	1,88	3,67	5,14	1,69	3,04	15,63	5,28	1,73	3,05	16,11
C006	0,82	0,82	1,00	0,82	2,01	1,31	1,53	3,08	2,75	1,60	1,72	4,73
C007	0,96	1,96	0,49	0,47	3,99	5,73	0,70	2,78	3,03	3,50	0,87	2,62
C008	1,55	0,96	1,61	2,49	3,96	1,93	2,05	8,13	2,75	1,41	1,95	5,36
C009	0,84	1,32	0,64	0,54	1,15	3,06	0,38	0,43	2,45	1,20	2,04	5,00
C010	0,78	0,86	0,91	0,71	1,33	1,23	1,08	1,44	1,56	1,19	1,31	2,05
C011	1,32	1,27	1,04	1,38	3,38	1,56	2,17	7,32	2,91	1,35	2,16	6,27
C012	1,27	0,65	1,95	2,48	4,06	0,78	5,21	21,13	3,7	0,98	3,78	13,97
C013	1,30	1,06	1,23	1,59	2,22	0,9	2,47	5,48	3,4	1,1	3,09	10,51
C014	1,16	1,02	1,13	1,31	3,13	1,38	2,27	7,10	2,65	2,58	1,03	2,72

Apêndice B

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo controle em jejum (J); 30 e 45 minutos após a sobrecarga

	J-Phe	J-Tyr	J-Phe/Tyr	J-Phe ² /Tyr	30'-Phe	30'-Tyr	30'-Phe/Tyr	30'-Phe ² /Tyr	45'-Phe	45'-Tyr	45'-Phe/Tyr	45'-Phe ² /Tyr
C015	1,59	1,49	1,07	1,70	5,06	2,66	1,90	9,63	3,33	1,77	1,88	6,26
C016	1,69	1,75	0,96	1,63	5,22	2,23	2,34	12,22	3,8	1,83	2,08	7,89
C017	0,94	1,28	0,73	0,69	2,74	1,56	1,76	4,81	2,74	1,78	1,54	4,22
C018	1,10	0,87	1,27	1,40	4,26	1,49	2,86	12,18	4,02	1,22	3,30	13,25
C019	0,92	0,52	1,76	1,61	3,06	0,73	4,19	12,83	2,28	2,29	1,00	2,27
C020	0,92	1,14	0,81	0,75	2,72	1,47	1,85	5,03	2,28	0,97	2,35	5,36
C021	1,30	1,10	1,19	1,55	2,07	1,66	1,25	2,58	2,07	1,74	1,19	2,46
C022	1,38	1,18	1,17	1,60	3,6	1,49	2,42	8,70	2,96	2,08	1,42	4,21
C023	0,99	1,00	0,99	0,99	3,01	1,46	2,06	6,21	2,54	1,48	1,72	4,36
C024	1,39	1,33	1,05	1,46	3,64	1,47	2,48	9,01	3,03	1,59	1,91	5,77
C025	1,55	1,38	1,13	1,75	4,66	2,31	2,02	9,40	3,56	1,93	1,84	6,57
C026	1,36	0,90	1,52	2,07	3,54	1,37	2,58	9,15	2,48	1,16	2,14	5,30
C027	1,27	1,51	0,84	1,07	3,91	1,93	2,03	7,92	3,12	1,49	2,09	6,53

Apêndice B

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo controle em 60 e 90 minutos após a sobrecarga de Phe

	60'-Phe	60'-Tyr	60'-Phe/Tyr	60'-Phe ² /Tyr	90'-Phe	90'-Tyr	90'-Phe/Tyr	90'-Phe ² /Tyr
C001	2,80	1,29	2,17	6,08	1,44	1,27	1,13	1,63
C002	2,91	1,29	2,26	6,56	2,53	1,15	2,20	5,57
C003	2,51	1,48	1,70	4,26	1,95	1,59	1,23	2,39
C004	3,21	1,31	2,45	7,87	2,32	1,18	1,97	4,56
C005	3,91	1,82	2,15	8,40	3,26	1,27	2,57	8,37
C006	1,98	1,40	1,41	2,80	1,80	1,38	1,30	2,35
C007	2,00	2,94	0,68	1,36	2,07	2,52	0,82	1,70
C008	2,52	1,22	2,07	5,21	2,18	1,20	1,82	3,96
C009	3,14	1,18	2,66	8,36	2,53	1,06	2,39	6,04
C010	1,25	0,93	1,34	1,68	1,49	1,08	1,38	2,06
C011	2,65	1,54	1,72	4,56	2,65	1,37	1,93	5,13
C012	2,79	0,8	3,49	9,73	2,37	0,71	3,34	7,91
C013	2,65	1,22	2,17	5,76	2,84	1,12	2,54	7,20
C014	2,36	2,91	0,81	1,91	1,88	1,37	1,37	2,58

Apêndice B

Valores Médios de Phe, Tyr, Phe/Tyr e Phe²/Tyr do grupo controle em 60 e 90 minutos após a sobrecarga de Phe

	60'-Phe	60'-Tyr	60'-Phe/Tyr	60'-Phe ² /Tyr	90'-Phe	90'-Tyr	90'-Phe/Tyr	90'-Phe ² /Tyr
C015	2,6	1,77	1,47	3,82	2,36	1,49	1,58	3,74
C016	3,11	1,91	1,63	5,06	2,8	1,87	1,50	4,19
C017	2,11	1,42	1,49	3,14	2,11	1,42	1,49	3,14
C018	3,39	1,38	2,46	8,33	2,18	1,42	1,54	3,35
C019	1,37	1,87	0,73	1,00	1,51	1,82	0,83	1,25
C020	1,9	1,1	1,73	3,28	1,52	1,21	1,26	1,91
C021	1,99	1,68	1,18	2,36	1,41	1,41	1,00	1,41
C022	2,7	1,46	1,85	4,99	2,12	1,42	1,49	3,17
C023	2,17	1,37	1,58	3,44	1,8	1,48	1,22	2,19
C024	2,55	1,51	1,69	4,31	2,3	1,41	1,63	3,75
C025	2,91	2,02	1,44	4,19	2,36	1,71	1,38	3,26
C026	2,87	1,22	2,35	6,75	2,79	1,26	2,21	6,18
C027	2,00	1,55	1,29	2,58	2,22	1,54	1,44	3,20