



Fenilcetonúria em Portugal: 40 anos de rastreio neonatal (1979-2019)

Phenylketonuria in Portugal: 40 years of neonatal screening (1979-2019)

Filipa Ferreira¹, Luísa Azevedo²⁻⁴, Carmen Sousa¹, Raquel Neiva¹, Helena Fonseca¹, Ana Marcão¹, Hugo Rocha¹, Célia Carmona¹, Sónia Ramos¹, Anabela Bandeira⁶, Esmeralda Martins⁶, Teresa Campos⁷, Esmeralda Rodrigues⁷, Paula Garcia⁸, Luísa Diogo⁸, Ana Cristina Ferreira⁹, Sílvia Sequeira⁹, Francisco Silva¹⁰, Luísa Rodrigues¹¹, Ana Gaspar¹², Patrícia Janeiro¹², António Amorim²⁻⁴, Laura Vilarinho^{1,5}

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(4) Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(6) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Departamento de Pediatria, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

(7) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Departamento de Pediatria, Centro Universitário Hospital de São João, Porto, Portugal

(8) Centro de Referência para Doenças Metabólicas, Hospital Pediátrico e Centro Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(9) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisboa Portugal

(10) Departamento de Pediatria, Hospital Central do Funchal, Funchal, Portugal

(11) Departamento de Pediatria, Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, Ponta Delgada, Açores, Portugal

(12) Centro de Referência para Doenças Metabólicas, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

_Resumo

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética autossómica recessiva, devido a um erro hereditário do metabolismo dos aminoácidos. A PKU caracteriza-se por um aumento de fenilalanina, em resultado de uma deficiência da enzima hepática, fenilalanina hidroxilase (PAH), uma enzima codificada pelo gene *PAH*. É uma das 26 patologias integradas no painel das doenças rastreadas em Portugal, a partir de sangue colhido em papel de filtro para o "teste do pezinho". A deteção precoce da doença tem como objetivo iniciar o tratamento nutricional atempadamente, de modo a prevenir os danos neurológicos nos doentes afetados. Em Portugal, desde 1979 e até ao final de 2019, foram rastreados através do Programa Nacional de Rastreio Neonatal 3 890 677 recém-nascidos. Sendo que, 356 são doentes com PKU e 37 são hiperfenilalaninemias moderadas. A prevalência ao nascimento da PKU e da hiperfenilalaninemia moderada no nosso país é de 1:10.929 e 1:36.123 recém-nascidos, respetivamente. Na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do INSA foram caracterizados geneticamente 223 doentes. Neste estudo, foram identificadas 56 mutações já descritas na literatura, a maioria compostos heterozigóticos (74% dos doentes). As duas mutações mais prevalentes na população portuguesa são: c.782G>A (p.Arg261Gln), c.1066-10G>A (IVS10-11G>A), seguidas pelas mutações c.1162G>A (p.Val388Met) e c.194T>C (p.Ile65Thr). Este estudo revelou uma elevada heterogeneidade quer do ponto de vista do fenótipo bioquímico quer ao nível molecular, o que poderá ser importante na resposta ao tratamento destes doentes uma vez que esta estará dependente do respetivo genótipo. Os dados deste estudo, contribuem para uma melhor compreensão e conhecimento epidemiológico da PKU em Portugal.

_Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive genetic disorder due to an inborn error of amino acid metabolism. This disease causes elevation of phenylalanine levels in blood and other body fluids due to impairment of the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH), codified by the PAH gene. PKU is one of the 26-blood spot screened pathologies included in the Portuguese Neonatal Screening Program (PNSP). The early diagnosis of the affected individuals is important, as it can prevent clinical manifestations of the disease, as neurological damage and severe mental retardation as well as treatment can be started shortly after birth and the patients fall within the broad normal range of general ability, attaining expected educational standards and have an independent life as adult. In Portugal, since 1979 until 2019, 3 890 677 newborns were screened for by Portuguese Neonatal Screening Program (PNSP). Through this program, findings revealed 356 PKU and 37 hyperphenylalaninaemia. The PKU birth prevalence in Portugal is estimated to be 1:10,929 and 1:36,123 newborn, respectively. In the Newborn Screening, Metabolic and Genetics Unit of Human Genetics Department of National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, 223 patients were molecularly characterized. The PAH molecular analysis of these patients revealed 56 distinct variants (already described in the literature), most of them found in compound heterozygosity (74% of the patients). In this study, the two most prevalent variants are c.782G>A p. (Arg261Gln) and c.1066-11G>A, c.1162G>A, followed by the variants, p. (Val388Met) and c.194T>C p. (Ile65Thr). Our data reveal high heterogeneity at the biochemical and molecular levels and is expected to provide a better understanding of the molecular basis of this disease and to provide clues to elucidate genotype-phenotype correlations. The information



obtained will also improve the diagnostic applicability of mutational analysis and the capacity to predict the evolution of the disease. The present study aims to identify and characterize the variants underlying PKU in affected individuals in the Portuguese PKU/HPA cohort, for a better understanding of this disease.

_Introdução

Em Portugal, nos anos 70, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) foi inicialmente implementado apenas com o rastreio da Fenilcetonúria (PKU). Mais tarde, em 1981 foi acrescentado a este programa o rastreio do Hipotiroidismo Congénito (CH) (1-4), e em 2004 alargado a mais 23 doenças metabólicas. Em 2019, foi incluído um novo rastreio, o rastreio da Fibrose Quística. Presentemente, este programa já rastreia 26 doenças e está centralizado num único laboratório do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Porto, que recebe em média 400 amostras de recém-nascidos/dia (5).

A fenilcetonúria (PKU; OMIM #261600) é uma doença genética autossómica recessiva, causada pela deficiência na enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH; OMIM #612349) (6) que converte a fenilalanina em tirosina, na presença do cofator, a tetrahydrobiopterina (BH4) (figura 1a,b). Sempre que a atividade da enzima PAH (EC 1.14.16.1) esteja reduzida, a fenilalanina, aminoácido essencial, não é hidrolisado em tirosina, acumulando-se no sangue e em outros fluidos corporais. Níveis elevados de fenilalanina e dos seus derivados metabólicos causam toxicidade originando atrasos no crescimento, microcefalia, convulsões, bem como alterações no desenvolvimento psicomotor e/ou intelectual (7,8). Quando a fenilalanina, em grande quantidade, atravessa a barreira hematoencefálica, origina alterações irreversíveis e estruturais no sistema nervoso central (9). A enzima, PAH, necessita de um cofator para funcionar, a tetrahydrobiopterina (BH4), o qual também é cofator da enzima tirosina hidroxilase (TH) e da triptofano hidroxilase (TPH). Cerca de 1-2% dos casos de hiperfenilalaninemia (HPA) são devidos a mutações nos genes que codificam as

enzimas envolvidas na biossíntese e regeneração do BH4 (figura 1b) (10,11). No entanto, alguns doentes com défices na biossíntese de BH4, como a Doença de Segawa e o défice em Sepiapterinoreductase, não manifestam hiperfenilalaninemia (12,13).

O gene *PAH*, compreende cerca de 100kb do DNA genómico humano e codifica uma proteína de 452 aminoácidos disposta num homotetrámero funcional. Este gene está mapeado no cromossoma 12q23.2 e é constituído por 13 exões e 12 regiões intrónicas (6,14). Presentemente, estão descritas mais de 1000 mutações no gene *PAH* associadas a PKU (*PAH*vdb; Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database; <http://www.pahdb.mcgill.ca/> e BIOPKU; <http://www.biopku.org>) (15). A gravidade clínica dependerá dos níveis de fenilalanina, que por sua vez, refletem o grau de deficiência da enzima PAH, resultante das diversas mutações no gene que codifica esta enzima. Sendo que a maior parte destas mutações, são do tipo *missense* (90%) e a mutação c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) é a mais frequente na população caucasiana (16-18). É importante a caracterização molecular da PKU, pois o tipo de mutação irá condicionar a atividade enzimática da PAH dos doentes, o que por sua vez, determinará o fenótipo bioquímico do doente. Uma atividade enzimática nula ou residual origina, regra geral, num fenótipo de PKU clássica (OMIM #261600), enquanto mutações que apenas inibem parcialmente a atividade enzimática, resultam em fenótipos moderados ou ligeiros de HPA. Existe assim um espectro de gravidade clínica que vai desde a “PKU clássica” (níveis de Phe sob dieta normal $\geq 1200\mu\text{mol/L}$ ou $>20\text{mg/dL}$), a “PKU moderada” (Phe $360\text{-}1200\mu\text{mol/L}$ ou $6\text{-}20\text{mg/dL}$), à hiperfenilalaninemia moderada (Phe $150\text{-}360\mu\text{mol/L}$ ou $2,5\text{-}6\text{mg/dL}$). Em geral, nos recém-nascidos, os níveis plasmáticos normais de Phe variam entre $35\text{-}100\mu\text{mol/L}$ (ou $0,6\text{-}1,7\text{mg/dL}$), com uma relação Phe/Tyr próximo de 1 (0,6-1,5) (19,20).

Regra geral, crianças com PKU não tratadas, apresentam diminuição de pigmentação e adquirindo um tom de pele e de cabelo mais claro que a restante família, devido a uma deficiência na síntese de melanina.



A prevalência desta doença, e as mutações mais comuns, diferem entre populações. Estima-se que na Europa a prevalência ao nascimento de PKU seja de 1:10.000 recém-nascidos (21), no entanto em algumas áreas, a frequência é ligeiramente maior (22), por exemplo, na população Andaluza, a prevalência é de 1:12.000 (23). Contrariamente, noutros países, como na Finlândia, a prevalência desta doença é a mais baixa da Europa; 1:100.000, de tal forma que a PKU não é incluída nos programas de rastreio neonatal (24,25). Em Portugal, a prevalência ao nascimento de PKU e de hiperfenilalaninemia moderada é de 1:10.929 e 1:36.123, respetivamente (26). O que significa que, em cada ano são rastreados aproximadamente 11 novos casos de PKU.

_Objetivos

Pretende-se com este trabalho, não só dar a conhecer os dados do rastreio neonatal da PKU em Portugal nos últimos 40 anos (1979-2019), como identificar e caracterizar as mutações causais da PKU/HPA na nossa população, contribuindo para a melhoria do diagnóstico/prognóstico de PKU/HPA. A análise mutacional de PKU/HPA na população portuguesa, permitirá também adequar a dieta de acordo com a relação genótipo-fenótipo. Por outro lado, pretende-se também reforçar a importância de um diagnóstico precoce, através do PNRN, minimizando assim, as consequências nefastas de um diagnóstico e terapia tardia.

Figura 1a: Via Metabólica da fenilalanina.

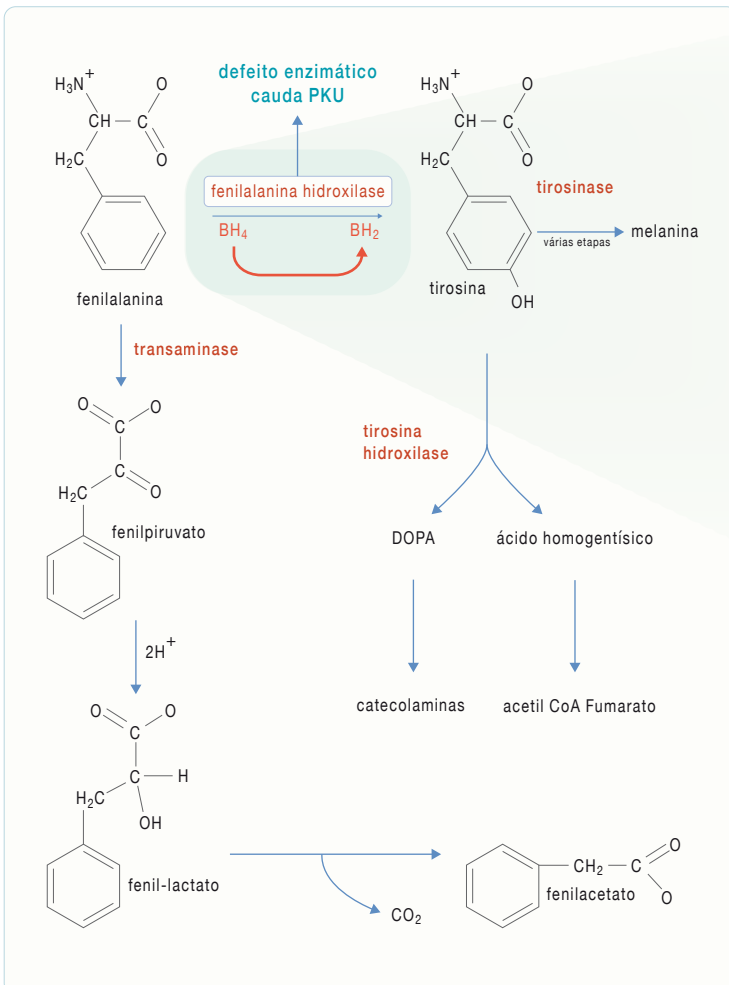
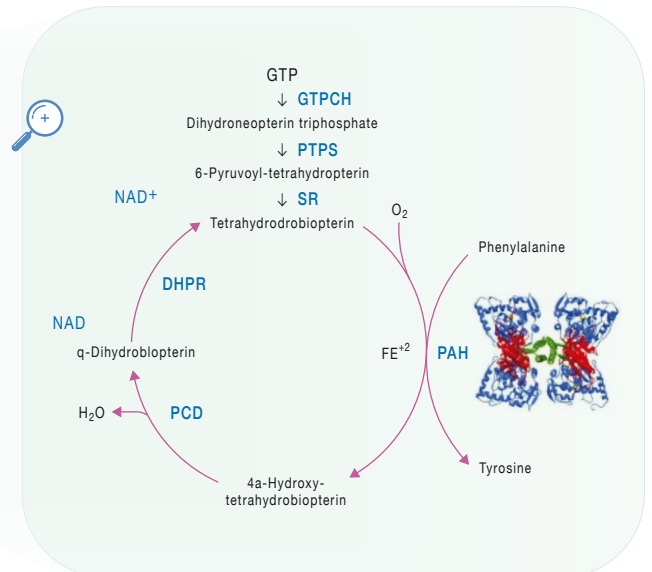


Figura 1b: Via de hidroxilação da fenilalanina e da síntese de BH4 (cofator).



In: van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet J Rare Dis. 2017 Oct 12;12(1):162. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0685-2>



_Material e métodos

Doentes

Até 2019, um total de 377 PKU/HPA foram detetados pelo PNRN. A maioria das amostras foram colhidas entre o 3º e o 6º dia de vida dos bebés nascidos em Portugal. Destes, 223 foram molecularmente caracterizados pela Unidade de Rastreio Neonatal (URN), representando cerca de 58% do total (223/377). Os restantes 154, já tinham sido estudados e publicados anteriormente (27). O diagnóstico de PKU/HPA é suspeito quando o nível de Phe no sangue é $\geq 6\text{mg/dL}$ ($360\ \mu\text{mol/L}$) numa amostra de sangue seco. Recém-nascidos, com níveis persistentes de Phe 2,5-6mg/dL e uma razão Phe/Tyr $>1,5$ são avaliados periodicamente nos Centros de Referência para o Tratamento de Doenças Hereditárias do Metabolismo (28). A dieta com restrição de fenilalanina é implementada sempre que os níveis de Phe sejam $\geq 6\text{mg/dL}$ ($360\ \mu\text{mol/L}$) (figura 2).

Caracterização molecular

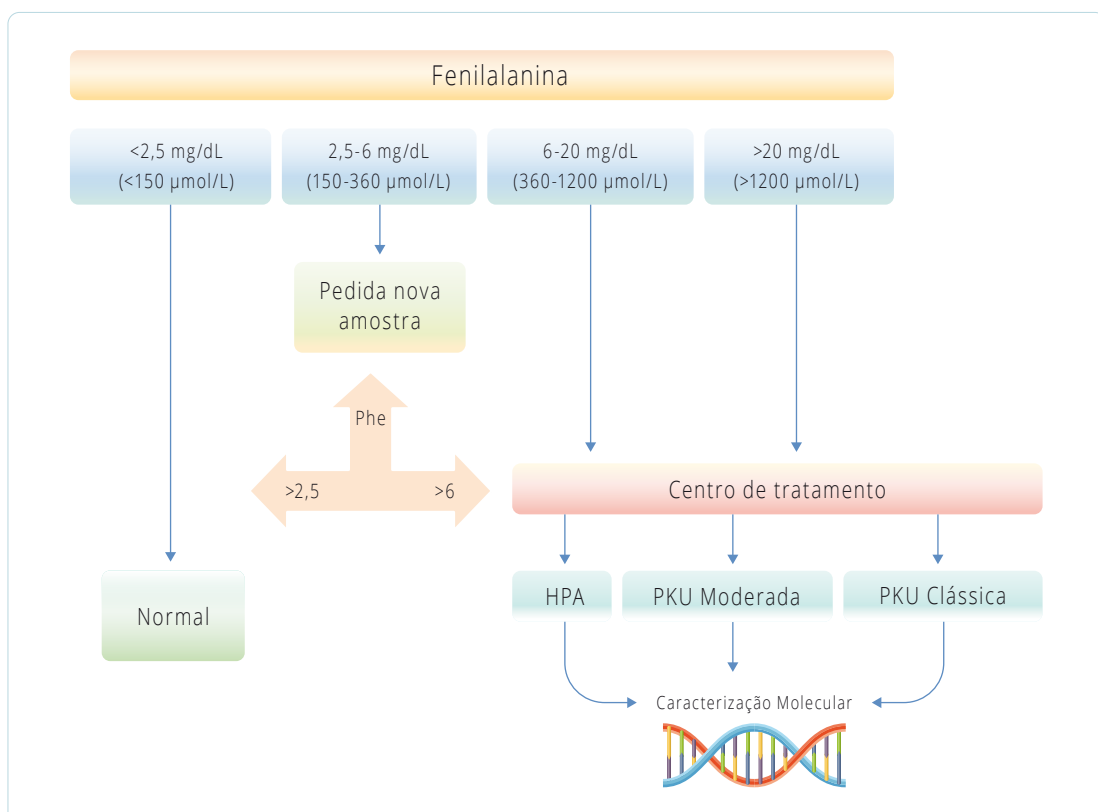
O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total ou sangue seco em papel (EZ1, QIAGEN) e os 13 exões e as respetivas regiões flangeadoras do gene *PAH* (NM_000277.3) amplificadas e sequenciadas através de métodos tradicionais (método de Sanger e *Next Generation Sequencing*).

_Resultados

Espectro mutacional

A análise aos 223 doentes caracterizados do ponto de vista molecular e bioquímico revelou a existência de 56 mutações distintas, distribuídas por 129 genótipos diferentes. A maior parte dos doentes estudados foram compostos heterozigóticos (73,5%). As duas mutações patogénicas mais prevalentes na população portuguesa são: c.782G>A (p.Arg261Gln), encontrada em 63 doentes; seguida da mutação intrónica,

Figura 2: Algoritmo utilizado no rastreio neonatal de fenilcetonúria (PKU).





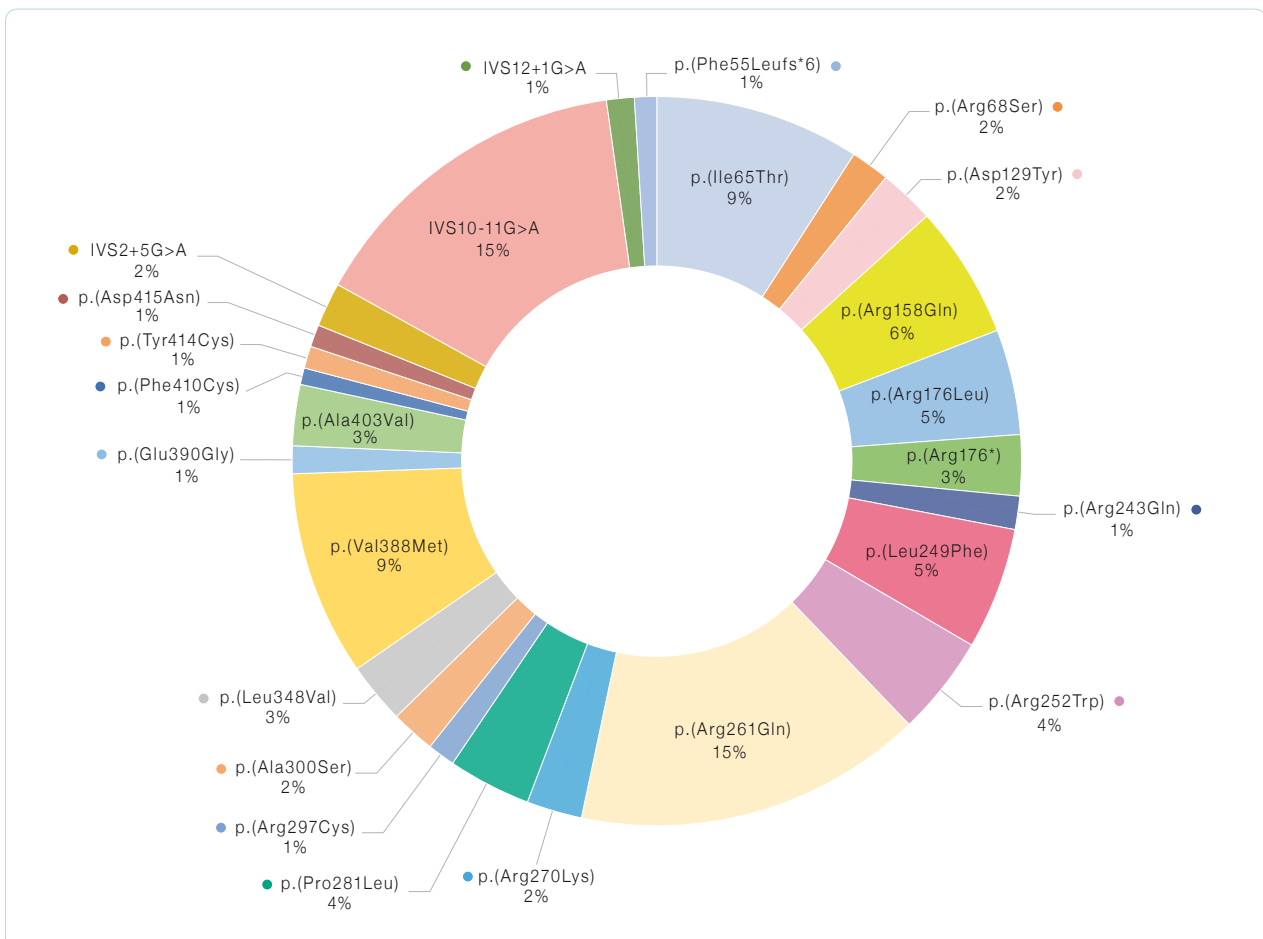
c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) em 60 doentes. As mutações c.194T>C (p.Ile65Thr) e c.1162G>A (p.Val388Met) foram encontradas em 37 doentes, respetivamente. Entre os indivíduos homozigóticos, 17 eram portadores da mutação c.782G>A (p.Arg261Gln), 10 da mutação c.1066-11G>A (IVS10-11G>A), 6 da mutação c.473G>A p.(Arg158Gln), e 5 com a mutação c.1162G>A (p.Val388Met) (gráfico 1).

Verificou-se neste estudo, que a maioria das mutações se encontram distribuídas na proteína da seguinte forma: 35 no domínio catalítico (62,5%), 10 no domínio regulador (17,85%), 4 no domínio de tetramerização (7,14%) e 7 na região intrónica (12,5%). Não foi observado nenhuma mutação nos exões 1 e 13.

Espectro bioquímico

Relativamente à correlação entre o fenótipo bioquímico (valor de fenilalanina ao rastreio) e o genótipo, em indivíduos homozigóticos, para as cinco mutações mais frequentes na população portuguesa, verificou-se que a mutação que está associada com um largo espectro de valores de fenilalanina é a mutação intrónica c.1066-11G>A, cujos valores variaram desde 10,7 até 30mg/dL. Contrariamente, indivíduos homozigóticos para a mutação c.745C>T (p.Leu249Phe), mostraram ter valores de fenilalanina mais baixos (valor médio de 10,53mg/dL). A mutação mais comum na população portuguesa de PKU; c.782G>A (p.Arg261Gln), está associada com valores médios de Phe de 14,37mg/dL, enquanto que as mu-

Gráfico 1: ↴ Mutações mais frequentes nos 223 doentes estudados com fenilcetonúria (PKU).





tações c. 473G>A (p.Arg158Gln) e c.1162G>A (p.Val388Met), os valores médios de Phe foram 19,86mg/dL e 12,69mg/dL, respetivamente.

_Discussão

Com este estudo pretendeu-se dar a conhecer os dados do rastreio da PKU, focando particularmente no espectro mutacional da fenilcetonúria, na população portuguesa ao longo de 40 anos de Programa de Rastreio Neonatal (1979-2019). Dos resultados obtidos, observou-se uma grande heterogeneidade, com 56 mutações distribuídas por 129 genótipos diferentes, a maioria delas do tipo *missense* (76,8%). Estes resultados estão de acordo com os publicados na literatura para países do sul da Europa e Mediterrâneo, mas claramente diferente daqueles referentes a países da Europa central e norte da Europa onde as mutações prevalentes são: c.1315+1G>C (IVS12+1G>C) e c.1222C>T (p.Arg408Trp) (16,29-31).

Dos resultados obtidos, verificou-se a existência de quatro mutações prevalentes: c.782G>A (p.Arg261Gln), c.1066-11G>A (IVS10-11G>A), c.1162G>A (p.Val388Met) e c.194T>C (p.Ile65Thr), representando cerca de 44,17% do total de alelos estudados. Esta frequência está em concordância com estudos anteriormente publicados, envolvendo a população portuguesa (4,27,32-36).

A mutação intrónica c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) é a mais comum na base de dados de PAH e dada a sua frequência na zona do Mediterrâneo, tem sido descrita como a “mutação do Mediterrâneo” (20,27,37-39). A terceira mutação, mais comum encontrada neste estudo, foi a c.194T>C (p.Ile65Thr), sendo que esta mutação é bastante frequente também em Espanha e Irlanda (20). Para além destas mutações, foram também encontradas outras mutações com considerável incidência na população portuguesa (entre 5,38% e 2,24%), nomeadamente: c.473G>A (p.Arg158Gln), c.527G>T (p.Arg176Leu), c.745C>T (p.Leu249Phe), c.754C>T (p.Arg252Trp), c.842C>T (p.Pro281Leu); c.526C>T (p.Arg176*), c.1042C>G (p.Leu348Val), c.1208C>T (p.Ala403Val), c.385G>T (p.Asp129Tyr) e c.809G>A (p.Arg270Lys).

De ressaltar, que a mutação c.1222C>T (p.Arg408Trp), descrita como sendo a nível mundial a mutação mais prevalente de PKU, na população portuguesa apenas foi identificada em heterozigotia num indivíduo. Esta mutação é a mais comum no norte da Europa (40-42).

_Conclusões

A fenilcetonúria (PKU) é a aminoacidopatia mais comum na população caucasiana e tornou-se o paradigma de uma doença que pode ser facilmente identificada através de um rastreio sistemático e que, tratada atempadamente, evita a deterioração neurológica grave com atraso mental profundo.

Os resultados obtidos do estudo do espectro mutacional da PKU são dados de epidemiologia molecular relevantes, pois são indicativos do grau de disfunção proteica, e/ou atividade residual e consequentemente do fenótipo metabólico a esperar. A classificação dos diferentes genótipos de PAH, permitirá o prognóstico do fenótipo bioquímico e metabólico e pode ser útil como ferramenta preditiva no tratamento das hiperfenilalaninemias no recém-nascido (43-45). O diagnóstico diferencial de HPA é crucial para distinguir crianças com HPA por défices na enzima PAH, e HPA por défices de BH4 (cofator), pois o tratamento e prognóstico da doença, são diferentes.

Assim, é extremamente importante o rastreio neonatal desta patologia, através do PNRN. Este, permitirá detetar precocemente esta doença e iniciar nos primeiros dias de vida, o tratamento adequado, restrito em fenilalanina, e que evitará situações irreversíveis de atrasos de desenvolvimento motor, cognitivo e intelectual. O diagnóstico diferencial de HPA é crucial para distinguir crianças com deficiência da PAH (em 98% dos casos) das deficiências resultantes por défice de BH4 (2% dos casos). Uma vez feito o diagnóstico, é importante a caracterização molecular, pois não só contribuirá para um melhor conhecimento da relação genótipo-fenótipo, como também para o prognóstico do sucesso da resposta terapêutica e ainda permitirá o aconselhamento genético adequado.



Referências bibliográficas:

- (1) Magalhães J, Osório R. O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. *J. Med.* 1984;2080: 322-325.
- (2) Magalhães J, Osório R, Alves J, Soares P. Le Dépistage de la Phénylcétonurie et de Hypothyroïdie Congénitale au Portugal. *La Dépeche.* 1986:40-47
- (3) Osório R, Soares P. Rastreo e Tratamento do Hipotiroidismo Congénito em Portugal. *Arq. Med.* 1987;3:243-48.
- (4) Osório RV, Vilarinho L, Soares JP. Rastreo nacional da fenilcetonúria, hipotiroidismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Med Port.* 1992 Mar;5(3):131-4.
<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/3215/2554>
- (5) Despacho n.º 7276/2019. DR, 2.ª série (Parte c), n.º 156 (16/8/2019):141-147. Aprova o Programa Nacional do Rastreo Neonatal (PNRN) e determina a sua implementação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P.
<https://dre.pt/application/conteudo/124006819>
- (6) Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, et al. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Vol 1, pp. 1015-77.
- (7) Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 1999 Oct;68(2):103-25. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2922>
- (8) Madden M. Phenylketonuria: defects in amino acid metabolism. *Mol Med.* 2004;5: 57-61.
- (9) Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S3-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.005>
- (10) Thöny B, Blau N. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat.* 2006 Sep;27(9):870-8. <https://doi.org/10.1002/humu.20366>
- (11) Blau N, Thöny B, Cotton RGH, et al. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al.(eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 1725-76.
- (12) Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):236-42. <https://doi.org/10.1038/ng1194-236>
- (13) Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, et al. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):269-77. <https://doi.org/10.1086/321970>
- (14) Donlon J, Sarkissian C, Levy H, et al. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, et al. (eds). *The online metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill, 2014.
- (15) Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jul;14(6):655-71. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.923760>
- (16) Guldborg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* 1993 Jul;17(1):141-6. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1295>
- (17) Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet.* 1997 Jan;60(1):95-102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712559/>
- (18) Birk Møller L, Nygren AO, Scott P, et al. Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. *Hum Mutat.* 2007 Feb;28(2):207. <https://doi.org/10.1002/humu.9481>
- (19) Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. *Mutat Res.* 2003 May 15;526(1-2):45-52. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(03\)00015-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(03)00015-0)
- (20) Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):345-56. <https://doi.org/10.1002/humu.10192>
- (21) Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inher Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):430-8. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0644-5>. Erratum in: *J Inher Metab Dis.* 2008 Jun;31(3):469. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0644-5>
- (22) Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010 Oct 23;376(9750):1417-27. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60961-0)
- (23) Delgado Pellecín C, García-Valdecasas MS, Bueno Delgado MA, et al. Experiencia del cribado neonatal ampliado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío. *Acta Pediatr Esp.* 2011;69:89.
- (24) Guldborg P, Henriksen KF, Sipilä I, Güttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet.* 1995 Dec;32(12):976-8. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.12.976>
- (25) Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, et al. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease,* 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001, pp. 1667-1724.
- (26) Vilarinho L, Garcia P, Pinho e Costa P. Programa Nacional de Rastreo Neonatal: relatório 2019. Lisboa: INSA, 2020. (In press)
- (27) Rivera I, Mendes D, Afonso Â, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.026>
- (28) Despacho n.º 3653/2016, de 7 de março. DR 2.ª série, n.º 50 (11/3/2016): 8724. Centros de Referência para o Tratamento das Doenças Hereditárias do Metabolismo. <https://dre.pt/application/file/a/75017024>
- (29) Jaruzelska J, Matuszak R, Lyonnet S, et al. Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J Med Genet.* 1993 Mar;30(3):232-4. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.232>
- (30) Guldborg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998 Jul;63(1):71-9. <https://doi.org/10.1086/301920>. Erratum in: *Am J Hum Genet* 1998 Oct;63(4):1252-3.
- (31) Gundorova P, Stepanova AA, Kuznetsova IA, et al. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia. *PLoS One.* 2019 Jan 22;14(1):e0211048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211048>
- (32) Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, et al. Relative frequency of IVS10nt546 mutation in a Portuguese phenylketonuric population. *Hum Mutat.* 1997;9(3):272-3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:3<272::AID-HUMU9>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<272::AID-HUMU9>3.0.CO;2-9)
- (33) Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida I, Lechner MC. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet.* 1998 Apr;35(4):301-4. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.4.301>
- (34) Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat.* 2001 Feb;17(2):122-30. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200102\)17:2<122::AID-HUMU4>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200102)17:2<122::AID-HUMU4>3.0.CO;2-C)
- (35) Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, et al. Fenilcetonúria Revisitada. *Arquivos de Medicina.* 2006;20(5-6):161-71. <http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v20n5-6/v20n5-6a03.pdf>
- (36) Vilarinho L, Esteves S, Ramos E, et al. PAH mutational spectrum: still expanding! *Open J Genet.* 2011;1(2):9-12. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2011.12002>
- (37) Okano Y, Wang T, Eisensmith RC, et al. Phenylketonuria missense mutations in the Mediterranean. *Genomics.* 1991 Jan;9(1):96-103. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90225-4](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90225-4)
- (38) Aldámiz-Echevarría L, Llàrena M, Bueno MA, et al. Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4 responsiveness in Spanish patients with phenylketonuria. *J Hum Genet.* 2016 Aug;61(8):731-44. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.38>



- (39) Vieira Neto E, Laranjeira F, Quelhas D, et al. Mutation analysis of the PAH gene in phenylketonuria patients from Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mol Genet Genomic Med.* 2018 May 10;6(4):575–91. <https://doi.org/10.1002/mgg3.408>
- (40) Giannattasio S, Jurgelevicius V, Lattanzio P, et al. Phenylketonuria mutations and linked haplotypes in the Lithuanian population: origin of the most common R408W mutation. *Hum Hered.* 1997 May-Jun;47(3):155-60. <https://doi.org/10.1159/000154403>
- (41) Lilliväli H, Ounap K, Metspalu A. Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(5):296-300. <https://doi.org/10.1159/000472217>
- (42) Lilliväli H, Reinson K, Muru K, et al. The evaluation of phenylalanine levels in Estonian phenylketonuria patients during eight years by electronic laboratory records. *Mol Genet Metab Rep.* 2019 Mar 23;19:100467. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100467>
- (43) Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1309-17. <https://doi.org/10.1086/301638>
- (44) Gámez A, Pérez B, Ugarte M, et al. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29737-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003231200>
- (45) Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):357-69. <https://doi.org/10.1002/humu.10197>