

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Andressa Lima Santos

**TERAPIA GÊNICA COMO ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO PARA
FENILCETONÚRIA**

São Paulo

2023

Andressa Lima Santos

**TERAPIA GÊNICA COMO ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO PARA
FENILCETONÚRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Santos, Andressa Lima

Terapia gênica como estratégia de tratamento para fenilcetonúria /
Andressa Lima Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo,
2023.

50 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro
Universitário São Camilo, 2023.

1. Fenilalanina 2. Fenilcetonúrias 3. Edição de genes 4. Terapia
genética I. Lima, Fábio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III.
Título

CDD: 573.21

Andressa Lima Santos

**TERAPIA GÊNICA COMO ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO PARA
FENILCETONÚRIA**

Professor Orientador: Fábio Mitsuo Lima

Professor examinador: Denise Barcelos

Professor examinador: Andréa Midory

DEDICATÓRIA

A Deus que me permitiu passar por quatro anos de graduação com saúde, por ter sido o meu alicerce durante toda essa jornada.

A minha mãe Ivone Lima que sempre esteve ao meu lado, que me apoiou e sempre me incentivou a realizar os meus sonhos.

A minha família, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu companheiro que me apoiou em cada decisão, me motivou e acreditou no meu potencial.

Aos amigos que a faculdade me proporcionou, que sempre estiveram comigo, que me ajudaram durante toda a graduação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado e me mantido firme durante o desenvolvimento desse projeto, por ter me dado força para superar minhas dificuldades.

Ao Programa Universidade para Todos, que permitiu que eu tivesse acesso a um ensino superior de qualidade.

Ao meu professor e orientador Fábio Mitsuo Lima por ter me ajudado com a realização desse projeto, por todo o incentivo e paciência ao longo desses meses.

A todos os meus professores por terem me dado a bagagem necessária para realização desse projeto.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

Muito Obrigada!

RESUMO

A fenilcetonúria é uma doença congênita genética que causa acúmulo de fenilalanina no sangue, cuja identificação de pacientes portadores é eficiente devido aos programas de triagem neonatal, os efeitos desse acúmulo podem ser observados gradativamente conforme a quantidade do aminoácido aumenta na corrente sanguínea. Essa condição ocorre devido a uma mutação no gene da enzima fenilalanina hidroxilase que inibe ou reduz sua função, impedindo a catalisação da fenilalanina em tirosina, essa intercorrência faz com que a fenilalanina seja sintetizada por outras vias, sofrendo transaminação e descarboxilação, reações que liberam compostos fenilcetonúricos que se acumulam na urina. Outros sintomas também podem ser observados no cérebro, causando deficiência intelectual grave, crise de convulsões e problemas comportamentais. Para evitar as complicações da doença, o tratamento amplamente utilizado é baseado em restrição dietética, por se tratar de um aminoácido essencial é uma estratégia eficaz, no entanto, devido a sua rigorosidade problemas com a adesão são observados. Outra metodologia de tratamento é a suplementação com um análogo sintético da tetrahidrobiopterina que é um cofator essencial na hidroxilação da fenilalanina, o dicloridrato de sapropterina, esse método prevê a reativação da atividade residual da fenilalanina hidroxilase em pacientes com hiperfenilalaninemia clássica ou moderada, no Brasil esse tratamento só é aplicado em pacientes femininas durante o período periconcepcional ou em período gestacional, a fim de evitar a síndrome da fenilcetonúria materna, que no feto pode causar restrição do crescimento intrauterino, retardo psicomotor, microcefalia e defeitos cardíacos congênitos. Os portadores de fenilcetonúria leve ou moderada têm maior probabilidade de se beneficiar com esse tratamento, comparado aos pacientes com fenótipo clássico. O fato da fenilcetonúria possuir diversas variantes de mutações que causam a doença, o tratamento com o dicloridrato de sapropterina ainda gera incertezas com relação a sua eficiência. Visando a melhor qualidade de vida dos pacientes portadores de fenilcetonúria diversos pesquisadores estão desenvolvendo alternativas para seu tratamento. A terapia gênica provou ser uma alternativa eficaz, a edição do genoma mediada por vetores de vírus adeno-associados obteve bons resultados em modelos animais demonstrando potencial para aplicação terapêutica. A tecnologia da terapia gênica consiste na introdução de genes saudáveis para substituir ou modificar genes inativos ou disfuncionais, utilizando técnicas de DNA recombinante, esses genes saudáveis são entregues através de vetores. Os vetores virais adeno-associados demonstraram transduzir de forma estável em células não divisíveis, além de serem vírus não patogênicos e de baixa resposta imunológica. Em três pesquisas distintas foi relatado que a entrega de genes saudáveis através desse vetor produziu correção completa e estável dos níveis sanguíneos de fenilalanina e restauração da atividade da fenilalanina hidroxilase em um modelo de camundongo fenilcetonúrico. Demonstrando a eficácia desta alternativa de tratamento.

Palavras-chave: fenilcetonúria; fenilalanina; terapia gênica; edição genômica.

ABSTRACT

Phenylketonuria is a genetic disease that causes flow of phenylalanine in the blood, whose identification of carrier patients is efficient due to neonatal screening programs, the effects of this flow can be observed gradually as the amount of the amino acid increases in the bloodstream. This condition occurs due to a mutation in the gene of the enzyme phenylalanine hydroxylase that inhibits or reduces its function, preventing the catalysis of phenylalanine into tyrosine that accumulates in the urine. Other symptoms can also be seen in the brain, causing severe intellectual disability, seizures and behavioral problems. To avoid the complications of the disease, the widely used treatment is based on dietary restriction, as it is an essential amino acid, it is an effective strategy, however, due to its rigor, problems with adherence are observed. Another treatment method is sapropterin dihydrochloride supplementation with a synthetic tetrahydrobiopterin, which is an essential cofactor in the hydroxylation of phenylalanine. treatment is only applied to female patients during the periconceptual period or in the gestational period, in order to avoid maternal phenylketonuria syndrome, which in the fetus can cause intrauterine growth restriction, psychomotor retardation, microcephaly and congenital heart defects. Patients with mild or moderate phenylketonuria are more likely to benefit from this treatment compared to patients with the classic phenotype. The fact that phenylketonuria had several animal variants that cause the disease, treatment with sapropterin dihydrochloride still generates differences regarding its efficiency. Aiming at a better quality of life for patients with phenylketonuria, several researchers are developing alternatives for its treatment. Gene therapy tested to be an effective alternative, genome editing mediated by adeno-associated virus vectors obtained good results in animal models demonstrating potential for therapeutic application. Gene therapy technology consists of introducing healthy genes to replace or modify inactive or dysfunctional genes, using recombinant DNA techniques, these genes are delivered through viral vectors. Adeno-associated viral vectors can be stably transduced into non-dividing cells, in addition to being non-pathogenic viruses with low immune response. In three separate studies it was reported that delivery of healthy genes through this vector produced complete and stable correction of blood phenylalanine levels and restoration of phenylalanine hydroxylase activity in a phenylketonuric mouse model. Demonstrating the effectiveness of this treatment alternative.

Key-words: phenylketonuria; phenylalanine; gene therapy; genomic editing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da Fenilalanina	20
Figura 2 - Estrutura básica do gene fenilalanina hidroxilase	22
Figura 3 - Procedimento de coleta	24
Figura 4 - Halo de inibição bacteriana	25
Figura 5 - Estratégias de terapia gênica in vivo e ex vivo	30
Figura 6 - Construção de um vetor viral para terapia gênica.....	34
Figura 7 - Produção em massa de vetores virais para terapia gênica.....	35
Figura 8 - Etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica	36
Figura 9 - Reversão do fenótipo de cabelos claros após terapia gênica dos camundongos PKU	39
Figura 10 - Co-entrega do receptor AAVr aumenta significativamente a transdução viral.....	41
Figura 11 - Alteração na cor de pelagem em camundongos	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias.....	26
Quadro 2 – Detalhamento dos vetores virais	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PKU	Fenilcetonúria
BH4	Tetrahidrobiopterina
PAH	Fenilalanina hidroxilase
Phe	Fenilalanina
CRISPR/Cas9	Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas em associação com a nuclease Cas9
µmol/L	Micromol por litro
vg	Genomas vetoriais
sgRNA	Single guide RNA (RNA guia único ou RNA guia)
AAV	Vírus adeno-associado
AAVr	Vírus adeno-associado recombinante
SaCas9	nuclease Cas9 da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano
qBH2	dihidrobiopterina quinonóide
kb	quilobase
HPA	hiperfenilalaninemia
MS/MS	espectrometria de massa em tandem
m/z	Massa sobre carga
mg/dL	Miligramas por decilitro
SNC	Sistema nervoso central
ITRs	Terminais invertidos
rAAV2/8	vetores adeno-associados recombinantes pseudotipados com capsídeo do sorotipo 8
GFP	Proteína fluorescente verde

SUMÁRIO:

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVOS GERAIS	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.METODOLOGIA	16
4.DESENVOLVIMENTO	17
4.1. FENILCETONÚRIA	17
4.1.1. História da fenilcetonúria	17
4.1.2. Perfil epidemiológico da PKU	18
4.1.3. Metabolismo da fenilalanina	19
4.1.4. Manifestações clínicas	20
4.1.5. Aspectos genéticos	21
4.1.6. Diagnóstico da fenilcetonúria	23
4.1.7. PKU Materna.....	27
4.2. TRATAMENTO.....	27
4.2.1. Tratamento baseado em restrição dietética	27
4.2.2. Tratamento com BH4	29
4.3. NOVAS ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO	29
4.4. TERAPIA GÊNICA.....	30
4.4.1. Transferência de genes	31
4.4.2. Vetores virais	31
4.4.3. Vetores não virais	33
4.4.4. Construção do vetor	33
4.5. TERAPIA GÊNICA APLICADA A FENILCETONÚRIA	34
4.5.1. Geração de um modelo de camundongo PKU	35
4.5.2. Terapia genética hepática com vetor de vírus adeno-associado recombinante	36
4.5.3. Terapia genética hepática por edição genética.....	38
4.5.4. Exemplo de uma estratégia atual de tratamento para PKU.....	39
5.CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é a doença hereditária mais frequente no metabolismo dos aminoácidos, de padrão autossômico recessivo. Trata-se de um erro inato no metabolismo da fenilalanina (Phe) causada por defeito no gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) que é responsável pela conversão da fenilalanina em tirosina. A perda da atividade enzimática faz com que as concentrações de Phe no sangue e nos tecidos aumentem e o não tratamento pode ocasionar deficiência intelectual grave, epilepsia, problemas comportamentais e psiquiátricos, convulsões e odor característico, sintomas observados nos quadros clássicos da PKU (ELHAWARY et al., 2022).

A PKU pode ser identificada logo nos primeiros dias de vida com o Programa Nacional de Triagem Neonatal através do teste do pezinho. O diagnóstico precoce e início imediato do tratamento são capazes de prevenir o aparecimento dos sintomas (VAN SPRONSEN et al., 2021). As concentrações de Phe no sangue que diagnosticam um paciente portador de PKU é de 1.200 $\mu\text{mol/L}$ na PKU clássica. A PKU atípica é definida por uma concentração entre 360 e 1.200 $\mu\text{mol/L}$ e a hiperfenilalaninemia moderada (HPAm) refere-se a pacientes cujo nível plasmático é inferior a 360 $\mu\text{mol/L}$ (WIEDEMANN et al., 2020).

O tratamento mais comum para essa doença consiste em restrição dietética, uma dieta com baixa ingestão de fenilalanina, capaz de diminuir suas concentrações no sangue e melhorar o quadro clínico. A Phe é um aminoácido essencial, ou seja, o organismo não é capaz de sintetizar, sendo assim o tratamento com restrição alimentar é eficaz (VAN SPRONSEN, 2010). No entanto, por ser um tratamento que deve ser seguido continuamente ao longo de toda a vida, alguns problemas em sua adesão podem ser encontrados (WIEDEMANN et al., 2020).

Para os graus moderados de PKU, outra forma de tratamento é o uso do medicamento dicloridrato de sapropterina. Trata-se de uma cópia sintética da tetrahydrobiopterina (BH₄), um cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado (KAUFMAN, 1963). Este cofator pode estimular a atividade residual da PAH e diminuir os níveis plasmáticos

de Phe em pacientes suscetíveis. No entanto, no Brasil esse tratamento só é empregado em pacientes femininas fenilcetonúricas (WIEDEMANN et al., 2020).

Embora o tratamento com restrição dietética seja o método universalmente aceito, a dificuldade do cumprimento desta dieta colaborou para uma intensa investigação para desenvolvimento de novas opções de tratamento (VILLIGER et al., 2018).

A fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de PKU uma nova estratégia de tratamento está sendo estudada atualmente, a terapia genética, técnicas de edição do genoma mediada por vetores virais adeno-associados (AAV) que prometem restaurar a função da PAH foram empregadas em diversos estudos. Esse método de tratamento se mostrou bastante eficaz em modelos de camundongos (YIN et al., 2022).

O experimento foi realizado por meio de vetores virais adeno-associados (AAV) que já obtiveram progressos significativos na terapia de várias doenças, como a distrofia retiniana, hemofilia e atrofia muscular espinhal (YIN et al., 2022).

As pesquisas obtiveram resultados satisfatórios com restauração da atividade da PAH, essa descoberta sugere que o direcionamento de doenças genéticas *in vivo* usando a entrega mediada por AAV de agentes de edição de base é viável, demonstrando potencial para aplicação terapêutica (VILLIGER et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Identificar as principais evidências científicas da capacidade da terapia gênica em curar a fenilcetonúria e compreender as vantagens desse procedimento frente aos tratamentos atuais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Pontuar a história da fenilcetonúria, bem como os marcos mais importantes e descobertas;
- Descrever os dados epidemiológicos, as manifestações clínicas e os aspectos genéticos da fenilcetonúria;
- Descrever o metabolismo da fenilalanina, os métodos diagnósticos e os tratamentos disponíveis;
- Repasso geral a respeito da terapia gênica, descrição dos vetores virais e não virais utilizados e descrever sua aplicabilidade ao tratamento da fenilcetonúria;

3 METODOLOGIA

Será realizada uma revisão bibliográfica narrativa baseada em artigos científicos, trabalhos monográficos, dissertações e capítulos de livros publicados entre os anos de 1933 e 2023 em bases de dados como Scielo, Pubmed, Google Scholar e portal de Periódicos CAPES utilizando as seguintes palavras-chaves: fenilcetonúria, fenilalanina, terapia gênica, edição genômica.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 FENILCETONÚRIA

4.1.1 História da Fenilcetonúria

Em 1934 o médico norueguês Asbjørn Følling descreveu pela primeira vez a fenilcetonúria. O jovem que na época era residente em pediatria, estudou o caso de dois irmãos que eram mentalmente atrasados e apresentavam um odor incomum na urina. Følling decidiu testar a urina dos pacientes para corpos cetônicos e encontrou o ácido fenilpirúvico que é um metabólito da fenilalanina (WOOLF; ADAMS, 2020). Følling concluiu que esse achado advinha da fenilalanina dietética e, posteriormente, inferiu que o atraso mental teria origem nesse metabólito e nomeou a condição de imbecillitas phenylpyrouvica (CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R., 2000) Em 1937 Lionel Penrose sugeriu o nome fenilcetonúria, o qual é utilizado até os dias de hoje (CHRIST, 2023).

No ano de 1935 Lionel Penrose e Asbjørn Følling constataram que a doença era de herança autossômica recessiva. Anos mais tarde, o Dr. George Jarvis comprovou o defeito da enzima fenilalanina hidroxilase em pacientes com PKU, que impedia a conversão da fenilalanina em tirosina (SCRIVER, 2007).

Na década de 1950, o Dr. Horst Bickel foi o primeiro a discutir a respeito do tratamento da PKU. Ele criou um programa de tratamento baseado em restrição dietética que consistia em uma fórmula alimentar isenta de fenilalanina. Para que o tratamento pudesse ser efetivo a condição deveria ser identificada logo nos primeiros meses de vida, antes do aparecimento dos sintomas, assim a triagem dos bebês começou ainda na década de 1950 e, a princípio, era feita com o teste de cloreto férrico em fraldas molhadas. Entretanto, esse método não era capaz de identificar o ácido fenilpirúvico nas primeiras semanas de vida, o que impossibilitou o diagnóstico de muitas crianças. Surge, então, a necessidade de se criar um exame que pudesse identificar a presença de Phe no sangue enquanto o bebê ainda estivesse na maternidade (CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R., 2000).

Robert Guthrie, em 1961, desenvolveu um teste laboratorial para identificação do nível de Phe plasmática, o teste de inibição bacteriana de Guthrie, também

chamado de teste do pezinho. Sua contribuição fez com que a PKU fosse identificada precocemente e, conseqüentemente, os métodos de tratamento também puderam ser aplicados o quanto antes, evitando o sintoma mais grave da PKU, a deficiência intelectual. Essa iniciativa conduziu a realização de programas de triagem neonatal o qual em 1970 já era rotina em grande parte dos países desenvolvidos (LEVY 1999; LEVY 2021).

No ano de 1983 Sávio L. C. Woo localizou o gene codificante da enzima PAH no cromossomo 12, seu isolamento e clonagem possibilitou o conhecimento e a compreensão do funcionamento da PAH e a ligação das mutações com a atividade enzimática (WOO et al., 1983). Cerca de 400 mutações foram identificadas como capazes de originar diferentes graus de severidade da PKU. Em 1992 Konecki obteve a sequência genômica completa da PAH (SCRIVER, 2007).

A partir dos anos 2000 surgiram novas propostas de tratamento para PKU (VAN SPRONSEN et al., 2021).

4.1.2 Perfil epidemiológico da PKU

A Fenilcetonúria é erro mais comum no metabolismo dos aminoácidos com prevalência global média de 1 a cada 10.000 nascidos vivos, com incidência variável em diferentes países do mundo (Brasil, 2004).

Segundo o ministério da Saúde “as maiores taxas são encontradas na Irlanda (1: 4.500) e na Turquia (1: 2.600), e as menores, na Finlândia, no Japão e na Tailândia (1:200.000, 1: 143.000 e 1: 212.000, respectivamente). No Brasil, tem sido encontrada uma prevalência variando de 1: 15.000 a 1: 25.000”

Foi realizado no Brasil nos anos de 2001 e 2002 um levantamento dos dados epidemiológicos da PKU e 1,251 milhões de crianças foram triadas através do programa de triagem neonatal, recurso previsto pelo Ministério da Saúde através do estatuto da criança e do adolescente (Lei Federal nº 8069, de 13 de julho de 1990). Dentre as crianças testadas foram identificados 79 casos positivos para PKU, prevalência de 1 a cada 15.839. No ano de 2002 foram triadas 1,382 milhões de crianças, constatando 56 casos positivos e prevalência de 1:24.780. Esses dados não foram obtidos de todos os estados brasileiros, faltaram os estados do Amazonas,

Amapá, Mato Grosso, Pará, Piauí, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe e Tocantins (MONTEIRO; CÂNDIDO, 2006).

A maior dificuldade para obtenção de informações a respeito da prevalência da doença no Brasil são as informações descentralizadas. Para esse levantamento foram contabilizadas crianças com diagnóstico detectado pela triagem neonatal ou tardiamente. Não se tem conhecimento a respeito de todos os casos de PKU no Brasil, principalmente dos portadores com mais de 15 anos de idade (MONTEIRO; CÂNDIDO, 2006).

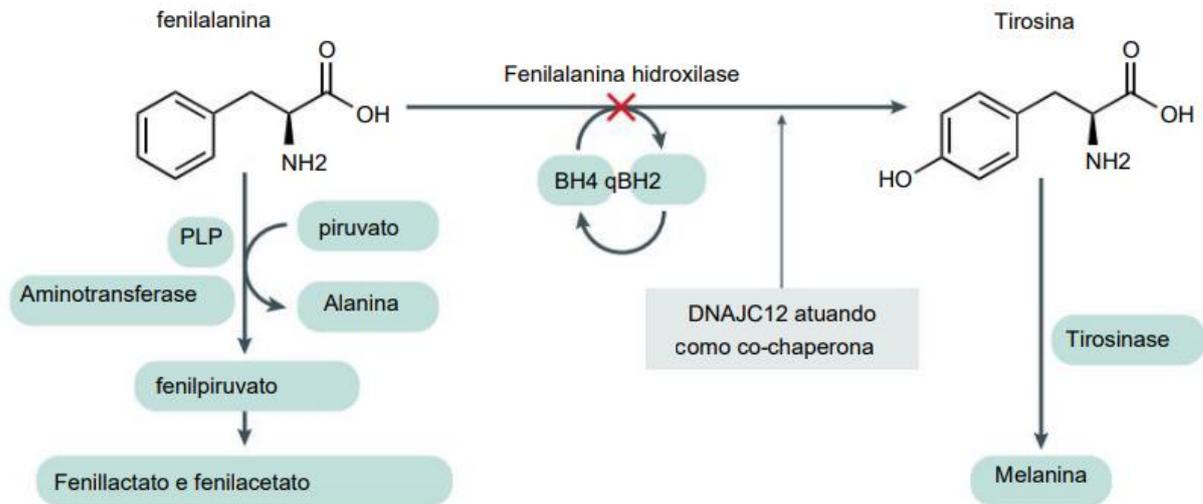
4.1.3 Metabolismo da fenilalanina

A fenilalanina (Phe) pertence à classe dos aminoácidos essenciais, isto é, devem ser adquiridos na dieta porque o organismo humano não é capaz de os sintetizar. É um aminoácido indispensável para a síntese proteica no organismo dos mamíferos. As principais fontes de Phe são a ingestão dietética e a reciclagem endógena dos estoques de aminoácidos e sua utilização ocorre via integração em proteínas, oxidação em tirosina ou conversão em outros metabólitos. A partir desse aminoácido obtém-se outro aminoácido não-essencial por hidroxilação, a tirosina (Tyr) (WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008).

A hidroxilação da Phe em Tyr é catalisada no fígado por uma enzima chamada fenilalanina hidroxilase (PAH) e a reação é dependente do cofator tetrahydrobiopterina (BH₄), oxigênio molecular e ferro (figura 1) (WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008). O BH₄ é oxidado a dihydrobiopterina quinonóide (qBH₂) durante a reação de hidroxilação, que por sua vez, é reciclada enzimaticamente de volta para BH₄ para apoiar a hidroxilação contínua de Phe (VAN SPRONSEN et al., 2021).

No caso do não funcionamento ou da atividade reduzida da enzima PAH a Phe pode ser metabolizada por transaminação e descarboxilação. A fenilalanina sofre uma reação de transaminação com o piruvato, ou seja, há uma transferência de um grupo amina de um aminoácido para um cetoácido. Essas vias alternativas originam compostos fenilcetonúricos (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato e ou fenilacetilglutamina), cujos valores de concentração elevada na urina contribuem para a suspeita de hiperfenilalaninemia (WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008).

Figura 1 - Metabolismo da Fenilalanina



fonte: VAN SPRONSEN et al., 2021.

Após a hidroxilação, a tirosina resultante pode originar mediadores químicos não proteicos com funções de neurotransmissor, as catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina) por isso sua baixa concentração acarreta no comprometimento da homeostase do Sistema nervoso central (SNC). A tirosina também é responsável pela síntese de melanina, por isso os pacientes fenilcetonúricos apresentam como sinal a baixa pigmentação da pele e cabelos (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Outra desordem desse processo acontece devido a erros no metabolismo da BH4, cofator essencial da hidroxilação da Phe. Seu mau funcionamento faz com que os níveis de Phe aumentem indiretamente. Essa condição classifica a PKU atípica ou hiperfenilalaninemia não fenilcetonúrica (MIRA; MARQUEZ, 2000).

4.1.4 Manifestações clínicas

Os pacientes portadores de PKU não apresentam sintomas logo nos primeiros meses de vida, os efeitos do acúmulo de Phe aparecem gradativamente conforme a quantidade do aminoácido aumenta na corrente sanguínea. Se não tratado, o paciente começa a apresentar diversos sintomas, como crises de convulsões, hipotonia, hipopigmentação da pele, cabelo e olhos, eczema e um odor característico devido às

fenilcetonas liberadas na urina e até o efeito mais grave da doença, a deficiência intelectual grave (ELHAWARY et al., 2022).

O início imediato do tratamento é capaz de prevenir o aparecimento dos sintomas, porém se for realizado de forma inadequada, os adultos portadores de PKU podem apresentar problemas clínicos, incluindo espasticidade dos membros inferiores e ataxia cerebelar, tremor, encefalopatia e anormalidades visuais (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Embora o tratamento dietético seja eficaz, há uma incidência de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e dificuldades de aprendizagem maior em pacientes tratados portadores de PKU do que indivíduos não portadores da doença. A dificuldade na adesão do tratamento durante a adolescência e a vida adulta está associada ao surgimento de efeitos adversos na atenção, humor, memória e função executiva (VAN SPRONSEN et al., 2021).

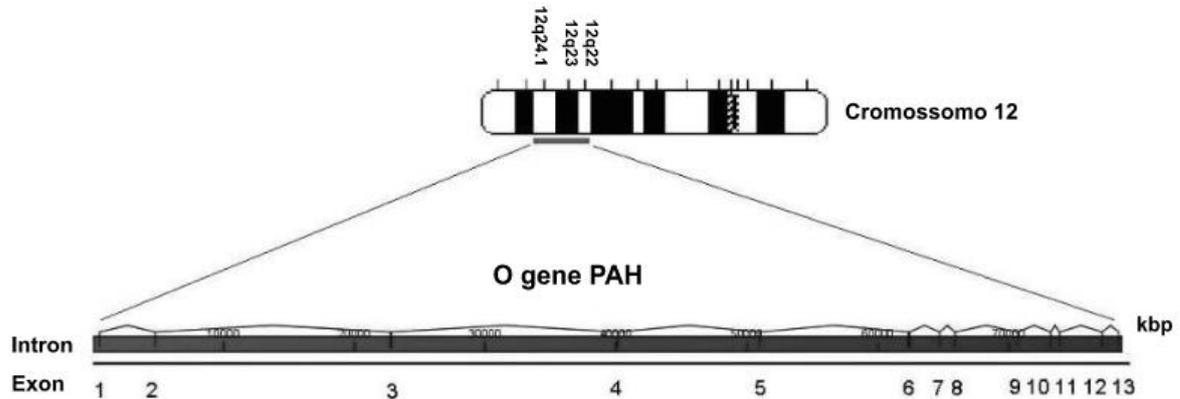
As manifestações patológicas devido a inatividade da PAH clinicamente mais importantes na PKU ocorrem no cérebro. A Phe, em altas concentrações na corrente sanguínea, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica competindo pelo transporte com outros aminoácidos importantes para a atividade cerebral, podem apresentar mielinização interrompida, sinaptogênese prejudicada e arborização dendrítica reduzida (VAN SPRONSEN et al., 2021, BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014).

4.1.5 Aspectos genéticos

A PKU é comumente causada por variantes patogênicas no gene PAH, uma proteína tetramérica composta por 4 subunidades idênticas localizada entre as bandas 2 e 4 da região 2 no braço longo do cromossomo 12 (12q23.2). Esse gene é composto por 13 exons e incluindo sua região flanqueadora, abrange aproximadamente 170 kb (figura 2) (SUMAILY; MUJAMAMMI, 2017).

O gene PAH humano exibe grande variação alélica, e mutações patogênicas foram descritas em todos os 13 exons do gene PAH e suas regiões flanqueadoras (WILLIAMS et al., 2008). As variantes são herdadas por padrão autossômico recessivo que levam à produção de monômeros de PAH com atividade reduzida ou inexistente ou ausência completa da enzima (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Figura 2 - Estrutura básica do gene fenilalanina hidroxilase



Fonte: Adaptado de Williams et al., 2008. Estrutura básica do gene PAH localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q23.2). O gene PAH humano contém 13 exons que codificam um polipeptídeo de 452 aminoácidos.

Mais de 1000 variantes já foram descritas, dentre elas 58,5% são mutações missense (alteração em um par de bases de DNA que resulta na substituição de um aminoácido por outro na formação da proteína), 22,7% deleções (remoção de um ou mais nucleotídeos do gene), 10,4% mutações no local de splicing (na qual a remoção dos íntrons não é feita corretamente podendo alterar a fase de leitura gerando a produção de uma proteína diferente), 6,1% mutações nonsense (na qual surge um códon de parada e a proteína que está sendo produzida é interrompida prematuramente) 2,0% de inserções e 0,1% de duplicações (WIEDEMANN et al., 2020).

Uma das mutações mais comuns na comunidade PKU é a substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano na posição 408 (Arg408Trp ou R408W) que resulta no fenótipo clássico da PKU (DILELLA, et al., 1987).

A hiperfenilalaninemia, nome dado ao excesso de Phe no sangue, pode ser causada por deficiência da enzima PAH ou das enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima BH4 (MIRA; MARQUEZ, 2000). Cada uma das mutações afeta a PAH e seu cofator BH4 de maneiras diferentes, por isso os fenótipos dos pacientes variam. Além disso, eles podem apresentar duas variantes de PAH diferentes, ocasionando mais de 2.600 genótipos causadores de PKU conhecidos (ELHAWARY et al., 2022).

Diferentes tipos de hiperfenilalaninemias podem ser encontrados de acordo com o erro metabólico envolvido formando um grupo heterogêneo de doenças, incluindo a PKU clássica e variações de hiperfenilalaninemias (HPAs), como a HPA persistente, a HPA branda e a PKU atípica (MIRA; MARQUEZ, 2000).

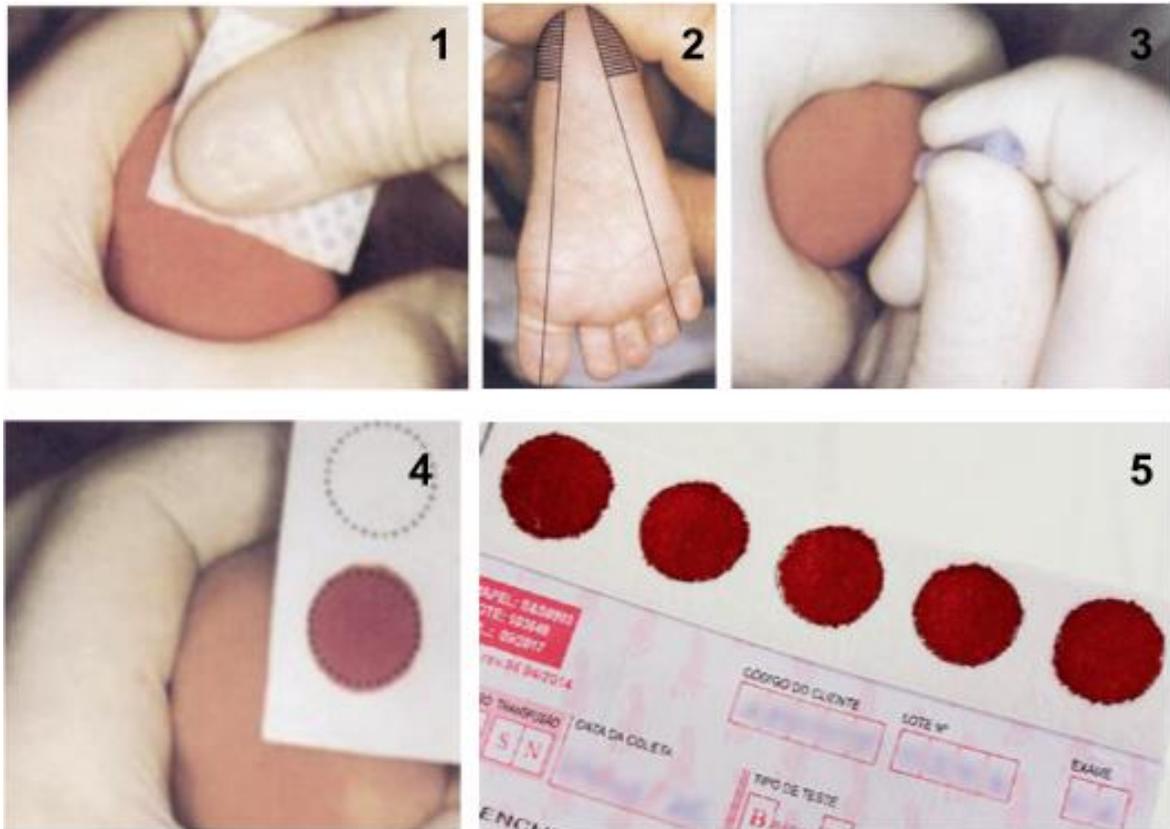
4.1.6 Diagnóstico da fenilcetonúria

Os pacientes portadores de PKU são triados através do "teste do pezinho", um programa de saúde pública que faz parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal implantado em 2001 pela Portaria Nº 822 de 06/06/01 do Ministério de Saúde, que determina a gratuidade e obrigatoriedade da realização de exames de triagem para identificação precoce do hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, doença falciforme e fibrose cística garantindo o tratamento e acompanhamento contínuo dos pacientes positivos, visando a redução da morbidade e melhorar a qualidade de vida (BRASIL, 2004).

O teste deve ser realizado entre o 3º e 5º dia de vida do recém-nascido, não anterior a 48 horas de nascimento, pois o neonato precisa ser alimentado e ingerir as proteínas necessárias para que os metabólitos se acumulem no sangue e, dessa forma, não gerar um resultado falso-negativo, também não deve ser realizado tardiamente, ultrapassando o tempo máximo, para que seja possível evitar complicações e o tratamento venha a ser iniciado de imediato (BRASIL, 2004).

Para a realização do teste, uma amostra de sangue deve ser coletada do calcanhar do recém-nascido em um papel filtro (figura 3), devidamente preenchido com todas as informações do recém-nascido e da mãe. A amostra coletada será submetida a testes de qualificação e quantificação (BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014).

Figura 3 - Procedimento de coleta

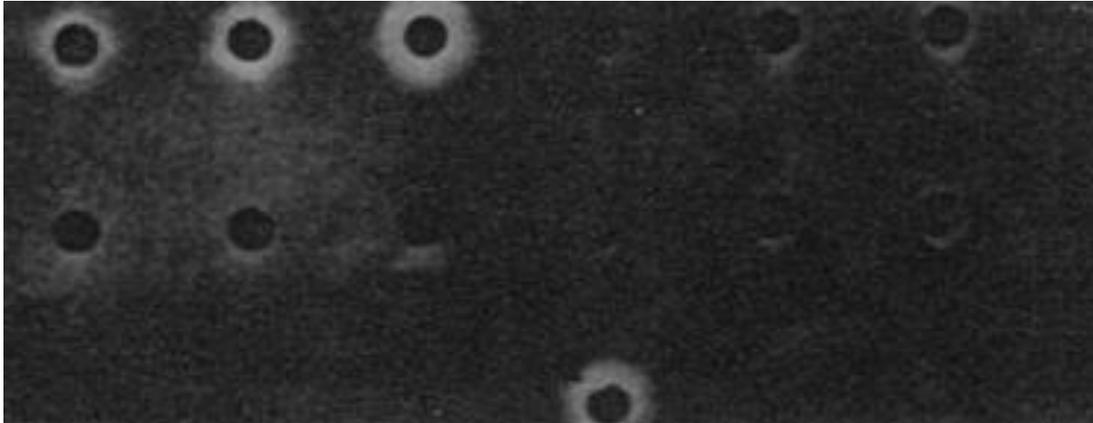


Fonte: Adaptado de Brasil, Ministério da Saúde, 2004. Deve ser feita a assepsia correta do local (1), o sangue deve ser coletado de uma das laterais da região plantar do calcanhar (2), com o uso de uma lanceta a região deve ser perfurada em um único movimento de forma rápida e em seguida um leve movimento da mão para a direita e esquerda, para garantir um corte suficiente para o sangramento necessário (3), uma gota de sangue irá se formar, essa deve ser desprezada (limpar com algodão ou gaze esterilizada) para evitar que outros fluídos possam ser coletados e prejudiquem o exame, coletar a nova gota que se formar com o papel filtro em movimentos circulares até o preenchimento completo do círculo (4), o mesmo deve ser feito nos outros círculos (5).

O método mais antigo e muito utilizado para realização do teste do pezinho é o ensaio de inibição bacteriana de Guthrie que consiste na inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* por meio de um composto tóxico. Para o teste são colocadas cepas bacterianas sensíveis à beta-2-fenilamina, a inibição do crescimento causada por este composto pode ser revertida pela fenilalanina. A bactéria e o composto tóxico são misturados com ágar e colocados em uma placa, os discos de papel filtro com a amostra são colocados no ágar e incubados. Quanto maior a quantidade de Phe na amostra, maior será a taxa de crescimento bacteriano, maior halo de inibição

bacteriana (figura 4) e o resultado pode ser observado por comparação de uma série de padrões (NETO, 2011).

Figura 4 - Halo de inibição bacteriana



Fonte: CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R., 2000.

Outra metodologia para identificação e quantificação da Phe que está substituindo o método de Guthrie na maioria dos laboratórios de triagem, é a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) que é capaz de identificar quais metabólitos estão presentes na amostra e em qual proporção (BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014). Neste método as moléculas existentes na amostra são convertidas em íons em fase gasosa, e posteriormente estes íons são separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z , permitindo a identificação e quantificação dos metabólitos analisados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

As triagens positivas devem ser confirmadas, através de outros testes com alta especificidade a fim de excluir os falsos positivos, como espectrometria de massa tandem ou com métodos cromatográficos. Cerca de 98% dos casos positivos para PKU são devido a defeitos na PAH e 2% a defeitos na síntese de BH4 e genes regeneradores (BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014).

Embora os distúrbios de BH4 sejam raros, a progressão da doença geralmente é muito mais grave do que em pacientes com PKU e os recém-nascidos afetados precisam de intervenção farmacológica imediata. Portanto, é obrigatório excluir a deficiência de BH4 em todos os recém-nascidos com HPA leve

por avaliação de pterina em DBS ou urina e atividade da diidropteridina redutase (BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014).

O diagnóstico da PKU é feito com base em uma concentração sanguínea elevada de Phe, valores acima de 4mg/dL (240 µmol/L) eram considerados concentração de corte para triagem da PKU. Com a atualização do método para espectrometria de massa em tandem os resultados se tornaram mais sensíveis diminuindo esses valores para 2mg/dL (120 µmol/L) (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Pacientes que apresentam níveis plasmáticos de Phe entre 2 mg/ dL e 8 mg/dL possuem hiperfenilalaninemia transitória, não necessitam de tratamento, trata-se de uma redução parcial da atividade enzimática, porém pacientes femininas com esse quadro devem se atentar durante o período gestacional. O elevado nível de Phe no plasma da mãe faz com que o nível de Phe no embrião seja ainda maior, devido ao gradiente positivo transplacentar, causando PKU embrionária que resulta em graves danos cerebrais no feto antes mesmo de seu nascimento. Ver classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias no quadro 1 (MARQUEZ, 2000).

A confirmação do diagnóstico deve ser feita mediante concentrações elevadas de Phe em duas amostras distintas, apresentando concomitantemente níveis baixos de tirosina (ELHAWARY et al., 2022).

Quadro 1 - Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias

Classificação	Concentração de Phe sérica (mg/dL)	Atividade enzimática (%)	Tratamento
PKU clássica	>20	<1	Sim
PKU leve	8-20	1-3	Sim
Hiperfenilalaninemia não PKU	2-8	>3	Não

Fonte: Adaptado de Martins et al., 2009.

Por meio de ensaios moleculares é possível diferenciar a causa do acúmulo de Phe no sangue, entre deficiência de PAH e distúrbios de BH4 (ELHAWARY et al., 2022). Uma ampla variedade de técnicas de genética molecular tem sido utilizada, incluindo Southern blotting, digestão com enzimas de restrição, detecção de mutações por sequenciamento e amplificação de sonda de ligação múltipla (WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008).

4.1.7 PKU Materna

O tratamento inadequado de gestantes fenilcetonúricas pode aumentar o risco de desenvolvimento fetal anormal. As altas concentrações de Phe no sangue da mãe causa uma condição chamada síndrome da fenilcetonúria materna que se manifesta no feto por restrição do crescimento intrauterino, retardo psicomotor, microcefalia e defeitos cardíacos congênitos (ELHAWARY et al., 2022).

Esse risco é observado entre a 8^a e 10^a semana de gestação e independe do status genético do feto para PKU (ELHAWARY et al., 2022). A Phe materna em excesso é capaz de atravessar a barreira placentária atingindo níveis plasmáticos fetais de 1,2 a 1,9 vezes mais elevados que no sangue materno, causando hiperfenilalaninemia que resultam em alterações na mielinização, na síntese proteica cerebral e na produção de neurotransmissores (FIGUEIRÓ-FILHO ET AL., 2004).

As concentrações séricas de Phe nas gestantes devem ser mantidas entre 120 µmol/L e 360 µmol/L em mulheres com PKU, antes da concepção e durante a gravidez para desenvolvimento fetal ideal (GRISCH-CHAN et al., 2019).

4.2 TRATAMENTO

O princípio do tratamento da PKU é a diminuição dos níveis plasmáticos de Phe a fim de prevenir o surgimento de complicações neurológicas. De acordo com as diretrizes brasileiras esse nível deve se manter em: de 120 a 360 µmol/L para lactentes e pré-escolares, até 480 µmol/L para escolares e até 700 µmol/L para adolescentes (ASCENSO ROSA, 2014).

4.2.1 Tratamento baseado em restrição dietética

A base para o tratamento da PKU é a restrição dietética. Por se tratar de um aminoácido essencial, os pacientes devem seguir uma dieta com baixa concentração

de Phe, mantendo seus níveis sanguíneos aceitáveis, como descrito acima, durante toda a vida (ELHAWARY et al., 2022).

A Phe está presente em grande parte das proteínas naturais, como carne, peixe, aves, leite, queijo, ovos, nozes, sementes, alimentos com farinha, entre outros. Portanto, uma dieta deficiente dessas proteínas naturais leva a uma diminuição da vitamina B12 (encontrada em carnes, aves e peixes), do cálcio e da vitamina D, conseqüentemente aumenta o risco de o paciente desenvolver osteoporose e crescimento retardado, assim faz-se necessário o uso de suplementação rica em vitaminas e minerais com a finalidade de evitar esses efeitos adversos (ELHAWARY et al., 2022).

Segundo Van Spronsen e colaboradores, “O tratamento dietético compreende três aspectos: restrição da ingestão de proteínas naturais, suplementação com uma mistura de aminoácidos livres de Phe e consumo de alimentos com baixo teor de proteínas”. (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Para evitar carências nutricionais, os fenilcetonúricos devem fazer o consumo de fórmulas que contenham mistura de aminoácidos livres que provêm de 50 a 90% de equivalentes de proteínas, representando em torno de 75 a 95% das necessidades proteicas (MARTINS, et al., 2009). Essa mistura carece em Phe e é enriquecida por Tyr, para substituir a Tyr que em indivíduos normais é produzida a partir da Phe (VAN SPRONSEN et al., 2021).

Carboidratos simples, como açúcares, mel e geleias e as gorduras como óleo vegetal e margarina, podem ser ingeridos livremente (KANUFRE et al., 2010) seu consumo é de grande importância pois é utilizado como fonte de energia que se estiver insuficiente pode aumentar os níveis de fenilalanina devido à degradação de proteína endógena (MARTINS, et al., 2009).

O tratamento baseado em restrição dietética se mostrou bastante eficaz, na prevenção de danos neurológicos, porém deve ser seguido assiduamente. Pacientes que tiveram a dieta descontinuada ou que não a mantiveram de maneira constante desenvolveram dificuldades psiquiátricas e psicossociais incluindo depressão, ansiedade, retraimento social, agorafobia, baixa autoestima, comportamento neurótico, diminuição da tolerância à frustração e outras fobias (HANLEY, 2004).

A dificuldade em manter uma dieta rigorosa é um desafio contínuo no acompanhamento da fenilcetonúria, o que justifica as pesquisas para alternativas terapêuticas (BLAU; VAN SPRONSEN; LEVY, 2010; BLAU; SHEN; CARDUCCI, 2014).

4.2.2 Tratamento com BH4

Outra abordagem de tratamento para fenilcetonúria, consiste na reativação da atividade residual da PAH através de um análogo sintético do BH4 o dicloridrato de sapropterina, indicado para mulheres com fenilcetonúria (clássica ou leve) ou hiperfenilalaninemia não PKU em período periconcepcional ou em período gestacional (BRASIL, 2021).

Os pacientes com PKU leve ou moderada têm maior probabilidade de se beneficiar com o tratamento, comparado aos pacientes com PKU clássica (CAZZORLA et al., 2014). A resposta ao tratamento farmacológico com BH4 depende do genótipo do paciente e cerca de 30% deles respondem bem à administração de BH4 (WIEDEMANN et al., 2020).

O critério que mede a responsividade a essa intervenção medicamentosa é a queda no nível plasmático de Phe de pelo menos 30% após uma carga de sapropterina de 20 mg/kg/dia (WIEDEMANN et al., 2020). A utilização do medicamento associado à restrição alimentar permite o alcance de uma maior tolerância a Phe bem como a flexibilização da terapia dietética em pacientes responsivos a esse tratamento (POUBEL; HAACK, 2022). Tanto a dieta quanto o uso do dicloridrato de sapropterina estão associados a uma maior qualidade de vida a longo prazo (CAZZORLA et al., 2014).

4.3 NOVAS ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

A necessidade de adesão constante a uma dieta restritiva é um dos grandes problemas enfrentados no tratamento da PKU, por essa razão, diversos pesquisadores estão avaliando novas alternativas permanentes direcionadas ao restabelecimento da atividade total da enzima PAH. Essa estratégia promissora permitiria que os pacientes ficassem livres dos tratamentos medicamentosos ou dietéticos (HARDING et al., 2006; WIEDEMANN et al., 2020).

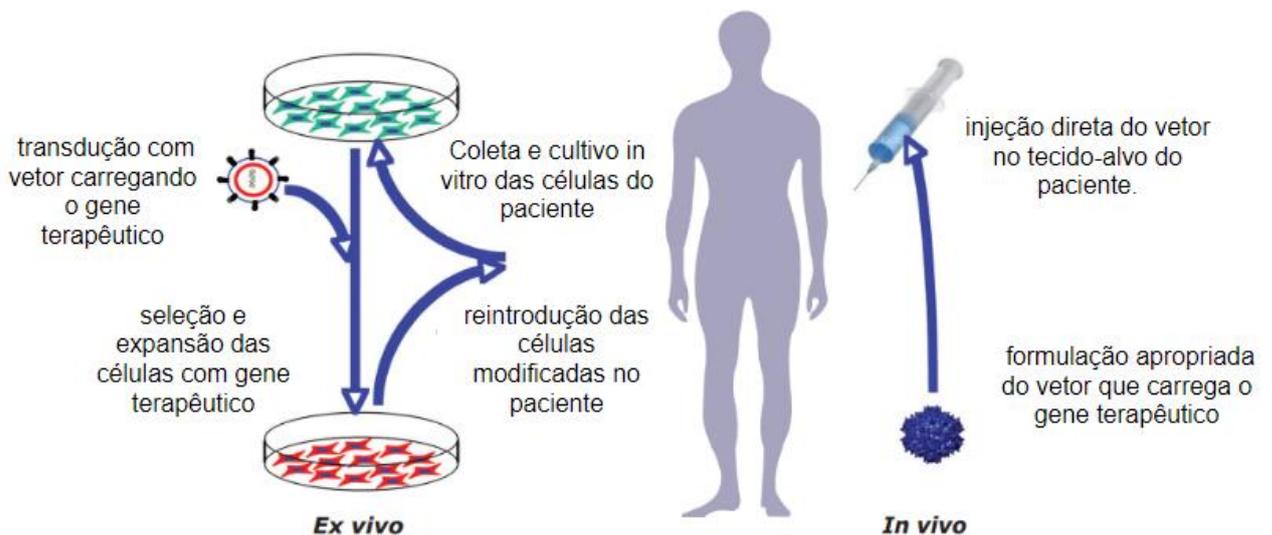
A PKU demonstrou ser um modelo ideal para terapia gênica. Diversos estudos demonstraram que a transferência do gene PAH dirigida ao fígado trouxe correção da hiperfenilalaninemia e melhora comportamental em um modelo de camundongo PKU, demonstrando um potencial para aplicação terapêutica (MOCHIZUKI et al., 2014).

4.4 TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica é o tratamento baseado na introdução de genes saudáveis de interesse (transgene), para substituir ou modificar genes inativos ou disfuncionais com o uso de técnicas de DNA recombinante. A terapia pode ser realizada em células somáticas ou germinativas. Na primeira, o objetivo é corrigir o gene através da inserção de um transgene em células somáticas. Essa modificação não poderá ser herdada na geração futura. Diferentemente, a segunda consiste na introdução do transgene em células germinativas com o efeito terapêutico podendo ser observado também nas próximas gerações (LINDEN, 2010).

O transgene pode ser introduzido de duas formas diferentes, *ex vivo*, quando as células são isoladas, modificadas em laboratório e retornadas ao corpo do paciente ou *in vivo* quando os genes são inseridos através de um vetor (figura 5) (MENCK; VENTURA, 2007).

Figura 5 - Estratégias de terapia gênica *in vivo* e *ex vivo*



Fonte: Adaptado de MENCK; VENTURA, 2007.

4.4.1 Transferência de genes

A terapia gênica consiste na introdução de genes em células, porém a entrada de DNA puro na membrana plasmática das células é extremamente rara. Esse mecanismo é benéfico para o organismo, pois dificulta alterações erradas no metabolismo celular. Por essa razão, há a necessidade de um veículo que facilite a entrada do DNA na célula, o vetor. Existem dois tipos de vetores: os vetores virais (retrovírus, lentivírus, herpesvírus, adenovírus e adeno-associado) e os vetores não-virais (LINDEN, 2010).

A escolha do vetor ideal requer alguns pré-requisitos. O vetor escolhido precisa liberar o gene de forma específica e eficiente, liberando um ou mais genes de tamanhos necessários para aplicações clínicas. O vetor não pode ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro, induzir reações alérgicas ou processos inflamatórios, ele deve aumentar as funções normais, corrigir deficiências ou inibir atividades deletérias de forma segura tanto para o paciente quanto para os profissionais que o manipulam. (GONÇALVES; PAIVA, 2027).

4.4.2 Vetores virais

Os vírus têm a capacidade natural de entregar material genético às células, o que os torna um excelente vetor para a entrega de genes (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Os retrovírus, são vírus envelopados de cadeia simples de RNA, com capacidade de transduzir tanto em células divididas quanto em células proliferativas, podendo transportar um gene de até 8 kb de DNA. Essa classe de vírus possui transcriptase reversa, transcreve um molde de RNA em DNA, seu material genético pode ser integrado às células quiescentes (que não estão em divisão) do sistema nervoso central (SNC) dos hospedeiros e conferir expressão gênica de longo prazo, além de poder incorporar o gene alvo de interesse no cromossomo hospedeiro das células em divisão, garantindo transmissão fiel do transgene às células descendentes (OLIVEIRA et. al., 2019).

O Vírus Herpes Simplex I (HSV-I), é um vírus de DNA envelopado que causa infecções persistentes ou recorrentes. Possuem alta eficiência de transdução e grande capacidade de transgene, podendo transportar genes de até 152 kb. São

capazes de entrar em estado de latência em neurônios e expressar o transgene em células que estão em divisão e não em células já divididas. Outra desvantagem desse vetor é seu alto perfil inflamatório (OLIVEIRA et. al., 2019; KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Outra classe de vetor viral, são os adenovírus que embora sejam capazes de infectar células neuronais causam alta toxicidade no SNC, podem empacotar genes de até 25 kbs (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Já os vírus adeno-associados (AAV) são os vetores mais proeminentes para a terapia gênica, devido a sua capacidade de transdução de longo prazo em células proliferativas e em tecidos permanentes e por sua natureza não patogênica. São vetores menores com virion de aproximadamente 25nm, possuem em sua estrutura proteínas e uma molécula de DNA de cadeia simples cujo genoma consiste em 3 genes de capsídeo, 4 genes de replicação e um gene chamado AAP contido em 3 quadros de leitura abertos, flanqueados por repetições terminais invertidas (ITRs) que servem na replicação e empacotamento do genoma. (ANTÓNIO JESUS ABRUNHEIRO, 2016; KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Para aumentar a especificidade do vetor viral, ligantes conhecidos para células-alvo podem ser incorporados no capsídeo, as proteínas do capsídeo facilitam a ligação do vírion e nos AAV existem mais de cem variantes dessas proteínas, desse modo é possível selecionar o ideal para direcionar efetivamente as células e tecidos desejados (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Os AAV são capazes de fornecer genes como um epissoma extracromossômico que reduz muito a possibilidade de mutagênese insercional e oncogênese (KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013).

Embora muito utilizados, os vetores virais conferem algumas desvantagens, mesmo com a capacidade viral reduzida, os hospedeiros podem sofrer fortes reações imunes quando em contato com componentes do vírus além de possível transformação oncogênica (OLIVEIRA et. al., 2019).

Quadro 2 – Detalhamento dos vetores virais

Vetor viral	Retrovírus	Herpes vírus HSV-1	Adenovírus	Vírus Adeno-Associado (AAV)
Família	Retroviridae	Herpesviridae	Adenoviridae	Parvoviridae
Capacidade transgênica	8 KB	152 KB	25 KB	4,7 KB
Genoma	ssRNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA
Inserções no DNA	Sim	Não (epissoma circular)	Não	Não (epissoma circular)
Capacidade de transdução em tecidos permanentes	Sim	Não	Sim	Sim
Capacidade de transdução em células em divisão	Sim	Sim	Sim	Sim
Resposta imune	Sim	Sim	Sim	Limitado

Fonte: Adaptado de KALBURGI; KHAN; GRAY, 2013

4.4.3 Vetores não virais

A introdução do material genético em células, com objetivo terapêutico, também pode ser feita através de vetores não virais. São os lipoplexos, poliplexos e lipopoliplexos, partículas construídas sinteticamente, nas quais o DNA plasmidial é transportado até a célula de interesse (CHIRA et. al., 2015).

Nos vetores lipoplexos o DNA plasmidial é recoberto por um lipídeo que pode ser catiônico, neutro ou aniônico. Os catiônicos são os mais utilizados por serem mais estáveis comparados aos neutros e aos aniônicos. As vantagens desses vetores são a maior segurança que eles oferecem e uma baixa citotoxicidade embora possuam tendência a se agregar sob condições fisiológicas, o que limita sua circulação e seu tempo de vida (OLIVEIRA et. al., 2019).

Os poliplexos são formados por um complexo entre um polímero catiônico e ácidos nucleicos, esses complexos são capazes de entrar na célula por endocitose,

esses vetores não são capazes de liberar sua carga de DNA para o citoplasma, por isso há necessidade de cotransfecção com agentes endossoma-lítico, são eficientes na transfecção porém seu uso clínico é limitado devido aos seus efeitos citotóxicos (OLIVEIRA et. al., 2019).

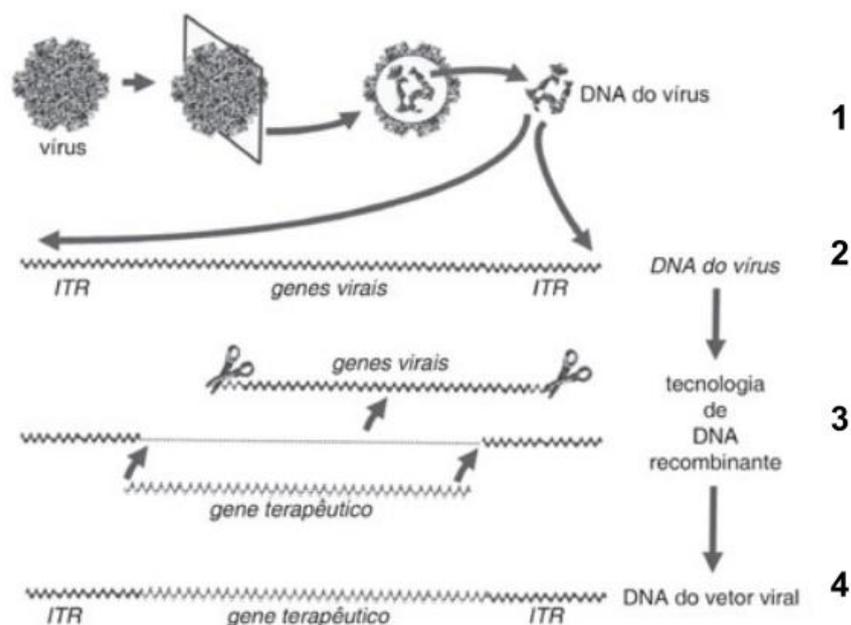
Já os vetores lipopoliplexos são constituídos pelas vantagens dos outros dois vetores são mais estáveis, apresentam maior reprodutibilidade e eficiência de transfecção (OLIVEIRA et. al., 2019).

Embora sejam menos eficientes comparado aos vetores virais, os vetores não virais são relativamente fáceis de produzir e têm risco menor de complicações inflamatórias (CHIRA et. al., 2015). Outra vantagem é a ausência de patogenicidade e o baixo custo de produção (OLIVEIRA et. al., 2019).

4.4.4 Construção do vetor

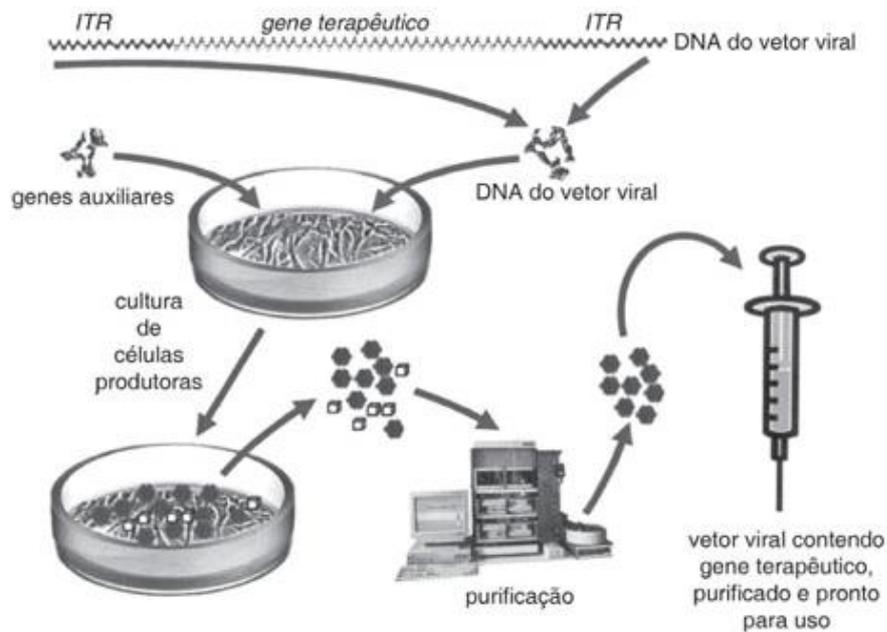
O processo de construção de um vetor viral para a terapia gênica consiste em substituir os genes virais pelo gene terapêutico, usando as tecnologias de DNA recombinante (Figura 6 e 7). O vetor é criado através inserção do gene terapêutico entre os dois ITRs, substituindo o gene viral, deletando toda a transfecção e replicação viral mantendo apenas os genes responsáveis pela invasão celular (LINDEN, 2010).

Figura 6 - Construção de um vetor viral para terapia gênica



Fonte: LINDEN, 2010. 1- Ilustração do vírus (AAV) e onde está o seu material genético; 2- mostra um DNA de fita simples com os genes essenciais (ITRs) para o ciclo viral e genes virais que promovem replicação, patogenicidade e virulência; 3- ilustra a retirada dos genes virais e substituição por genes terapêuticos de interesse; 4- representação do novo DNA do vetor viral, contendo os genes terapêuticos e os ITRs.

Figura 7 - Produção em massa de vetores virais para terapia gênica.



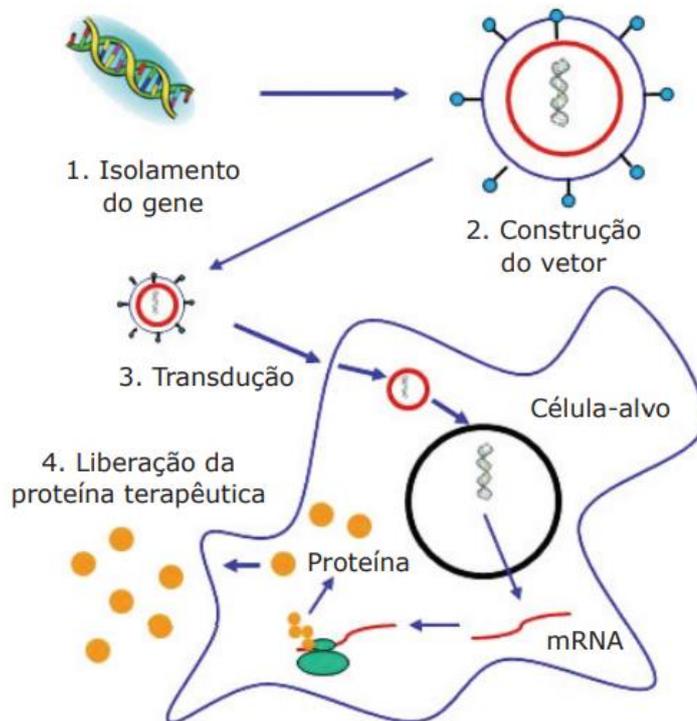
Fonte: LINDEN, 2010. O DNA do vetor viral foi construído conforme mostrado na figura 6, esse DNA é apresentado por precipitação ou eletroporação (aplicação de pulsos elétricos curtos de alta tensão que aumentam o potencial de transporte da membrana) em células produtoras, junto com um plasmídeo contendo genes auxiliares, os quais são necessários para empacotar o DNA do vetor dentro da estrutura de vírus semelhante aos AAV originais. As células produtoras formam grandes quantidades de vetores virais completos, juntamente com contaminantes, que são removidos em uma etapa de purificação, após a qual conseguem-se trilhões de partículas virais contendo o gene terapêutico livre de impurezas. o vetor está, assim, pronto para uso.

4.5 TERAPIA GÊNICA APLICADA A FENILCETONÚRIA

O tratamento de muitas doenças, por meio da terapia gênica com vetores virais, vem sendo pesquisado, alcançando-se bons resultados. Tanto doenças hereditárias como adquiridas têm sido alvos constantes de estratégias de terapia gênica (MENCK; VENTURA, 2007).

As etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica são: o isolamento do gene, a construção de um vetor, a transferência para células no tecido-alvo, e a produção da proteína codificada e expressa pelo gene terapêutico nessas células (figura 8) (MENCK; VENTURA, 2007).

Figura 8 - Etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica



Fonte: MENCK; VENTURA, 2007.

Atualmente, diversos estudos sobre terapia gênica direcionados ao tratamento da PKU estão em desenvolvimento. Esses estudos visam a restauração da função da PAH e descobertas promissoras foram feitas (BLAU et al., 2014).

4.5.1 Geração de um modelo de camundongo PKU

Para testar diferentes estratégias de tratamento para PKU *in vivo*, é necessário um modelo animal apropriado que recapitule com precisão a doença humana. O modelo mais comumente utilizado é o Pah^{enu2}, descrito pela primeira vez em 1990 por David McDonald (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Os camundongos Pah^{enu2} possuem uma mutação pontual no gene PAH no exon 7 (c.835T>C; p.F263S) que altera a posição do aminoácido 263 de uma fenilalanina para uma serina. Essa mutação foi gerada por mutagênese química

aleatória em uma cepa de camundongo Black and Tan Brachyury (BTBR) usando o agente alquilante N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), que abole a função da PAH e causa níveis de Phe anormalmente elevados (VILLIGER et al., 2018).

Quando mantidos em uma dieta normal, os camundongos homocigotos apresentaram níveis sanguíneos de Phe acima de 25mg/dL. Os animais são fenotipicamente hipopigmentados e notavelmente atrasados em seu crescimento, são cognitivamente prejudicados, possuem metabólitos anormais de neurotransmissores de serotonina e dopamina no cérebro, sintomas observados em pacientes com PKU Clássica. A síndrome da PKU materna também pode ser observada nesse modelo animal (GRISCH-CHAN et al., 2019).

O camundongo PKU é um excelente modelo genético validado para estudar abordagens de transferência de genes hepáticos *in vivo*, pois oferece uma leitura direta para eficácia terapêutica (GRISCH-CHAN et al., 2019).

4.5.2 Terapia genética hepática com vetor de vírus adeno-associado recombinante

Alguns estudos demonstraram que a terapia gênica direcionada ao fígado usando um vetor de adenovírus corrigiu os níveis séricos de Phe transitoriamente *in vivo*, porém essa abordagem não foi continuada, pois o vetor provocou uma alta resposta imune do hospedeiro contra o vírus recombinante (GRISCH-CHAN et al., 2019). Por outro lado, os vetores de vírus adeno-associados (AAV) fazem parte de outra classe de transferência de genes que demonstraram transduzir de forma estável células indivisíveis, como os hepatócitos (MOCHIZUKI et al., 2014).

A edição do genoma por meio de vetores virais adeno-associados (AAV) é uma estratégia promissora de terapia gênica para várias doenças, especialmente para aplicação clínica *in vivo*. Os AAVs são vírus predominantemente não integrados e não patogênicos que transduzem de forma eficiente em vários tecidos alvos, como o fígado (YIN et al., 2020).

O vetor de vírus adeno-associado recombinante (AVVr) é o sistema de vetores mais utilizado, para adição segura e eficaz de genes dirigidos ao fígado, com ensaios clínicos em andamento para diversas doenças, como hemofilia A e B, porfirias, entre

outras (GRISCH-CHAN et al., 2019). Atualmente, 12 sorotipos de AAV selvagens foram identificados (CARVALHO, 2010).

Em tentativas de correção do gene utilizando os AAVs de sorotipos 2 e 5 foi possível observar a correção dos níveis de Phe sanguíneo, porém só após a administração (via injeção na veia porta) de doses muito altas (10^{12} – 10^{14} genoma do vetor [vg]/camundongo) em camundongos machos e ainda maiores em camundongos fêmeas e a concentração Phe voltou a mesma que a inicial em 40 semanas da administração (MOCHIZUKI et al., 2014).

A implementação dos AAVs de sorotipo 8 foi um grande avanço, pois o capsídeo AAV8 mostrou maior afinidade e produz uma frequência de transdução no fígado de roedores melhor que qualquer outro sorotipo AAV (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Três grupos distintos de pesquisadores testaram os vetores adeno-associados recombinantes pseudotipados com capsídeo do sorotipo 8 (rAAV2/8) que expressam PAH-cDNAs (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Harding et al., (2006) evidenciaram que a administração de vetores rAAV2/8 contendo o cDNA PAH murino sob a regulação transcricional de um forte promotor específico do fígado (LSP, capaz de direcionar a expressão gênica específica em alto nível), através da veia porta, em doses 5×10^{11} vg em camundongos Pah^{enu2} produziram correção completa e estável dos níveis sanguíneos de Phe por até 17 semanas. A atividade hepática da PAH foi corrigida em cerca de 11,5%, resultado associado a um aumento significativo na diminuição de Phe após ingestão dietética.

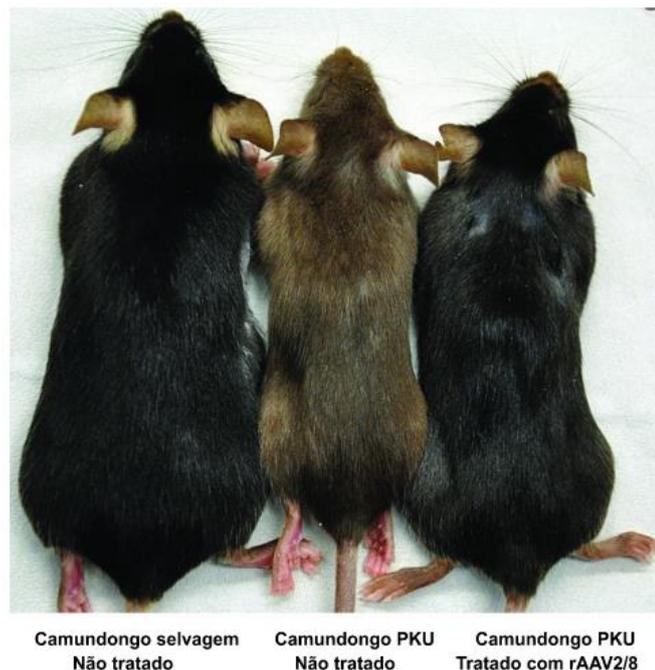
Ding et al., (2006) também fizeram sua contribuição, administraram no fígado de camundongos PKU (cruzados com C57Bl/6, cepa comum de camundongos, para melhorar o desempenho reprodutivo) por meio de injeções únicas na veia porta ou na cauda, vetores rAAV2/8. Após duas semanas da aplicação, as concentrações sanguíneas de Phe diminuíram para níveis normais tanto em camundongos machos quanto em fêmeas. Os resultados permaneceram estáveis por 42 semanas.

Nas descobertas de YAGI et al., (2011), verificou-se que uma única injeção de 1×10^{11} ou 1×10^{12} partículas de um vetor pseudotipado de AAV8 construído com um genoma de AAV auto complementar (scAAV), em camundongos PKU, resultou em

uma redução de Phe sanguínea para níveis normais ou próximo do normal por mais de 1 ano em ambos os sexos.

Nos três estudos relatos, foi possível observar uma reversão na hipopigmentação da pelagem dos camundongos tratados após a terapia gênica dirigida ao fígado mediada por rAAV2/8 (figura 9) (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Figura 9 - Reversão do fenótipo de cabelos claros após terapia gênica dos camundongos PKU



Fonte: adaptado de GRISCH-CHAN et al., 2019. reversão da pelagem marrom para preta de camundongos PKU tratados.

4.5.3 Terapia gênica hepática por edição genética

Nos últimos anos, diversos estudos incorporaram a edição do genoma para tratamento de doenças genéticas no fígado de modelos animais. A ferramenta de edição mais utilizada é a CRISPR/Cas9, no qual um RNA guia quimérico programável direciona uma endonuclease (Cas9) para o locus de interesse. Se os produtos gerados pela Cas9 (quebras de DNA de fitas duplas) forem restaurados por reparo dirigido por homologia, ou seja, se além do sistema CRISPR/Cas9, houver um fragmento de DNA exógeno modelo, as mutações serão reparadas com precisão. O reparo preciso é essencial para corrigir os distúrbios autossômicos recessivos, no

entanto, os hepatócitos no fígado adulto reparam as quebras de DNA de fitas duplas por meio de junções não homólogas que resulta em mutações de deleção ou inserções (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Quando o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para tratamento de outras doenças monogênicas, as taxas de reparo foram extremamente baixas e provavelmente se aplicada a PKU não seriam suficientes para corrigir o nível de Phe sanguíneo (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Em estudos atuais, foi desenvolvida uma nova ferramenta de edição de genoma baseada em CRISPR, que corrige pares de bases de forma direta e individual. Essa ferramenta se mostrou promissora na correção de uma mutação G para A em um camundongo Pah^{enu2}. A entrega dos editores de base mediada por rAAV resultou em taxas de reparo da base alvo > 20% e uma redução de níveis séricos de Phe para níveis fisiológicos (GRISCH-CHAN et al., 2019).

Esses dados sugerem que os editores de base têm grande potencial para o tratamento de pacientes PKU com fenótipo de mutações T para C, A para G, G para A e C para T (GRISCH-CHAN et al., 2019).

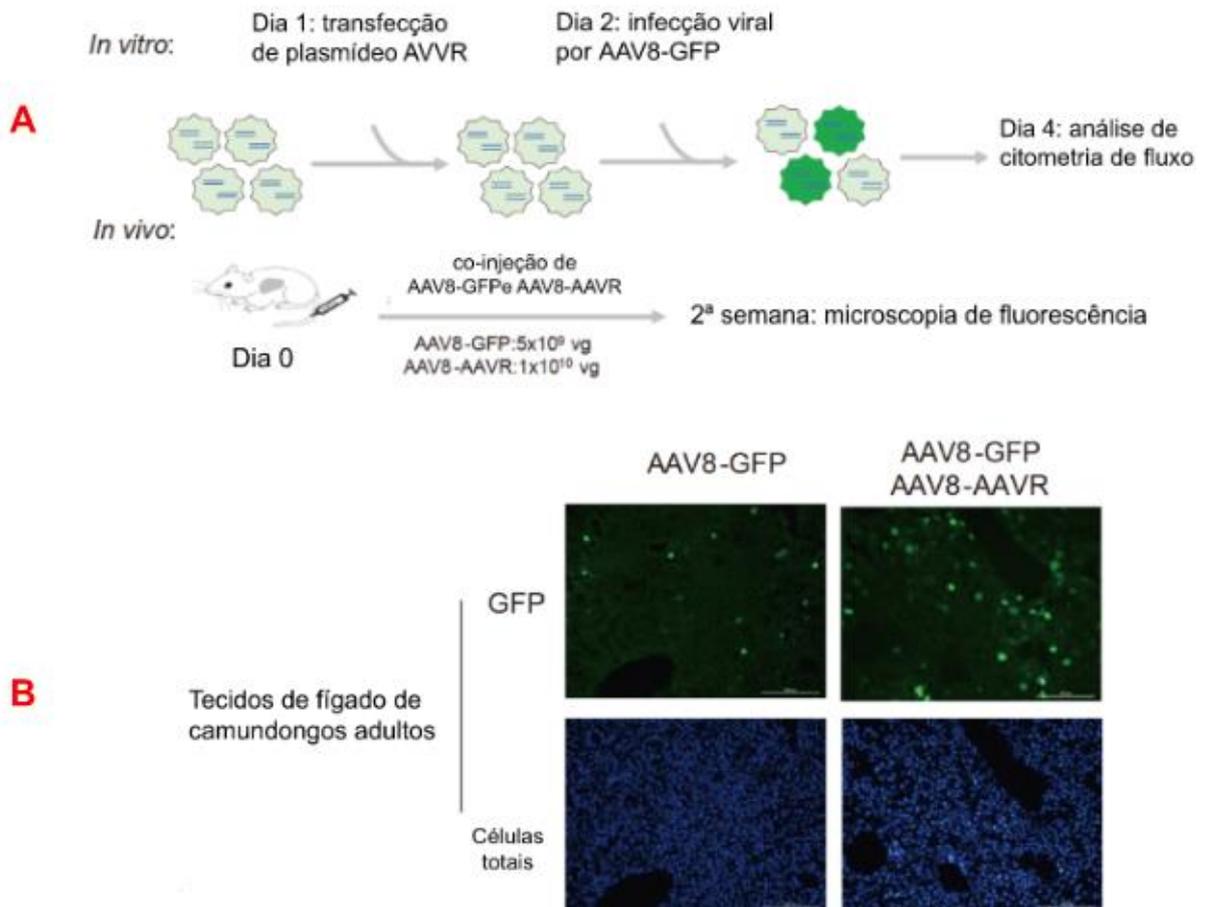
4.5.4 Exemplo de uma estratégia atual de tratamento para PKU

Em um laboratório de Xangai, Yin et al. (2020) demonstraram que a co-entrega do receptor AAVr aumenta significativamente a transdução viral e para provar a eficiência da transdução *in vitro* e *in vivo*, foram testadas linhagens de células e cepas de camundongos adultos (Figura 10-A).

Células 293T foram transfectadas com plasmídeo de expressão AAVr *in vitro*. A superexpressão de AAVr aumentou a transdução de GFP (proteína fluorescente verde) expressa pelo vetor AAV8 (AAV8-GFP) em títulos baixos. Em análise de citometria de fluxo foi observado que a porcentagem de células positivas para GFP aumentou 4 vezes e a intensidade média de fluorescência nas células aumentou 13,5 vezes. *In vivo*, foram distribuídos juntamente com o AAVr, os vírus AAV8-GFP, cerca de 5×10^9 cópias do genoma e AAV8-AAVr cerca de 1×10^{10} cópias do genoma, de baixa titulação, por meio de injeção na veia da cauda. Após duas semanas foi possível observar por meio de microscopia de fluorescência (figura 10-B) um aumento de

quase 15 vezes na transdução viral no grupo de co-injeção de AAV8-AAVr (Yin et al. 2020).

Figura 10 - Co-entrega do receptor AAVr aumenta significativamente a transdução viral



Fonte: Adaptado de YIN et al., 2020. A, linhagens de células e camundongos adultos transfectados com AAV8-AAVr. B, imagens representativas de seções de fígado de camundongos tratados com AAV8-GFP ou com AAV8-GFP e AAV8-AAVr.

A partir desses resultados, os pesquisadores puderam desenvolver uma estratégia de terapia genética para PKU. Inicialmente, era necessário corrigir a mutação e isso foi feito por meio da edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9. Foi utilizada a nuclease Cas9 da bactéria *Staphylococcus aureus*, abreviado como SaCas9, por ter boa eficiência de edição e um tamanho relativamente menor que é adequado para o empacotamento de AAV. Foi projetado e escolhido o sgRNA adjacente ao local da mutação (YIN et al., 2020).

Foram utilizados 3 vetores para restaurar a atividade da PAH *in vivo*: um para empacotar o sgRNA e a SaCas9 por trás de um promotor LP1 específico do fígado (AAV8-SaCas9/sgRNA); o segundo vetor contém um molde doador de 1.400 pb de comprimento com uma Arg para corrigir o Trp em células mutantes (AAV8-Doador); e o último pacote vetorial de AAVr que também é acionado por um promotor LP1 específico do fígado (AAV8-AAVr) (YIN et al., 2020).

No estudo foram testados 5 grupos de camundongos com 8 semanas de idade: em dois grupos todos os animais receberam, via injeção na veia da cauda, vírus AAV8-SaCas9/sgRNA (3×10^{11} cópias do genoma) e o vírus AAV8-Doador (2×10^{11} cópias do genoma), um grupo com AAV8-AAVr e o outro sem; em outros dois grupos, os camundongos receberam o vírus AAV8-Doador, um grupo com AAV8-AAVr e o outro sem; no último grupo, os camundongos foram tratados sem vírus, servindo como grupo controle (YIN et al., 2020).

Os camundongos foram monitorados e suas concentrações séricas de Phe foram medidas mês a mês. Após o 5º mês de tratamento, o nível de Phe do grupo co-injetado com AAV8-AAVr caiu para cerca de 50% do nível antes do tratamento, enquanto o nível de Phe de camundongos PKU não tratados aumentou 10%. Esses resultados demonstram que a co-injeção de AAV8-AAVr diminuiu significativamente a concentração de Phe no sangue. Além disso, tanto no grupo co-injetado com AAV8-AAVr quanto no grupo não injetado com AAVr houve reversão na cor da pelagem (figura 11) (YIN et al., 2020).

Figura 11 - Alteração na cor de pelagem em camundongos



Fonte: Adaptado de YIN et al., 2020.

Esse fato sugere que a co-entrega de AAVr com componentes de edição de genoma por meio do vetor AAV8 aumentou significativamente a eficiência de clivagem de SaCas9. E a atividade do reparo dirigido por homologia precisa em tecido de fígado de camundongo adulto, foi capaz de melhorar significativamente o fenótipo de PKU (YIN et al., 2020).

Essa estratégia de terapia gênica mediada por AAV pode ser benéfica não apenas para doenças metabólicas direcionadas ao fígado, mas também em outros tecidos, no entanto questões de segurança devem ser investigadas mais profundamente (YIN et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

A fenilcetonúria é o erro mais comum no metabolismo dos aminoácidos com bom prognóstico se identificado precocemente. O tratamento consiste na diminuição dos níveis séricos de fenilalanina e o método padrão para tratar a doença é a restrição dietética, que apesar de bastante eficaz em prevenir os danos neurológicos e as manifestações clínicas mais severas da doença, devido a sua rigurosidade enfrenta dificuldades em sua adesão.

Com a necessidade de um tratamento definitivo visando uma melhor qualidade de vida dos pacientes, a terapia gênica se mostrou bastante promissora.

Este trabalho fornece evidências concretas de que com a utilização de vírus adeno-associado (AAV) como vetores de transferência de genes direcionados para o fígado, tem sido possível obter uma menor resposta imunológica contribuindo para um maior sucesso de tratamento a longo prazo.

Foi possível observar que a terapia gênica foi capaz de restaurar significativamente a atividade da fenilalanina hidroxilase e diminuir as concentrações de fenilalanina no sangue de camundongos. Demonstrando potencial terapêutico para aplicação em humanos futuramente. No entanto, a questão de segurança deste método ainda é uma grande preocupação que deve ser extensivamente investigada.

REFERÊNCIAS

ANTÓNIO JESUS ABRUNHEIRO, Vasco. **Produção e purificação de vetores virais adeno-associados para terapia génica**. 2016. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

BLAU, N.; SHEN, N.; CARDUCCI, C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. **Expert review of molecular diagnostics**. v. 14, n. 6, p.655–671, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.923760>. Acesso em: 13 mar. 2023.

BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F.J.; LEVY H.L. Phenylketonuria. **Lancet**. vol.376, n. 9750, p.1417-1427, 2010. DOI:10.1016/S0140-6736(10)60961-0. Acesso em: 22 fev. 2023.

BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. **Dicloridrato de sapropterina para o tratamento de pacientes com fenilcetonúria a partir de cinco anos de idade**. Brasília, 2021 Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/01/1353321/20210712_relatorio_619_sapropterina_fenilcetonuria_p29.pdf. Acesso em: 02 mai. 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. **Fenilcetonúria (PKU)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/programa-nacional-da-triagem-neonatal/fenilcetonuria-pku#:~:text=%C3%89%20uma%20doen%C3%A7a%20metab%C3%B3lica%20rara,e%20os%20diferentes%20grupos%20%C3%A9tnicos>. Acesso em: 23 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral de Atenção Especializada. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal.pdf. acesso em: 2 mar. 2023

Cazzorla, C.; Cegolon, L.; Burlina, A.P. et al. Avaliação da qualidade de vida (QoL) em uma coorte de pacientes com fenilcetonúria. **BMC Public Health**. v. 14. n. 1243, p. 1-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1243>. Acesso em: 12 abr. 2023

CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. **Pediatrics**, v.105 n. 1, p.89–103, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.105.1.89>. Acesso em: 2 mar. 2023

CHIRA, S.; JACKSON, C. S.; OPREA, I.; OZTURK, F.; PEPPER, M. S.; DIACONU, I.; BRAICU, C.; RADULY, L. Z.; CALIN, G. A.; BERINDAN-NEAGOE, I. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. **Oncotarget**, v. 6 n. 31, p. 30675–30703, 2015. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5169>. acesso em: 12 mai 2023.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p.623–636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>. Acesso em: 9 mar. 2023.

CHRIST, S. E. Asbjørn Følling and the discovery of phenylketonuria. **Journal of the history of the neurosciences**, Washington, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2003 DOI: [10.1076/jhin.12.1.44.13788](https://doi.org/10.1076/jhin.12.1.44.13788). Acesso em: 1 mar. 2023

DILELLA, A.; MARVI, J.; BRAYTON, K. et al. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. **Nature**, v. 327, p.333–336, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1038/327333a0>. Acesso em: 9 mar. 2023

DING, Z.; GEORGIEV, P.; THÖNY, B. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. **Gene therapy**. v. 13, n. 7, p. 587–593. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302684>. Acesso em: 4 abr. 2023.

ELHAWARY, N.A.; ALJAHDALI, I.A.; ABUMANSOUR, I.S. et al. Etiologia genética e desafios clínicos da fenilcetonúria. **Hum Genomics** v. 16, n. 22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00398-9>. Acesso em: 22 fev. 2023

FIGUEIRÓ-FILHO, Ernesto Antonio et al. Fenilcetonúria materna: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 26, p. 813-817, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032004001000009> acessado em: 04 mai. 2023.

GONÇALVES, G. A. R. I; PAIVA, R. de M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein** (São Paulo), v. 15, p. 369-375, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024> acessado em: 12 mai 2023

GRISCH-CHAN, Hiu Man et al. State-of-the-Art 2019 on Gene Therapy for Phenylketonuria. **Human gene therapy**. vol.30.10, p.1274–1283, 2019 DOI:<https://doi.org/10.1089/hum.2019.111>. Acesso em: 22 mar 2023

HANLEY, W.B. Fenilcetonúria do adulto. **The American Journal of Medicine**, v. 117, n. 8, p. 590-595, 2004 DOI:10.1016/j.amjmed.2004.03.042. Acesso em: 24 abr. 2023

HARDING, C., GILLINGHAM, M., HAMMAN, K. et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. **Gene therapy**. v. 13, n. 5, p. 457–462, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302678>. Acesso em: 2 mai 2023

KANUFRE, V. et al. Special diet and phenylketonuria: a challenge of body weight maintenance. **Rev Med Minas Gerais**, v. 20, n. 3, p. S20-4, 2010. Disponível em: <https://www.rmmg.org/artigo/detalhes/926>. Acesso em: 23 abr. 2023

KALBURGI, S N.; KHAN, N. N.; GRAY, S. J. Recent gene therapy advancements for neurological diseases. **Discovery medicine**, v. 15, n. 81, p. 111–119, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554939/>. Acesso em: 13 mai 2023.

KAUFMAN, S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 50, n. 6, p.1085-1093, 1963. DOI:10.1073/pnas.50.6.1085. Acesso em: 9 mai. 2023

LEVY H. L. Robert Guthrie and the Trials and Tribulations of Newborn Screening. **Int J Neonatal Screen**. v. 7, n. 1, p. 5, 2021. DOI: 10.3390/ijns7010005. Acesso em: 25 fev. 2023.

LEVY, H. L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, n. 5, p. 1811-3, 1999. DOI:10.1073/pnas.96.5.1811. Acesso em: 2 mar. 2023.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300004>. Acesso em: 12 mai. 2023.

MARTINS F.F.; MENDES A.B.; CRUZ W.M. DE S., BOAVENTURA G.T. Metabolismo do cálcio na Fenilcetonúria. **Rev Nutr.** v. 22, n. 3, p. 419-28, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000300012>. Acesso em: 2 mar 2023.

MIRA, N. V. M. DE; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública / Journal of Public Health**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi-bin/fbpe/fbtext?got=last&pid=S0034-89102000000100016&usr=fbpe&lng=pt&seq=0034-8910-019&nrm=iso&sss=1&aut=71981947>. Acesso em: 01 mai. 2023.

MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, v. 75, p. 50-61, 2007. DOI: 10.11606/issn.2316-9036.v0i75p50-61. Acesso em: 12 maio. 2023.

MOCHIZUKI, S. et al. Long-term correction of hyperphenylalaninemia by aav-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. **Gene therapy.** v. 11, n. 13, p. 1081–1086, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302262>. Acesso em: 15 abr. 2023.

MONTEIRO, L. T. B.; CÂNDIDO, L. M. B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos, **Rev Nutr**, v. 19, n. 3, p. 381-387, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000300009>. Acesso em: 9 mer. 2023.

OLIVEIRA, B.; FRANÇA. E. S.; SOUZA, V. G.; VALLINOTO, A. C. R.; SILVA, A. N. M. R. Vetores virais para uso em terapia gênica. **Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua.** v.. 9, p. 57-66, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008>. Acesso em: 12 mai. 2023.

ÓWOOLF, L. I.; Adams, John. **The Early History of PKU.** International journal of neonatal screening vol. 6.3 p.59, 2020. DOI: 10.3390/ijns6030059. Acesso em: 12 abr. 2023.

PEREIRA VIEIRA DE CARVALHO, ANNA CAROLINA. **Construção e caracterização de um vírus Adeno-associado com expressão direcionada para células em divisão**. 2010. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – USP/Instituto Butantã IPT, São Paulo, 2010. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-18062010-125910/publico/AnnaCarolinaPereiraVieiradeCarvalho_Mestrado.pdf.

Acesso em: 8 abr. 2023

POUBEL, M.; HAACK, A. Qualidade de vida em adultos com fenilcetonúria: uma revisão sistemática. 2022. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 22257-22281, 2022. DOI:10.34117/bjdv8n3-428. acessado em: 02 mai. 2023.

ROSA, R. R. P. A.; SILVA, F. C. L.; DA BRANCO, A. C. da S. C. Fenilcetonúria: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 27–47, 2014. DOI: 10.5216/ref.v11i4.31258. Acesso em: 23 abr. 2023.

SCRIVER, C. R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. **Human mutation**. v. 28, n. 9, p. 831–845, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.20526>.

Acesso em: 14 abr. 2023

SUMAILY, K.M.; MUJAMAMMI, A.H. Fenilcetonúria: um novo olhar sobre um tema antigo, avanços no diagnóstico laboratorial e estratégias terapêuticas. **Int J Health Sci (Qassim)**. v. 11, n. 5, p. 63–70, 2017. disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/5669513#impact> . 19 abr. 2023.

VAN SPRONSEN, F. Fenilcetonúria: uma perspectiva do século XXI. **Nat Rev Endocrinol**, vol.6, p.509-514, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.125>.

Acesso em: 22 fev. 2023.

VAN SPRONSEN, F.J.; BLAU, N.; HARDING, C. et al. Fenilcetonúria. **Nat Rev Dis Primers**, v. 7, n. 36, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0>. Acesso em: 22 fev. 2023.

VILLIGER, L., GRISCH-CHAN, H.M., LINDSAY, H. et al. Tratamento de uma doença hepática metabólica por edição de base do genoma in vivo em camundongos adultos.

Nature Medicine, v. 24, n. 10, p. 1519–1525, 2018. DOI: 10.1038/s41591-018-0209-1. Acesso em: 1 mai. 2023

WIEDEMANN, A. et al. La phénylcétonurie - De la diététique à la thérapie génique. **Medecine sciences** v. 36,. n. 8-9, p. 725-734, 2020. DOI: 10.1051/medsci/2020127. Acesso em: 08 mar. 2023

WILLIAMS R.A.; MAMOTTE C.D.; BURNETT J.R.; Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolismo. **Clin Biochem Rev.** v. 29, n. 1, p. 31-41, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423317/>. Acesso em: 8 mar. 2008.

WOO, S.; Lidsky, A.; Güttler, F. et al. O gene clonado da fenilalanina hidroxilase humana permite o diagnóstico pré-natal e a detecção do portador da fenilcetonúria clássica. *Nature.* v. 306, p. 151-155, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1038/306151a0>. Acesso em: 8 mar. 2023.

YAGI, H.; OGURA, T.; MIZUKAMI, H.; URABE, M.; HAMADA, H.; YOSHIKAWA, H.; OZAWA, K.; KUME, A. Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. **The journal of gene medicine.** v. 13, n. 2, p. 114–122, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jgm.1543>. Acesso em: 22 abr. 2023

YIN, S.; MA, L., SHAO, T. et al. Enhanced genome editing to ameliorate a genetic metabolic liver disease through co-delivery of adeno-associated virus receptor. *Science China. Life sciences.* v. 65, n. 4, p. 718–730, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1744-6>. Acesso em: 2 abr. 2023