

# **Evaluación de la relación Genotipo, Fenotipo y respuesta a la Tetrahidrobiopterina en Población Andaluza afecta de Fenilcetonuria**

---

Hospitales Universitarios “Virgen del Rocío”  
Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología

Facultad de Medicina  
Universidad de Sevilla

**M<sup>a</sup> del Amor Bueno Delgado**  
**Sevilla, 2010**

A Javi y a Javier



JUNTA DE ANDALUCÍA

HOSPITALES UNIVERSITARIOS  
Virgen del Rocío  
UNIDAD DOCENTE DE PEDIATRÍA  
Prof. Titular: I. Gómez de Terreros



Departamento de Farmacología,  
Pediatria y Radiología

IGNACIO GÓMEZ DE TERREROS, *PROFESOR TITULAR DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA*, MARIA LUZ COUCE PICO, *PROFESORA ASOCIADA DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y CARMEN DELGADO PECELLÍN DOCTORA DEL LABORATORIO DE METABOLOPATÍAS DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA*

#### CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada: “EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN GENOTIPO, FENOTIPO Y RESPUESTA A LA TETRAHIDROBIOPTERINA EN POBLACIÓN ANDALUZA AFECTA DE FENILCETONURIA”, ha sido elaborada por **Dña. MARÍA DEL AMOR BUENO DELGADO** bajo la dirección de los abajo firmantes. Así mismo, dicha tesis reúne todos los requisitos pertinentes para su presentación y lectura, a fin de optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmamos el presente en Sevilla a dieciocho de Mayo de dos mil diez.

Prof. I. Gómez de Terreros

Profª María Luz Couce Pico

Dra. Carmen Delgado Pecellín



JUNTA DE ANDALUCÍA

HOSPITALES UNIVERSITARIOS  
Virgen del Rocío  
UNIDAD DOCENTE DE PEDIATRÍA  
Prof. Titular: I. Gómez de Terreros



Departamento de Farmacología,  
Pediatria y Radiología

**Dña. MARÍA DEL AMOR BUENO DELGADO** CON D.N.I. 28776689D, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Ser la autora de la presente tesis titulada “EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN GENOTIPO, FENOTIPO Y RESPUESTA A LA TETRAHIDROBIOPTERINA EN POBLACIÓN ANDALUZA AFECTA DE FENILCETONURIA”, dirigida por los Dres. D. Ignacio Gómez de Terreros, Dña. María Luz Couce Pico y Dña. Carmen Delgado Pecellín y presentada para optar al grado de doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmo el presente en Sevilla a dieciocho de Mayo de dos mil diez.

Fdo: Dña María del Amor Bueno Delgado

## AGRADECIMIENTOS

Nunca hubiera podido imaginarme que hoy 25 de Mayo de 2010 estaría reflexionando sobre los agradecimientos de una Tesis Doctoral, y mucho menos que esa tesis fuera la mía. ¡Y es que tengo tanto y a tantos que agradecer! El último año en mi vida ha sido un torbellino, han pasado demasiadas cosas para un mismo año, algunos seres muy queridos se han quedado atrás, pero la gran mayoría, afortunadamente, me han acompañado en todo el camino que he tenido que recorrer, sin los cuales nunca habría sido capaz de finalizar este proyecto. A todos, un millón de gracias.

Pero si realmente hay alguien a quien tengo que agradecer el camino andado hasta llegar al día de hoy es a Manolo, el Dr. Pérez Pérez para sus pacientes, que lo adoraban y lo siguen adorando, pues no pasa un día en el que no me pregunten por él. Y es que de no ser por él no estaría ahora dando los últimos retoques a este trabajo, que realmente no es más que el trabajo de una vida al servicio de los demás, la suya. Aún recuerdo el primer día que llegué a la consulta con la idea de pasar el último año de residencia en la consulta de Metabolopatías y me dijo que quería que hiciera la tesis y que fuera sobre la PKU, ¿pero qué quiere decir?, pensaba una y otra vez, nunca había oído ese término y me eché a temblar, pues no sabía dónde me había metido. Con el tiempo pude apreciar cuán infundados habían sido mis temores ya que en él encontré un maestro que me enseñaba con la rectitud de un padre pero con la ternura de un abuelo, me ha enseñado mucho sobre metabolismo, mucho sobre pediatría, mucho sobre profesionalidad pero sobre todo sobre humanidad hacía los pacientes independientemente de su edad. Por todo esto y mucho más no tengo palabras para decirle lo agradecida que me siento y el cariño tan grande que le profeso. Gracias.

A Reyes, por ser mis manos y mis pies y sobre todo una amiga con la que siempre he podido desahogarme y reírme, una experta en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, y Pepita y Lala y Paqui e Isabel, el equipo completo, siempre han tenido unas palabras de apoyo a lo largo de este año cuando sentía que no iba a poder ganarle el pulso a este proyecto.

Tengo que agradecerle a Ignacio, a M<sup>a</sup> Luz y a Carmen su pronta aceptación de este trabajo con entusiasmo y todas las veces que me han animado y también pedirles

perdón por las miles de correcciones que han tenido que hacer, no creo que nadie pueda tener unos directores de tesis mejores que ellos.

A M<sup>a</sup> Sierra por ser al alma del laboratorio de Metabopatías en nuestro hospital, y sentir y vivir cada paciente como propio, a pesar de no conocerlo en persona en la mayoría de los casos.

No puedo dejar de estar agradecida a la Dra. Lourdes Ruiz Desviat que en todo momento ha estado dispuesta a ayudarme en la valoración de algunas mutaciones de este estudio. Su dedicación así como las de las otras doctoras del CEDEM (M<sup>a</sup> José, Celia, Begoña, Belén, Magdalena...), a la investigación para mejorar la vida de los pacientes es todo un ejemplo a seguir.

A mis compañeros del Hospital Infantil Virgen del Rocío de Sevilla, y como no a mis compañeros de Máster de Enfermedades Raras, por todo lo que he aprendido junto a ellos.

A los pacientes fenilcetonúricos y sus familias, que día a día luchan contra esta enfermedad, y de los que he recibido tantas muestras de apoyo y cariño a nivel profesional y personal.

Finalmente, a mi familia, qué haría yo sin ellos, son mi punto de apoyo, una alfombra mullida para que el camino sea más suave, un hombro sobre el que llorar y reír, las raíces que me sustentan y de las que saco energía, al fin y al cabo mi vida.

Javi, ¿Qué haría yo sin él?, mi marido, mi complemento perfecto. Hemos vivido tantas cosas buenas y no tan buenas, pero aún con estas últimas, no cambiaría bajo ningún concepto nada de esta vida junto a él. Cómo no voy a estarle agradecida si es el único capaz de arrancarme una sonrisa hasta en los momentos más difíciles, de hacerme ver siempre la cara positiva de todas las cosas, si durante todo el tiempo dedicado a este trabajo no ha dejado de apoyarme y animarme cuando el pesimismo podía conmigo, si nunca me ha recriminado las horas de trabajo (salvo cuando consideraba que mi salud, no muy fuerte, estaba en juego) que le he robado a él y a nuestro peque en los últimos meses, por quererme a pesar de todo y estar siempre ahí, y a sus padres por acogerme como una hija, y por supuesto a mi “cuñaita”, sin ella la vida no sería tan divertida.

Y al pequeño Javier, que ya es grande, mi sol, mi vida. No soy capaz de expresar lo que supone en mi vida y cuanto lo quiero.

A mis padres, mi abuelo y mis hermanos, me habéis enseñado a querer incondicionalmente, a hacer mi trabajo bien para servir a los demás, y todo lo que rige mi vida. Sin vosotros no sería lo que soy, os necesito junto a mí.

Por supuesto al tito abuelo Víctor, responsable de mi vocación a la Medicina, y por tanto de todo lo que ha venido después.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>5-HIAA</b> .....	5 hidroxindolacético
<b>5HT</b> .....	5-hidroxitriptófano
<b>AECOM</b> .....	Asociación Española para el estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo
<b>AHV</b> .....	Ácido homovalínico
<b>BH<sub>2</sub></b> .....	Dihidrohdrobiopterina
<b>BH<sub>4</sub></b> .....	(6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
<b>BHE</b> .....	Barrera hematoencefálica
<b>CDRP</b> .....	Cantidad diaria recomendada de proteínas
<b>CI</b> .....	Coficiente intelectual
<b>COMT</b> .....	Catecol-O-metiltransferasa
<b>DGGE</b> .....	<i>“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”</i>
<b>DHPR</b> .....	Dihidropterina reductasa
<b>Dx</b> .....	Diagnóstico
<b>EEG</b> .....	Electroencefalograma
<b>EMH</b> .....	Enfermedades Metabólicas Hereditarias
<b>ESPGAN</b> .....	Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica
<b>FAO</b> .....	Federación para la agricultura y la alimentación
<b>F</b> .....	Femenino
<b>GEMO</b> .....	Gliceril-éter monooxigenasa
<b>GTPCH</b> .....	GTP Ciclohrolasa I
<b>HAR</b> .....	Herencia autosómica recesiva
<b>HFA</b> .....	Hiperfenilalaninemia
<b>HFAB</b> .....	Hiperfenilalaninemia Benigna
<b>H.H.U.U.</b> .....	Hospitales Universitarios
<b>HPLC</b> .....	Fluorimetría mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa
<b>IGF-I</b> .....	Somatomedina C
<b>IVA</b> .....	Acidemia Isovalérica
<b>LNAA</b> .....	Aminoácidos largos neutros
<b>LCR</b> .....	Líquido cefalorraquídeo
<b>M</b> .....	Masculino

<b>MMA</b> .....	Acidemia Metilmalónica
<b>MSUD</b> .....	Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce
<b>NO</b> .....	Óxido nítrico
<b>NOS</b> .....	Óxido Nítrico Sintetasa
<b>NKH</b> .....	Hiperglicinemia no cetósica
<b>nt</b> .....	Neurotransmisores
<b>OMS</b> .....	Organización Mundial de la Salud
<b>Phe</b> .....	Fenilalanina
<b>PA</b> .....	Acidemia Propiónica
<b>PAL</b> .....	Fenilalanina Amonio Liasa
<b>PAH</b> .....	Fenilalanina Hidroxilasa
<b>PCD</b> .....	4 $\alpha$ -carbinolamin-tetrahidropterina deshidratasa
<b>P.L.R</b> .....	Proteína ligadora de retinol
<b>PN</b> .....	Proteínas naturales
<b>PNAVB</b> .....	Proteínas naturales de alto valor biológico
<b>PTPS</b> .....	6-piruvoil-tetrahidropterina sintetasa
<b>PKU</b> .....	Fenilcetonuria
<b>PKUC</b> .....	Fenilcetonuria Clásica
<b>PKUM</b> .....	Fenilcetonuria Moderada
<b>PKUS</b> .....	Fenilcetonuria Suave
<b>RDA</b> .....	<i>“Recommended Dietary Allowances”</i>
<b>RMN</b> .....	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SD</b> .....	Desviación <i>Standard</i>
<b>SNC</b> .....	Sistema nervioso central
<b>SPKUM</b> .....	Síndrome de fenilcetonuria materna
<b>SO</b> .....	Sulfito Oxidasa
<b>T4</b> .....	Tiroxina
<b>Tyr</b> .....	Tirosina
<b>Try</b> .....	Triptófano
<b>TRYH</b> .....	Triptófano Hidroxilasa
<b>TYH</b> .....	Tirosina Hidroxilasa
<b>UE</b> .....	Unión Europea
<b>UMNI</b> .....	Unidad de Metabolopatías y Nutrición Infantil

## **ÍNDICE**

# ÍNDICE

<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	5
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>2.1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS</b> .....	11
<b>2.2. HIPERFENILALANINEMIA POR DÉFICIT DE FENILALANINA HIDROXILASA</b> .....	15
<b>2.2.1. Historia de la fenilcetonuria</b> .....	15
<b>2.2.2. Metabolismo de la fenilalanina y tetrahidrobiopterina</b> .....	16
<b>2.2.3. Estructura, función y regulación de la Fenilalanina Hidroxilasa</b> .....	20
<b>2.2.4. Presentación clínica</b> .....	21
<b>2.2.5. Patogenia</b> .....	22
<b>2.2.6. Genética</b> .....	24
<b>2.2.7. Diagnóstico</b> .....	26
<b>2.2.8. Tratamiento</b> .....	28
2.2.8.1. Monitorización del tratamiento.....	30
2.2.8.2. Complicaciones asociadas a la dieta de restricción proteica.....	31
2.2.8.2.1. <i>Déficits nutricionales</i> .....	31
2.2.8.2.2. <i>Falta de adhesión a la dieta</i> .....	31
2.2.8.2.3. <i>Dieta de por vida</i> .....	32
2.2.8.3. Terapias alternativas.....	32
<b>2.2.9. Pronóstico</b> .....	34
2.2.9.1. Complicaciones neurológicas en adultos.....	35
<b>2.2.10. Fenilcetonuria materna</b> .....	35
2.2.10.1. Manifestaciones clínicas.....	36
2.2.10.2. Mecanismo de acción.....	37
2.2.10.3. Seguimiento.....	37

<b>2.3. HIPERFENILALANINEMIA POR TRASTORNOS DEL METABOLISMO DE LA BIOPTERINA</b> .....	39
<b>2.3.1. Presentación clínica</b> .....	39
<b>2.3.2. Patogenia</b> .....	40
<b>2.3.3. Genética</b> .....	40
<b>2.3.4. Pruebas diagnósticas</b> .....	40
<b>2.3.5. Tratamiento</b> .....	41
<b>2.3.6. Pronóstico</b> .....	43
<b>2.4. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS EN EL NIÑO Y EL ADULTO</b> .....	44
<b>2.4.1. Papel de los aminoácidos en la síntesis de proteínas</b> .....	44
<b>2.4.2. Ingesta de proteínas individual y colectiva</b> .....	45
<b>2.4.3. Cantidad diaria recomendada de proteínas en el adulto</b> .....	46
<b>2.4.4. Requerimientos de aminoácidos en el adulto</b> .....	47
<b>2.4.5. Cantidad diaria recomendada de proteínas en lactantes, niños y adolescentes</b> .....	48
<b>2.4.6. Requerimientos de aminoácidos en el lactante, el niño y el adolescente</b> .....	48
<b>2.4.7. Corrección de la dieta en función de la calidad de la proteína</b> .....	50
<b>2.4.8. Cantidad diaria recomendada de proteínas en mujeres durante el embarazo y la lactancia</b> .....	50
<b>2.4.9. Valoración nutricional a partir de los datos antropométricos y bioquímicos</b> .....	50
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	55
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	59
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	63
<b>5.1. DISEÑO</b> .....	65
<b>5.2. FASES DEL ESTUDIO</b> .....	65
<b>5.3. SUJETOS</b> .....	65

5.3.1. Para la fase observacional descriptiva del estudio del fenotipo y el genotipo de la población con hiperfenilalaninemia andaluza .....	65
5.3.2. Para la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH <sub>4</sub> .....	66
5.3.3. Para la valoración nutricional antes y después de iniciar tratamiento con BH <sub>4</sub> .....	67
5.4. PERÍODO .....	68
5.5. ÁMBITO .....	68
5.6. MÉTODO .....	69
5.6.1. Para el estudio del fenotipo y el genotipo de la población con hiperfenilalaninemia andaluza .....	69
5.6.1.1. Determinación del fenotipo de pacientes con deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa a partir de los niveles de Phe al diagnóstico. ....	69
5.6.1.2. Determinación del fenotipo de pacientes con deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa a partir de los niveles de tolerancia de Phe en la dieta.....	69
5.6.1.3. Estudios bioquímicos para la determinación del fenotipo .....	70
5.6.1.4. Estudios moleculares para la determinación del genotipo.....	70
5.6.2. Para la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH <sub>4</sub> .....	71
5.6.2.1. Test de sensibilidad a BH <sub>4</sub> .....	71
5.6.3. Para la valoración nutricional antes y después de iniciar tratamiento con BH <sub>4</sub> .....	72
5.7. VARIABLES DE ESTUDIO .....	72
5.7.1. Del fenotipo y el genotipo de la población con hiperfenilalaninemia andaluza. ....	72
5.7.2. De la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH <sub>4</sub> .....	72
5.7.3. De la valoración nutricional pre y post-tratamiento con BH <sub>4</sub> .....	74
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	74
5.9. LIMITACIONES .....	76
6. RESULTADOS .....	77
6.1. DATOS DESCRIPTIVOS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA .....	79

<b>6.2. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DEL FENOTIPO DE LA POBLACIÓN ANDALUZA CON HIPERFENILALANINEMIA.</b> .....	83
<b>6.2.1. Cifras de fenilalanina al diagnóstico en mg/dL.</b> .....	83
<b>6.2.2. Tolerancia de fenilalanina en la dieta.</b> .....	83
<b>6.2.3. Correlación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con la tolerancia de fenilalanina en la dieta en pacientes con déficit de Fenilalanina Hidroxilasa</b> .....	86
<b>6.3. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DEL GENOTIPO DE LA POBLACIÓN ANDALUZA CON HIPERFENILALANINEMIA.</b> .....	89
<b>6.4. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL TEST DE SENSIBILIDAD A BH<sub>4</sub>.</b> .....	99
<b>6.4.1. Datos descriptivos de la población a la que se le ha realizado el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub></b> .....	99
<b>6.4.2. Resultados de la relación de las cifras de fenilalanina al diagnóstico con el resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.</b> .....	103
<b>6.4.3. Resultados de la relación del genotipo con los resultados del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.</b> .....	105
<b>6.4.4. Resultados del estudio de las cifras de fenilalanina al diagnóstico comparadas con las cifras de fenilalanina tras la ingesta de BH<sub>4</sub>.</b> .....	113
<b>6.4.5. Resultados del estudio de la ingesta de proteínas naturales pre-tratamiento con BH<sub>4</sub> y durante el mismo.</b> .....	114
<b>6.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO PARA VALORAR EL PERFIL NUTRICIONAL ANTERIOR Y POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE BH<sub>4</sub> EN LOS PACIENTES CON HFA Y RESPUESTA POSITIVA AL NUEVO TEST DE SENSIBILIDAD A BH<sub>4</sub>.</b> .....	116
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	125
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	153
<b>9. RESUMEN</b> .....	159
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	163
<b>11. ANEXO</b> .....	179

# **1. JUSTIFICACIÓN**

## 1 JUSTIFICACIÓN

La Fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica, autosómica recesiva, debida a una alteración en la hidroxilación del aminoácido Fenilalanina (Phe) a Tirosina (Tyr), catalizada por la fenilalanina hidroxilasa (PAH), requiriendo tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cofactor<sup>1</sup>.

El programa de *screening* neonatal implantado universalmente en España en 1980 tiene como objetivo conseguir el diagnóstico y tratamiento precoz de la enfermedad y proveer de información a la familia sobre la epidemiología, la patología, el diagnóstico y el tratamiento de la PKU.

La evolución natural de la enfermedad en los pacientes no tratados produce generalmente retraso mental y trastornos conductuales severos. Sin embargo, la PKU es uno de los pocos trastornos genéticos en los que el tratamiento precoz puede prevenir el daño neurológico<sup>2</sup>.

No obstante, a pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos en esta entidad, en los últimos años se han objetivado en estos pacientes interferencias en su calidad de vida de índole psicosocial, planteándose la hipótesis de que pudieran estar derivadas del hecho de vivir con una patología crónica y una dieta restringida en alimentos de uso habitual en el resto de la población<sup>3</sup>.

Los recientes avances en relación a la repuesta terapéutica con BH<sub>4</sub> y su repercusión en la restricción dietética, nos ha conducido a profundizar en la correlación del genotipo, fenotipo y respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub> en nuestra área de referencia, compuesta por los pacientes con PKU de la Comunidad andaluza, así como a aplicar y evaluar la nueva prueba diseñada por el Dr. Pérez Pérez, impulsor y responsable de la Unidad de Enfermedades Metabólicas y Nutrición Infantil hasta su jubilación, que nos permita seleccionar a pacientes PKU susceptibles de ser tratados con BH<sub>4</sub>, de fácil aplicación y sin requerimiento de ingreso hospitalario.

Ofrecer nuevas aportaciones a la atención integral de nuestros enfermos PKU, de los que en la actualidad estoy responsabilizada, me induce a llevar a cabo el presente trabajo de investigación, tanto desde la perspectiva de facilitar nuestras decisiones

terapéuticas, como en el de la mejora, no menos importante, conducente a potenciar el bienestar y calidad de vida de los afectados.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS

El conocimiento de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias (EMH) data históricamente de hace más de un siglo. En concreto, el estudio generalizado de las EMH fue iniciado por A. Garrod en 1908 al observar que los pacientes con Alcaptonuria excretaban una gran cantidad de ácido homogentísico en orina<sup>4</sup>. Garrod llegó a la conclusión de que esta acumulación se debía a una alteración en una enzima del metabolismo de la Tyr y que la herencia de esta enfermedad se podía explicar según las leyes de Mendel. Así mismo, definió que determinadas enfermedades se producen por el fallo o ausencia de una enzima que cataliza un paso específico de una ruta metabólica<sup>5</sup>.

El metabolismo es el conjunto regulado y coordinado de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo vivo. Dichas reacciones son catalizadas por unas proteínas denominadas enzimas. Estas enzimas pueden actuar a nivel del metabolismo general o de un ciclo particular; como un receptor celular, un transportador de membrana o como parte de una organela celular.

Las alteraciones congénitas o adquiridas de las enzimas implicadas en dichas reacciones se denominan enfermedades metabólicas.

Si éstas se han transmitido por herencia de la dotación genética de los progenitores hablamos de Enfermedad Metabólica Hereditaria (EMH). La herencia de las EMH suele ser monogénica y más frecuentemente autosómica recesiva<sup>6</sup>.

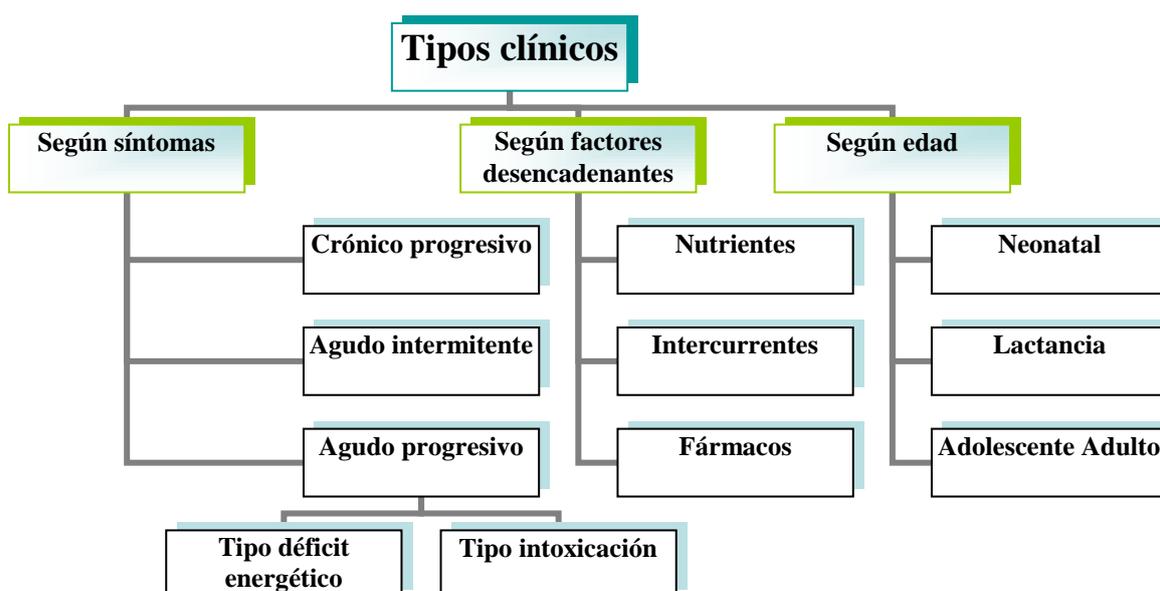
La mayor parte de ellas tienen una incidencia individual baja, por lo que son consideradas enfermedades raras. La Unión Europea (UE) define como enfermedad rara aquella que tiene una prevalencia de menos de 5 casos por 10.000 habitantes, lo que equivale a un 6-8% de la población europea. Esto se traduce en una estimación de 29 millones de afectados en la UE-27 y de 3 millones en España<sup>7</sup>.

Las EMH de forma individual pertenecen al grupo de Enfermedades Raras pero al ser muy numerosas en conjunto (se han descrito más de 700 EMH diferentes) afectan a un número elevado de individuos<sup>8</sup>.

El origen de una EMH se halla en alteraciones del material genético (DNA), que se expresa como un daño del producto génico específico (proteína) y que se traduce en un cambio fenotípico. Éste puede ser debido a una pérdida o ganancia de funciones de la proteína, alterando la homeostasis fisiológica e induciendo como consecuencia las manifestaciones clínicas (enfermedad).

Las diferencias entre los distintos fenotipos vienen determinadas por el grado de afectación del gen y el tipo y función de la proteína alterada, ya que según actúe surgirán distintos grupos de enfermedades con gran variabilidad clínica lo que conduce a otra de las principales características de las EMH: la diversidad. Esta gran diversidad clínica de las EMH dificulta considerablemente su clasificación.

En el siguiente esquema se muestra una clasificación de las EMH desde distintas perspectivas (Figura 1)<sup>8</sup>.



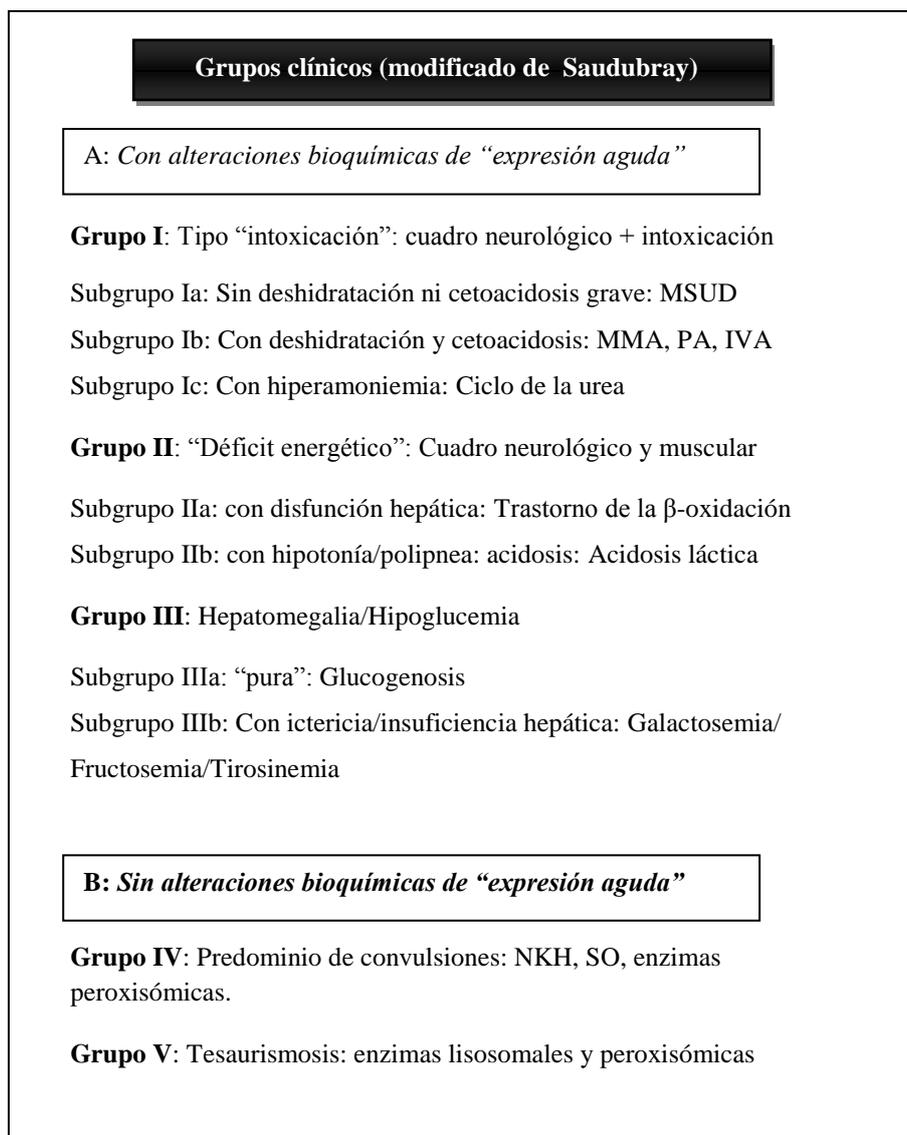
**Figura 1.-** Clasificación de EMH por Sanjurjo et al.

Otra clasificación, es la que realizó el Dr. Saudubray, de EMH de “expresión aguda” en el período neonatal, siendo muy utilizada en el momento actual (Figura 2).

Por tanto la gran diversidad de las EMH y su escasa prevalencia individual constituyen sus dos principales características y determinan que tanto el diagnóstico de

sospecha, el análisis bioquímico-molecular para la confirmación diagnóstica y el tratamiento sean complejos.

Fisiopatológicamente las alteraciones que se producen dependen del exceso o cúmulo de una sustancia del metabolismo intermediario y/o de la ausencia del producto que deja de sintetizarse por la alteración enzimática. En el primer caso las manifestaciones clínicas dependerán de la potencial toxicidad del producto acumulado y en el segundo del grado de esencialidad del mismo.



**Figura 2.-** Clasificación de las EMH en el periodo neonatal.

La capacidad para reconocer y diagnosticar EMH se ha incrementado enormemente debido al desarrollo de la tecnología analítica, el conocimiento bioquímico en general, el desarrollo de la biología celular y un mayor conocimiento del genoma humano. A ello hay que sumar el desarrollo de la prueba de Cribado Endocrino-Metabólico Neonatal o Prueba del Talón, que permite la detección en período asintomático por marcadores analíticos elevados de algunas patologías entre ellas la PKU.

Al igual que la capacidad para reconocer y diagnosticar las EMH, las alternativas terapéuticas de estas enfermedades también han aumentado en los últimos años pudiendo ofrecer al paciente nuevas opciones, entre las que se incluyen el perfeccionamiento de las dietas, el uso de cofactores, tratamientos enzimáticos sustitutivos...

## **2.2. HIPERFENILALANINEMIA POR DÉFICIT DE FENILALANINA HIDROXILASA**

### **2.2.1. HISTORIA DE LA FENILCETONURIA**

La PKU fue descrita por primera vez en 1934, por Asbjörn Fölling, profesor de Investigaciones Nutricionales de la Escuela de Medicina de la Universidad de Oslo en Noruega, al estudiar a dos hermanos con retraso mental, alteraciones cutáneas, olor corporal especial y excreción muy elevada de ácido fenilpirúvico en la orina. Denominó a esta enfermedad “*Imbecillitas phenylpirúvica*”<sup>9</sup>. Él mismo observó su herencia autosómica recesiva (HAR) e identificó la Phe como precursor del ácido fenilpirúvico y marcador bioquímico de la enfermedad.

Pero no fue hasta 1937 cuando se denominó a este trastorno PKU, nombre que se ha mantenido hasta el momento actual<sup>9</sup>.

Una década más tarde, Jervis observó que si daba Phe a individuos sanos aumentaba la Tyr, pero esto no ocurría si se la daba a pacientes fenilcetonúricos, llegando a la conclusión de que la PKU se debía a un fallo en la transformación de Phe a Tyr<sup>10</sup>. Sin embargo hasta 1953, año en el que Bickel publica la efectividad de una dieta restringida en Phe como terapia para los fenilcetonúricos, no se produce ningún avance en el tratamiento de la PKU<sup>11</sup>.

En 1963 Guthrie y Susie desarrollaron un método que permitía la determinación de Phe con muestras de sangre seca del talón del recién nacido<sup>12</sup>. Éste fue denominado test de inhibición bacteriana de Guthrie y supuso un hito en la historia de la PKU, ya que al diagnosticarse en el periodo neonatal, permitió iniciar el tratamiento precozmente, previniendo el retraso mental<sup>13</sup>.

Las primeras mutaciones de la hiperfenilalaninemia (HFA) se identificaron en los años 80 tras localizar Woo en 1983, por primera vez, el gen *PAH* responsable en el cromosoma 12q24.1<sup>14</sup>.

En los últimos años se han iniciado ensayos de expresión *in vitro* de numerosos alelos de HFA, visualizándose varios dominios de la PAH, y actualmente se están realizando los primeros estudios sobre terapia génica.

### **2.2.2. METABOLISMO DE LA FENILALANINA Y TETRAHIDROBIOPTERINA**

La Phe es un aminoácido aromático esencial (no puede ser sintetizado en el organismo humano) que compone aproximadamente el 5% de las proteínas de origen natural, se absorbe a nivel intestinal de forma competitiva con otros aminoácidos neutros<sup>15</sup> y es metabolizado en el hígado por el sistema de la PAH.

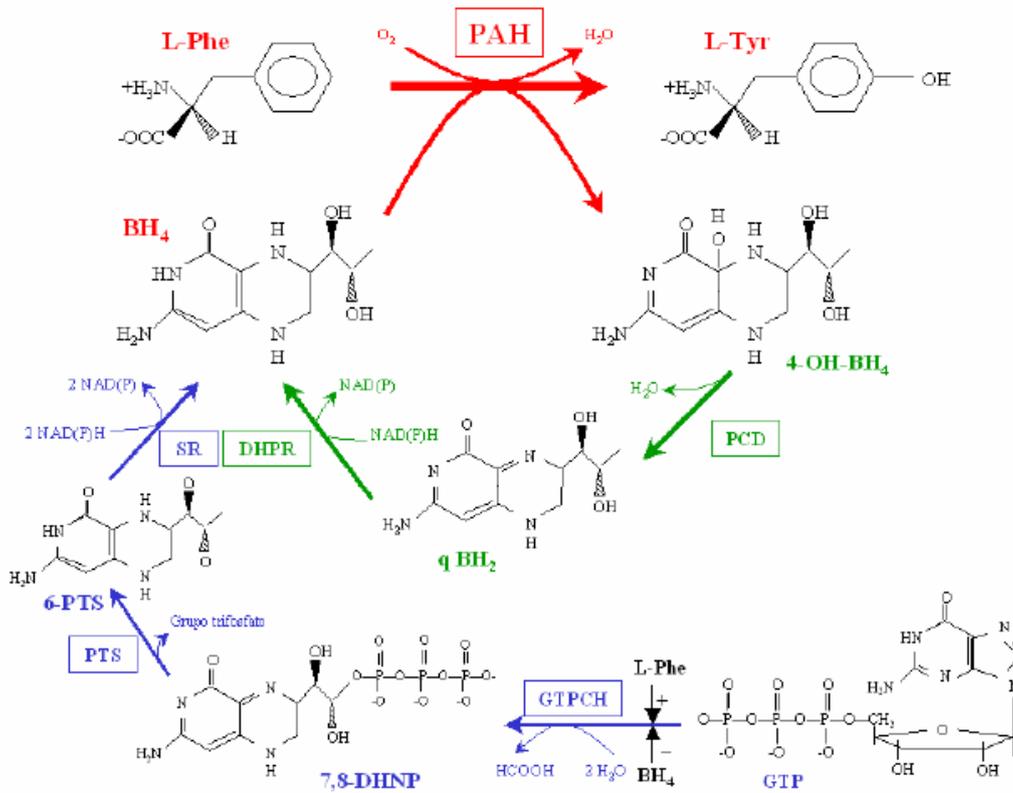
El primer paso en el catabolismo irreversible de la Phe es su hidroxilación a Tyr por la enzima PAH, una monooxigenasa, que utiliza como cofactor a la (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y oxígeno molecular como cosustrato.

La PAH para su funcionamiento requiere una adecuada concentración de BH<sub>4</sub> por lo que su actividad depende de dos enzimas que regeneran el cofactor a partir de su forma reducida, la 4 $\alpha$ -carbinolamin-tetrahidropterina deshidratasa (PCD) y la dihidropterina reductasa (DHPR), así como de la actividad de las distintas enzimas que componen la ruta de biosíntesis intracelular de BH<sub>4</sub> (Figura 3)<sup>16</sup>.

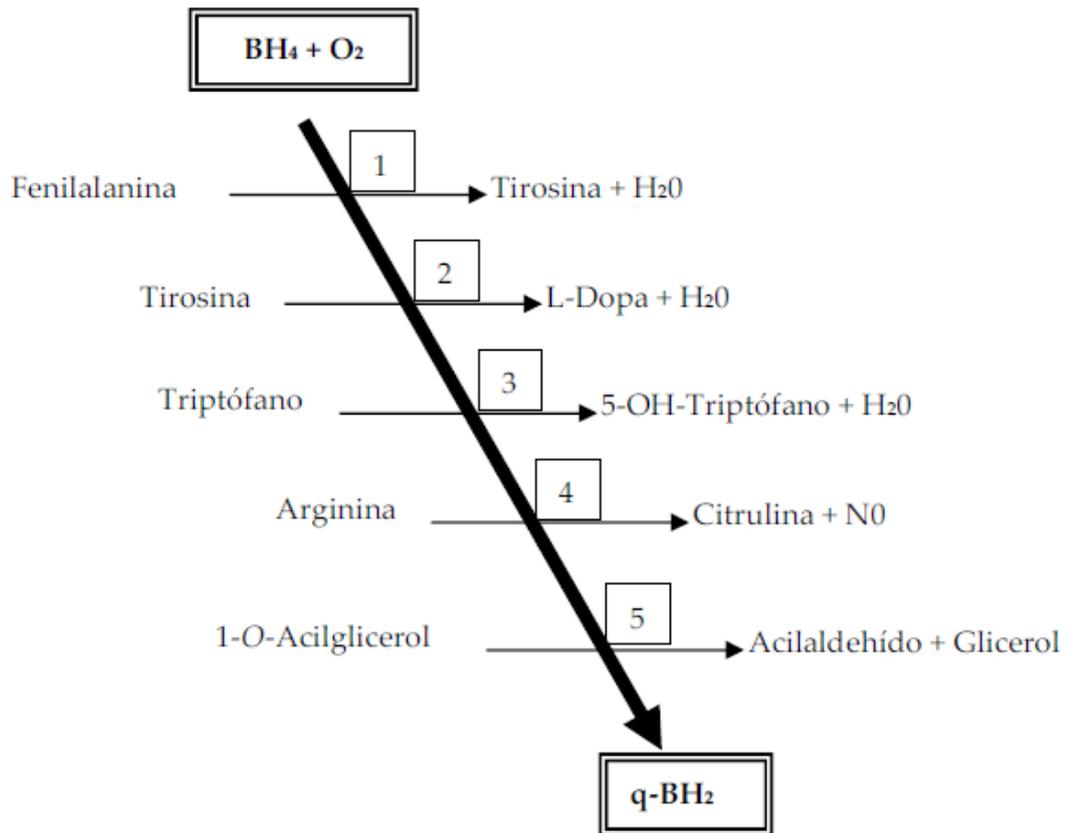
BH<sub>4</sub> está implicada en varias reacciones enzimáticas (Figura 4) y en algunas funciones menos conocidas a nivel celular. Las enzimas conocidas que dependen de BH<sub>4</sub> son PAH, Tirosina Hidroxilasa (TYH), Triptófano Hidroxilasa (TRYH) 1 y 2, los 3 tipos de óxido nítrico sintetasa (NOS) y gliceril-éter monooxigenasa (GEMO).

A nivel celular se ha identificado BH<sub>4</sub> como factor de crecimiento en *Crithidia fasciculata* y con función de factor de control de infectividad en *Leishmania major*. En el sistema nervioso central BH<sub>4</sub> es un factor de autoprotección para óxido nítrico (NO) o neuroprotector general para NOS y tiene función liberadora de dopamina<sup>17</sup>.

Alteraciones de la PAH o defectos en la producción o reciclaje de BH<sub>4</sub> provocarán un aumento de Phe en sangre, denominado HFA, y déficit de Tyr, L-Dopa, dopamina, catecolaminas, melanina y 5-hidroxitriptófano (5HT).

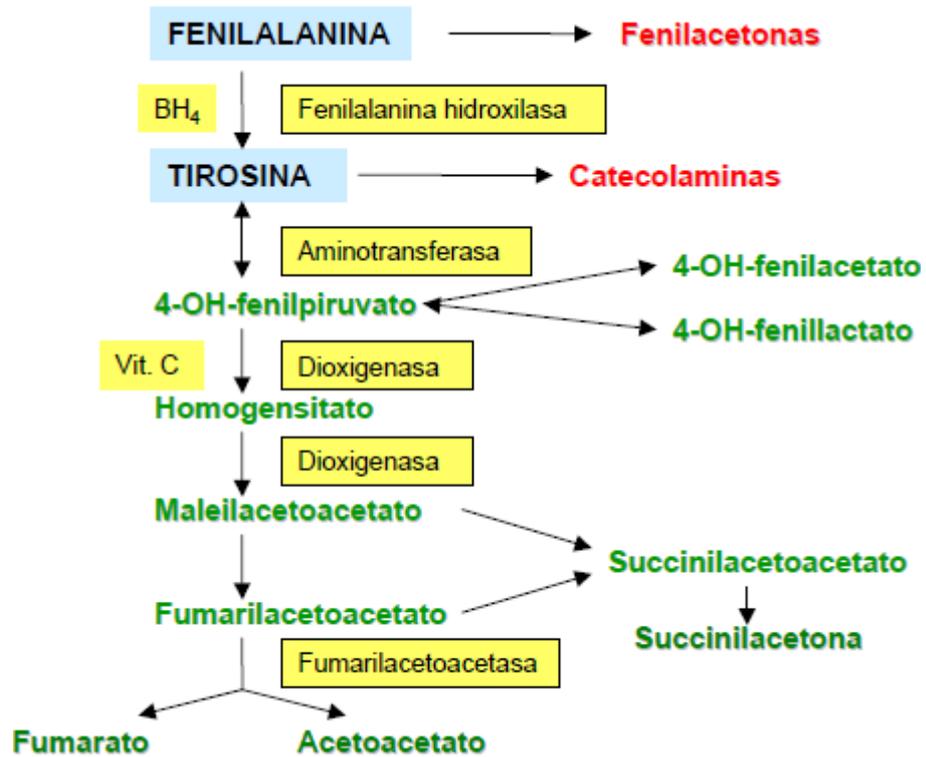


**Figura 3.-** Sistema de hidroxilación de la Phe. El ciclo catalítico de la PAH en presencia de su cofactor natural BH<sub>4</sub> se expresa en rojo, las rutas principales de biosíntesis de BH<sub>4</sub> en azul, y las de reducción del cofactor oxidado en verde. Las enzimas implicadas se muestran en recuadros. Se indica activación (+) ejercida por la L-Phe y la inhibición (-) ejercida por la BH<sub>4</sub> sobre la etapa limitante en la biosíntesis del cofactor.



**Figura 4.-** Reacciones enzimáticas mediadas por  $\text{BH}_4$ : 1) PAH; 2) TYH; 3) TRYH; 4) NOS; 5) Gliceril-eter-monooxigenasa.  $\text{q-BH}_2$ : quinonoil dihidrobiopterina.

La Phe acumulada, al estar interrumpida su hidroxilación a Tyr, activa otras rutas metabólicas que producen unos metabolitos indetectables habitualmente<sup>16</sup>. Sufre una transaminación produciéndose ácido fenilpirúvico, una cetona que se excreta en la orina, detectada por Fölling y responsable del nombre de Fenilcetonuria o PKU con el que internacionalmente se conoce a este trastorno del metabolismo<sup>18</sup>.



**Figura 5.-** Metabolismo de la Fenilalanina y la Tirosina.

El excedente de Phe, tras la transaminación será reducido y decarboxilado, produciéndose ácidos feniláctico y fenilpirúvico respectivamente (Figura 5)<sup>19,20</sup>. La Tyr pasa a ser un aminoácido esencial y queda limitada la síntesis de otras aminas biógenas incluyendo la melanina, la dopamina y la norepinefrina.

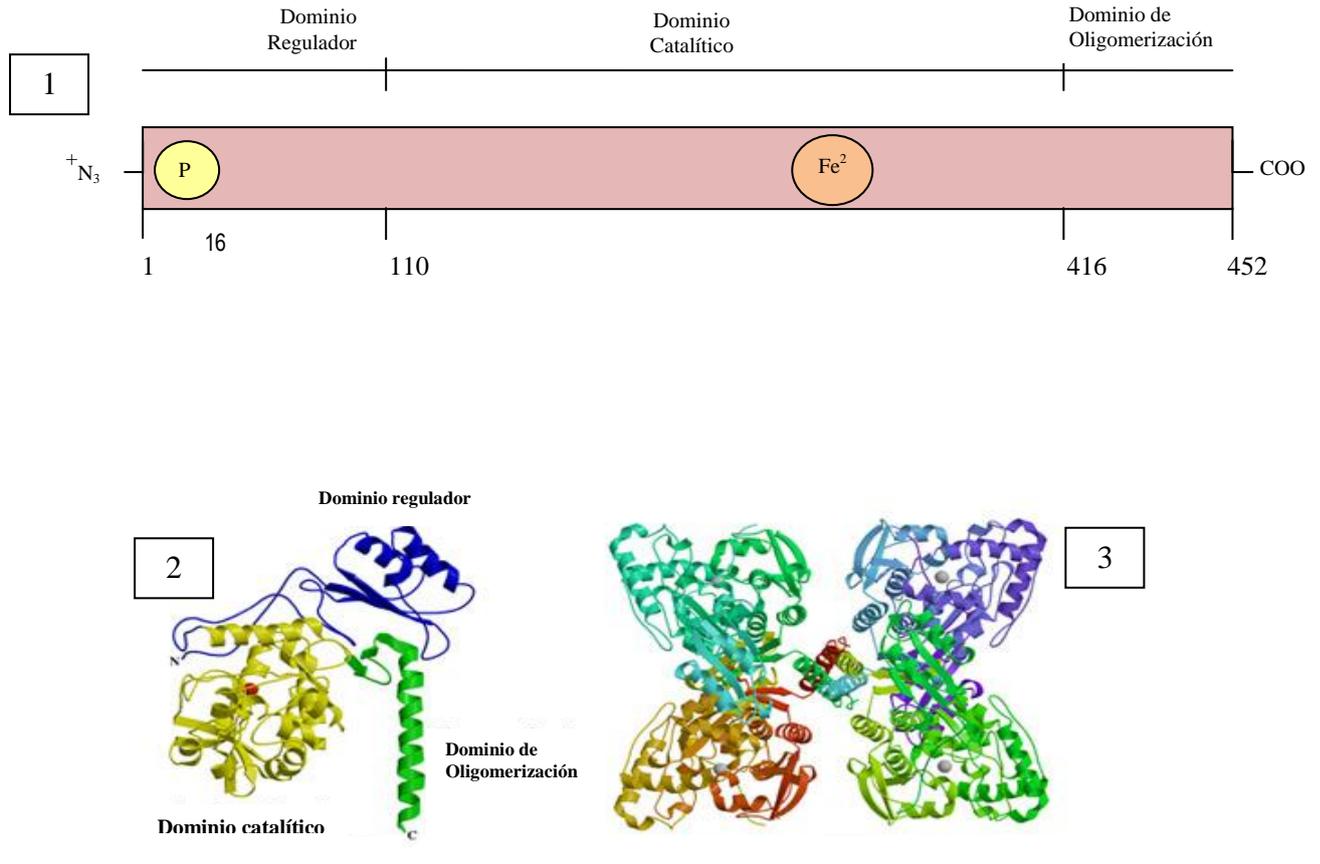
Por otro lado el aumento de la Phe en sangre, se traduce en un desbalance de aminoácidos largos neutros (LNAA) con el subsiguiente descenso de los niveles de Tyr y serotonina a nivel cerebral. El índice Phe sangre/Phe cerebral es aproximadamente 4:1<sup>21</sup>.

### 2.2.3. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA PAH

La enzima PAH forma parte de la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, que utilizan  $\text{BH}_4$  como cofactor y que requieren un átomo de hierro en su estructura para ser funcionales. Debido a que la PAH humana es difícil de estudiar por su rápida degradación post-mortem, la mayoría de los estudios de estructura y función se han realizado en PAH purificada de hígado de rata, con la que guarda una similitud del 92%<sup>22</sup>. En humanos se expresa fundamentalmente en el hígado, aunque algunos estudios indican que también se expresa minoritariamente en el riñón<sup>23</sup> y en los melanocitos<sup>24</sup>.

Distintos estudios han demostrado la existencia de tres dominios funcionales en la proteína (Figura 6)<sup>16,25,26,27</sup>:

- 1) **Dominio regulador** (residuos 1 - 110 desde el extremo amino-terminal): dada la importancia fisiológica del sistema de hidroxilación de la Phe, la enzima está fuertemente regulada y tiene como activador alostérico los niveles de Phe y como inhibidor los niveles de  $\text{BH}_4$ , dependiendo además de la fosforilación-defosforilación del residuo Ser16.
- 2) **Dominio catalítico** (residuos 111 - 410): en él se halla el centro activo de la enzima, con el átomo de hierro y los sitios de unión del sustrato y el cofactor.
- 3) **Dominio de oligomerización** (residuos 411 - 452): para su actividad, la enzima debe ensamblarse en forma de dímero y sobre todo en forma de tetrámero, que tiene una actividad cinco veces superior. La formación de estos tetrámeros se ve favorecida en presencia de  $\text{BH}_4$ .



**Figura 6.-** Organización estructural de la proteína PAH. 1) Estructura primaria de la proteína PAH, donde se localizan los dominios funcionales, el átomo de hierro y el sitio de fosforilación. (Erlandsen y Stevens, 1999), 2) Modelo tridimensional propuesto para la PAH en forma monomérica (Konecki y Lichter-Konecki, 2001) y 3) Modelo tridimensional propuesto para la forma tetramérica de la PAH (Scriver y Kaufman, 2001).

#### 2.2.4. CLÍNICA

La historia natural de esta enfermedad es la aparición de daño neurológico progresivo e irreversible en los individuos afectados, durante la infancia y la adolescencia<sup>28</sup>. Los pacientes desarrollan en un alto porcentaje de casos retraso mental severo, trastornos del comportamiento y lesiones psíquicas y neurológicas<sup>29,30,31,32</sup>.

La característica clínica común más frecuente es el retraso mental severo (Coeficiente intelectual (CI) <50), a menudo asociado a olor a ratón (debido a la excreción de ácido fenilacético), eccema (20-40%), piel, cabello y ojos claros (por estar disminuida la síntesis de melanina), crecimiento retardado, microcefalia y alteraciones

neurológicas (25% epilepsia, 30% temblor, 5% espasticidad, 80% anomalías en el electroencefalograma (EEG))<sup>2</sup>.

El cerebro de los pacientes con PKU no tratados desde la infancia presenta disminución de la arborización de las dendritas, daño de la sinaptogénesis y alteraciones de la mielinización. También pueden presentar hipertonía, hiperreflexia, parkinsonismo, anormalidades de la marcha y tics<sup>16,33</sup>.

Casi todos los pacientes que no han recibido tratamiento de forma precoz presentan trastornos del comportamiento como hiperactividad, movimientos anormales, temblor, estereotipias, agresividad, automutilaciones, ansiedad y mala adaptación social<sup>2,27-29</sup>.

El daño producido por la HFA no se manifiesta de forma aguda, sino que es necesario un cúmulo prolongado para que se observen alteraciones neurológicas. Este es el motivo por el que los pacientes con PKU son clínicamente normales hasta el final de la lactancia, momento en el que se suele empezar a apreciar su retraso psicomotor<sup>34</sup>. Asimismo, en pacientes que abandonan el tratamiento, no se producen descompensaciones agudas y los síntomas neurológicos no se expresan hasta meses o años después<sup>35,36,37,38</sup>.

El fenotipo clínico se correlaciona directamente con los niveles de Phe en sangre reflejando el grado de déficit de PAH.

### 2.2.5. PATOGENIA

Se plantean varias hipótesis como responsables de las graves afectaciones neuropsicológicas que presentan los pacientes con PKU no tratada:

- Toxicidad de la elevada concentración de Phe en sangre: Defendida por Rezvani I que sostiene que es la hiperfenilalaninemia la responsable de las lesiones orgánicas de la PKU, siendo el cerebro el órgano más afectado<sup>18</sup>.
- La alta concentración de Phe, al compartir sistema de transporte con otros aminoácidos neutros, dificulta el paso de los mismos a través de las membranas celulares y de la barrera hematoencefálica (BHE). Esto provoca una serie de desequilibrios plasmáticos e intracelulares que llevan a la formación de

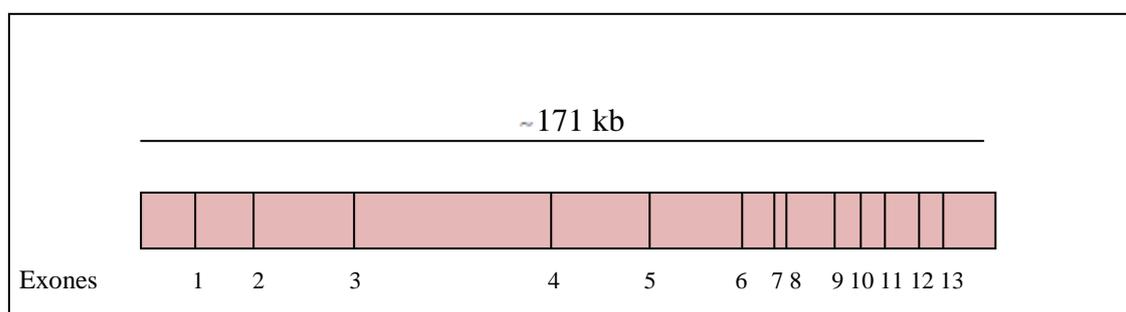
proteínas anómalas, que ocasionarían la disminución de la proliferación dendrítica y la mielinización defectuosa<sup>39,40</sup>.

- La deficiencia cerebral de Tyr, que pasa a ser un aminoácido esencial por estar interferida su síntesis en la PKU, podría ser responsable de muchas de las complicaciones neurológicas. Se han observado grandes fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de Tyr a lo largo del día en pacientes PKU tratados con dieta de restricción de Phe y con suplemento de Tyr, llegando a ser indetectable tras un largo período de ayuno<sup>41</sup>. El transporte a través de la BHE, tanto de Tyr como de Try, está alterado por la HFA. El defecto relativo de estos AA se traduce en una reducción de la síntesis de serotonina, dopamina y norepinefrina debida tanto a la disminución intraneuronal de sustratos, como a la inhibición competitiva de la hidroxilación de la Tyr y el Try, que también comparten cofactor (BH<sub>4</sub>). Se ha visto que en pacientes PKU la síntesis de dopamina está muy descendida en áreas prefrontales, lo que justificaría el temblor y parkinsonismo, entre otras complicaciones, que presentan los fenilcetonúricos<sup>42</sup>.
- La neurotoxicidad de los metabolitos de la Phe ha sido propuesta por Kaufman en contraposición a la hipótesis de Rezvani I, indicando que el componente más tóxico parece ser el ácido fenilacético<sup>43</sup>.
- Sierra et al. plantean la hipótesis de un posible defecto de actividad del sistema de defensa antioxidante<sup>44</sup> y el déficit de ubiquinona-10 en los pacientes PKU con dieta restringida en Phe, como factores responsables del daño neuronal en estos pacientes<sup>45</sup>. El déficit de Tyr, precursor de la ubiquinona-10, así como el bloqueo de las enzimas implicadas en su síntesis por el exceso de Phe en sangre, podrían tener un papel importante.

Con todos estos datos podemos concluir que está claro que de una manera u otra el aumento de la Phe y las consecuencias que de esto se derivan tienen un papel determinante en la fisiopatología de este trastorno metabólico y que a pesar de haber progresado mucho en el estudio de la génesis del daño cerebral aún queda por dilucidar el mecanismo exacto por el que se produce el daño neuronal.

## 2.2.6. GENÉTICA

El déficit de PAH es un trastorno transmitido con una herencia mendeliana autosómica recesiva. El gen *PAH* se localiza en humanos en la región q22-q24.1 del cromosoma 12. Tiene una longitud total de 171 kb y contiene 13 exones<sup>16,27</sup> (Figura 7). Su transcripción está regulada por múltiples factores como los glucocorticoides, el AMPc, hormonas y el HNF-1 mediante secuencias específicas presentes en la región del promotor<sup>16,46</sup>.



**Figura 7.-** Organización estructural del gen *PAH* (Pey, 2004)

En el momento actual se han identificado a nivel mundial más de 532 mutaciones distintas, asociadas a PKU, aunque siguen detectándose continuamente nuevas variantes alélicas. Un 63% son mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (*missense*), un 13% son de las de tipo unión intrón-exón (*splice*), sin sentido o stop (*nonsense*) y silentes, así como deleciones o inserciones (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

El mecanismo más frecuente por el que las mutaciones del gen *PAH* ejercen sus efectos patogénicos es la inestabilidad conformacional de la proteína, lo que le confiere menor solubilidad, menor estabilidad térmica y mayor predisposición a la degradación proteolítica.

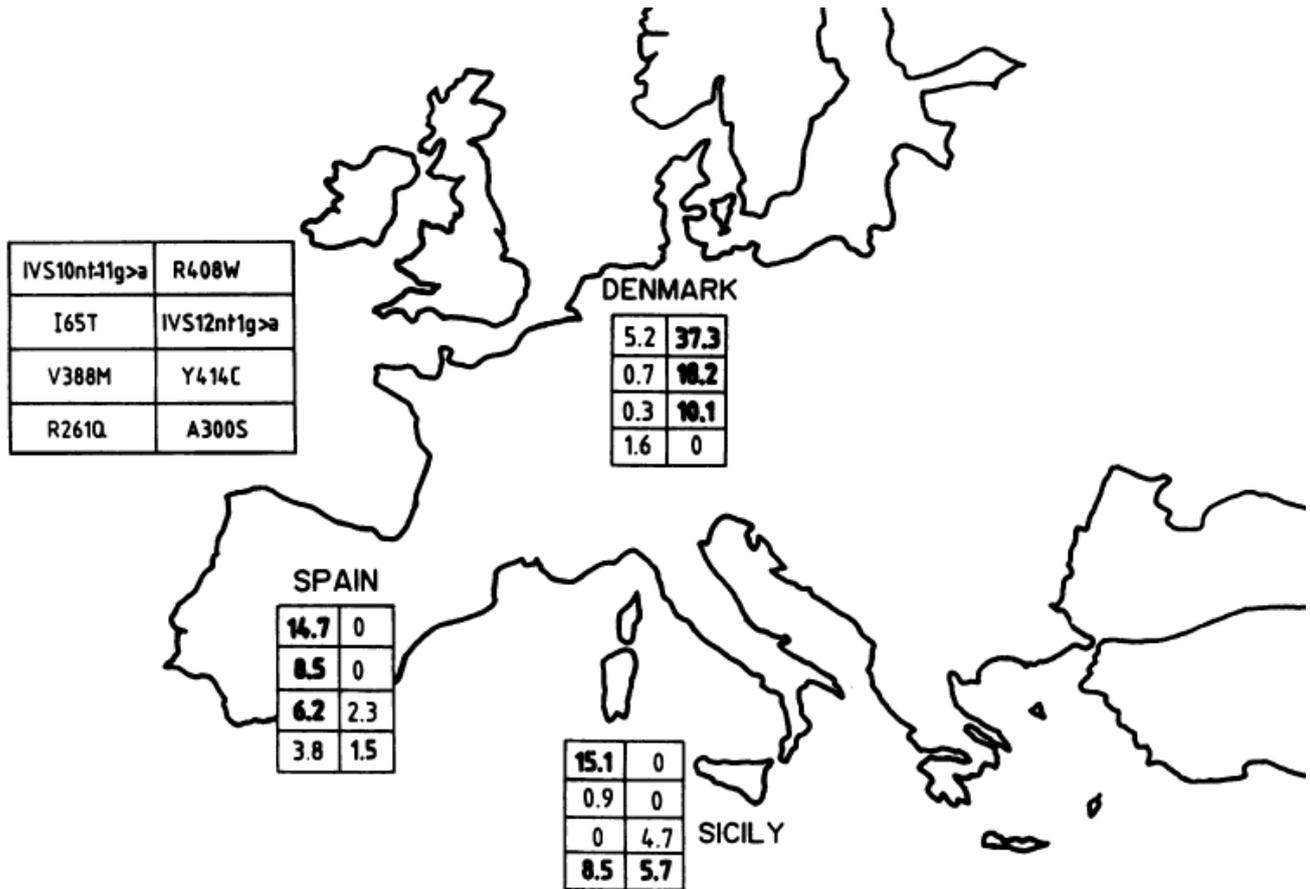
Los estudios de expresión *in vitro*, con frecuencia, permiten correlacionar el defecto funcional de las mutaciones con el fenotipo de los pacientes<sup>47</sup>. Las mutaciones que confieren una actividad residual alta *in vitro* suelen estar asociadas a fenotipos suaves. La presencia en homocigosis de mutaciones con actividad residual *in vitro* nula o muy reducida se correlaciona con los fenotipos más graves de la enfermedad. Sin embargo,

existen mutaciones en las que no coincide la actividad residual observada *in vitro* con el fenotipo del paciente. Por otro lado también hay que tener en cuenta, que la mayoría de los pacientes son heterocigotos para distintas mutaciones, y que el fenotipo clínico y bioquímico final depende de la interacción entre las proteínas resultantes de ambos alelos. Otro dato a tener en cuenta es que se han descrito casos de pacientes, incluso hermanos, con un mismo genotipo pero diferentes fenotipos clínicos<sup>48,49</sup>. Esta inconsistencia genotipo-fenotipo ha impedido, hasta ahora, predecir con total fiabilidad la gravedad del fenotipo en los pacientes PKU a partir del genotipo<sup>50,51</sup> y de ahí el hecho de que la utilidad clínica del genotipo sea limitada<sup>52,53</sup>.

Aunque no existe una única mutación con mayor prevalencia es cierto que si existen distintas prevalencias según el grupo étnico. Por ejemplo la mutación R408W está presente en un 30% de los alelos en Europa mientras que en los orientales la más frecuente es la R243Q contando con un 13% de los alelos.

En un estudio del genotipo de la población española con déficit de PAH<sup>54</sup> realizado en 1997 por Pérez et al, se observó una marcada diferencia en el espectro de mutaciones con el Norte y el Sur de Europa. Concluyeron, en cuanto a la distribución de los genotipos, que si bien con el Norte las diferencias son mucho mayores, también existen diferencias considerables con otras poblaciones de la cuenca Mediterránea, por ejemplo en Sicilia donde la mutación más prevalente es la misma que en España, pero las siguientes en frecuencia en España, son prácticamente inexistentes en esta región italiana (Figura 8).

La prevalencia del déficit de PAH también varía entre diferentes poblaciones, por ejemplo 1/1000000 en Finlandia contra el 1/4200 en Turquía. En España la prevalencia está estimada en 1/12000 aproximadamente, serían portadores por tanto 1/55.



**Figura 8.-** Mapa de la frecuencia relativa de distribución de 8 mutaciones PKU en España (Pérez et al. 1997), Dinamarca (Guldberg et al. 1993a), y Sicilia (Guldberg et al. 1993b). Las 3 mutaciones más frecuentes de cada población fueron escogidas por comparación.

### 2.2.7. DIAGNÓSTICO

Los niveles de Phe en sangre son normales al nacer pero aumentan rápidamente desde los primeros días de vida. En la mayoría de los países occidentales la HFA se detecta mediante *screening* neonatal.

No existe un consenso universal sobre la edad en la que debe ser extraída la muestra (1-10 días de vida), la metodología a emplear (test de inhibición microbiológica de Guthrie, técnicas enzimáticas, HPLC o espectrometría de masas en tándem) y el nivel de Phe en sangre a partir del cual se considera positivo el resultado y sería necesario ampliar el estudio. Parece que es más idóneo realizar la determinación el tercer día de vida tras 48 horas de toma de alimento y considerar patológico un valor de Phe  $\geq 2,5$  mg/dL (150  $\mu\text{mol/L}$ ), y en el caso de utilizarlo, un coeficiente Phe/Tyr  $>3^{16}$ .

El déficit de cofactor debe ser excluido mediante el estudio de pterinas en sangre y orina y DHPR en sangre.

Un incremento persistente de Phe podemos hallarlo también en prematuros, recién nacidos con alimentación parenteral, o con afectación hepática (en estos también estarán aumentadas las cifras de metionina, Tyr, leucina/isoleucina).

El diagnóstico definitivo viene determinado por el análisis del DNA.

El déficit de PAH se puede clasificar en función de las cifras de Phe en sangre al diagnóstico (antes de iniciar la restricción proteica) y por la tolerancia de Phe a los 5 años de edad, clasificación que realizó Güttler en 1980<sup>55,56</sup>. La tolerancia de Phe depende directamente de la actividad residual de la PAH<sup>57,58</sup>. En 1999 Desviat et al. describió la frecuencia de estos fenotipos en la población española<sup>59</sup>.

	% actividad residual PAH <sup>1</sup>	Cifras Phe Dx (mg/dL) <sup>2</sup>	Tolerancia Phe (mg/Kg/día) <sup>2</sup>	Tolerancia media a Phe (mg/día) <sup>2</sup>	Frecuencia en España <sup>3</sup>
PKUC	< 1%	>20	< 20	250 - 350	15,70%
PKUM	1 - 5%	>10-20	20 - 25	350 - 400	9,00%
PKUS	> 5%	>6-10	25 - 50	400 - 600	23,00%
HFAB	> 5%	2,5-6	>50	>600	47,7%

**Tabla 1.-** Clasificación de los pacientes con deficiencia de PAH según la tolerancia a Phe a los 5 años de edad, junto con la frecuencia de estos fenotipos en la población.

- 1) según Bartholome, 1981
- 2) según Güttler, 1980; Güttler y Guldberg, 1996.
- 3) según Desviat et al, 1999.

Aunque en realidad existe un espectro continuo de severidad, esta clasificación es útil de cara a determinar la necesidad o no de tratamiento dietético y si éste debe ser más o menos estricto.

El diagnóstico prenatal del déficit de PAH, aunque habitualmente no es solicitado por los avances en el tratamiento de esta enfermedad, es posible mediante el análisis de mutaciones del caso índice en el DNA de vellosidades coriónicas o del líquido amniótico.

### 2.2.8. TRATAMIENTO

El objetivo en el tratamiento del déficit de PAH es reducir las cifras de Phe en sangre lo suficiente para prevenir el daño neurológico. Estos niveles van a depender de la actividad residual de PAH y la ingesta de Phe con la dieta. Para la mayoría de los pacientes el único tratamiento eficaz es la restricción dietética de Phe. La necesidad o no de dieta va a estar definida por las cifras de Phe en sangre al diagnóstico (con alimentación normalizada, ingesta de 3 g de proteínas/Kg/día durante al menos 3 días antes de la extracción), lo cual varía según los distintos países, en lo que sí coinciden todos es que las cifras óptimas de Phe dependen de la edad (Tabla 2)<sup>60</sup>.

	<i>España</i> <sup>60</sup>	<i>Reino Unido</i> <sup>61</sup>	<i>Alemania</i> <sup>62</sup>	<i>E.E.U.U</i> <sup>54</sup>
<i>Inicio tratamiento</i>	> 360 $\mu\text{mol/L}$	> 420 $\mu\text{mol/L}$	> 600 $\mu\text{mol/L}$	> 600 $\mu\text{mol/L}$
<i>0 - 6 años</i>	< 360 $\mu\text{mol/L}$	< 360 $\mu\text{mol/L}$	< 240 $\mu\text{mol/L}$	< 360 $\mu\text{mol/L}$
<i>6 - 9 años</i>	< 480 $\mu\text{mol/L}$	< 480 $\mu\text{mol/L}$	< 240 $\mu\text{mol/L}$	< 360 $\mu\text{mol/L}$
<i>9 - 12 años</i>	< 600 $\mu\text{mol/L}$	< 480 $\mu\text{mol/L}$	< 900 $\mu\text{mol/L}$	< 360 $\mu\text{mol/L}$
<i>12 - 15 años</i>	< 600 $\mu\text{mol/L}$	< 700 $\mu\text{mol/L}$	< 900 $\mu\text{mol/L}$	< 600 $\mu\text{mol/L}$
<i>Adolescentes /adultos</i>	< 600 $\mu\text{mol/L}$	< 700 $\mu\text{mol/L}$	< 1200 $\mu\text{mol/L}$	< 900 $\mu\text{mol/L}$
<i>Embarazo</i>	< 180 $\mu\text{mol/L}$	< 240 $\mu\text{mol/L}$	< 240 $\mu\text{mol/L}$	< 240 $\mu\text{mol/L}$

**Tabla 2.-** Niveles plasmáticos de Phe utilizados como referencia para tomar la decisión de tratar y posteriormente mantener a lo largo de la vida según las indicaciones de los protocolos utilizados en distintos países.

En 1998, en España fue establecido por la AECOM<sup>60</sup>, que todo paciente con unos valores en sangre superiores a 360  $\mu\text{mol/L}$  (6mg/dL) debía ser tratado. Así mismo, los pacientes con cifras de Phe mantenidas entre 150 y 360  $\mu\text{mol/L}$  (2,5-6 mg/dL) se considera que tienen un fenotipo benigno y que no requieren tratamiento, aunque sí deben ser monitorizados para valorar la posible aparición de alteraciones neurológicas menores o en el caso de las mujeres, evitar el síndrome de PKU materna (SPKUM)<sup>28</sup>.

No obstante, hoy día la tendencia es en muchos países de Europa, entre ellos España, iniciar el tratamiento con niveles de Phe >240  $\mu\text{mol/L}$  (4 mg/dL), y mantener estos niveles hasta los 5 años de edad. Hasta los 9 años deberían ser < 360  $\mu\text{mol/L}$  (6 mg/dL) y < 480  $\mu\text{mol/L}$  (8mg/dL) al menos hasta los 13 años de vida<sup>63</sup>.

La restricción proteica es de tal entidad que requiere el uso de una dieta semi-sintética que se compone de:

- Alimentos naturales con bajo contenido en Phe (<30 mg /100g de producto; e.j. varias frutas y verduras).
- Cantidades controladas de alimentos naturales y manufacturados con Phe >30 mg/100 g de producto (patatas, espinacas, brócoli, guisantes, plátanos, yogures u otro alimento de alto valor biológico). En la unidad de Metabolopatías y Nutrición infantil de los H.H.U.U. Virgen del Rocío utilizamos un sistema de porciones (1 porción= 20 mg de Phe) y unas tablas de equivalencias para que puedan ajustar la alimentación a la cantidad de Phe prescrita en la consulta.
- Fórmulas de aminoácidos exentas de Phe y suplementadas con Tyr. La restricción en la ingesta de PN conlleva una ingesta restringida de otros aminoácidos, vitaminas y oligoelementos. Para evitar la aparición de patologías secundarias asociadas a estas carencias es necesario suplementar la dieta de los pacientes con productos industriales que contengan estos nutrientes. Con este fin se han desarrollado fórmulas de aminoácidos exentas de la Phe y enriquecidas con Tyr, vitaminas, oligoelementos y ácidos grasos esenciales. La cantidad de estos productos depende de los requerimientos de cada paciente según edad, procesos intercurrentes<sup>39</sup>, etc...

En general se siguen las recomendaciones de la OMS/FAO para los distintos nutrientes, y en especial para los aminoácidos, que está establecida en un mínimo 1,3 g de proteínas por kilo y día en niños menores de 2 años y 0,97 g de proteínas por kilo y día a partir de esa edad (Tabla 9).

- Alimentos especiales “aproteicos” con muy bajo contenido de proteínas (<0,5 g proteínas/100 g de producto): pastas, arroz, galletas..., diseñados para paliar el perjuicio psicológico y social que supone esta dieta contribuyendo a mejorar la palatabilidad de las comidas, la variedad de ingredientes y a aumentar el aporte calórico.

Estos cuatro grupos de alimentos deben ser distribuidos equilibradamente a lo largo del día.

Aquellos alimentos con alto contenido en Phe (e.j. carne, pescado, huevo) no están permitidos.

El Aspartamo (metil éster L-aspartil L-phenilalanina), un edulcorante artificial empleado en bebidas, comidas y como excipiente en algunos medicamentos, contiene un 50% de Phe y por tanto no debe ser utilizado por estos pacientes.

En el caso de lactantes, la lactancia materna al tener bajo contenido en Phe, se puede mantener restringiendo el tiempo de la toma en los casos más severos, dando a continuación la fórmula especial. Si el lactante se alimentara con lactancia artificial se le dará una mezcla calculada de fórmula de inicio y de la exenta en Phe para cubrir las necesidades nutritivas de este grupo poblacional.

Durante los procesos intercurrentes se debe reducir el aporte de Phe al 50% y aumentar la ingesta calórica para contrarrestar el catabolismo endógeno de proteínas<sup>39</sup>.

#### **2.2.8.1. Monitorización del tratamiento**

La restricción proteica en la dieta de los pacientes fenilcetonúricos, orientada a mantener las cifras de Phe en el rango previsto según tolerancia individual, tiene como contrapunto la aparición de deficiencias nutricionales, de ahí la importancia de realizar una monitorización exhaustiva desde el punto de vista clínico, dietético y analítico. En España se sigue generalmente el Protocolo de Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento de las Hiperfenilalaninemias propuesto por la AECOM en 1998 y que se expone en la Tabla 4 de forma resumida<sup>60</sup>.

	0 - 6 meses	6 - 24 meses	> 24 meses	Embarazo
<i>Niveles de Phe</i>	Semanal	Quincenal	Mensual	Semanal
<i>Analítica general</i>	Diagnóstico	Anual	Anual	Inicio y fin
<i>Control clínico</i>	Mensual	Trimestral	Semestral	Mensual
<i>Control neurológico</i>	Cada 2 – 3 años			
<i>Control psicológico</i>	18 meses, 3, 6, 9 años y final (12-14 años)			
<i>RMN cerebral</i>	Sólo si mal control de los niveles de Phe			

**Tabla 4.-** Controles clínicos y bioquímicos recomendados por la AECOM para el seguimiento de pacientes PKU. Los controles pueden verse modificados según la evolución de cada paciente.

### 2.2.8.2. Complicaciones asociadas a la dieta de restricción proteica

#### 2.2.8.2.1. Déficits nutricionales

El déficit de vitamina B<sub>12</sub> es frecuente en adolescentes y adultos con PKU que han suspendido la suplementación de la dieta con aminoácidos exentos de Phe y vitaminas pero que continúan con la dieta restringida en proteínas<sup>64</sup>.

En aquellos pacientes que realizan una dieta estricta se pueden detectar déficits en otras vitaminas, oligoelementos y minerales. Se han descrito múltiples deficiencias de nutrientes en pacientes PKU, tanto de ácidos grasos esenciales, como de selenio, carnitina, zinc, hierro, vitamina A, etc<sup>65,66,67</sup>.

Sin embargo dichas deficiencias no aparecen en todos los casos, ni está esclarecido si tienen alguna repercusión clínica. También se ha notificado déficit de calcio, osteopenia y mayor incidencia de fracturas en estos pacientes.

#### 2.2.8.2.2 Falta de adhesión a la dieta

El mayor inconveniente de estas dietas es la importante reducción de la calidad de vida de los pacientes y de sus familias derivada del hecho de que las fórmulas especiales que deben tomar tienen mal olor y sabor producido por su contenido en metionina que aún no se ha logrado soslayar a pesar de los numerosos esfuerzos de la industria farmacéutica por hacerlos más atractivos<sup>68,69,70</sup>.

### 2.2.8.2.3 Dieta de por vida

Por razones históricas aún no existen datos de las consecuencias de una dieta de por vida más allá de los adolescentes y adultos de mediana edad. A la vista de la variable vulnerabilidad del cerebro a los niveles elevados de Phe a lo largo de la vida, los hallazgos neuropsicológicos, han sido interpretados como posibles marcadores de CI y complicaciones neurológicas a largo plazo. A razón de disminuir al máximo el riesgo de complicaciones a largo plazo las guías de tratamiento de PKU recomiendan dieta de por vida y si esto no fuera posible al menos monitorización de por vida.

### 2.2.8.3. Terapias alternativas

Si bien el tratamiento dietético es muy efectivo, éste es complejo y con frecuencia la adhesión al mismo es pobre sobre todo a partir de la adolescencia, periodo en que el paciente comienza a ser más independiente. Esta circunstancia ha llevado a la necesidad de investigar nuevas alternativas terapéuticas.

- Terapia génica: Se ha intentado transferir genes de PAH mediante vector en el ratón<sup>PAHemu2</sup> utilizando vectores no-virales, adenovirus recombinantes, retrovirus recombinantes y adenovirus asociados recombinados<sup>71</sup>.

Sin embargo ninguno de estos experimentos ha producido un cambio significativo en el fenotipo del ratón<sup>PAHemu2</sup>, bien por un escaso desarrollo del gen o por la producción de anticuerpos neutralizantes, entre otros<sup>71</sup>.

Es necesaria aún la creación de un vector capaz de transferir un gen más seguro y eficaz antes de que sea posible iniciar ensayos en humanos.

- Trasplante hepático: Corrige completamente el déficit de PAH, pero los riesgos quirúrgicos del trasplante y del post-trasplante (inmunosupresión) son demasiado altos para considerar esta opción como alternativa al tratamiento dietético<sup>39</sup>.
- Phe amonio liasa (PAL): Se han realizado experimentos en animales con la enzima *non-mammalian* PAL, que transforma la Phe en ácido transcinámico. Al administrar células de *E. Coli* que expresan PAL al ratón<sup>PAHemu2</sup> por inyección intraperitoneal se ha observado un importante descenso de los niveles de Phe en sangre<sup>72,73,74</sup>. Sin embargo

parece que aún será necesario un tiempo para poder administrar este tratamiento a los pacientes con PKU.

- Los Aminoácidos Largos Neutros (LNAA) (Phe, Tyr, Try, leucina, isoleucina y valina) compiten por el mismo sistema de transporte (transportador de aminoácidos *L-type*) para atravesar la BHE. Estudios en el ratón<sup>PAHemu2</sup> y en pacientes han demostrado un descenso de Phe cerebral tras la administración de LNAA (sin Phe) vía oral<sup>75,76,77</sup>. Constituyen una alternativa terapéutica especialmente en pacientes adolescentes y adultos que no realizan adecuadamente el tratamiento dietético.
- Recientemente se ha demostrado que algunos pacientes seleccionados pueden disminuir los niveles de Phe al rango terapéutico tras la administración de BH<sub>4</sub> monoterapia (5-20 mg/Kg/día)<sup>78</sup>. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con PKU moderada son susceptibles de poder ser tratados con cofactor. La enzima PAH es un homotetrámero, donde cada uno de los monómeros tiene un dominio catalítico, regulador y de oligomerización. Según Blau y Erlandsen<sup>79</sup> existen 4 mecanismos que justifican la respuesta a BH<sub>4</sub> en los pacientes con deficiencia de PAH:

- ❖ Incremento de la afinidad de PAH por BH<sub>4</sub>
- ❖ Evita la degradación del tetrámero activo
- ❖ Aumenta la biosíntesis de BH<sub>4</sub>
- ❖ Regulador de la expresión de PAH

La hipótesis de mayor peso es que la respuesta a BH<sub>4</sub> es multifactorial, pero son necesarias más investigaciones.

De la experiencia acumulada al tratar pacientes PKU se deduce que este tratamiento no tiene efectos secundarios significativos, no obstante aún no está demostrada su eficacia terapéutica a largo plazo, y hay que tener en cuenta su coste elevado y que no es útil para todos los pacientes.

El control de la HFA con el tratamiento dietético es generalmente muy bueno durante la infancia y el inicio de la adolescencia. Sin embargo la importante restricción dietética interfiere con los hábitos dietéticos culturales, principalmente en adolescentes

y adultos, llevando a frecuentes transgresiones de las recomendaciones terapéuticas dadas en cuanto a la alimentación. Se ha demostrado en un estudio alemán de PKU que por encima de los 10 años sólo un 40% de los pacientes mantiene los niveles de Phe en el rango recomendado<sup>67,80</sup>.

No obstante, el tratamiento dietético de la PKU es habitualmente demandado por los pacientes y sus familias, y es prácticamente imposible sin el soporte de un equipo especialmente entrenado en el tratamiento de las enfermedades metabólicas. Este equipo debe estar compuesto por dietistas, al menos 2 pediatras especializados en EMH, un bioquímico encargado del laboratorio de metabolopatías y un psicólogo que atienda los problemas derivados de un tratamiento dietético de por vida. El equipo terapéutico debe estar preparado para trabajar de manera interdisciplinar en un Centro en el que deberían atenderse al menos 20 pacientes para tener suficiente experiencia<sup>81</sup>.

### **2.2.9. PRONÓSTICO**

El pronóstico del paciente con PKU depende de múltiples variables, como son la edad de inicio del tratamiento, los niveles de Phe en las distintas etapas de la vida, duración de los periodos con deficiencia de Phe y el gradiente individual de transporte de Phe a través de la BHE. Es posible que existan otros factores no determinados que influyan en el pronóstico de esos pacientes, no obstante el más importante es sin duda alguna los niveles de Phe en sangre durante la infancia y la adolescencia.

Estudios longitudinales han revelado que el inicio de la dieta en las 3 primeras semanas de vida y cifras medias de Phe en sangre  $\leq 360 \mu\text{mol/L}$  ( $\leq 6 \text{ mg/dL}$ ) durante la infancia y la adolescencia temprana tienen como resultado un desarrollo intelectual normal. Sin embargo, por cada  $300 \mu\text{mol/L}$  ( $5 \text{ mg/dL}$ ) que se exceda de la cantidad de Phe en sangre recomendada en los 6 primeros años de vida, el CI se reduce  $0,5 \text{ SD}$ , y  $0,25 \text{ SD}$  entre los 5-10 años de edad. Además a la edad de 4 años el CI se ha reducido en  $0,25 \text{ SD}$  por cada 4 semanas de retraso en el inicio del tratamiento y cada 5 meses de déficit de Phe.

Después de los 10 años de vida todos los estudios muestran un rendimiento intelectual estable hasta la madurez independientemente de los niveles de Phe y un buen rendimiento escolar si se ha realizado un control adecuado durante los 10

primeros años de vida<sup>82,83,84,85</sup>. No obstante están por realizar estudios longitudinales de pronóstico en adultos de mediana y elevada edad.

### **2.2.9.1. Complicaciones neurológicas en adultos**

Estudios neuropsicológicos de reacción en el tiempo demuestran la vulnerabilidad reversible del cerebro a lo largo de la vida, por los aumentos intercurrentes de los niveles de Phe<sup>3</sup>.

Tras largos periodos con HFA mantenida, se pueden visualizar con técnicas de neuroimagen (RMN), lesiones en la sustancia blanca cerebral. Estas lesiones no se correlacionan con la inteligencia o con signos neurológicos y son reversibles, desapareciendo tras 3-6 meses de tratamiento dietético estricto<sup>86</sup>.

Los pacientes con mal control metabólico durante la infancia presentan alteraciones del comportamiento como hiperactividad, agresividad, desadaptación social y ansiedad, generalmente asociado a bajo CI. Los sujetos con un adecuado tratamiento pueden presentar tendencia a la depresión y baja autoestima. Estos síntomas no guardan relación con los niveles de Phe y existe la hipótesis de que pueden ser debidos más al hecho de vivir con una patología crónica que al defecto biológico del aumento de los niveles de Phe<sup>87</sup>.

Un pequeño número de adolescentes y adultos han desarrollado una franca enfermedad neurológica que ha mejorado al reiniciar el tratamiento dietético<sup>88</sup>. Estos individuos tienen como característica común el haber tenido un mal control metabólico durante la infancia. Sin embargo, el riesgo de aquellos que han tenido un buen control durante la infancia y al llegar a la juventud han relajado la dieta parece ser prácticamente inexistente.

### **2.2.10. FENILCETONURIA MATERNA**

Las primeras referencias bibliográficas que hacen mención al SPKUM datan del año 1968 cuando Kerr comprueba que administrando Phe a simios hembra la descendencia presentaba retraso mental<sup>89</sup>.

En 1969 Huntley y Stevenson describen 2 hermanas con 28 gestaciones, 16 gestaciones habían terminado con abortos en el primer trimestre y de las 12 que llegaron a término todas presentaban retardo del crecimiento intrauterino y microcefalia y 9 de ellas malformaciones cardíacas<sup>90</sup>.

Aunque era conocido que las cifras de Phe tenían efecto teratógeno durante la gestación en mujeres PKU<sup>91</sup>, no es hasta 1980 que se publica por Lenke y Levy que se reconoce como tal el SPKUM<sup>92</sup>.

### 2.2.10.1 Manifestaciones clínicas

Las concentraciones elevadas de Phe durante la gestación pueden ser responsables de:

- Alteraciones faciales: Cara redondeada, fisuras palpebrales, glabelas prominentes, epicanto, hipertelorismo, paladar ojival y estrabismo. La facies del SPKUM es muy similar a la del Síndrome alcohólico fetal lo que ha llevado a plantear la posibilidad de que alcohol y Phe compartan el mismo mecanismo patológico<sup>93</sup>.

- Retraso mental
- Microcefalia
- Retraso del crecimiento intrauterino
- Malformaciones cardíacas
- Abortos espontáneos de repetición

Si se comparan los datos de Lenke y Levy (1980)<sup>93</sup> en los que valoraron mujeres embarazadas con PKUC (cifras >1200  $\mu\text{mol/L}$ ) de las que sólo el 0,5% había recibido tratamiento, con el estudio de Koch et al.<sup>94</sup> en el que un 26% de las embarazadas realizó tratamiento antes de la concepción, un 35% desde el primer trimestre y un 9% desde el 2º, se observa un descenso considerable en la incidencia de complicaciones en mujeres PKU embarazadas.

A la vista de estos resultados se inició un estudio prospectivo sobre PKU Materna con la intención de valorar el impacto de la dieta restringida en Phe en el desarrollo

fetal<sup>93</sup>. Se examinaron 572 embarazos de 382 mujeres con PKU<sup>95</sup>. Se observó que cuando las cifras de Phe en sangre se situaban entre 120-360  $\mu\text{mol/L}$  desde 8-10 semanas antes de la concepción y se mantenían estos niveles durante todo el embarazo se conseguía un desarrollo fetal adecuado<sup>96</sup>.

#### **2.2.10.2 Mecanismo de acción**

Debido a un gradiente activo a través de la placenta la Phe en el feto guarda una relación de 1:2 a 1:7 con la de la madre. La Phe compite por el transporte placentario de otros LNAA y afecta al desarrollo fetal por mecanismos patogénicos desconocidos<sup>97</sup>, aunque como se ha comentado con anterioridad existe una hipótesis de que pudiera ser el mismo que el del alcohol en el síndrome alcohólico fetal.

Este gradiente, unido a la inmadurez hepática del sistema de hidroxilación del feto y al hecho de ser heterocigotos forzados, que conlleva una peor actividad enzimática, determina la necesidad de que la embarazada PKU deba mantener cifras inferiores a las recomendadas habitualmente para ella. Por otro lado las concentraciones bajas de Phe pueden limitar la síntesis de proteínas cerebrales en el feto y ser deficiente. Esto llevó a la necesidad de determinar un rango de seguridad para los niveles de Phe en sangre materna.

Se aconseja que el rango óptimo de control para una fenilcetonúrica embarazada se mantenga entre 100 – 240  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **2.2.10.3. Seguimiento**

La cuestión del SPKUM necesita ser tratada desde etapas tempranas de la vida con los padres de pacientes PKU a lo largo de la infancia. Walter et al.<sup>98</sup> plantean que a partir de los 5 años de vida una niña PKU puede comprender una simple explicación del problema y que cuando llegue a la edad fértil todos los consejos deben ir encaminados principalmente en este sentido. El objetivo de esta educación es proporcionarles una comprensión básica de la concepción y la PKU así como la importancia de una dieta estricta preferiblemente antes de la concepción.

El riesgo de tener un hijo con PKU es bajo, de 1/100, al ser 0,5% la frecuencia de portadores en España.

- Inicio de la dieta preconcepcional<sup>98</sup>

Muchas mujeres PKU en el momento de plantearse tener un hijo están realizando una dieta muy normalizada. En estos casos sería necesario realizar una educación intensiva e instituir una dieta restringida en Phe.

La mujer y su pareja necesitan tener tablas de equivalencias de proteínas y de Phe para poder calcular exacta y correctamente la cantidad de Phe prescrita. Así mismo deberán anotar todos los alimentos ingeridos con y sin Phe y la cantidad ingerida. Con estas medidas las cifras de Phe en sangre descenderán al rango previsto en unos 10 días aproximadamente, proporcionando a la paciente ánimos para continuar. Junto a la dieta es necesario un control bioquímico exhaustivo que permita ir adaptando la alimentación a las circunstancias (enfermedad, hiperemesis, 2º y 3º trimestre). En algunas mujeres puede haber fluctuaciones incluso con el ciclo menstrual.

Las mujeres con PKU que han mantenido una dieta restringida en Phe también pueden necesitar repasar los conceptos relativos a la alimentación durante el periodo pre-concepción y el embarazo, ya que puede no resultarle tan fácil como ellas creen conseguir los niveles óptimos de fenilalaninemia.

## **2.3. HIPERFENILALANINEMIA POR TRASTORNOS DEL METABOLISMO DE LA BIOPTERINA**

Representan un 1% de los casos de HFA.

Los trastornos del metabolismo de la BH<sub>4</sub> y el déficit de las aminas biógenicas incluyen el déficit de GTP Ciclohidrolasa I (GTPCH), de 6-piruvoil-tetrahidropterina sintetasa (PTPS), déficit de dihidropterina reductasa (DHPR), y el déficit de pterina- 4<sup>a</sup>-carbinolamina deshidratasa (PCD) (primaptenuria)<sup>16,98</sup>.

### **2.3.1. PRESENTACIÓN CLÍNICA**

Existen 3 formas de presentación:

1. Asintomática: La HFA es detectada en el *screening* neonatal y al completar el estudio de la HFA se evidencia el déficit de biopterinas.

2. Sintomática con deterioro neurológico en la infancia a pesar de la dieta restringida en Phe: Esto puede ocurrir cuando no se completa el estudio tras detectar aumento de Phe en el *screening* neonatal, asumiendo que se trata de un déficit de PAH.

3. Sintomática con deterioro neurológico en la infancia con dieta normal: En aquellos casos en los que no se ha realizado *screening* neonatal de HFA y en los casos en que habiéndose realizado la Phe es tan baja que no se ha considerado relevante.

Los síntomas pueden pasar desapercibidos en el periodo neonatal y no ser advertidos hasta varios meses después. Todos los trastornos del metabolismo de las pterinas, excepto el déficit de PCD, están asociados a alteraciones del tono muscular, movimientos anormales, irritabilidad y letargia, convulsiones, alteraciones del control de la temperatura, retraso psicomotor progresivo y microcefalia. Pueden existir calcificaciones y atrofia cerebral en el déficit de DHPR. En el déficit de PCD los síntomas son moderados y transitorios.

### 2.3.2. PATOGENIA

Los trastornos de la síntesis o reciclaje de las pterinas están asociados a un descenso de la actividad de la PAH, TYRH, TRYH y NOS (Figura 3). El grado de HFA debido a déficit de PAH es muy variable pudiendo oscilar desde niveles normales a ser >2000  $\mu\text{mol/L}$ . El déficit de aminas en el sistema nervioso central (SNC) es con frecuencia importante y responsable de los síntomas de estos trastornos. La disminución del ácido homovalínico (AHV) en LCR es responsable de la disminución del “turnover” de la dopamina, del mismo modo el déficit del ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA) provoca disminución del metabolismo de la serotonina<sup>16,98</sup>.

### 2.3.3. GENÉTICA

Todos estos trastornos son autosómicos recesivos. La descripción de los genes más relevantes y la base de datos de las mutaciones están disponibles en [www.bh4.org](http://www.bh4.org).

### 2.3.4. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Los protocolos de diagnóstico y de interpretación de resultados son los siguientes:

- a) Determinación de pterinas en sangre y orina y de DHPR en sangre.

Debe ser extraída en todos los neonatos con HFA en el momento de la detección neonatal. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

Deficiencia	Phe en sangre ( $\mu\text{mol/L}$ )	Biopterinas en sangre y orina	Neopterinas en sangre y orina	Primapterinas en sangre y orina	CSF 5HIAA Y HVA	Actividad DHPR en sangre
PAH	>120	↑	↑	-	N	N
GTPCH	90 -1200	↓↓	↓↓	-	↓	N
PTPS	240 - 2500	↓↓	↑↑	-	↓	N
DHPR	180 - 2500	↓↓	N o ↑	-	↓	↓
PCD	180 - 1200	↓	↑	↑↑		N

**Tabla 5.-** Interpretación de los resultados en el estudio de un trastorno del metabolismo de las pterinas

**b) Test de sobrecarga con BH<sub>4</sub>**

Consiste en administrar una dosis de 20mg/kg de BH<sub>4</sub> 30 minutos antes de una comida. Se extraen muestras de sangre a las 0, 4, 8 y 24 horas. El test es positivo si disminuyen los niveles de Phe un 30% o más, a las 8 horas de la administración o a las 24 horas. La disminución de la Phe puede ser menor en el déficit de DHPR. El análisis de pterinas en sangre a las 4 horas confirmará que la BH<sub>4</sub> se ha absorbido<sup>16,98</sup>.

Un test de BH<sub>4</sub> combinado con una sobrecarga de Phe (100 mg/Kg) y administración de BH<sub>4</sub> (20 mg/Kg), puede ser empleado como alternativa. Este test combinado es principalmente útil en pacientes que ya recibían tratamiento restringido en Phe para poder identificar a los pacientes con déficit de PAH que respondan a BH<sub>4</sub> y diferenciar entre los defectos de la síntesis o regeneración del cofactor, así como en los casos en que no se pueda determinar los niveles de pterinas en sangre<sup>99</sup>.

**c) Determinación de neurotransmisores en LCR**

La medición de HVA y de 5-HIAA es una parte esencial del estudio diagnóstico y es requerida para monitorizar el tratamiento con L-Dopa y 5-hidroxitriptófano (5HT). Tras la extracción el LCR debe ser congelado en nitrógeno líquido a -70°C previo al análisis. Si se extrajera sangre ésta debería ser centrifugada inmediatamente y el sobrenadante debería congelarse. Los rangos de referencia para AHV y 5-HIAA dependen de la edad<sup>100</sup>.

El diagnóstico prenatal es posible en el primer trimestre por biopsia de las vellosidades coriales y estudio de las mutaciones si ya se conocieran las del caso índice. El estudio de biopterinas en el líquido amniótico se puede realizar en el 2º trimestre en todos los déficits enzimáticos del metabolismo de las pterinas. En el déficit de DHPR y de PTPS se puede estudiar la actividad enzimática en eritrocitos fetales o en amniocitos. La GTPCH sólo se expresa en el tejido hepático fetal<sup>98</sup>.

**2.3.5. TRATAMIENTO**

En el déficit de GTPCH, PTPS y DHPR el objetivo del tratamiento es controlar la HFA y corregir el déficit de aminas en el SNC. En el déficit de DHPR también hay que administrar ácido fólico para prevenir el déficit de folatos en el SNC<sup>101</sup>. En los

déficits de PTPS y GTPCH, la HFA responde al tratamiento oral con BH<sub>4</sub>. En el déficit de DHPR puede ser efectiva también pero precisa mayores concentraciones y puede provocarse un incremento de BH<sub>2</sub> que a su vez incrementaría el riesgo de déficit de folatos en el SNC. Por este motivo en el déficit de DHPR se recomienda tratar la HFA con dieta y no dar BH<sub>4</sub><sup>102</sup>.

El tratamiento para reponer las aminas en el SNC se realiza también por vía oral con un compuesto de L-Dopa con carbidopa con una proporción de 1:10 ó 1:4. La carbidopa es un inhibidor de la dopadecarboxilasa que reduce la conversión periférica de Dopa a dopamina por lo que limita los efectos secundarios y permite reducir la dosis de L-Dopa manteniendo su efectividad. Los efectos secundarios (náuseas, vómitos, diarrea, irritabilidad) también pueden aparecer al inicio del tratamiento. Por esta razón el tratamiento que L-Dopa y 5HT debe iniciarse a dosis baja (Tabla 6) e ir incrementándolo progresivamente hasta llegar a la dosis recomendada de mantenimiento<sup>99</sup>.

Fármaco	Dosis (oral)	Frecuencia	GTPCH	PTPS	PCD	DHPR
<b>BH<sub>4</sub></b>	1 - 3 mg/Kg/día	Cada 24 horas	+	+	±	
<b>5HT</b>	1 - 2 mg/Kg/día aumentando 1 - 2 mg/Kg/día cada 4 - 5 días hasta alcanzar dosis de mantenimiento (8 - 10 mg/Kg/día)	Cada 6 horas. Dosis mantenimiento según niveles nt en SNC	+	+		+
<b>L-DOPA (combinada con Carbidopa)</b>	1 - 2 mg/Kg/día aumentando 1 - 2 mg/Kg/día cada 4 - 5 días hasta alcanzar dosis de mantenimiento (10 - 12 mg/Kg/día)	Cada 6 horas. Dosis mantenimiento según niveles nt en SNC	+	+		+
<b>Selegilina (l-eprenilo)</b>	0,1 - 0,25 mg/día	Cada 6 - 8 horas (como adyuvante de 5HT y L - DOPA)	±	±		±
<b>Entacapone</b>	15 mg/Kg/día	Cada 8 - 12 horas	±	±		±
<b>Ácido fólico</b>	15 mg/día	Cada 24 horas				+

**Tabla 6.-** Tratamiento de los trastorno del metabolismo de las pterinas.

El ajuste de estas dosis con frecuencia depende de los resultados de AHV y 5HIAA en LCR. La monitorización de los niveles de amina en LCR debe realizarse cada 3 meses en el primer año, cada 6 meses en la primera infancia y anualmente en años

posteriores. Si fuera posible el LCR debería recogerse antes de administrar una dosis de la medicación.

La hiperprolactinemia es una consecuencia del déficit de dopamina por lo que los niveles de prolactina en suero se pueden usar como un método para monitorizar el tratamiento ya que valores normales de prolactina indicarían un adecuado aporte de dopamina<sup>103</sup>.

La Selegilina (un inhibidor de la oxidación de monoaminas) puede ser usada como adyuvante al tratamiento de reemplazo de aminas. Esto puede permitir la reducción de la dosis de L-Dopa de 5HT y permite una mejora en los síntomas clínicos<sup>104</sup>.

Más recientemente se ha comunicado que el Entacapona, un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que está también autorizado para el tratamiento con Co-beneldopa o Co-careldopa para pacientes con enfermedad de Parkinson que experimentan deterioro fin de dosis, permite la reducción de más del 30% de los requerimientos de L-Dopa<sup>105</sup>.

### **2.3.6. PRONÓSTICO**

Sin tratamiento la historia natural del déficit de GTPCH, PTPS y DHPR es un deterioro neurológico progresivo y muerte precoz. Sin embargo, con el tratamiento depende de la edad al diagnóstico y de la severidad del fenotipo. La mayoría de los niños con déficit de GTPCH y PTPS tienen cierto grado de dificultad en el aprendizaje a pesar de un buen control metabólico. Los pacientes con déficit de DHPR si comienzan con dieta, tratamiento con aminas y ácido folínico en los primeros meses de vida pueden tener un desarrollo y un crecimiento normal<sup>16</sup>.

## **2.4. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS EN EL NIÑO Y EL ADULTO**

El objeto de la nutrición en el niño y en el adulto no es sólo conseguir un desarrollo pondoestatural adecuado, sino evitar carencias nutricionales y prevenir enfermedades con alta morbimortalidad en el adulto, directamente relacionadas con la dieta.

El conocimiento de las necesidades nutricionales constituye la base teórica indispensable para determinar la alimentación ideal de un individuo en cualquier periodo de la vida y en diferentes condiciones ambientales.

Tomando como base estos datos y los conocimientos científicos vigentes en cada momento, una serie de organismos internacionales publican periódicamente recomendaciones sobre nutrición infantil y en el adulto.

Las primeras recomendaciones dietéticas fueron las del *Food and Nutrition Board del National Research Council* de los Estados Unidos en 1943. La última edición de los aportes e ingestas recomendados “*Recommended Dietary Allowances*” (RDA), publicada por este organismo data de 1989<sup>106</sup>.

Las recomendaciones que se van a exponer en este apartado están basadas en las RDA<sup>107,108</sup>, en las del comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría<sup>109,110</sup>, en las del comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN)<sup>111,112</sup>, y en los informes técnicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

La OMS-FAO ha realizado un estudio para cuantificar las necesidades energéticas y nutritivas de la población desde 1949. En 2007 se ha publicado el último de una serie de informes del que se va a exponer la información referida en el mismo, acerca de la RDA de proteínas en lactantes, niños, adolescentes, adultos y embarazadas<sup>113</sup>.

### **2.4.1. Papel de los aminoácidos en la síntesis de proteínas**

Las proteínas son componentes esenciales del organismo. Su contenido en la masa corporal aumenta del 11% en el recién nacido al 15% al año de edad<sup>111</sup>.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos de alto peso molecular, que cumplen con una función estructural y forman parte de unidades bioquímicas especiales: enzimas, hormonas, anticuerpos.

Los aminoácidos son utilizados para sintetizar las proteínas corporales. La síntesis de cada una de estas proteínas se realiza a partir de la ingesta adecuada de aminoácidos esenciales y no esenciales.

Son aminoácidos esenciales los que no pueden ser sintetizados por el organismo y por tanto precisan ser aportados exógenamente. Son la leucina, valina, isoleucina, treonina, Phe, Try, metionina y lisina. Además hay algunos que deben ser considerados esenciales en la primera infancia, porque las necesidades en esta etapa son mayores que la capacidad de síntesis, debido a la ausencia o bajo rendimiento de las enzimas que intervienen en su interconversión. Este es el caso, por ejemplo, de la histidina hasta los 6 meses de vida, y de la cistina, principalmente en el recién nacido y sobre todo en el pretérmino, dado su papel precursor de la taurina, que juega un papel fundamental en el desarrollo cerebral<sup>108,109</sup>.

#### **2.4.2. Ingesta de proteínas individual y colectiva.**

Los requerimientos de proteínas se calculan habitualmente mediante el método factorial que consiste en sumar las pérdida de nitrógeno por orina, heces y sudor a las necesidades para el crecimiento y la renovación de los tejidos.

Los requerimientos de proteínas recogidos en el estudio de la OMS-FAO 2007<sup>113</sup> se han obtenido a partir de la ingesta media de proteínas de la población.

Para un individuo se ha definido como segura una ingesta de proteínas correspondiente al percentil 97,5 de la distribución de los requerimientos individuales, es decir, la media + 1.96 SD. De esta forma, cualquier individuo con dicha ingesta de proteínas tiene un riesgo muy bajo (< 2,5%) de presentar un déficit proteico.

Sin embargo, para una población no se puede definir un consumo seguro a partir de un individuo, porque el riesgo de déficit proteico está determinado por el balance entre los requerimientos y la ingesta. En la mayoría de los casos este valor será mayor que el consumo seguro individual, y en condiciones normales al ser la SD de la ingesta

superior a la SD de los requerimientos, la ingesta de seguridad de la población se aproximará a un valor algo mayor que el requisito establecido para un individuo  $+ 1.96$  SD de la ingesta.

Para los adultos se han calculado los requerimientos de proteínas según la edad, mientras para los niños se ha hecho en función del peso, por tener mayor precisión.

Las necesidades por persona, también pueden basarse en el peso real o en pesos estandarizados a partir de la altura o la edad recogidos en las gráficas correspondientes. Cabe destacar, sin embargo, que para los niños que están fuera del rango de peso corporal aceptable para su edad (P10-90) existe el riesgo de subestimar o sobrestimar los requisitos de proteínas recomendadas.

Por otro lado se recomienda que en dietas especiales, en las que es necesario hacer una corrección en función de la calidad de la proteína (p.ej dieta exenta de Phe en la PKU), en las que es necesario hacer comparaciones entre los requisitos y la ingesta diaria, las correcciones deben aplicarse a la dieta y no a los requerimientos de proteínas. Esto facilitaría el cálculo de la ingesta y la cantidad de proteínas diarias recomendadas en una familia en la que sus miembros realizan dietas distintas. Sin embargo, hay situaciones en las que puede resultar más sencillo hacer la corrección en la forma tradicional, es decir, mediante el ajuste de la estimación de las necesidades.

### **2.4.3. Cantidad diaria recomendada de proteínas en el adulto**

Las necesidades de proteínas en hombres y mujeres adultos de diferentes pesos corporales se muestran en la Tabla 7.

Para los adultos, la CDRP/kg de peso es igual para ambos sexos, en todas las edades y para todos los pesos dentro del rango aceptable (P10-P90). El valor recomendado de proteínas para un adulto es de 0,83 g/kg/día, para las proteínas con una digestibilidad de aminoácidos corregidos 1,0. No se ha identificado límite superior de seguridad pero es poco probable que la ingesta de dos veces el nivel de seguridad tenga riesgo alguno asociado.

Sin embargo, se recomienda precaución a los que realizan una ingesta 3-4 veces superior a la ingesta diaria recomendada.

<b>Peso (Kg)</b>	<b>CDPR (g/día)<sup>a</sup></b>
40	33
45	37
50	42
55	46
60	50
65	65
70	70
75	62
80	66

a. 0.83 g/kg /día con valor corregido de digestibilidad de aminoácidos de 1.0

**Tabla 7.-** CDRP en adultos (mujeres y hombres > 18 años)

#### 2.4.4. Requerimientos de aminoácidos en el adulto

Los requerimientos de aminoácidos para adultos se muestran en la tabla 8 en mg/Kg de peso al día, y la cantidad de cada aminoácido por gramo de proteína. Se han calculado a partir de los requerimientos medios de aminoácidos y proteínas (0,66 g/Kg/día), ya que los requerimiento de aminoácidos esenciales no se han establecido aún con seguridad, aunque se considera que deben constituir el 20% de los aportes totales de proteínas en el adulto y hasta el 40% en el recién nacido<sup>108,109</sup>.

<b>Aminoácido</b>	<b>mg/Kg/día</b>	<b>mg/g proteína</b>
Histidina	10	15
Isoleucina	20	30
Leucina	39	59
Lisina	30	45
Metionina	10	16
Cisteína	4	6
Metionina + Cisteína	15	22
Fenilalanina+ Tirosina	25	30
Treonina	15	23
Triptófano	4	6
Valina	26	39

**Tabla 8.-** Requerimientos de aminoácidos en adultos

#### **2.4.5. Cantidad diaria recomendada de proteínas en los lactantes, niños y adolescentes**

En el lactante es compleja la aplicación del método factorial para calcular los requerimientos diarios de proteínas, por lo que se suele recomendar la ingesta proteica en este periodo en base al patrón alimenticio de un lactante sano alimentado con leche materna<sup>114</sup>.

Se recomienda que el cálculo de la CDRP para niños y adolescentes se realice en 2 pasos:

1. Los requerimientos de proteínas por kg de peso deben obtenerse acordes a la edad.
2. Estos deben ser multiplicados bien por el peso real o por el peso para el P50 de la talla, para obtener la cantidad total de proteínas diarias recomendadas.

Para el cálculo más detallado de las necesidades proteicas de los niños, si los pesos reales no estuvieran disponibles, se recomienda obtener el peso medio para la edad del paciente en las tablas de la O.M.S<sup>114</sup>.

Hay que tener en cuenta que un aporte excesivo de proteínas en la infancia es peligroso ya que conlleva un aumento de la carga renal de solutos que conduce a un aumento de urea que puede conducir a acidosis metabólica e hiperaminoacidemia, por una parte y de determinados aminoácidos, como Phe, por otra.

Las necesidades de proteínas de los lactantes, niños y adolescentes de ambos sexos se muestran en la Tabla 9.

El peso que se muestra en la Tabla 9 es orientativo para usarlo como guía cuando se desconoce el peso del paciente.

El ajuste de la calidad de proteína, según la edad, debe hacerse según lo establecido en el punto 2.4.7.

#### **2.4.6. Requerimientos de aminoácidos en el lactante, el niño y el adolescente**

Los requerimientos de aminoácidos en lactantes y niños se han calculado usando un modelo factorial, basado en una dieta estimada para un adecuado desarrollo pondo-estatural y mantenimiento. El método que se ha seguido para calcular el aporte de aminoácidos para un adecuado mantenimiento sería el mismo que para los adultos, sin

embargo para que el crecimiento sea correcto debe considerarse la cantidad de proteínas que precisan los tejidos en relación a las proteínas de todo el cuerpo. Se muestra en la tabla 10 los aminoácidos fundamentales para el crecimiento, así como la cantidad necesaria de los mismos por grupo de edad.

Edad Años	Niños			Niñas		
	Peso <sup>a</sup> Kg	CDPR g/Kg/día	CDPR g/día	Peso <sup>a</sup> Kg	CDPR g/Kg/día	CDPR g/día
0,5	7,8	1,31	10,2	7,2	1,31	9,4
1	10,2	1,14	11,6	9,5	1,14	10,8
1,5	11,5	1,03	11,8	10,8	1,03	11,1
2	12,3	0,97	11,9	11,8	0,97	11,4
3	14,6	0,9	13,1	14,1	0,9	12,7
4-6	19,7	0,87	17,1	18,6	0,87	16,2
7-10	28,1	0,95	25,9	28,5	0,92	26,2
11-14	45	0,9	40,5	46,1	0,89	41
15-18	66,5	0,87	57,9	56,4	0,84	47,4

a. Valores de referencia según la OMS

**Tabla 9.-** CDRP en lactantes, niños y adolescentes

Edad Años	Lisina	Aa. Sulfurados	Treonina	Triptófano	Lisina	Aa. Sulfurados	Treonina	Triptófano
	mg/Kg/día				mg/g proteínas			
0,5	64	31	34	9,5	57	28	31	8,5
1 - 2	45	22	23	6,4	52	26	27	7,4
3-10	35	18	18	4,8	48	24	25	6,6
11- 14	35	17	18	4,8	48	23	25	6,5
15 - 18	33	16	17	4,5	47	23	24	6,3
>18	30	15	15	4	45	22	23	6

**Tabla 10.-** Requerimientos de aminoácidos en lactantes, niños y adolescentes.

### 2.4.7. Corrección de la dieta en función de la calidad de la proteína

Cuando la ingesta proteica de dietas específicas se ha calculado para cubrir los requerimientos, o cuando estas dietas se evalúan en función de su suficiencia, debe ajustarse el aporte proteico a la calidad de la proteína, como se expone a continuación<sup>114</sup>:

- - Calcular el contenido total de proteínas de la dieta = nitrógeno total  $\times$  6.25.
- - Calcular la cantidad de proteína disponible en la dieta = la proteína total  $\times$  la digestibilidad de la proteína corregida por el nivel de aminoácidos (el factor de digestibilidad  $\times$  nivel de aminoácidos).

### 2.4.8. CDRP en mujeres durante el embarazo y la lactancia

Durante el embarazo y la lactancia es preciso aumentar la ingesta diaria de proteínas (Tabla 11). Este aumento de la ingesta proteica debe ser incorporado a la dieta habitual y no en forma de suplementos proteicos.

	R. proteínas adicional g/día	R. energía adicional kJ/día	Proteínas:Energía
<b>E.Gestacional</b>			
1° T	1	375	0,04
2° T	10	1200	0,11
3° T	31	1950	0,23
<b>Lactancia</b>			
≤ 6 meses	19	2800	0,11
> 6 meses	13	1925	0,11

**Tabla 11.-** Requerimientos adicionales de proteínas durante la gestación y la lactancia.

### 2.4.9. Valoración nutricional a partir de los datos antropométricos y bioquímicos

El laboratorio de bioquímica se utiliza, principalmente, para detectar estados deficitarios subclínicos, de forma complementaria a otros métodos de valoración del estado nutricional: dietéticos, clínicos y antropométricos. En general, en la valoración

del estado nutricional es recomendable el uso de una combinación de análisis o pruebas.

- **Valoración del estado proteico**

La mayor parte de las proteínas corporales se encuentran en el músculo esquelético (30-50% del total proteico) y una pequeña cantidad en forma de proteínas viscerales (proteínas séricas, hematíes, granulocitos, linfocitos, hígado, riñón, páncreas y corazón).

Se consideran tres tipos de análisis: proteínas somáticas, excreción de metabolitos en orina y balance nitrogenado<sup>115</sup>.

A) La medición de una o más de las **proteínas séricas** es el método frecuentemente utilizado para la valoración del estado de las proteínas transportadoras.

El hígado es el principal órgano de síntesis de la mayor parte de estas proteínas:

- *Albúmina*: en el organismo humano la cantidad de albúmina es de 3-5 g/kg de peso corporal encontrándose más del 50% fuera del espacio vascular. Su biosíntesis puede estar disminuida por falta de proteína dietética, estrés fisiológico, hepatopatía, hipotiroidismo y presencia excesiva de cortisol sérico.

- *Transferrina*: es una  $\beta$ -globulina sérica transportadora de hierro, sintetizada principalmente en el hígado, que se encuentra casi totalmente en el espacio intravascular.

- *Prealbúmina*: también conocida como *transtiretina* y *prealbúmina unida a tiroxina*. Se sintetiza en el hígado y sirve como una proteína de transporte para tiroxina (T4) y de transporte de la proteína ligadora de retinol (P.L.R). Debido a su corta vida media y escasa cantidad total corporal (0.01 g/kg) se considera un marcador sensible de la nutrición proteica y además responde más rápidamente que la albúmina y la transferrina a los cambios en el estado proteico.

- *P.L.R.*: es una proteína hepática que transporta retinol cuando se complementa con la prealbúmina. Sus concentraciones se alteran rápidamente ante la deficiencia de proteína y de energía y se recuperan tras un adecuado tratamiento nutricional.

- Somatomedina C (IGF-I): es un péptido producido por el hígado en respuesta a la estimulación de la hormona de crecimiento. Realmente no es una proteína sérica pero se trata de un marcador sensible del estado proteico.

- Fibronectina: glicoproteína sintetizada por diversos tipos de células (hígado, endotelio, fibroblastos). Tiene una vida media de tan solo 20 horas. A diferencia de las proteínas antes consideradas la fibronectina no es tan dependiente del hígado. La deprivación nutricional da origen a bajas concentraciones séricas que vuelven a la normalidad con la terapéutica nutricional.

**B) Las pruebas más frecuentemente utilizadas de excreción de metabolitos proteicos por orina son:**

- Excreción de creatinina: deriva del catabolismo del fosfato de creatinina, un metabolito presente en el tejido muscular. Por tanto, la cantidad total de masa muscular existente en un organismo puede valorarse indirectamente con esta prueba.

Un índice de excreción de creatinina de 60-80% representa un moderado déficit de masa muscular corporal; el déficit es grave, si es inferior al 60%.

- Excreción 3-hidroxiprolina: la 3-hidroxiprolina urinaria es un producto derivado de componentes del colágeno de tejidos calcificados o no.

En niños el índice de hidroxiprolina es semejante al anterior, pero en éste se introduce un factor de corrección, que es el peso.

- Excreción de 3-metil-histidina: La metilhistidina es un aminoácido que se encuentra exclusivamente en la actina de las fibras musculares esqueléticas y en la miosina de las fibras blancas. Al catabolizarse estos productos se libera 3-metilhistidina, que se elimina por la orina.

**C) Se denomina balance nitrogenado** a la medida de los cambios que tienen lugar en la proteína corporal. El método se basa en la aceptación de que casi todo el nitrógeno corporal se incorpora al componente proteico. Como la proteína corporal contiene 16% de nitrógeno (Nitrógeno = Proteína (en gramos) / 0.25). Se dice que un individuo se encuentra en balance

nitrogenado cuando las ingestas son adecuadas para reemplazar las pérdidas endógenas de nitrógeno y el crecimiento del pelo y de las uñas.

### **3. HIPÓTESIS**

### **3. HIPÓTESIS**

Dadas las características comentadas que envuelven al paciente PKU y todo lo referido en los apartados anteriores se plantean las siguientes hipótesis:

1. La población PKU andaluza presenta un genotipo característico debido a la gran diversidad de etnias que han convivido a lo largo de los siglos en esta comunidad.
2. El genotipo y del fenotipo son variables útiles para predecir la posibilidad de responder al tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes andaluces con HFA debida a déficit de PAH.
3. El resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> aplicado a nuestros pacientes, sin necesidad de ingreso hospitalario, y con menos determinaciones analíticas, tiene la misma fiabilidad que el test que se realiza habitualmente.
4. Los pacientes PKU con resultado positivo en el nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> realizan dieta con ingesta de proteínas naturales adecuada a la cantidad diaria de proteínas naturales recomendada (CDPR) por la OMS-FAO y por la ESPGAN para su edad, manteniendo niveles de Phe correctos.
5. Los pacientes que realizan tratamiento con BH<sub>4</sub> tienen mejor estado nutricional tras la liberalización de la dieta.

## **4. OBJETIVOS**

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales:

1. Estudio del fenotipo, de pacientes con HFA debida a defectos en el gen *PAH*, desde el inicio del *screening* neonatal de la PKU en Andalucía.
2. Estudio del genotipo, de pacientes con HFA debida a defectos en el gen *PAH*, desde el inicio del *screening* neonatal de la PKU en Andalucía.
3. Aplicación y valoración de un nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> para seleccionar los pacientes susceptibles de ser tratados con BH<sub>4</sub> para liberalizar la dieta.
4. Determinación del porcentaje de población PKU andaluza que podría beneficiarse del tratamiento con BH<sub>4</sub> a partir de los datos obtenidos del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

### 4.2 Objetivos específicos:

1. Determinación del fenotipo más prevalente en la población PKU andaluza.
2. Determinación del genotipo más prevalente en la población PKU andaluza.
3. Estudio de la frecuencia relativa con la que se aprecian mutaciones del gen *PAH* sensibles a BH<sub>4</sub> en la población andaluza.
4. Valoración de la utilidad del genotipo y del fenotipo para predecir la posibilidad de responder al tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes andaluces con HFA debida a déficit de *PAH*.
5. Valoración de la ingesta de proteínas de origen natural anterior y posterior a la administración de BH<sub>4</sub> en los pacientes con respuesta positiva al nuevo test para definir la eficacia del mismo.
6. Valoración de las cifras de Phe tras aumentar ingesta de proteínas por la administración de BH<sub>4</sub> para corroborar el resultado positivo del Test.
7. Valoración de la situación nutricional de los pacientes PKU que han normalizado la alimentación (CDPR por la OMS/FAO) por la ingesta de BH<sub>4</sub>.

8. Comprobar si existen diferencias en el estado nutricional antes y después de la ingesta de BH<sub>4</sub>.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1. DISEÑO

Estudio observacional descriptivo retrospectivo de una serie de casos para la evaluación del fenotipo y genotipo de la población con PKU andaluza; valoración de un nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> en estos pacientes e impacto del tratamiento con BH<sub>4</sub> en el perfil nutricional. Para la valoración nutricional, al no observarse cambios antropométricos ni clínicos, se decidió analizar las modificaciones en las proteínas nutricionales plasmáticas (albúmina, prealbúmina, transferrina y P.L.R.) por ser marcadores sensibles de variaciones subclínicas del estado nutricional.

### 5.2. FASES DEL ESTUDIO

El estudio incluye las siguientes fases:

1. Fase observacional descriptiva que permitirá la recogida de información necesaria para completar el análisis del fenotipo y genotipo de la población con PKU de Andalucía.
2. Fase de valoración de efectividad del nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, que permita valorar la respuesta y posible utilidad del tratamiento en pacientes PKU con déficit de PAH de una manera más cómoda y sin necesidad de ingreso hospitalario.
3. Fase de estudio de intervención (antes-después) para valorar el perfil nutricional del paciente PKU, mediante la determinación de proteínas plasmáticas, antes y después de un año de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub>.

### 5.3. SUJETOS

#### 5.3.1. Para la fase observacional descriptiva del estudio del fenotipo y el genotipo de la población con hiperfenilalaninemia andaluza

##### ➤ CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Se seleccionaron todos los pacientes de la Comunidad Andaluza (Área atendida por la UMNI de los H.H.U.U. Virgen del Rocío de Sevilla) con cifras de Phe mayores a 150 µmol/L.

- La determinación de Phe se podría haber realizado:
  - Como parte del programa de detección precoz de PKU en el período neonatal, puesto en marcha en el año 1979 en Sevilla.
  - En pacientes en los que se determinó el nivel de Phe al ser estudiados por retraso psicomotor.
  - En sujetos estudiados por tener un familiar diagnosticado de HFA.

➤ **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Todos los pacientes con HFA por defecto en la síntesis o reciclaje del cofactor.

**5.3.2. Para la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>**

➤ **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Se seleccionaron los pacientes con HFA:
  - Con cifras de Phe al diagnóstico < 1200 µmol/L y que precisaban hacer dieta restringida en PN.
  - Portadores de al menos una mutación suave (asociada a respuesta a BH<sub>4</sub>).
  - Portadores de nuevas mutaciones, cuya actividad residual es desconocida, para poder catalogar dichas mutaciones.
  - Niñas y mujeres con HFA con cifras de Phe entre 150-360 µmol/L que no precisan dieta restringida en el momento actual pero que ante una gestación podrían necesitar dieta para mantener cifras de Phe < 240 µmol/L (cifra máxima de Phe permitida para prevenir la embriopatía del SPKUM en gestantes con PKU).

- A petición de los padres y/o del mismo paciente a pesar de no cumplir los criterios de inclusión para la realización del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

➤ **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Se excluyeron pacientes con HFA:
  - Con cifras de Phe al diagnóstico > 1200 µmol/L.
  - Portadores de dos mutaciones severas.
  - Pacientes con HFA que no precisaban, para tener niveles adecuados de Phe, dieta con restricción proteica.
  - Pacientes con PKU, a petición de los padres y/o del mismo paciente, a pesar de cumplir los criterios de inclusión para la realización del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.
  - Aquellos pacientes que presentaron vómitos durante la realización de la prueba.
  - Aquellos pacientes PKU que a pesar de haber tenido un resultado positivo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y precisar dieta con restricción proteica, no quisieron tomar el tratamiento por decisión del propio paciente o de los progenitores.
  - Aquellos pacientes con resultado del test negativo que no quisieron realizar la prueba terapéutica.

**5.3.3 Para la valoración nutricional antes y después de iniciar tratamiento con BH<sub>4</sub>**

➤ **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes con HFA que estén realizando tratamiento con BH<sub>4</sub> en un periodo no inferior a un año.

### ➤ CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con HFA que no lleven aún un año de tratamiento con BH<sub>4</sub>.

## 5.4. PERÍODO

Para el objetivo del estudio, en su fase observacional y descriptiva se han estudiados los pacientes que han presentado los criterios de inclusión y sin criterios de exclusión durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1979 al 31 de diciembre de 2009.

Para la valoración del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> se han estudiados los pacientes que presentaron los criterios de inclusión y sin criterios de exclusión durante el período comprendido entre el 1 de enero de 2005 al 31 de diciembre de 2009.

Para el análisis del estado nutricional de los pacientes antes y después de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> se estudiaron los pacientes que presentaron los criterios de inclusión y sin criterios de exclusión durante el período comprendido entre el 1 de agosto de 2007 (fecha en que se recibió autorización del Servicio Andaluz de Salud para el uso de BH<sub>4</sub> en pacientes con déficit de PAH) al 31 de diciembre de 2008 y se reevaluaron al año de su inclusión en esta fase del estudio.

## 5.5. ÁMBITO

En esta Tesis Doctoral se valoraron los datos y los estudios realizados en la UMNI del Hospital Infantil de los H.H.U.U. Virgen del Rocío de Sevilla en los últimos 30 años (1979-2009).

El ser centro de referencia para el tratamiento de esta patología durante esos años en Andalucía ha hecho que se atiendan los pacientes con HFA de toda la Comunidad Autónoma. Esto proporciona un gran tamaño muestral para tratarse de una enfermedad rara y ha puesto a nuestro alcance el poder diseñar estudios que nos permitieran conocer con mayor profundidad cual es el perfil de la HFA fenotípica y genotípicamente en Andalucía, así como valorar el nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y el estado nutricional tras un año de tratamiento con esta medicación con una muestra significativa de pacientes con HFA.

Todos los pacientes y/o sus tutores legales fueron atendidos en una entrevista personal de forma individualizada en la que se explicó la naturaleza y objetivos de los estudios así como los beneficios y riesgos de ellos derivados. Una vez aclaradas las dudas generadas, para satisfacción de los Derechos del Paciente, como instrumento favorecedor del correcto uso de los Procedimientos Diagnósticos y Terapéuticos y, en cumplimiento de la Ley General de Sanidad los pacientes y/o sus tutores legales firmaron el consentimiento informado para la realización de las distintas pruebas que requería cada estudio.

El test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y el tratamiento a largo plazo con este medicamento, al tratarse de un medicamento huérfano en pacientes con deficiencia de PAH, contó con el consentimiento del Comité Ético de los H.H.U.U Virgen del Rocío.

## **5.6. MÉTODO**

### **PRUEBAS REALIZADAS**

#### **5.6.1 Para el estudio del fenotipo y el genotipo de la población con HFA andaluza**

##### **5.6.1.1 Determinación del fenotipo de pacientes con deficiencia de PAH a partir de los niveles de Phe al diagnóstico.**

Para la determinación del fenotipo de los pacientes en los que se detectó HFA en el *screening* neonatal se utilizaron los niveles de Phe (mg/dL) extraídos el primer día que acudió el paciente a la consulta, descartándose los resultados obtenidos para el cribado de la HFA.

##### **5.6.1.2 Determinación del fenotipo de pacientes con deficiencia de PAH a partir de los niveles de tolerancia de Phe en la dieta.**

Para la determinación del fenotipo de los pacientes en los que se detectó HFA se utilizó la clasificación de Güttler (Tabla 1).

### 5.6.1.3 Estudios bioquímicos para la determinación del fenotipo

Los niveles de Phe y aminoácidos en sangre fueron determinados en el Laboratorio de Metabolopatías de los H.H.U.U. Virgen del Rocío de Sevilla por las Dras. García Valdecasas y Delgado Pecellín.

- *Determinación de aminoácidos*

La determinación de Phe y Tyr en plasma se realizó fluorimétricamente mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa (HPLC). El sistema HPLC utilizado fue el modelo *Beckman Coulter*®.

Para la prueba de *screening* neonatal de la PKU y para el control ambulatorio de los niveles de Phe de los pacientes con PKU, incluidas las muestras que fueron enviadas desde el domicilio para la realización del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, se utilizaron muestras de sangre total remitidas en papel Scheleiner and Schull 903 (S&S) que fueron analizadas mediante Espectrometría de Masas en Tándem. El modelo empleado fue *Applied Biosystems*®.

### 5.6.1.4 Estudios moleculares para la determinación del genotipo.

Los análisis genéticos fueron realizados en el Centro de Estudios y Diagnóstico de Enfermedades Moleculares por la Dra. Ruiz Desviat mediante “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*” (DGGE) y secuenciación directa DNA genómico de los pacientes y sus familiares se extrajo de sangre total<sup>116</sup>.

Se utilizó DGGE de rango amplio para localizar las mutaciones<sup>117</sup>.

En aquellos casos en los que sólo se identificó uno de los alelos mutados mediante DGGE, los 13 fragmentos exónicos del gen *PAH* fueron secuenciados.

La secuenciación en ciclo directo se realizó con la mezcla *BigDye Terminator v.3.1* (*Applied Biosystems*®) y se analizó mediante electroforesis capilar con un analizador genético *ABI Prism 3700* (*Applied Biosystems*®).

## **5.6.2 Para la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>**

### **5.6.2.1 Test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>**

En nuestra Unidad se iniciaron las sobrecargas con BH<sub>4</sub> para selección de HFA por déficit de PAH, susceptibles de realizar tratamiento con BH<sub>4</sub>, en el año 2005 siguiendo el siguiente protocolo:

1. Extracción de 5 c.c de sangre líquida en tubo de heparina de litio para determinación basal de Phe, tras ayuno nocturno.
2. Sobrecarga oral con 100 mg/Kg de L-fenilalanina (SHS®) en polvo, disueltos en agua. Se mantuvo el ayuno.
3. A las 3 horas nueva determinación de Phe, mediante extracción de sangre seca en papel y administración de una dosis única de 6-RBH<sub>4</sub> (Laboratorios Schircks Jona, Suiza®) de 20 mg/Kg, en comprimidos de 10 y 50 mg, disueltos en agua y protegida de la luz solar o enteros. A los 30 min de la ingesta de BH<sub>4</sub> se reanudó la dieta con ingesta limitada en Phe, que habitualmente realizaba el paciente.
4. Control de los niveles de Phe a las 7, 12 y 24 horas tras la ingesta de 6-RBH<sub>4</sub>.

La primera parte de la prueba (extracción de Phe basal, extracción de Phe a las 3 horas de la ingesta de la misma y administración de BH<sub>4</sub>) se realiza en consulta hospitalaria y las otras 3 determinaciones se extraen en sangre seca en papel y se remiten por correo a la Consulta de Enfermedades Metabólicas donde se adjuntan a las otras dos muestras y se envían al Laboratorio de Enfermedades Metabólicas de los H.H.U.U. Virgen del Rocío de Sevilla.

Esta variante del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> que se emplea tradicionalmente fue diseñada por el Dr. D. Manuel Pérez Pérez, Jefe de sección de la UMNI de Sevilla, se puso en marcha en el año 2005.

### 5.6.3 Para la valoración nutricional antes y después de iniciar tratamiento con BH<sub>4</sub>

Se determinaron los niveles de proteínas plasmáticas el día en que se inició el tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año del mismo.

## 5.7. VARIABLES DE ESTUDIO

### 5.7.1 Del fenotipo y el genotipo de la población con PKU andaluza.

- Cifras de Phe en sangre seca en papel S&S (mg/dL) al diagnóstico en el *screening* neonatal (Cuantitativa continua)
  - 1 mg/dL de Phe = 60,5 μmol/L de Phe
- Mutaciones (Cualitativa)
- Fenotipo asociado a cada mutación: Suave –Moderada –Severa – Nueva (Cualitativa)

### 5.7.2 De la aplicación y valoración del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>

- Respuesta al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (Cualitativa dicotómica: Positiva/Negativa)

Para valorar el resultado de este nuevo test de BH<sub>4</sub> se aplicó el siguiente método:

- **Resultado positivo:**
  - Descenso de Phe  $\geq$  50% a las 24 horas de haber administrado BH<sub>4</sub>
  - Todos los pacientes con resultado positivo y con necesidad de dieta restringida en PN, para mantener niveles adecuados de Phe, iniciaron tratamiento con BH<sub>4</sub> con dosis personalizada (5-20 mg/Kg/día), según necesidad, y se fue liberalizando la dieta progresivamente, según tolerancia, determinada por los niveles de Phe en sangre periódicos, aumentando la ingesta de proteínas naturales a expensas principalmente de PNAVB.

- Se hicieron controles de Phe seriados para comprobar que se mantenían en el rango admitido como apto en los pacientes PKU para su edad (Tabla 2) tras el aumento de la ingesta proteica.
- **Resultado negativo:**
  - Todos los pacientes con resultado negativo (respuesta < 50%) realizaron prueba terapéutica con BH<sub>4</sub>.
  - La prueba terapéutica consistió en dar PN según la CDRP por la OMS para su edad (Tablas 7 y 9) y 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> al día, durante una semana. A la semana se hacía una determinación del nivel de Phe:
    - Si éste era menor o igual a las cifras de Phe recomendadas para su edad (Tabla 2) el resultado de la prueba era positivo y el resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> era considerado un falso negativo.
    - Si era mayor al límite máximo admitido para su edad el resultado de la prueba se consideraba negativo y el resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> verdadero negativo.
- Porcentaje de respuesta al test (Cuantitativa continua)
- Respuesta a la prueba terapéutica realizada en los casos con respuesta negativa al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> para verificar resultado negativo (Cualitativa dicotómica: Verdadero Negativo: Falso Positivo)
- Dosis de BH<sub>4</sub>/Kg/día (mg/Kg/día) requerida para liberalizar la dieta (Cuantitativa continua)
- Cantidad de PN en g/Kg/día ingeridas antes del tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes con respuesta positiva en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (Cuantitativa continua).
- Cantidad de PN en g/Kg/día ingeridas después del tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes con respuesta positiva en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>. (Cuantitativa continua).

- Cifras de Phe en sangre (mg/dL) tras el incremento de la ingesta de PN en los pacientes con respuesta positiva en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (Cuantitativa continua).

### 5.7.3 De la valoración nutricional pre y post-tratamiento con BH<sub>4</sub>

- Niveles de proteínas nutricionales en sangre (mg/dL) antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes con respuesta positiva en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>: transferrina (200 – 360 mg/dL), albúmina (3500 – 2500 mg/dL), prealbúmina (20 – 40 mg/dL) y P.L.R. (3 – 6 mg/dL) (Cualitativas continuas).
- Niveles de las proteínas nutricionales en sangre mencionadas anteriormente (mg/dL) un año después del inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes con respuesta positiva en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (Cualitativas continuas).

## 5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

➤ Se realizó estadística descriptiva de las variables del estudio. Para ello usamos frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas (sexo, subtipos de HFA, momentos de diagnóstico de las HFA, lugar de procedencia y respuesta al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>). Estas frecuencias se han representado con diagrama sectorial. Se han utilizado diagramas de barras para representar la distribución de los rangos de edad, de los fenotipos y de las mutaciones más frecuentes.

➤ Las variables cuantitativas según siguieron o no una distribución normal (tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov) se resumieron mediante Md±SD (media, desviación estándar) y rango (mínimo y máximo) y/o P50 [P25 - P75] (mediana, rango intercuartílico) respectivamente.

➤ Una vez demostrado que el patrón de distribución era normal, se aplicaron pruebas de asociación estadística (test paramétricos) para demostrar si existía relación entre distintas variables (relacionadas e independientes).

- Se ha utilizado *la prueba T para la igualdad de medias de pruebas independientes* para valorar la relación entre las cifras de Phe al diagnóstico y el resultado en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, previa confirmación de la igualdad de varianzas con *la prueba de Levene*

- Se ha realizado análisis de correlación empleando *el coeficiente de correlación de los rangos de Spearman* para determinar si existe relación entre los niveles de Phe al diagnóstico con la tolerancia de Phe en la dieta en pacientes con déficit de PAH.

- Se aplicó *la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon*, prueba no paramétrica que sirve para comparar muestras relacionadas y determinar la existencia o no de diferencias entre ambas, para comparar los niveles de Phe al diagnóstico con las cifras de Phe tras liberalizar la dieta, la ingesta de proteínas por Kg de peso antes de BH<sub>4</sub> y posterior a BH<sub>4</sub> y para comparar la transferrina, prealbúmina, albúmina y P.L.R cuando el paciente tenía una dieta restringida en proteínas y al año de realizar una ingesta de proteínas naturales adecuada a su edad por estar realizando tratamiento con BH<sub>4</sub>.

- Para analizar los diferentes grupos de estudio con variables cuantitativas se han utilizado representaciones gráficas de **diagramas de cajas y bigotes**. Estos diagramas usan el concepto de percentiles, la caja central concentra el 50% de los datos, sus extremos son el primer y el tercer cuartil (P25 y P75 respectivamente), la línea central es la mediana y los bigotes delimitan el 95 % central de los datos).

Se ha representado con este tipo de diagrama la correlación entre las cifras de Phe al diagnóstico y la tolerancia de Phe en la dieta y la relación entre las cifras de Phe al diagnóstico y la respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub>.

También se ha usado para representar las comparaciones de los datos anteriores y posteriores al tratamiento con BH<sub>4</sub> comentados con anterioridad.

- El análisis estadístico se ha realizado con el paquete *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) versión 18.0, de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Nota: Debido a que estamos estudiando a la población total afectada de PKU de Andalucía, no es necesaria realizar inferencias estadísticas.

## **5.9. LIMITACIONES**

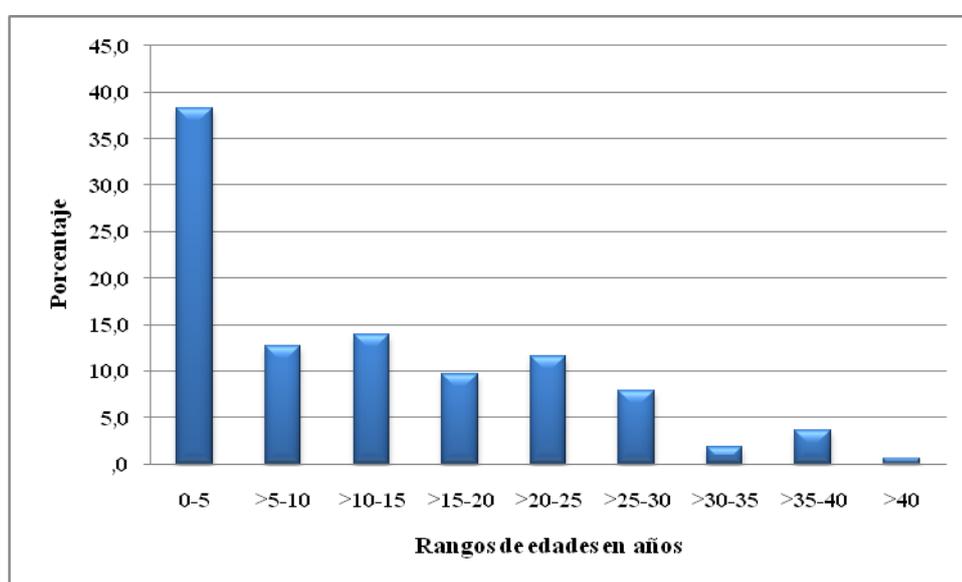
El corto período de tiempo que ha transcurrido desde el inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub> y el tamaño de la muestra, constituyen una limitación en este estudio, aunque para estudios de una enfermedad rara se considera que la muestra es adecuada si  $n > 20$ , por lo que se debería reevaluar este resultado ampliando la muestra y volver a valorar en un período de 5-10 años.

## **6. RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DATOS DESCRIPTIVOS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En el período comprendido entre el 1 de Enero de 1979 y el 31 de Diciembre de 2009 se estudiaron en nuestra Unidad 169 pacientes por HFA que, en el momento de cerrar el registro de datos, presentaban edades comprendidas entre los 41 días y los 47 años de vida ( $12,20 \pm 10,52$ ).

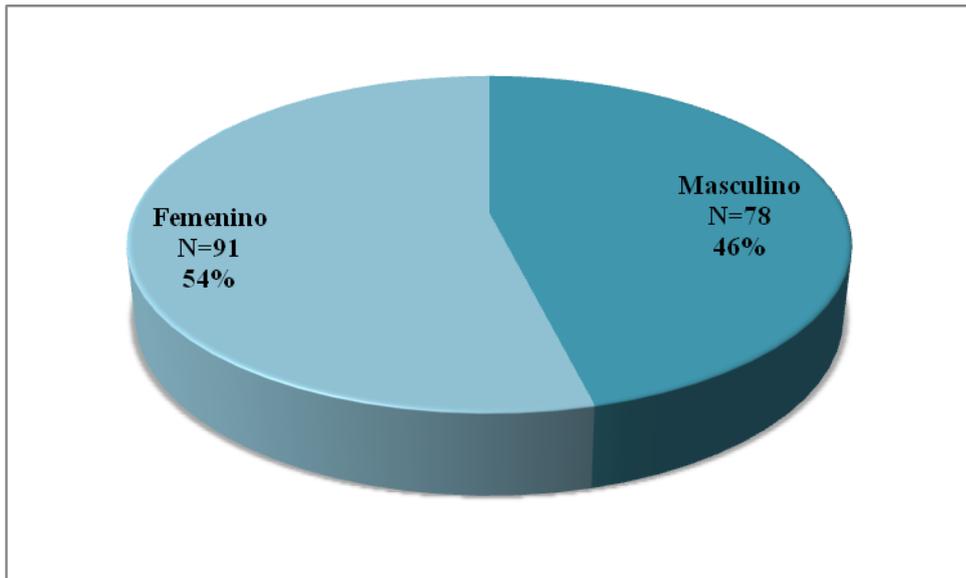


**Figura 9.-** Distribución por edades de los sujetos a valorar.

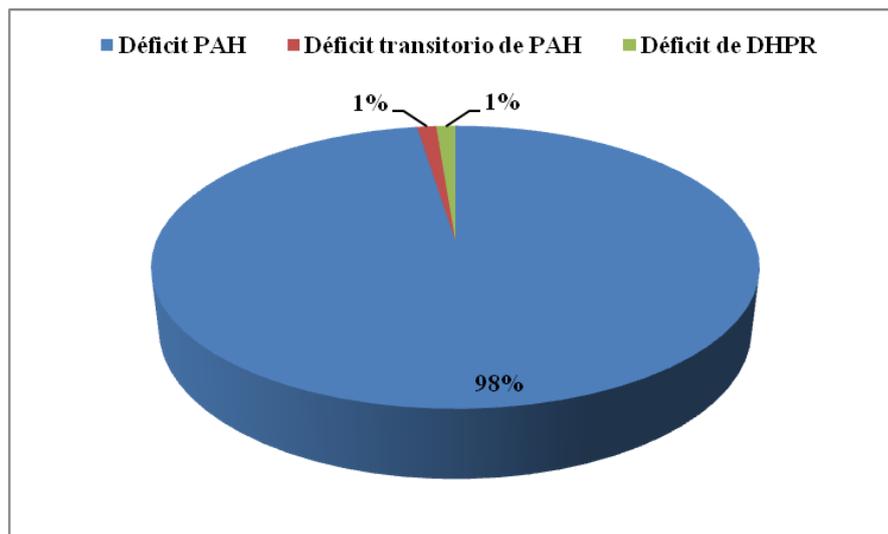
Todos los pacientes con HFA, 78 varones y 91 mujeres, pertenecían a la Comunidad Andaluza (Figura 10).

El diagnóstico final de dichos pacientes fue:

- Déficit de PAH: 165 pacientes
- Déficit transitorio de PAH: 2 pacientes.
- Déficit en el reciclaje de BH<sub>4</sub> (déficit de DHPR): 2 pacientes (Figura 11).



**Figura 10.-** Distribución por sexo de la población a estudiar



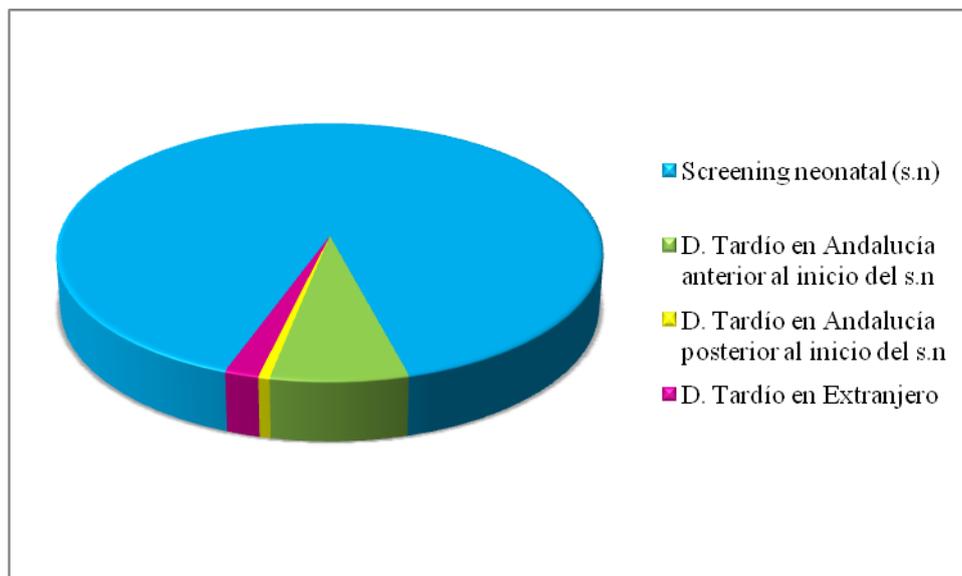
**Figura 11.-** Distribución de las distintas etiologías de HFA en la población de estudio.

El total de recién nacidos con déficit de PAH en Andalucía, tomando los datos de los 10 años previos, fue de 2 a 19 pacientes nuevos por año, lo cual representa una tasa media de 9 pacientes por cada 100.000 nacidos vivos (0,9:10.000 nacidos vivos). Estos datos indican que la tasa de portadores en la Comunidad Andaluza es de 1:55 habitantes. Los datos de natalidad y población en Andalucía son los correspondientes al año 2009 obtenidos del Instituto Nacional de Estadística<sup>118</sup>.

En estos 30 años recogidos se han detectado dos pacientes con defecto en la síntesis o reciclaje del cofactor y dos déficit transitorios de PAH.

Los 165 pacientes con déficit de PAH se diferenciaron, según la edad al diagnóstico, en:

- Diagnóstico precoz, aquellos pacientes diagnosticados antes de los 2 meses de vida: 149 pacientes.
- Diagnóstico tardío, a partir de los 2 meses de vida: 16 pacientes.
  - Por presentar retraso mental: 13 pacientes.
  - Familiares estudiados tras el diagnóstico de un hermano o familiar: 3 pacientes.



**Figura 12.-** Tiempo al diagnóstico y lugar de procedencia

Durante el período de estudio hubo un caso falso negativo, una PKUM en nuestra población de estudio. El resto de los casos de diagnóstico tardío corresponden a pacientes que nacieron antes de la implantación del *screening* neonatal o a pacientes nacidos en países en los que el protocolo de diagnóstico precoz no es universal y que posteriormente se trasladaron a nuestro medio (Tabla 12).

	Frecuencia	Porcentaje
<i>Screening neonatal (s.n )</i>	149	90,3
<b>D. Tardío en Andalucía anterior al inicio del s.n</b>	12	7,3
<b>D. Tardío en Andalucía posterior al inicio del s.n</b>	1	0,6
<b>D. Tardío en Extranjero</b>	3	1,8
<b>Total</b>	165	100

**Tabla 12.-** Tiempo al diagnóstico y lugar de procedencia

De los 149 pacientes con déficit de PAH diagnosticados por el *screening* neonatal, 148 eran neurológicamente normales tanto al nacer como en el momento del inicio del estudio en la consulta, entre los 11 y 30 días de vida.

Un paciente presentó, desde el nacimiento, rasgos dismórficos compatibles con SPKUM, malformaciones faciales, hipotonía global, ausencia de reflejos primarios y test de Apgar 2/4/6; esta clínica quedó justificada por presentar los progenitores consanguinidad de grado 1 y ser ambos PKU de diagnóstico tardío alojados en una institución para enfermos mentales.

Se considera diagnóstico tardío el realizado con una edad superior a los 2 meses de vida, pero la edad de los pacientes con deficiencia de PAH detectados posteriormente al *screening* neonatal se situó entre los 11 meses y los 19 años de edad. Según referían los progenitores o tutores legales, estos pacientes no presentaron ninguna incidencia al nacimiento ni en el período neonatal. La clínica al diagnóstico estos pacientes fue variable según su edad y sobre todo según su tolerancia a Phe:

- Pacientes estudiados por retraso mental: 13 pacientes con edades al diagnóstico entre los 11 meses y los 27 años de vida ( $5,96 \pm 7,14$ ). Todos presentaban graves trastornos cognitivos, del habla y del comportamiento. Tenían una tolerancia a Phe de 150 – 600 mg al día, ( $256 \pm 121,33$ ).
- Familiares de pacientes: Se detectaron 3 casos. Presentaban retraso mental asociado a trastornos del comportamiento, no filiado. Tenían una

edad comprendida entre 7 y 19 años de vida ( $11,66 \pm 6,42$ ). La tolerancia media, en mg/día, de Phe, se situaba en el rango 200 – 280 mg/día ( $233,33 \pm 41,63$ ).

Los dos casos con déficit transitorio de PAH estuvieron hasta el diagnóstico y durante todo su período de observación asintomáticos, con buena ganancia estaturponderal, y exploraciones neurológicas normales. Fueron detectados por el *screening* neonatal con 3,6 y 2,7 mg/dL de Phe y los niveles de Phe se normalizaron espontáneamente a partir del 5º mes de vida. En el estudio genético realizado al nacimiento para confirmar el diagnóstico de HFA por déficit de PAH, no se detectó ninguna mutación en el gen *PAH* en uno de los pacientes, y el otro era portador de la mutación A403V, asociada al fenotipo más suave de la enfermedad.

En el período 1979-2009 se diagnosticaron 2 déficits de DHPR, a partir del *screening* neonatal. Ambas pacientes fueron neurológicamente normales tanto al nacer como en el momento del inicio del estudio a los 20 días de vida.

Se trataba de dos hermanas de ascendencia marroquí, con padres consanguíneos. La evolución de ambas hermanas ha sido muy dispar. La mayor de 13 años presenta un desarrollo neurológico adecuado a su edad, sin embargo la pequeña, con 7 años, tiene múltiples distonias y autismo con un tratamiento adecuado.

## **6.2. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DEL FENOTIPO DE LA POBLACIÓN ANDALUZA CON HFA.**

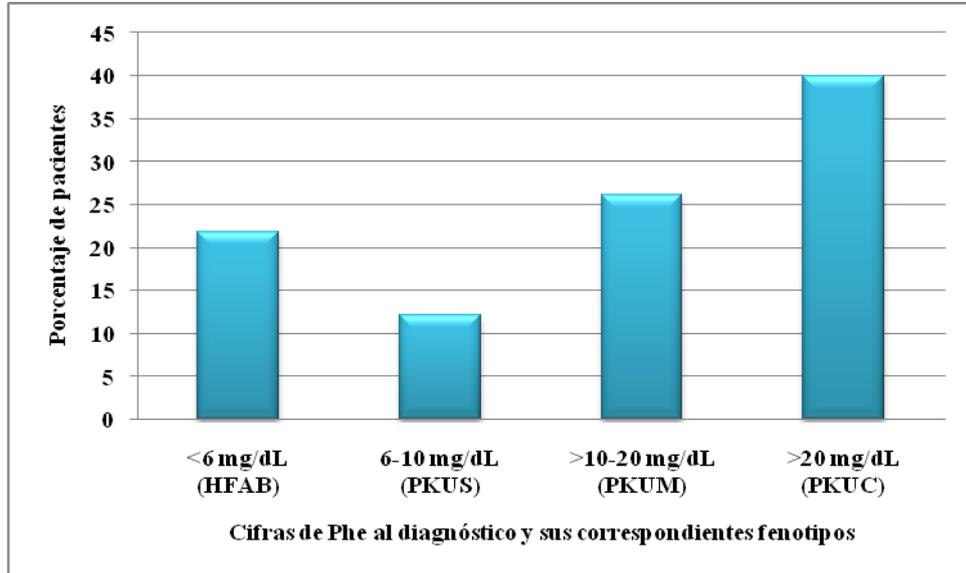
### **6.2.1 Cifras de Phe al diagnóstico en mg/dL.**

En la figura 13 y en la tabla 13 se aprecia que el fenotipo en función de las cifras de Phe al diagnóstico más frecuente en Andalucía es la PKUC que presenta el 40% de la muestra, seguido de la PKUM, la HFAB y la PKUS con un 26,1%, 21,8% y 12,1% respectivamente.

### **6.2.2 Tolerancia de Phe en la dieta.**

Los pacientes con HFA de la población en estudio presentaban tolerancias de Phe entre 120 mg/día y 1000 mg/día, ( $411,84 \pm 252,07$ ).

Con esta clasificación no fueron considerados 58 casos del total de 165 pacientes que constituían la muestra, por tener una tolerancia de Phe en la dieta < 250 mg/día.



**Figura 13.-** Porcentaje de fenotipos en función de las cifras de Phe (mg/dL) al diagnóstico.

	Frecuencia	Porcentaje
<6 mg/dL (HFAB)	36	21,8
6-10 mg/dL (PKUS)	20	12,1
>10-20 mg/dL (PKUM)	43	26,1
>20 mg/dL (PKUC)	66	40
<b>Total</b>	165	100

**Tabla 13.-** Cifras de Phe al diagnóstico agrupadas según los intervalos de Güttler (HFAB: Hiperfenilalaninemia Benigna; PKUS: Fenilcetonuria Suave; PKUM: Fenilcetonuria Moderada; PKUC: Fenilcetonuria Clásica).

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	250-350 mg/día	36	21,8	33,6
	>350-400 mg/día	22	13,3	20,6
	>400-600 md/día	11	6,7	10,3
	>600 mg/día	38	23,0	35,5
	Total	107	64,8	100,0
Perdidos	Sistema	58	35,2	
Total		165	100,0	

**Tabla 14.-** Tolerancia de Phe en mg/día aplicando los intervalos de Güttler.

Así mismo, se muestra en la tabla 15 una distribución de rangos para la tolerancia de Phe modificando la propuesta por Güttler, evitándose de esta manera que queden casos sin clasificar. Se aprecia en esta tabla que un 35,2% de los pacientes presentan cifras de tolerancia de Phe inferiores a 250 mg/día.

	Frecuencia	Porcentaje
<250 mg/día	58	35,2
250-350 mg/día	36	21,8
>350-400 mg/día	22	13,3
>400-600 mg/día	11	6,7
>600-800 mg/día	17	10,3
>800 mg/día	21	12,7
Total	165	100,0

**Tabla 15.-** Tolerancia de Phe mg/día ampliando los intervalos para su clasificación (Güttler adaptado).

### 6.2.3 Correlación de los niveles de Phe al diagnóstico con la tolerancia de Phe en la dieta en pacientes con déficit de PAH.

Para evitar posibles sesgos producidos por la coincidencia de otras patologías asociadas sólo se seleccionaron para este estudio los valores de los 149 pacientes que se diagnosticaron en el *screening* neonatal. Se compararon retrospectivamente los niveles de Phe al diagnóstico (pre-tratamiento) con la tolerancia.

La correlación entre la Phe al diagnóstico y la tolerancia, medida mediante el coeficiente de correlación de los rangos de Spearman, fue significativa ( $r = - 0,837$ ;  $p < 0,01$ ).

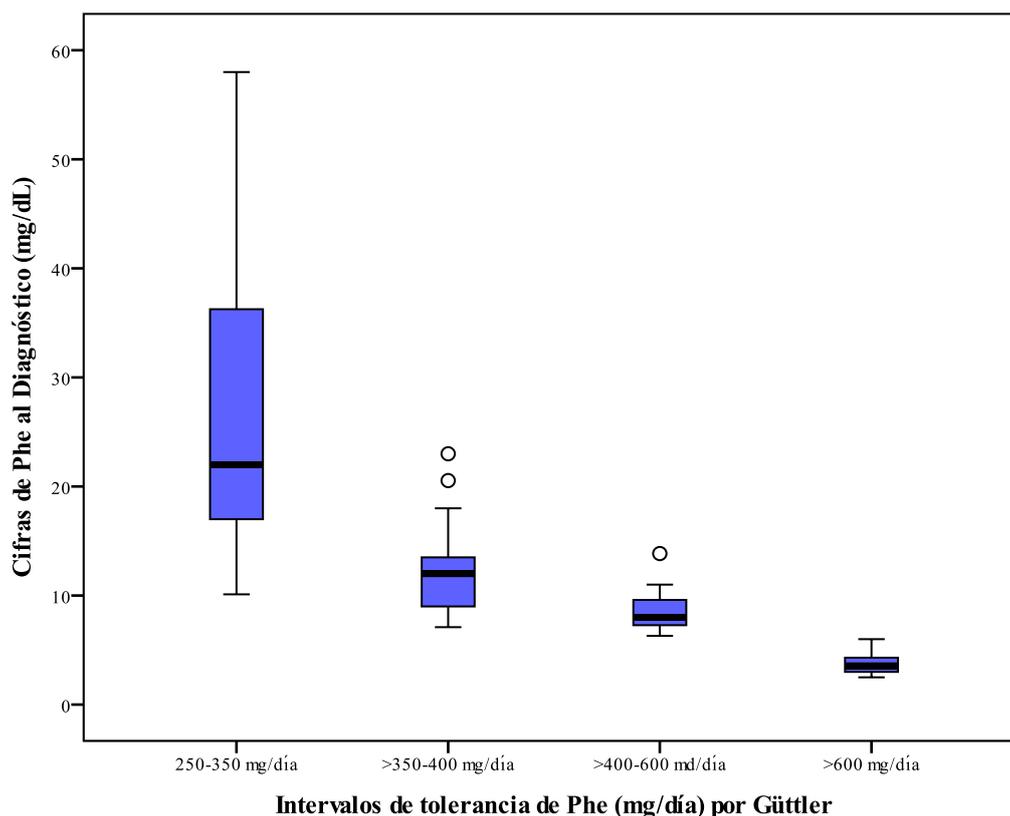
De los 149 casos el 32,2% (N=48) no fueron considerados en la clasificación por presentar una tolerancia de Phe en la dieta  $< 250$  mg/dL, y la clasificación de Güttler parte de una tolerancia de 250 mg/día de Phe.

	Relación Phe al Diagnóstico (mg/dL)/Intervalos de tolerancia de Phe en mg/día por Güttler			
	250-350 mg/día	>350-400 mg/día	>400-600 mg/día	>600 mg/día
Frecuencia	31	21	11	38
Porcentaje	30,7	20,8	10,9	37,6
(Md $\pm$ S.D)	(25,45 $\pm$ 12,28)	(11,82 $\pm$ 4,34)	(8,48 $\pm$ 2,25)	(3,73 $\pm$ 0,96)
Mínimo-Máximo	10 - 58	7 - 23	6 - 14	3 - 6
P50 [P25-P75]	22 [17-37,51]	12 [8,74-13,75]	8 [7,2-9,7]	3,55 [3-4,35]

Md: Media; S.D: Desviación estándar.

**Tabla 16.-** Relación entre la Phe al Diagnóstico y los intervalos de tolerancia de Phe por Güttler.

En la tabla 16 se aprecia que aplicando los intervalos de Güttler el grupo con mayor prevalencia (37,6%), entre los 149 pacientes con HFA valorados, es el compuesto por los que toleran más de 600 mg de Phe al día. Mientras que el grupo con tolerancia entre 250 - 350 mg al día de Phe ocupaba el segundo puesto con un 31% de casos.



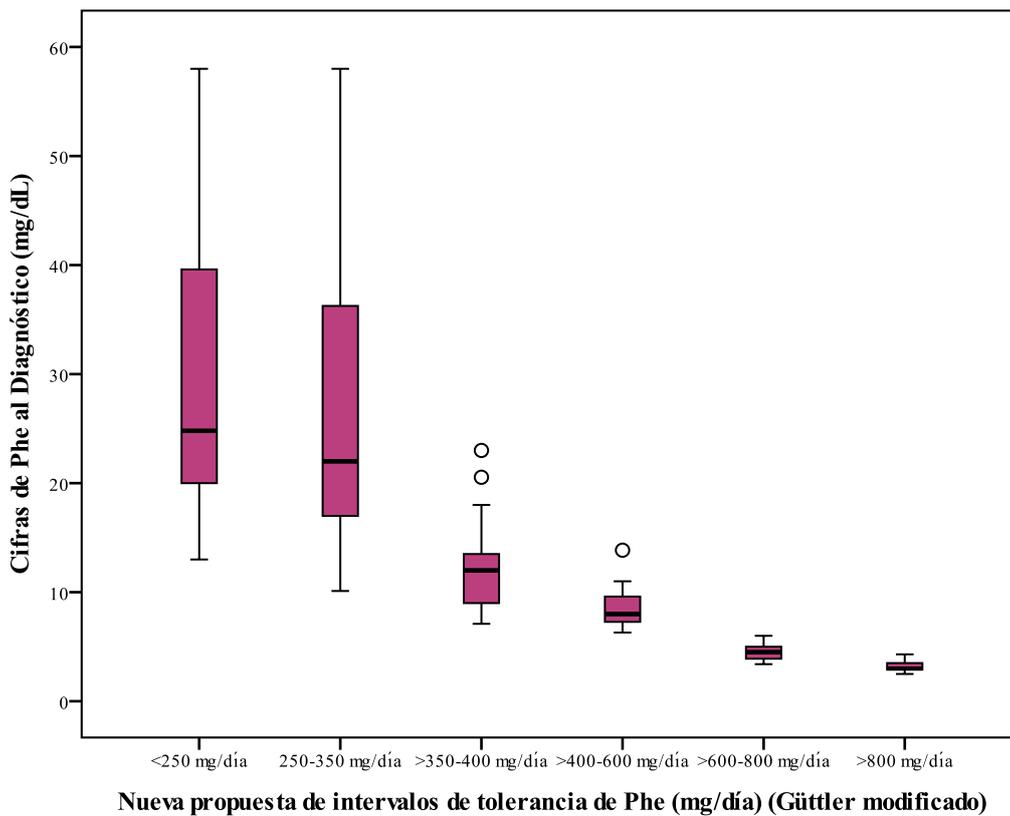
**Figura 14.-** Tolerancia de Phe en mg/día aplicando los intervalos de Güttler.

En la tabla 17 se recogen los datos de la relación de los niveles de Phe al diagnóstico con la tolerancia de Phe en mg/día, repartidos de modo alternativo a la clasificación propuesta por Güttler (Güttler modificado). Se ha añadido un intervalo para los pacientes con tolerancia < 250 mg/día de Phe, otro para los pacientes con tolerancia entre 600 y 800 mg/día de Phe y un último para aquellos con tolerancia > 800 mg/día, ampliando de este modo el número de intervalos para facilitar la clasificación de todos los pacientes con HFA que se incluyeron para esta valoración.

En esta tabla, con la nueva distribución de intervalos de tolerancia de Phe en la dieta, vemos que el fenotipo más frecuente según la tolerancia de Phe es el de PKUC, al registrar los datos no incluidos con la clasificación de Güttler. Observamos en la misma, que en la población estudiada, el 32,2% presenta una tolerancia a Phe en mg/día en la dieta < 250 mg/día, siendo este el grupo de población mayoritario.

Relación Phe al Diagnóstico (mg/dL)/Intervalos de tolerancia de Phe en mg/día (Güttler modificado)						
	<250 mg/día	250-350 mg/día	>350-400 mg/día	>400-600 mg/día	>600-800 mg/día	>800 mg/día
Frecuencia	48	31	21	11	17	21
Porcentaje	32,2	20,8	14,1	7,4	11,4	14,1
(Md ± D.S.)	(28,01 ± 12,13)	(25,42 ± 12,28)	(11,82 ± 4,34)	(8,48 ± 2,25)	(4,5 ± 0,89)	(3,16 ± 0,5)
Mínimo-Máx	13 -58	10 - 58	7- 23	6 - 14	3 - 6	3 - 4
P50 [P25-P75]	224,8 [20-39,8]	22 [17-37,51]	12 [8,74-13,75]	8 [7,2-9,7]	4,5 [3,75-5,35]	3 [2,8-3,6]

**Tabla 17.-** Relación de los niveles de Phe al diagnóstico con la tolerancia de Phe en la dieta. (Güttler modificado).



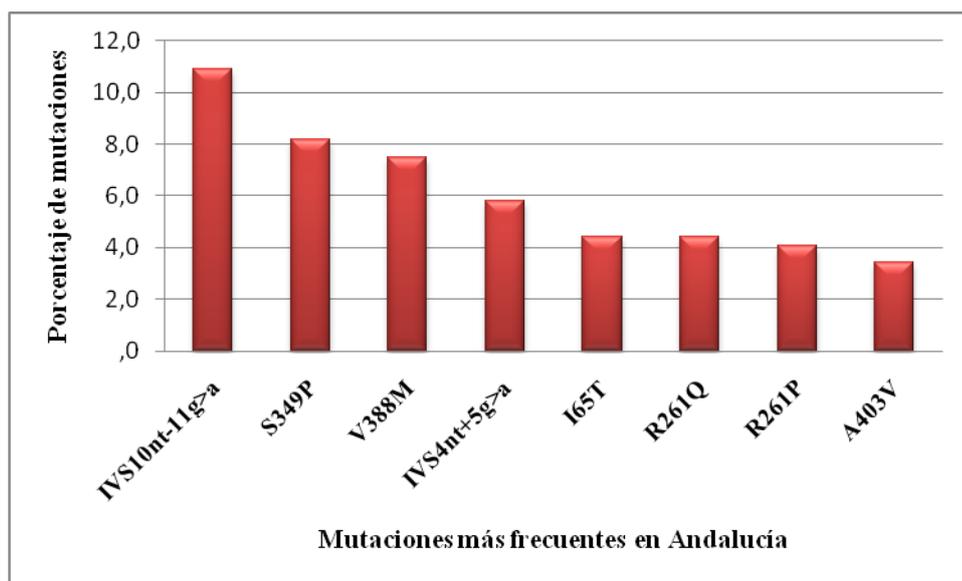
**Figura 15.-** Tolerancia de Phe en mg/día con nueva propuesta de rangos para la tolerancia de Phe (Güttler modificado).

No obstante, se ha analizado también si existía correlación entre las cifras de Phe en el momento del diagnóstico de los 16 pacientes PKU detectados tardíamente con la tolerancia que éstos presentaron, obteniéndose una correlación significativa [Coeficiente de correlación de Spearman ( $r = -0,676$ ;  $p < 0,01$ )].

### **6.3 RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DEL GENOTIPO DE LA POBLACIÓN ANDALUZA CON PKU.**

Se ha determinado el genotipo en 147 pacientes diagnosticados de déficit de PAH en nuestra Unidad. Dicho estudio ha sido realizado en el Centro de Enfermedades Moleculares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. El resto se trata de pacientes a los que no se ha realizado el genotipo por estar diagnosticados antes de la realización universal del genotipo y no acuden actualmente a la consulta, o estar pendientes de la autorización de la Comisión de Genética, creada en el último año en nuestro Hospital, para la realización del mismo. En 6 pacientes no se pudo detectar la segunda mutación causante del déficit de PAH, lo que supone un 2% del total.

Se han observado 71 mutaciones distintas en la población andaluza con HFA por déficit de PAH. Por orden de frecuencia las que aparecen en mayor número de pacientes son la IVS10nt11 g>a (10,9%), la S349P (8,2%), la V388M (7,5%) y la IVS4nt-5g>a (5,8%), I65T y R261Q (4,4%), R261P (4,1%) y A403V (3,8%).



**Figura 16-** Mutaciones más frecuentes en nuestra población y porcentaje de cada una.

En la siguiente tabla se muestran las mutaciones detectadas asociadas al fenotipo del paciente.

Mutación	Nº	Fenotipo			
		<i>HFAB</i>	<i>PKUS</i>	<i>PKUM</i>	<i>PKUC</i>
no detectadas	6	4	0	1	1
A104D	1	0	0	1	0
A300S	4	3	1	0	0
A306	1	1	0	0	0
A309V	2	0	0	1	1
A403V	10	9	0	1	0
A47V	2	2	0	0	0
C217G	1	0	1	0	0
C717G	1	1	0	0	0
D145N	1	1	0	0	0
D145V	1	1	0	0	0
D415N	2	2	0	0	0
del F39	2	1	0	1	0
E178G	2	2	0	0	0
E280K	3	1	0	0	2
E390G	5	2	3	0	0
E66K	1	0	1	0	0

Continuación

Mutación	N°	Fenotipo			
		HFAB	PKUS	PKUM	PKUC
F39L	1	0	0	0	1
F55 fs	1	0	0	0	1
F55L	4	2	2	0	0
G272X	3	0	0	1	2
G289R	2	0	1	0	1
G352fs del	2	0	1	1	0
G46S	2	0	1	1	0
I421T	1	1	0	0	0
I65T	13	2	3	3	5
IVS10nt-11g>a	32	3	2	8	19
IVS12nt+1g>a	9	0	0	1	8
IVS4nt-5c>g	1	0	0	0	1
IVS1nt+5g>t	4	0	1	2	1
IVS2nt5g>a	1	0	1	0	0
IVS4nt+5g>a	17	0	2	8	7
IVS8nt-7a>g	4	0	0	1	3
L258P	2	0	2	0	0
L348V	2	0	0	1	1
R281L	2	1	1	0	0
N438fs	1	0	0	0	1
N61K	1	0	1	0	0
P122S	1	1	0	0	0
P275R	1	0	0	1	0
P281L	3	0	0	0	3
P362T	3	1	1	0	1
Q20X	1	0	0	0	1
Q304Q	6	0	1	0	5
R155C	1	0	1	0	0
R158Q	5	0	0	2	3
R176L	1	1	0	0	0
R176X	1	0	0	1	0
R241H	2	2	0	0	0
R243Q	5	1	0	1	3
R243X	2	0	0	0	2
R252Q	2	0	0	1	1
R256Q	1	0	0	1	0
R261P	13	1	0	7	5

*Continuación*

Mutación	Nº	Fenotipo			
		<i>HFAB</i>	<i>PKUS</i>	<i>PKUM</i>	<i>PKUC</i>
R261Q	13	4	0	4	5
R261X	1	0	0	0	1
R265Q	1	1	0	0	0
R281L	1	0	0	0	1
R408W	7	1	0	3	3
R68S	9	2	1	2	4
S349P	24	4	1	6	13
S87R	1	0	1	0	0
S88R	1	1	0	0	0
T380M	1	1	0	0	0
V230I	1	1	0	0	0
V245A	1	1	0	0	0
V388M	22	2	4	7	9
Y198fs	1	0	0	0	1
Y204X	4	0	0	1	3
Y206X	1	0	0	1	0
Y414C	8	1	2	4	1

**Tabla 18.-** Mutaciones detectadas en la población andaluza con déficit de PAH estudiada en nuestra Unidad y frecuencia de cada una de ellas.

En la Tabla 19 se muestran los 123 genotipos distintos que se encontraron en nuestros pacientes y su fenotipo. Las actividades descritas para cada mutación corresponden a las que han sido determinadas *in vitro*, publicadas y recopiladas en la página gen *PAH* recopiladas por la *PAH Mutation Analysis Consortium* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>). Según se indica en esta página, estas actividades *in vitro* se han realizado por distintos métodos y no siempre coinciden unos resultados con otros. Asimismo, hay mutaciones cuya actividad residual parece baja, pero se activa con rapidez en presencia de Phe o BH<sub>4</sub> y tienen finalmente una actividad prácticamente del 100%.

<i>Mutación A</i>	<i>Actividad A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Actividad B</i>	<i>Nº</i>	<i>Fenotipo</i>
<b>A104D</b>	26-67%	<b>R158Q</b>	3-15%	1	PKUM
<b>A300S</b>		<b>E390G</b>	85%	1	HFAB
<b>A300S</b>		<b>P362T</b>		1	HFAB
<b>A300S</b>		<b>Q304Q</b>		1	PKUS
<b>A403V</b>	100%	<b>I65T</b>	30%	1	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>nd</b>		1	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>R261Q</b>	47%	1	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>S349P</b>	0%	1	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>V388M</b>	43%	2	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>E178G</b>		1	HFAB
<b>A403V</b>	100%	<b>R261Q</b>	47%	2	PKUM (1) HFAB (1)
<b>A403V</b>	100%	<b>R265Q</b>		1	HFAB
<b>A47V</b>	16%	<b>E178G</b>		1	HFAB
<b>A47V</b>	40%	<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	1	HFAB
<b>C217G</b>		<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	1	PKUS
<b>D145N</b>	Nueva	<b>P122S</b>	Nueva	1	HFAB
<b>D145V</b>		<b>nd</b>		1	HFAB
<b>del F39</b>	20%	<b>F55L</b>		1	HFAB
<b>del F39</b>	20%	<b>R176X</b>		1	PKUM
<b>E280K</b>	0%	<b>V388M</b>	43%	1	PKUC
<b>E390G</b>	85%	<b>V388M</b>	43%	1	PKUS
<b>E66K</b>	Nueva	<b>S349P</b>	0%	1	PKUS
<b>F39L</b>	50%	<b>R408W</b>	0%	1	PKUC
<b>G272X</b>	0%	<b>G289R</b>	Nueva	1	PKUC
<b>I65T</b>	30%	<b>P275R</b>		1	PKUM
<b>I65T</b>	30%	<b>R158Q</b>	3-15%	1	PKUM
<b>I65T</b>	30%	<b>A309V</b>	70%	1	PKUC
<b>I65T</b>	30%	<b>F55L</b>		1	PKUS
<b>I65T</b>	30%	<b>IVS4nt+5g&gt;t</b>		1	HFAB
<b>I65T</b>	30%	<b>Q304Q</b>		2	PKUC
<b>I65T</b>	30%	<b>V388M</b>	43%	1	PKUS
<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	<b>G352fs del</b>		1	PKUM
<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	<b>I65T</b>	30%	1	PKUM
<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	0%	6	PKUC (4) PKUM (2)

## Continuación

<i>Mutación A</i>	<i>Actividad A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Actividad B</i>	<i>Nº</i>	<i>Fenotipo</i>
IVS10nt-11g>a	0%	N61K		1	PKUS
IVS10nt-11g>a	0%	P362T		1	PKUC
IVS10nt-11g>a	0%	R243Q	10%	1	PKUC
IVS10nt-11g>a	0%	R243X	<0,2%	1	PKUC
IVS10nt-11g>a	0%	T380M		1	HFAB
IVS12nt+1g>a	0%	G272X	0%	1	PKUC
IVS12nt+1g>a	0%	IVS12nt+1g>a	0%	3	PKUC
IVS12nt+IG>A	0%	R68S	76%	1	PKUM
IVS1nt+5g>t		E390G	85%	1	PKUS
IVS1nt+5g>t		R261Q	47%	2	PKUC (1) PKUM (1)
IVS2nt5g>a		I65T	30%	1	PKUS
IVS4+5g>t		IVS8-7a>g		1	PKUC
IVS4nt+5c>g		IVS12nt1g>a	0%	1	PKUC
IVS4nt+5g>a		R243Q	10%	1	PKUC
IVS4nt+5g>t		E390G	85%	1	PKUS
IVS4nt+5g>t		IVS10nt-11g>a	0%	2	PKUM
IVS4nt+5g>t		IVS4nt5g>t		1	PKUC
IVS4nt+5g>t		nd		1	PKUM
IVS4nt+5g>t		V388M	43%	5	PKUC (1) PKUM (4)
IVS4nt+5g>t		Y414C	80%	1	PKUM
IVS4nt5+g>t		R256Q		1	PKUM
L258P	Nueva	L258P	Nueva	1	PKUS
L348V	44%	R252Q	3%	1	PKUC
L348V	44%	R261Q	47%	1	PKUM
MII		F55L		2	PKUS (1) HFAB (1)
N438fs	0%	R158Q	3-15%	1	PKUC
P281L	0%	P281L	0%	1	PKUC
P281L	0%	S349P	0%	1	PKUC
Q304Q		Q304Q		1	PKUC
R155C	Nueva	G289R	Nueva	1	PKUS
R158Q	3-15%	IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
R158Q	3-15%	R261Q	47%	1	PKUC
R176L	20-40%	E280K	0%	1	HFAB

## Continuación

<i>Mutación A</i>	<i>Actividad A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Actividad B</i>	<i>Nº</i>	<i>Fenotipo</i>
R241H		I421T		1	HFAB
R241H		S349P	0%	1	HFAB
R243Q	10%	A300S		1	HFAB
R243Q	10%	IVS10nt-11g>a	0%	2	PKUC (1) PKUM (1)
R243X	0,20%	IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
R261P	32%	I65T	30%	2	PKUC
R261Q	47%	D415N	72-100%	1	HFAB
R261Q	47%	E390G	85%	1	HFAB
R261Q	47%	F55 fs		1	PKUC
R261Q	47%	IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
R261Q	47%	R261P	32%	3	PKUM
R261Q	47%	S349P	0%	1	PKUC
R261Q	47%	E280K	0%	1	PKUC
R261Q	47%	R408W	0%	1	PKUC
R261X		IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
R281L		Q20X		1	PKUC
R408W	0%	R252Q	3%	1	PKUM
R408W	0%	R408W	0%	2	PKUC
R68S	76%	A306		1	HFAB
R68S	76%	D415N	72-100%	1	HFAB
R68S	76%	IVS4nt+5g>t		1	PKUC
R68S	76%	P362T		1	PKUS
S349P	0%	IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
S349P	0%	nd		1	HFAB
S349P	0%	Q304Q		1	PKUC
S349P	0%	R261Q	47%	2	PKUM
S349P	0%	S349P	0%	5	PKUM
S349P	0%	V388M	43%	2	PKUC
S349P	0%	Y198fs		1	PKUC
S87R	82%	G352fs delG		1	PKUS
S88R		Y414C	80%	1	HFAB
T380M		IVS10nt-11g>a	0%	1	HFAB
V230I	50-65%	R408W	0%	1	HFAB
V245A	63%	C717G		1	HFAB

*Continuación*

<i>Mutación A</i>	<i>Actividad A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Actividad B</i>	<i>Nº</i>	<i>Fenotipo</i>
V388M	43%	IVS10nt-11g>a	0%	1	PKUC
V388M	43%	IVS8nt-7a>g		3	PKUC (2) PKUM (1)
V388M	43%	nd		1	PKUC
V388M	43%	R261Q	47%	1	PKUC
V388M	43%	V388M	43%	1	PKUM
V388M	43%	Y414C	80%	1	PKUM
Y204X		R68S	76%	4	PKUC (2) PKUM (2)
Y206X		A309V	70%	1	PKUM
Y414C	80%	G272X	0%	1	PKUM
Y414C	80%	G46S	0%	2	PKUM
Y414C	80%	IVS4nt+5g>t		1	PKUS
Y414C	80%	nd		1	PKUC

nd: no detectada

**Tabla 19.-** Genotipo de los pacientes con deficiencia de PAH y su fenotipo

El 87% de los genotipos son heterocigotos. Se muestran en la siguiente tabla las mutaciones en homocigosis.

<i>Mutación A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Fenotipo</i>
V388M	V388M	1 PKUM
S349P	S349P	5 PKUM
R408W	R408W	2 PKUC
R261Q	R261Q	3 PKUM
Q304Q	Q304Q	1 PKUC
P281L	P281L	1 PKUC
L258P	L258P	1 PKUS
IVS4nt+5g>t	IVS4nt5g>t	1 PKUC
IVS12nt+1g>a	IVS12nt+1g>a	3 PKUC
IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	4 PKUC 2 PKUM

**Tabla 20.-** Genotipos con mutaciones en homocigosis.

De los 123 genotipos distintos sólo 19 de ellos se repiten en más de una ocasión. Entre estos se encontraban 7 familias.

<i>Mutación A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Parentesco</i>
A403V	V388M	2 HFAB	Hermanos
A403V	R261Q	1 PKUM 1 HFAB	No
I65T	Q304Q	2 PKUC	No
IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	4 PKUC 2 PKUM	No
IVS12nt+1g>a	IVS12nt+1g>a	3 PKUC	No
IVS1nt+5g>t	R261Q	1 PKUC 1 PKUM	Hermanos
IVS4nt+5g>t	IVS10nt-11g>a	2 PKUM	No
IVS4nt+5g>t	V388M	1 PKUC 4 PKUM	No
M1I	F55L	1 PKUS 1 HFAB	Hermanos
R243Q	IVS10nt-11g>a	1 PKUC 1 PKUM	No
R261P	I65T	2 PKUC	Hermanos
R261Q	R261P	3 PKUM	No
R408W	R408W	2 PKUC	No
S349P	R261Q	2 PKUM	No
S349P	S349P	5 PKUM	No
S349P	V388M	2 PKUC	No
V388M	IVS8nt-7a>g	2 PKUC 1 PKUM	Hermanos
Y204X	R68S	2 PKUC 2 PKUM	Hermanos
Y414C	G46S	2 PKUM	Hermanos

**Tabla 21.-** Genotipos repetidos.

Se recogen a continuación los genotipos iguales en los que el fenotipo es distinto.

<i>Mutación A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Fenotipo</i>
A403V	R261Q	1 PKUM 1 HFAB
IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	4 PKUC 2 PKUM
IVS1nt+5g>t	R261Q	1 PKUC 1 PKUM
IVS4nt+5g>t	V388M	1 PKUC 4 PKUM
M1I	F55L	1 PKUS 1 HFAB
R243Q	IVS10nt-11g>a	1 PKUC 1 PKUM
V388M	IVS8nt-7a>g	2 PKUC 1 PKUM
Y204X	R68S	2 PKUC 2 PKUM

**Tabla 22.-** Genotipos iguales con fenotipos distintos.

Se han detectado 7 mutaciones nuevas en nuestra población.

<i>Mutación A</i>	<i>Actividad A</i>	<i>Mutación B</i>	<i>Actividad B</i>	<i>Nº</i>	<i>Fenotipo</i>
G272X	0%	G289R	Nueva	1	PKUC
R155C	Nueva	G289R	Nueva	1	PKUS
L258P	Nueva	L258P	Nueva	1	PKUS
E66K	Nueva	S349P	0%	1	PKUS
D145N	Nueva	P122S	Nueva	1	HFAB
R241H	23%	I421T	Nueva	1	HFAB

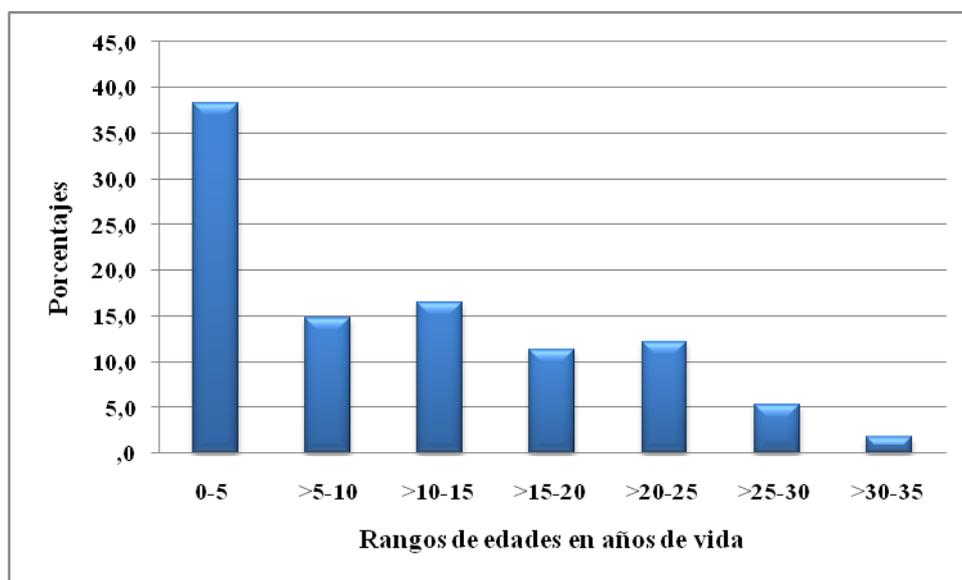
**Tabla 23.-** Nuevas mutaciones detectadas en Andalucía.

## **6.4. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL TEST DE SENSIBILIDAD A BH<sub>4</sub>.**

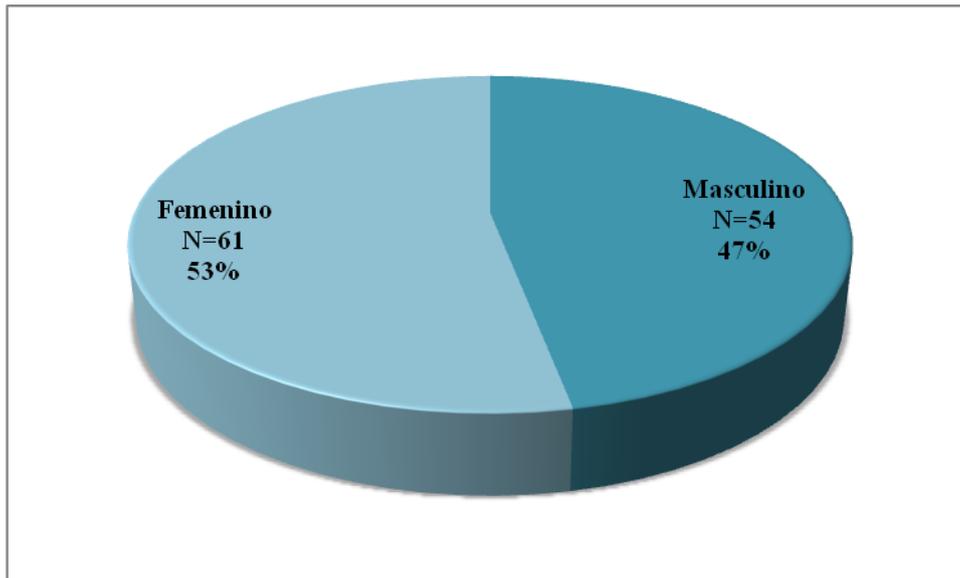
### **6.4.1. Datos descriptivos de la población a la que se le ha realizado el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>**

El test para valorar la susceptibilidad de ser tratado con BH<sub>4</sub> en pacientes con HFA por déficit de PAH se ha realizado en 118 sujetos. 3 de ellos presentaron vómitos durante la realización del test, por lo han sido excluidos. De los 115 restantes el 47% fueron varones con edades comprendidas entre 31 días y 33 años de vida (media: 10,14 ± 8,08 años de vida) y cifras de Phe al diagnóstico entre 3 y 58 mg/dL (19,98 ± 13,47).

El 53% fueron mujeres cuyas edades se encontraban entre los 28 días y 31 años de vida (media: 11,15 ± 8,74 años de vida) y cifras de Phe al diagnóstico en rango igual al recogido en el grupo de varones (3 – 58 mg/dL; media: 19,98 ± 13,47).

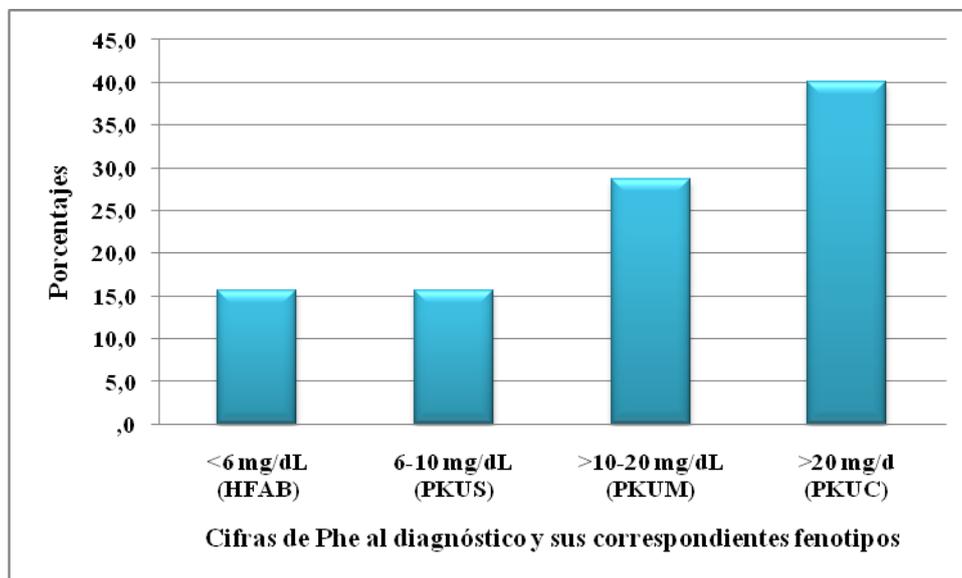


**Figura 17.-** Distribución por rangos de edad de los pacientes a los que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.



**Figura 18.-** Distribución por sexo de los pacientes a los que se les ha realizado el test de BH<sub>4</sub>.

En la siguiente figura se reflejan los fenotipos de los pacientes que formaron parte de este estudio.

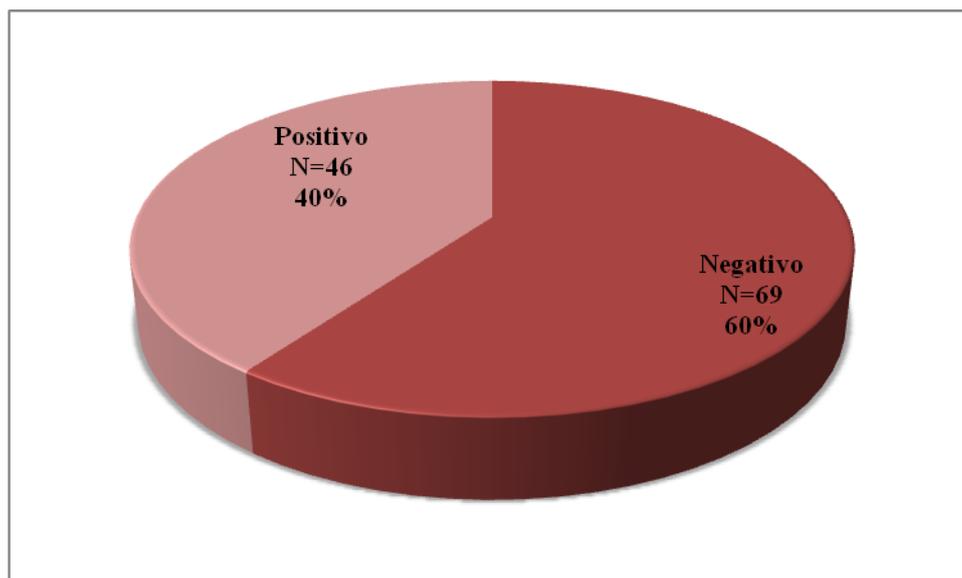


**Figura 19.-** Fenotipo de los pacientes a los que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

	Frecuencia	Porcentaje
<6 mg/dL (HFAB)	18	15,7
6-10 mg/dL (PKUS)	18	15,7
>10-20 mg/dL (PKUM)	33	28,7
>20 mg/dL (PKUC)	46	40
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>100,0</b>

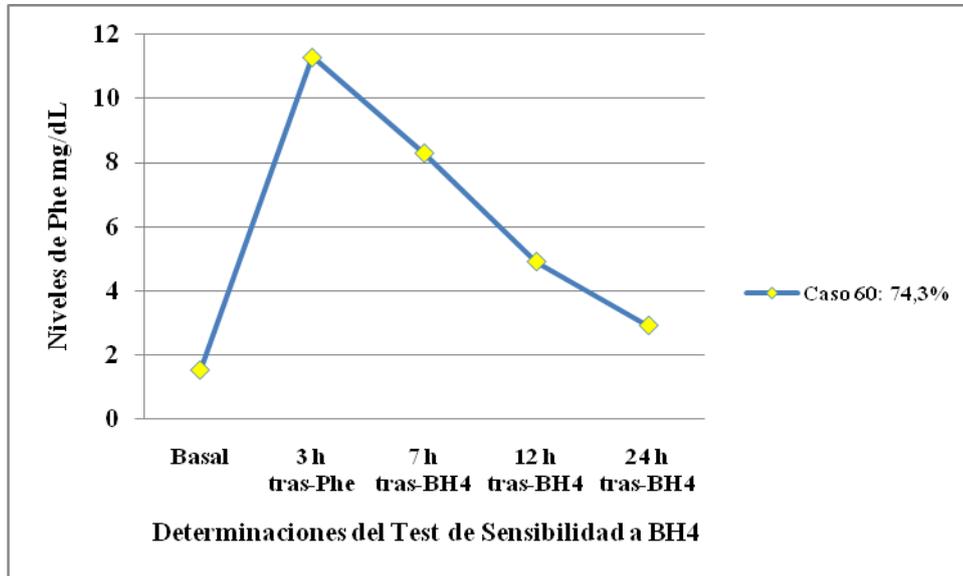
**Tabla 24.-** Fenotipo de los pacientes a los que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

El test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> fue positivo en 46 pacientes y negativo en 69.



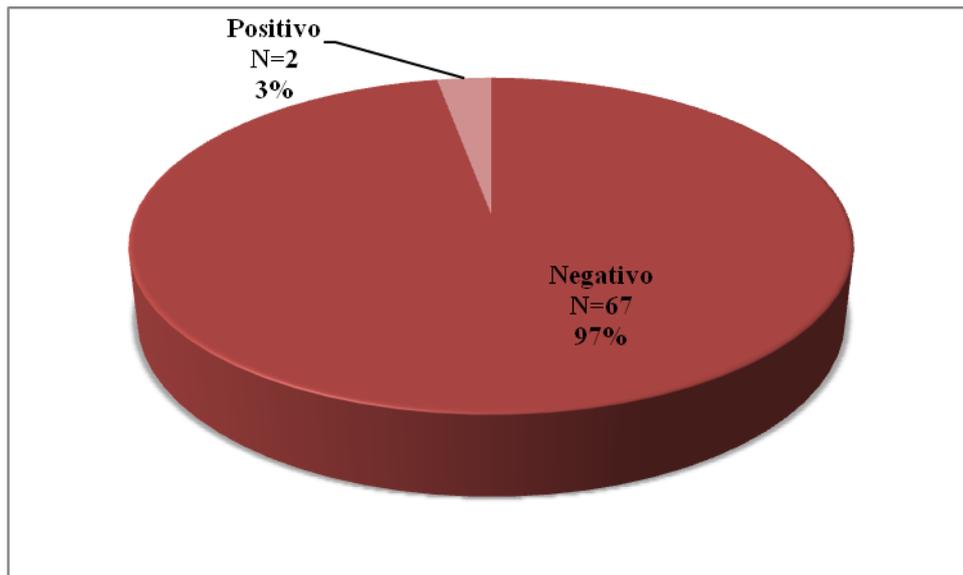
**Figura 20.-** Resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

Un caso con respuesta en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> del 77,8% no obtuvo respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub> por lo que hubo que suspenderlo.



**Figura 21.-** Curva de respuesta a BH<sub>4</sub> del caso falso positivo

A todos los pacientes con resultado negativo en el test de BH<sub>4</sub> se les realizó una prueba con 20 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub> y PN en la cantidad recomendada para su edad por la OMS, durante una semana con el siguiente resultado:



**Figura 22.-** Porcentaje de respuesta a la prueba terapéutica

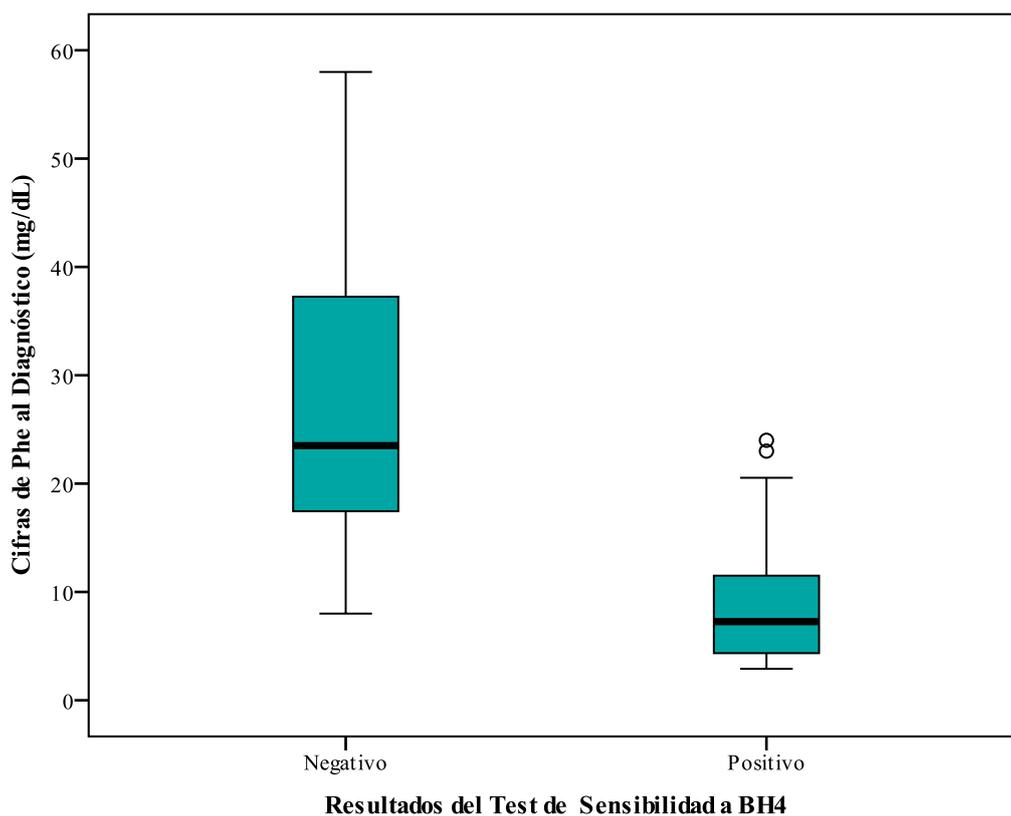
#### 6.4.2 Resultados de la relación de las cifras de Phe al diagnóstico con el resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

En la siguiente tabla se valora la relación de las cifras de Phe al diagnóstico (fenotipo) con el resultado obtenido en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> en cada paciente.

Relación de las cifras de Phe al diagnóstico (mg/dL) / Resultado test de sensibilidad a BH <sub>4</sub>		
	Negativo	Positivo
Frecuencia	67	48
Porcentaje	58,3	41,7
(Md ± D.S.) de Phe	(25,69 ± 12,12)	(8,21 ± 5,4)
Mínimo-Máximo de Phe	8 - 58	3 - 24
P50 [P25-P75]	23,52 [17 - 37,52]	7,25 [4,28 - 11,75]

**Tabla 25.-** Relación de los niveles de Phe al diagnóstico con el resultado del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> realizado en nuestra unidad.

Recogiéndose los datos de la relación de la cifra de Phe al diagnóstico con el resultado en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>. Se aprecia que, en aquellos pacientes con resultado negativo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, la media de cifras de Phe al diagnóstico es de 25,69 mg/dL. El valor mínimo que presentó este grupo de pacientes fue 8 mg/dL, y el máximo 58 mg/dL. Sin embargo en los pacientes con resultado positivo la media de Phe al diagnóstico fue 8,21 mg/dL situándose todos los pacientes en el rango 3 – 24 mg/dL de Phe.



**Figura 23.-** Se aprecia que el 50% de los pacientes con resultado negativo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> tienen al diagnóstico cifras de Phe > 23,66 mg/dL, y el 50% de los que tienen resultado positivo presentan niveles al diagnóstico inferiores a 7,8 mg/dL.

Para valorar la existencia o no de una relación significativa entre las cifras de Phe al diagnóstico y el resultado en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> se realizó la prueba T para muestras independientes, comprobando previamente que la distribución de contraste de la muestra era normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $Z=0,01$ ).

Tras confirmar la igualdad de varianzas entre las dos variables con la prueba de Levene ( $p=0,01$ ), se aplicó la prueba T para igualdad de medias obteniéndose que la relación entre las cifras de Phe al diagnóstico y el resultado del test de BH<sub>4</sub> es estadísticamente significativa ( $p=0,01$ ).

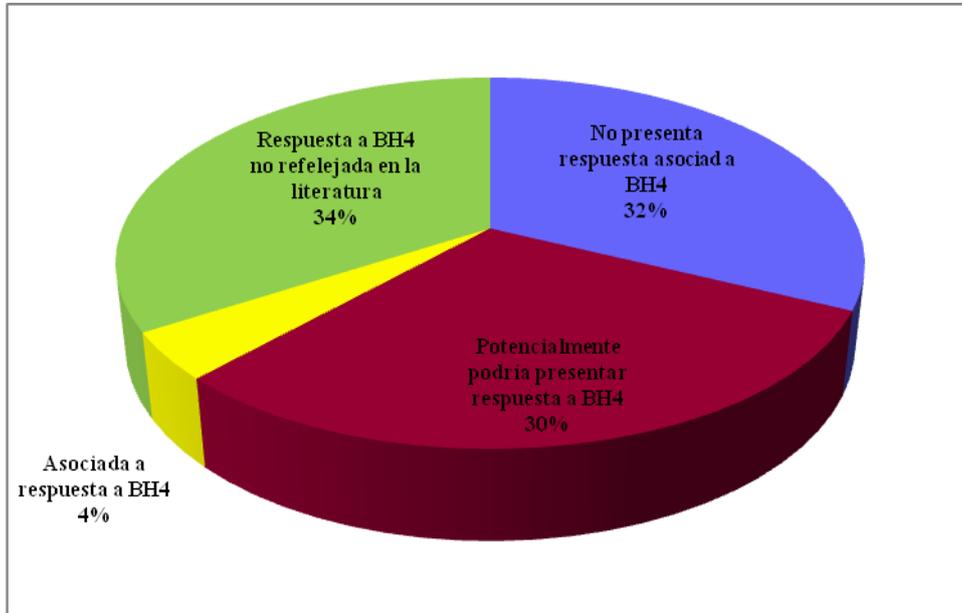
### 6.4.3 Resultados de la relación del genotipo con los resultados del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

Mutación A	Mutación B	Mutación A	Mutación B	Mutación A	Mutación B	Mutación A	Mutación B
S349P	IVS10nt-11g>a	Y414C	G272X	IVS10nt-11g>a	I65T	R68S	P362T
S349P	V388M	Y414C	IVS4nt+5g>a	IVS10nt-11g>a	P362T	R68S	IVS4nt+5g>a
S349P	Q304Q	Y414C	G46S	IVS10nt-11g>a	R243X	R68S	D415N
S349P	R261P	Y206X	A309V	I65T	no detectada	R408W	R252Q
R68S	P362T	Y204X	R68S	I65T	F55L	R408W	R408W
R68S	IVS4nt+5g>a	Y204X	R68S	I65T	R158Q	R281L	Q20X
R68S	D415N	V388M	A403V	I65T	A309V	R261X	IVS10nt-11g>a
R408W	R252Q	V388M	IVS10nt-11g>a	I65T	V388M	R261Q	S349P
R408W	R408W	V388M	R261P	I65T	Q304Q	R261Q	R408W
R281L	Q20X	V388M	IVS8nt-7a>g	I65T	P275R	R261Q	A403V
R261X	IVS10nt-11g>a	V388M	V388M	I65T	A403V	R261Q	R261P
R261Q	S349P	V388M	S349P	G272X	G289R	R261Q	IVS10nt-11g>a
R261Q	R408W	S87R	G352fs del	F39L	R408W	R261Q	R261P
IVS12nt+1g>a	R68S	S349P	IVS10nt-11g>a	E66K	S349P	R261Q	E280K
IVS10nt-11g>a	G352fs del	S349P	V388M	E390G	V388M	R261P	I65T
IVS10nt-11g>a	N61K	S349P	Q304Q	E280K	V388M	R243X	IVS10nt-11g>a
IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	S349P	R261P	del F39	R176X	R243Q	A300S
IVS4nt+5g>a	V388M	L348V	R261P	del F39	F55L	R241H	S349P
IVS4nt+5g>a	R243Q	L258P	L258P	D145V	no detectada	R241H	I421T
IVS4nt+5g>a	IVS8nt-7a>g	IVS4nt+5g>a	V388M	D145N	P122S	R176L	E280K
IVS4nt+5g>a	R256Q	IVS4nt+5g>a	IVS4nt+5g>a	C217G	IVS10nt-11g>a	R158Q	R261P
IVS4nt+5g>a	E390G	IVS4nt+5g>a	Y414C	A47V	IVS10nt-11g>a	R155C	G289R
IVS2nt5g>a	I65T	IVS4nt+5g>a	no detectada	A403V	R265Q	Q304Q	Q304Q
IVS1nt+5g>t	R261P	IVS4nt+5g>a	IVS10nt-11g>a	A300S	P362T	N438fs	R158Q
IVS1nt+5g>t	E390G	IVS12nt+1g>a	G272X	A300S	Q304Q	R281L	F55L
L348V	R252Q	IVS12nt+1g>a	IVS12nt+1g>a	A104D	R158Q		

**Tabla 26.-** Genotipos de pacientes PKU que han realizado el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> junto a la respuesta a BH<sub>4</sub> descrita en la literatura para cada mutación. En rojo: La mutación no está asociada a respuesta a BH<sub>4</sub>; en verde: la mutación está potencialmente asociada a respuesta a BH<sub>4</sub>; en azul: la mutación está asociada a respuesta a BH<sub>4</sub>; en negro: no está descrita la asociación a respuesta a BH<sub>4</sub>, en la literatura consultada, en el momento actual<sup>a</sup>.

a. Estos datos han sido tomados de las páginas [www.bh4.org](http://www.bh4.org) y [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)

El comportamiento respecto a la respuesta a BH<sub>4</sub>, de las mutaciones detectadas en la población a la que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, siguió la siguiente distribución:



**Figura 24.-** Porcentaje de mutaciones asociadas a respuesta a BH<sub>4</sub> en la población atendida en nuestra Unidad.

Comportamiento de las mutaciones respecto a BH <sub>4</sub>		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	No presenta respuesta asociada a BH <sub>4</sub>	70	32
	Potencialmente podría presentar respuesta a BH <sub>4</sub>	66	30,1
	Asociada a respuesta a BH <sub>4</sub>	9	4,1
	Respuesta a BH <sub>4</sub> no reflejada en la literatura	74	33,8
Total		219	100
Perdidos	Sistema	11	
Total		230	

**Tabla 27.-** Comportamiento de las mutaciones detectadas en nuestra población respecto a la respuesta a BH<sub>4</sub>.

Entre las mutaciones más frecuentes en Andalucía (Figura 16) ninguna presenta respuesta a BH<sub>4</sub> directamente, cuatro podrían presentar respuesta a BH<sub>4</sub> y las restantes no tienen respuesta asociada a BH<sub>4</sub>.

Mutaciones más frecuentes	Respuesta asociada a BH <sub>4</sub>	Nº
<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	No respuesta asociada a BH <sub>4</sub>	32
<b>S349P</b>	No respuesta asociada a BH <sub>4</sub>	24
<b>V388M</b>	Pontencialmente asociada a respuesta a BH <sub>4</sub>	22
IVS4nt+5g>a	No registrada en la literatura	17
<b>I65T</b>	Pontencialmente asociada a respuesta a BH <sub>4</sub>	13
<b>R261Q</b>	Pontencialmente asociada a respuesta a BH <sub>4</sub>	13
R261P	No registrada en la literatura	12
<b>A403V</b>	Pontencialmente asociada a respuesta a BH <sub>4</sub>	10

**Tabla 28.-** Mutaciones más frecuentes en nuestra población y su comportamiento respecto a la respuesta a BH<sub>4</sub>.

En la siguiente tabla se recogen todos los datos de los pacientes a los que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y tuvieron un resultado positivo.

NºI	Sexo	Edad	Phe Dx (mg/dL)	Tolerancia Phe (mg/día)	Mutación A	Mutación B	% Respuesta 24h
165	M	3	6,3	450	<b>I65T</b>	<b>F55L</b>	94,41
161	F	12	4,8	760	<b>V388M</b>	<b>A403V</b>	75
160	F	5	3,8	860	<b>V388M</b>	<b>A403V</b>	88,84
159	M	1	3,5	850	<b>R261Q</b>	<b>A403V</b>	72,52
157	M	4	6,4	600	S87R	G352fs del	75,52
156	M	4	9	300	<b>I65T</b>	<b>V388M</b>	53
153	F	21	7,1	400	<b>IVS10nt-11g&gt;a</b>	N61K	71,2
151	F	3	4,6	650	<b>I65T</b>	<b>A403V</b>	84,26
138	M	9	15,31	200	<b>L348V</b>	R261P	77,32
137	F	1	5	600	<b>R241H</b>	I421T	51,86
136	F	7	7,36	230	<b>IVS1nt+5g&gt;t</b>	<b>E390G</b>	79,18
132	M	4	13,85	420	IVS4nt+5g>a	no detectada	73,89
120	F	4	4,5	620	D145N	P122S	87,5
118	M	3	4,2	620	R176L	<b>E280K</b>	69,09

Continuación

NºI	Sexo	Edad	Phe Dx (mg/dL)	Tolerancia Phe (mg/día)	Mutación A	Mutación B	% Respuesta 24h
115	M	2	8,2	460	C217G	IVS10nt-11g>a	63,96
111	F	5	2,97	760	S349P	no detectada	81,23
109	F	23	15,7	240	R261Q	R261P	45,33
107	F	27	24	200	R68S	IVS4nt+5g>a	49,47
102	F	4	23	360	I65T	A309V	95,43
90	M	6	3,6	620	R261Q	A403V	91,64
84	F	3	12	300	IVS4nt+5g>a	Y414C	96,11
83	F	3	13,5	375	R261Q	R261P	72,31
82	M	17	17	280	IVS12nt+1g>a	R68S	41,72
81	F	15	9,7	320	E390G	V388M	53,42
78	M	9	3	700	R281L	F55L	87,32
77	M	15	7,2	460	R281L	F55L	79,2
76	F	16	17	360	Y414C	G272X	56,65
75	F	2	3,9	700	R243Q	A300S	91,85
74	M	12	14	360	Y414C	G46S	58,93
73	M	3	7,5	460	Y414C	G46S	78,22
71	F	22	11	450	R261Q	A403V	88,49
69	M	3	6	600	IVS4nt+5g>a	E390G	78,24
68	F	5	2,9	620	R68S	D415N	83,53
67	M	2	5,7	650	R241H	S349P	84,96
63	M	22	9,5	360	Y414C	IVS4nt+5g>a	59,85
53	F	4	4	450	A47V	IVS10nt-11g>a	53
49	F	4	3,8	650	D145V	no detectada	85,88
45	F	3	3,5	860	A300S	P362T	85,81
44	M	10	20,54	380	V388M	R261P	51,55
43	M	12	8,48	400	E66K	S349P	57,53
39	F	4	6	600	A300S	Q304Q	83,44
30	F	19	7,3	380	R68S	P362T	90,48
25	F	6	3,7	700	del F39	F55L	88,63
24	F	4	10,11	350	R261Q	R261P	57,73
15	M	5	4,5	680	A403V	R265Q	85,59
9	M	26	10,8	320	A104D	R158Q	58,27
6	M	10	8	420	R155C	G289R	51,17
86	M	0,14	13	460			90

**Tabla 29.-** Datos de los pacientes con deficiencia de PAH en los que se realizó el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>. M: Masculino; F: Femenino; NºI: Corresponde al número de identificación del paciente; Dx: Diagnóstico

Se ha sombreado en azul a los pacientes con respuesta positiva que siguieron tratamiento con BH<sub>4</sub> a largo plazo, en verde aquellos que tuvieron respuesta positiva tras la prueba terapéutica y que siguieron tratamiento con BH<sub>4</sub> a largo plazo. En blanco los que teniendo respuesta positiva no siguieron tratamiento con BH<sub>4</sub> por los motivos que se exponen a continuación. Finalmente se han subrayado en rosa los pacientes que tras 1,5 – 2 años de tratamiento no precisaron seguir con el mismo para mantener dieta sin restricción proteica.

En la tabla siguiente están registrados los pacientes que realizan tratamiento con BH<sub>4</sub> actualmente, junto a la dosis de BH<sub>4</sub> que precisan para poder realizar una dieta sin restricción proteica y los gramos de proteínas naturales por kilo de peso al día que están consumiendo.

NºI	% respuesta BH <sub>4</sub>	Dosis BH <sub>4</sub> (mg/Kg/día)	P.N pre- BH <sub>4</sub> (g/Kg/d)	P.N post- BH <sub>4</sub> (g/Kg/d)
24	58	17	0,64	1
25	89	5	1	2,5
43	58	19,3	0,7	2,5
44	52	10	0,5	1,2
63	60	5	1	3
67	85	7	0,5	1
69	78	7,8	0,6	2,7
71	88	5	0,8	1,5
73	78	12,6	0,39	2
74	59	10	0,33	1,5
76	57	15	0,24	2,5
81	53	10	0,3	2,5
82	42	16,2	0,2	1,5
83	72	18,5	0,39	1,5
84	96	20	0,6	2,7
90	92	6,2	0,74	1,8
102	95	9,6	0,5	0,9
107	49	15	1	2
109	45	10	0,7	1,5
136	79	14,3	0,8	2
138	77	15	0,5	1
156	53	20	1	1,7
165	94	5	1,5	3
86	90	7,5	0,78	2,7

**Tabla 30.-** Dosis de BH<sub>4</sub> (mg/Kg) y P.N pre y post BH<sub>4</sub> (g/Kg) al día en los pacientes que realizan tratamiento con BH<sub>4</sub>. (Los datos de sexo y edad que corresponden a estos pacientes están recogidos en la tabla anterior).

La dosis mínima que hemos llegado a utilizar permitiéndonos instaurar una dieta sin ningún tipo de restricción en Phe es de 5 mg/Kg/día y la máxima de 20 mg/Kg día, con una media de  $11,7 \pm 5,15$ . El 75% de los pacientes precisó dosis entre 5 – 15 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub>, siendo suficiente 5 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub> para 4 de estos pacientes. El 25% restante utilizó dosis > 15 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub>, siendo necesario en dos casos administrar la dosis máxima permitida para poder liberalizar completamente la alimentación.

Los motivos por los que 22 pacientes no realizan tratamiento con BH<sub>4</sub> con resultados positivo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> son los siguientes:

1. Pacientes varones con cifras de Phe al diagnóstico <6 mg/dL que durante los procesos intercurrentes precisaban realizar dieta restringida en proteínas para mantener niveles de Phe adecuados a su edad, y refirieron los padres dificultad para que realizaran la dieta, pero que no realizan tratamiento con BH<sub>4</sub> a largo plazo: 3 pacientes (Nº Identificación (Nº.I.: 15, 118, 159).
2. Pacientes con cifras de Phe al diagnóstico > 6 mg/dL que precisaron tratamiento con BH<sub>4</sub> pero que a los 1,5 – 2 años se retiró, continuando con alimentación normoproteica y controles adecuados de Phe: 3 pacientes (Nº.I.: 39, 132, 157).
3. Mujeres con HFAB y PKUS a las que se le realizó el test como medida futura, por si precisaran realizar dieta restringida en proteínas durante el embarazo y no se adhirieran a la misma, y que no precisan actualmente dieta restringida en proteínas: 13 pacientes (Nº.I.: 30, 45, 49, 53, 68, 75, 111, 120, 137, 151, 153, 160, 161).
4. Pacientes que se ha perdido el seguimiento: 3 pacientes (Nº.I.: 9, 78).

Podemos apreciar en la tabla 31 que el 78% de los pacientes con respuesta negativa en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> eran portadores de al menos una mutación no asociada a BH<sub>4</sub>. El 21% restante eran portadores de mutaciones cuya relación con la respuesta a BH<sub>4</sub> no ha sido determinada aún, pero que se podría hacer una aproximación a partir de los resultados obtenidos en este estudio.

Entre los pacientes con respuesta positiva al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (Tabla 29) por el contrario sólo eran portadores de mutaciones no asociadas a respuesta a BH<sub>4</sub> el

28%, y el 95% era portador de al menos una mutación asociada o potencialmente asociada a respuesta a BH<sub>4</sub>.

Todos los pacientes, menos un caso (29), con mutaciones potencialmente asociadas a BH<sub>4</sub> en los dos alelos, tuvieron una respuesta positiva al test.

Nº. I.	Sexo	Edad	Phe Dx (mg/dl)	Tolerancia Phe (mg/día)	Mutación A	Mutación B	% Respuesta
1	M	2	21	200	IVS10nt-11g>a	R243X	17,52
2	F	19	20	240	Y206X	A309V	23,57
5	F	28	22	230	V388M	nd	36,96
7	M	7	37	200	G272X	G289R	2,17
10	F	8	42	220	S349P	IVS10nt-11g>a	24,01
11	M	21	45	240	V388M	S349P	20,91
12	F	13	8	380	IVS2nt5g>a	I65T	27
21	F	3	9	360	L258P	L258P	21,78
26	F	31	20	200	R243Q	IVS10nt-11g>a	13,16
29	F	19	12	360	V388M	V388M	40,41
31	M	1	11,6	380	IVS4nt+5g>a	R256Q	-10,15
33	F	22	18,7	350	IVS10nt-11g>a	I65T	-4,52
35	M	17	40	200	IVS4nt+5g>a	IVS4nt+5g>a	21,96
36	M	10	39,2	220	N438fs	R158Q	28,3
37	M	22	27,9	250	IVS10nt-11g>a	P362T	37,18
38	M	23	33	250	F39L	R408W	14,2
40	F	2	13	300	I65T	R158Q	36,07
47	F	2	12	320	IVS4nt+5g>a	V388M	25,39
50	M	11	28,6	220	R261Q	IVS10nt-11g>a	30,75
54	M	25	16,8	350	I65T	P275R	17,53
55	F	22	58	220	R261P	I65T	0,14
57	F	3	13	360	IVS4nt+5g>a	V388M	-38,53
60	M	3	13	340	IVS4nt+5g>a	V388M	73,77
61	F	30	40	200	IVS4nt+5g>a	V388M	34,83
62	M	11	39,6	250	S349P	S349P	16,48
64	M	11	40	220	R261X	IVS10nt-11g>a	31,85
72	F	7	25	200	R261Q	S349P	24,19
88	F	7	44,4	220			15,6
92	F	6	21,8	280	R158Q	R261P	22,71
93	M	3	20	220	IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	18,68

Continuación

Nº. I	Sexo	Edad	Phe Dx (mg/dl)	Tolerancia Phe (mg/día)	Mutación A	Mutación B	% Respuesta
95	M	5	26	240	IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	18,27
96	F	6	15	220	IVS4nt+5g>a	IVS10nt-11g>a	18,46
98	M	34	30	260	E280K	V388M	22,69
99	F	6	21	200	L348V	R252Q	18,01
100	F	0,2	15	400			-6,62
104	M	10	25	240	IVS4nt+5g>a	IVS10nt-11g>a	35,12
105	M	11	35	300	S349P	V388M	25,27
106	F	25	38	300	Q304Q	Q304Q	11,6
108	M	2	23,8	220	IVS12nt+1g>a	G272X	-3,44
113	M	18	35	220	R261Q	R408W	23,27
114	F	11	37,51	250	IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	-1,78
116	M	14	22	320	S349P	S349P	-1,06
117	F	18	50	300	R243X	IVS10nt-11g>a	25,69
119	F	5	20,97	260	R281L	Q20X	3,74
123	F	3	14	240	del F39	R176X	3,26
125	F	12	40	280	IVS1nt+5g>t	R261P	-5,23
126	F	6	14,5	240	IVS1nt+5g>t	R261P	30,06
127	M	21	40	220	S349P	Q304Q	17,58
128	M	18	58	300	V388M	IVS8nt-7a>g	12,05
130	F	10	26	350	V388M	IVS8nt-7a>g	8,27
131	F	4	17	340	R408W	R252Q	28,25
133	M	12	12	360	R408W	R408W	39,41
134	F	3	18,9	120	IVS10nt-11g>a	G352fs del	24,92
139	F	16	25	220	Y204X	R68S	28,19
140	F	26	20,8	200	Y204X	R68S	26,88
141	M	12	13,14	160	Y204X	R68S	30,74
142	M	23	20	270	Y204X	R68S	27,63
143	F	5	23,52	260	IVS12nt+1g>a	IVS12nt+1g>a	17,91
144	F	18	29	200	V388M	IVS10nt-11g>a	27,15
145	F	22	17,9	260	S349P	R261P	7,79
146	F	22	17,9	260	S349P	R261P	40,47
147	M	3	24	140	IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	40,45
149	F	17	25	300	R261Q	E280K	14,3
150	M	2	21,8	240	IVS4nt+5g>a	R243Q	36,04
154	M	14	47	280	I65T	Q304Q	33,66
158	M	2	15,7	240	IVS10nt-11g>a	IVS10nt-11g>a	7,23
162	F	6	40	200	IVS4nt+5g>a	IVS8nt-7a>g	11,84
80	M	0,14	12,1	420			-1,31

**Tabla 31.-** Datos de los pacientes con respuesta negativa en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>. M: Masculino; F: Femenino; Nº: Corresponde al número de identificación del paciente; Dx: Diagnóstico.

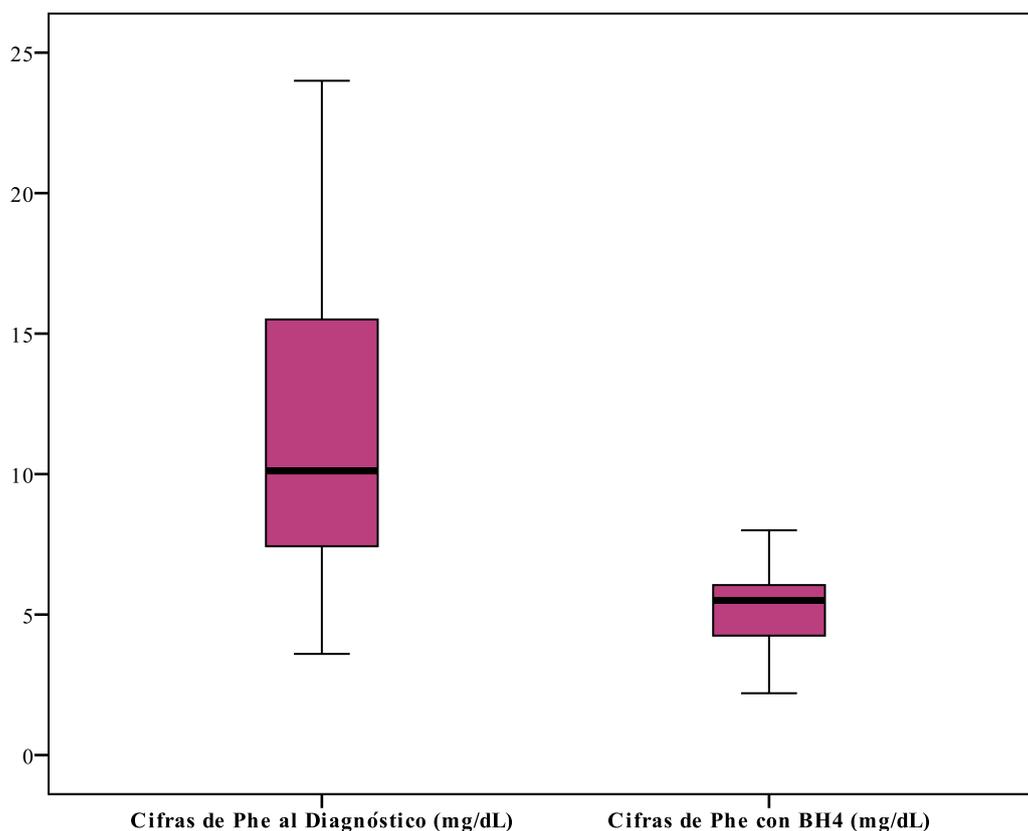
#### 6.4.4. Resultados del estudio de las cifras de Phe al diagnóstico comparadas con las cifras de Phe tras la ingesta de BH<sub>4</sub>.

	Cifras de Phe al diagnóstico (mg/dL)	Cifras de Phe con BH <sub>4</sub> (mg/dL)
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(11,51 ± 5,81)	(5,21 ± 1,47)
Mínimo-Máx	3,6 - 24	2,2 - 8
P50 [P25-P75]	10,11 [7,36 - 15,7]	5,5 [4,2 - 6,3]

**Tabla 32.-** Datos descriptivos de las cifras de Phe de los pacientes en tratamiento con BH<sub>4</sub>.

Se aprecia en esta tabla la diferencia de medias y de desviación típica entre las cifras de Phe al diagnóstico, momento en que el paciente realizaba una alimentación sin restricción proteica y las cifras de Phe con ingesta de proteínas adecuada a su edad y peso (sin restricción proteica, por tanto), y con ingesta de BH<sub>4</sub>.

Se compararon ambas medianas mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas obteniéndose una significación asintótica igual a 0,05 por lo que se puede concluir que la diferencia entre las cifras de Phe al diagnóstico y las cifras de Phe tras el tratamiento con BH<sub>4</sub> y dieta sin restricción en PN, es significativa.



**Figura 25.-** Niveles de Phe al diagnóstico y de Phe en tratamiento con BH<sub>4</sub>.

#### 6.4.5. Resultados del estudio de la ingesta de PN pre-tratamiento con BH<sub>4</sub> y durante el mismo.

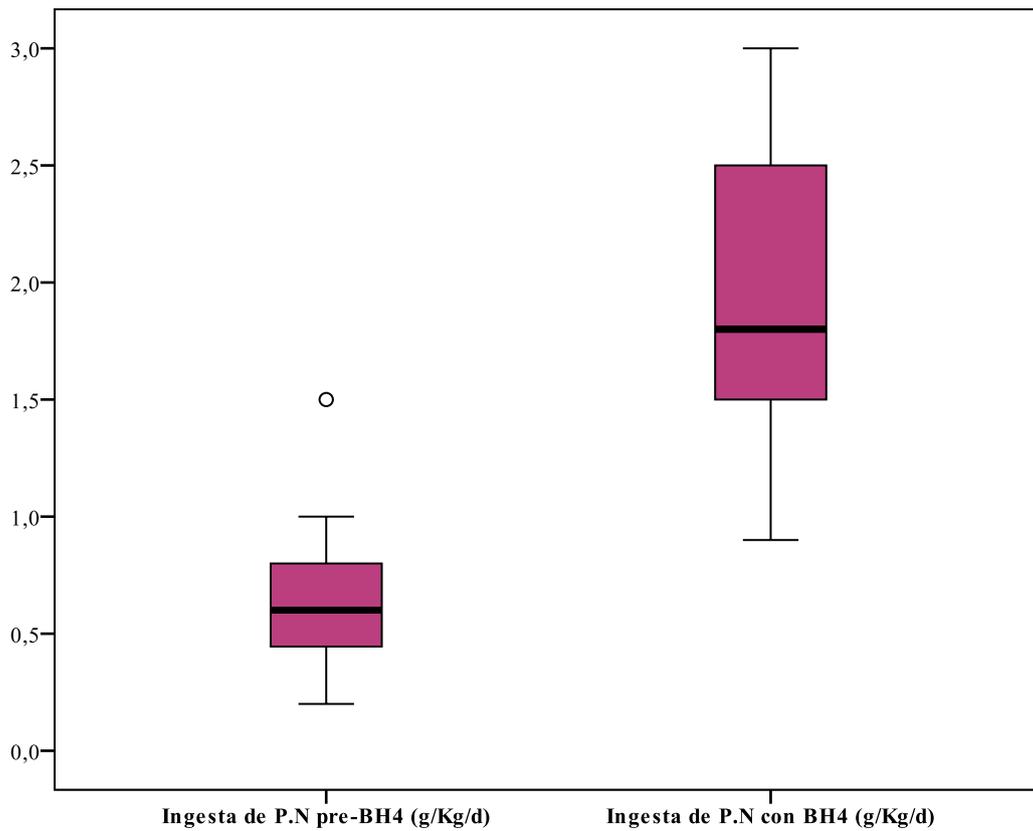
Utilizando la misma prueba estadística se ha comparado la ingesta de proteínas naturales antes y durante la ingesta de BH<sub>4</sub>.

	Ingesta de P.N pre-tratamiento con BH <sub>4</sub> (g/ Kg/día)	Ingesta de P.N con tratamiento con BH <sub>4</sub> (g/ Kg/día)
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(0,63 ± 0,3)	(1,88 ± 0,67)
Mínimo-Máx	0,2 - 1,5	0,9 - 3
P50 [P25-P75]	0,6 [0,39 - 0,8]	1,8 [1,5 - 2,5]

**Tabla 33.-** Datos descriptivos de la ingesta de proteínas naturales (P.N) pre-tratamiento con BH<sub>4</sub> y durante el mismo.

La significación asintótica de la comparación de medianas de la ingesta de proteínas naturales antes de tomar BH<sub>4</sub> y durante el tratamiento con el mismo, con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, fue  $p=0,01$  por lo que se puede concluir que la diferencia entre las medianas de ambas variables, es estadísticamente significativa.

En el siguiente gráfico se aprecia cómo varió la ingesta de PN antes y durante el tratamiento con BH<sub>4</sub>.



**Figura 26.-** Ingesta de P.N pre-tratamiento con BH<sub>4</sub> y durante el mismo.

### **6.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO PARA VALORAR EL PERFIL NUTRICIONAL ANTERIOR Y POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE BH<sub>4</sub> EN LOS PACIENTES CON HFA Y RESPUESTA POSITIVA AL NUEVO TEST DE SENSIBILIDAD A BH<sub>4</sub>.**

En los 23 pacientes con resultado positivo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, que realizan tratamiento con el fármaco en el momento actual, y que se inició en un periodo de tiempo superior a una año, se ha estudiado la situación nutricional pre y post-tratamiento con BH<sub>4</sub>.

Con este fin se ha realizado un análisis para comparar las proteínas nutricionales (albúmina, prealbúmina, transferrina y proteína ligadora de retinol (P.L.R.)), antes del aumento de la ingesta de proteínas naturales y un año después de dicho incremento.

El incremento de proteínas consistió en dar al paciente la cantidad diaria de proteínas recomendada por la OMS para su edad y peso de forma que no fuera necesario el empleo de una fórmula de aminoácidos exenta de Phe y suplementada con Tyr para alcanzar dichos requerimientos.

Dos pacientes realizan actualmente tratamiento con BH<sub>4</sub> pero no han sido incluidos en esta fase del estudio por no haber completado el año de tratamiento requerido para entrar en esta fase del estudio.

A todos los pacientes con respuesta positiva al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> se les realizó un control de proteínas nutricionales plasmáticas (transferrina, prealbúmina, albúmina y P.L.R.), antes del inicio del tratamiento y al año del mismo.

El objetivo de este estudio es valorar si existe variación en el perfil nutricional, a raíz de modificar la ingesta de proteínas naturales, por la administración de BH<sub>4</sub>.

Se valorarán de forma independiente las cuatro proteínas referidas con anterioridad.

➤ **Transferrina**

Los datos correspondientes a los niveles de transferrina antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> y de incrementar la ingesta de P.N y al año del inicio del mismo se recogen en la siguiente tabla.

Valores de referencia de la Transferrina: 200 – 360 mg/dL.

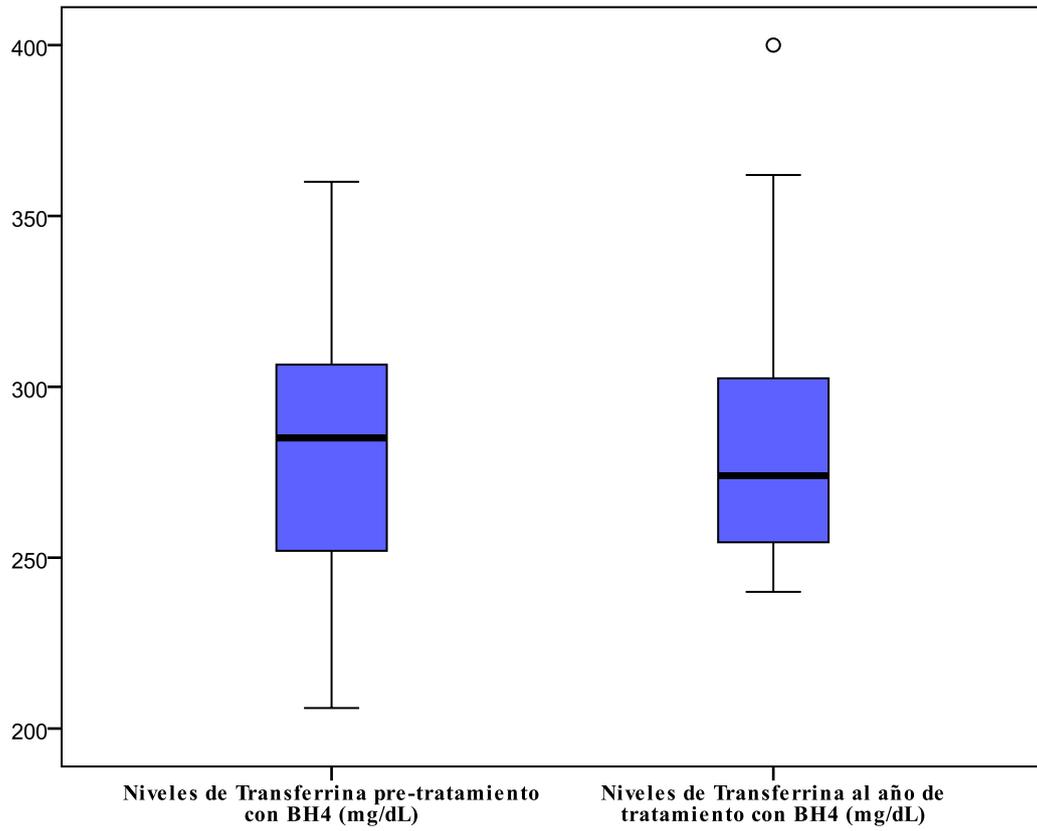
	Cifras de transferrina (mg/dL) pre-tratamiento con BH <sub>4</sub>	Cifras de transferrina (mg/dL) al año de tratamiento con BH <sub>4</sub>
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(281,43 ± 83,97)	(287,3 ± 41,27)
Mínimo-Máx	206 - 306	240 - 400
P50 [P25-P75]	285 [250 - 307]	274 [252 - 305]

**Tabla 34.-** Datos descriptivos de los niveles de transferrina antes del inicio y al año del tratamiento con BH<sub>4</sub>.

Para valorar si existían diferencias significativas entre las cifras de transferrina antes de incrementar la ingesta de P.N por realizar tratamiento con BH<sub>4</sub>, y al año del cambio, se realizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para pruebas relacionadas.

La significación asintótica fue de 0,17 ( $p > 0,05$ ), por lo que no existen evidencias estadísticas que indiquen una diferencia significativa entre ambas variables.

Se presenta a continuación una figura con los niveles de transferrina, en mg/dL, antes y después de la ingesta de BH<sub>4</sub>.



**Figura 27.-** Niveles de transferrina antes de iniciar terapia con BH<sub>4</sub> y al año de comenzarla.

➤ **Prealbúmina**

Se exponen a continuación los datos referentes a los niveles de prealbúmina, antes de iniciar tratamiento con BH<sub>4</sub> y tras un año de terapia con el mismo.

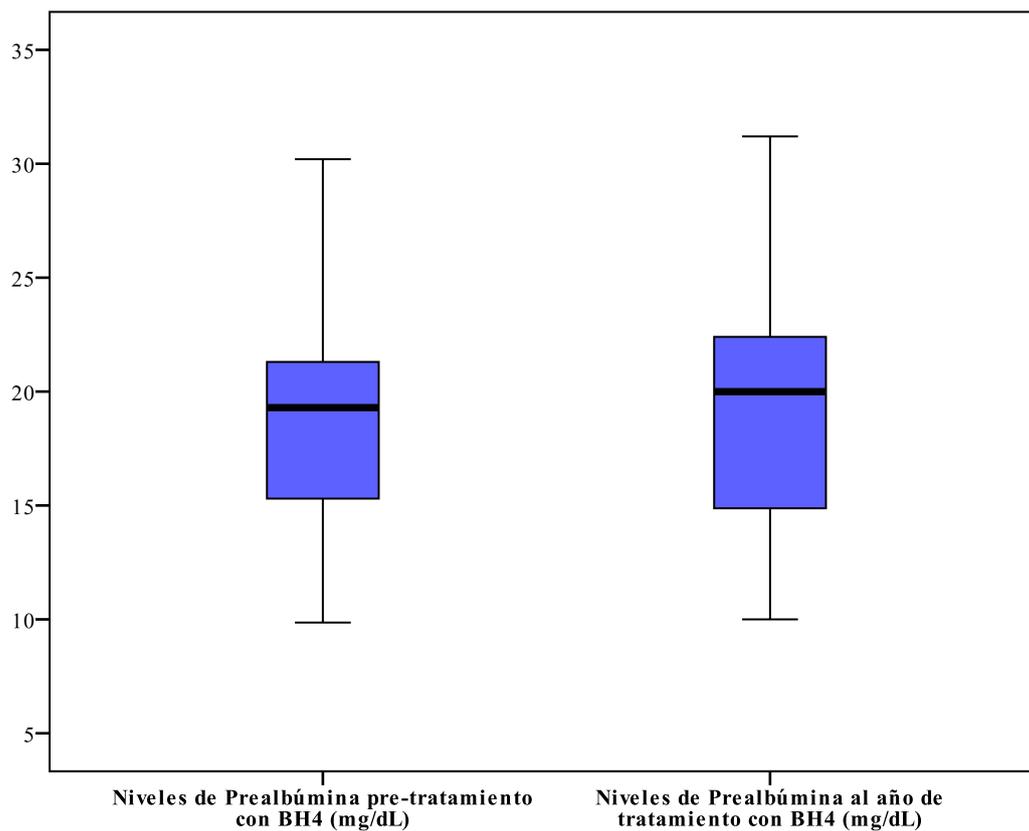
Valores de referencia de la prealbúmina: 20 – 40 mg/dL

	Cifras de prealbúmina (mg/dL) pre-tratamiento con BH <sub>4</sub>	Cifras de prealbúmina (mg/dL) al año de tratamiento con BH <sub>4</sub>
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(18,62 ± 5,62)	(18,95 ± 6,01)
Mínimo-Máx	9,86 - 30,2	10 - 31,2
P50 [P25-P75]	19,3 [15,3 - 21,4]	20 [14,4 - 22,4]

**Tabla 35.-** Datos descriptivos de los niveles de prealbúmina al inicio del tratamiento BH<sub>4</sub> y al año del mismo.

Al aplicar la Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon a los niveles de prealbúmina antes del inicio y al año de tratamiento con BH<sub>4</sub> se obtuvo una significación asintótica de 0,157 ( $p > 0,05$ ), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos niveles.

Se puede valorar en la siguiente figura los niveles de prealbúmina antes y al año de realizar tratamiento con BH<sub>4</sub>.



**Figura 28.-** Niveles de prealbúmina antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año de comenzar la terapia con el mismo.

➤ **Albúmina**

Los datos referentes a la albúmina se muestran en la siguiente tabla.

Valores de referencia de la albúmina: 3500 – 5200 mg/dL.

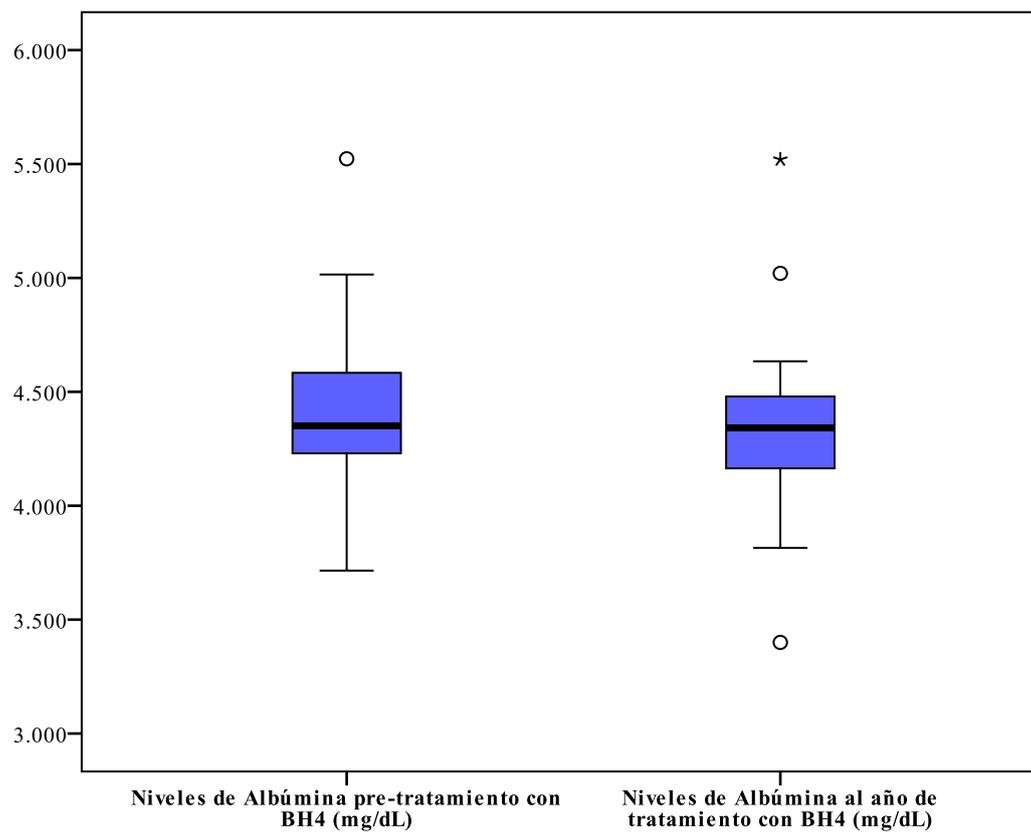
	Cifras de albúmina (mg/dL) pre-tratamiento con BH <sub>4</sub>	Cifras de albúmina (mg/dL) al año de tratamiento con BH <sub>4</sub>
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(4409,69 ± 411,15)	(4340,21 ± 414,22)
Mínimo-Máx	3715 – 5523	3400 - 5520
P50 [P25-P75]	4350 [4200 - 4611]	4341 [4158 - 4526]

**Tabla 36.-** Datos descriptivos de los niveles de albúmina al inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año de la modificación de la ingesta de proteínas por el mismo.

Se volvió a aplicar en este caso para valorar si existían diferencias significativas entre las cifras de albúmina antes de incrementar la ingesta de proteínas naturales por realizar tratamiento con BH<sub>4</sub>, y al año del cambio, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para pruebas relacionadas.

La significación asintótica fue 0,626 ( $p > 0,05$ ), por lo que no existe evidencia estadística que indique una diferencia significativa entre ambas variables.

Se presenta a continuación una figura con los niveles de albúmina, antes y después de la modificación de la dieta por la ingesta de BH<sub>4</sub>.



**Figura 29.-** Niveles de albúmina antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año de comenzar la terapia con el mismo.

➤ **Proteína ligadora de retinol (P.L.R)**

Se exponen a continuación los datos más relevantes para la valoración de los niveles de P.L.R antes del incremento de proteínas naturales en la dieta y del inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub> y un año después de la aplicación de estas modificaciones.

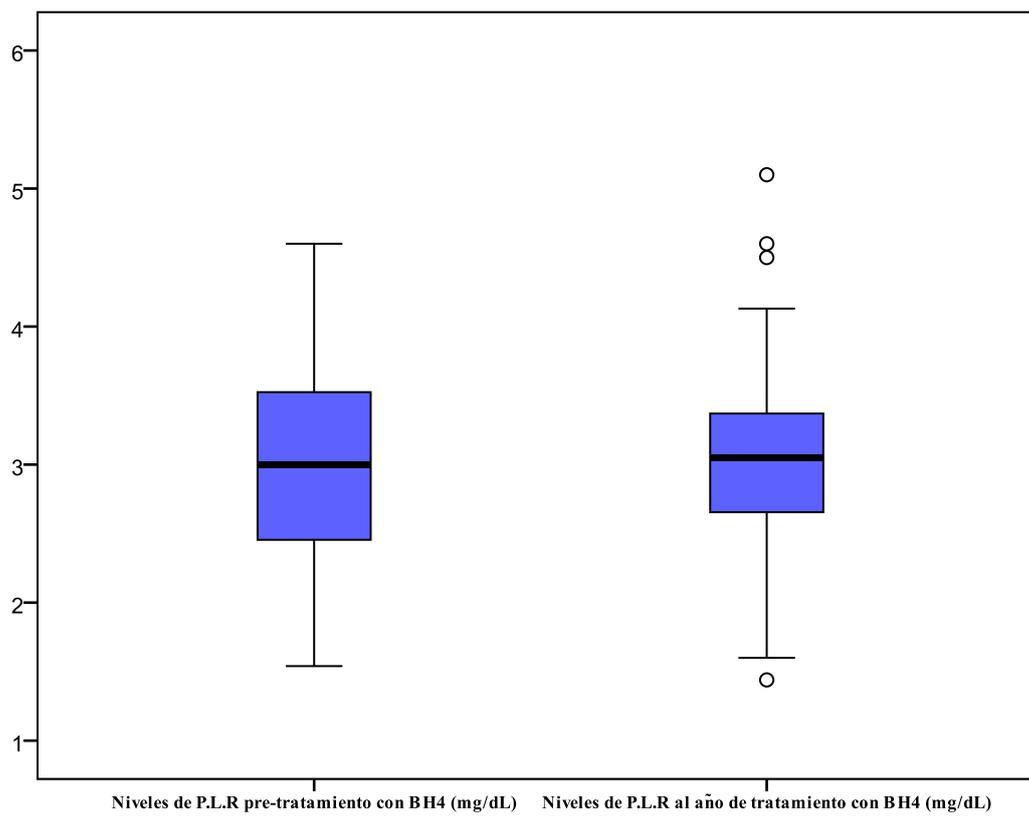
Valores de referencia de la P.L.R: 3 – 6 mg/dL

	Cifras de P.L.R (mg/dL) pre-tratamiento con BH <sub>4</sub>	Cifras de P.L.R (mg/dL) al año de tratamiento con BH <sub>4</sub>
Frecuencia	23	23
Porcentaje	100	100
(Md ± D.S.)	(3,03 ± 0,85)	(3,07 ± 0,93)
Mínimo-Máx	1,54 - 4,6	1,44 - 4,1
P50 [P25-P75]	3 [2,41 - 3,6]	3,05 [2,59 - 3,53]

**Tabla 37.-** Datos descriptivos de los niveles de P.L.R al inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año del mismo

Para valorar si los niveles de P.L.R habían experimentados cambios significativos tras las modificaciones realizadas en la alimentación de los pacientes en tratamiento con BH<sub>4</sub> antes y al año del tratamiento con el mismo se utilizó la Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, obteniéndose una significación asintótica de 0,306 ( $p > 0,05$ ), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos niveles.

Se representan, a continuación, gráficamente la distribución de ambas variables.



**Figura 30.-** Niveles de P.L.R. antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub> y al año de comenzar la terapia con el mismo.

## **7. DISCUSIÓN**

## 7. DISCUSIÓN

Desde que en 1934 A. Folling<sup>9</sup> describiera la PKU y 19 años después Bickel (1953)<sup>11</sup> demostrara la eficacia de la dieta restringida en Phe como tratamiento de la enfermedad, se han producido importantes avances en su diagnóstico y tratamiento, orientados, en parte, al conocimiento molecular de la misma. Se ha puesto de manifiesto el plegamiento y la función de la PAH<sup>26</sup>, siendo continua la descripción de nuevas mutaciones, definiéndose su actividad residual, etc.

La instauración del cribado neonatal para detectar la PKU ha facilitado el inicio en edades tempranas de la vida del tratamiento dietético, haciendo que el desarrollo neurológico del paciente con PKU sea prácticamente normal<sup>119</sup>.

Sin embargo, el tratamiento dietético es muy restrictivo, puede producir déficits nutricionales, la adhesión a la dieta en adolescentes y adultos es escasa<sup>120</sup> y dos tercios de las mujeres PKU no siguen la dieta antes de quedar embarazadas<sup>121</sup>.

Aún a pesar de la dificultad que conlleva desarrollar productos para una enfermedad rara, la industria farmacéutica no deja de investigar y producir nuevos suplementos de aminoácidos sin Phe, de mayor calidad médica y organoléptica, y nuevas terapias que mejoren el pronóstico de estos pacientes como BH<sub>4</sub><sup>122</sup>, suplementación con LNAA<sup>75,76,77</sup>, terapia enzimática sustitutiva con PAL<sup>75</sup> y terapia génica<sup>71</sup>.

Sin embargo, la investigación a nivel clínico no ha sido paralela a todos estos progresos. La baja incidencia de la PKU (1:10.000-20.000 recién nacidos vivos en Europa y USA respectivamente)<sup>123</sup>, dificulta la realización de estudios con resultados extrapolables al resto de la población afectada por esta patología, debido a que generalmente cada clínico tiene un bajo número de pacientes, y son escasos los estudios multicéntricos.

Por este motivo, aunque actualmente son numerosas las guías para el manejo de la PKU, con frecuencia son muy dispares entre ellas<sup>124,125,126,127,128,129</sup>, ya que no existe un consenso unánime entre las distintas sociedades científicas sobre la fenilalaninemia a partir de la cuál debería iniciarse la restricción de proteínas en la dieta, ni en los niveles de óptimos de Phe en sangre que es deseable mantener en las diferentes edades<sup>130,131</sup>. Tampoco existe homogeneidad en cuanto a las dietas restringidas en Phe<sup>124-126</sup>.

En 1999 Kure et al<sup>122</sup>. publicaron el primer estudio sobre tratamiento con BH<sub>4</sub> en pacientes con déficit de PAH. Pero incluso respecto a esta terapia no existe acuerdo unánime sobre la forma de evaluar su respuesta ni se ha definido aún cómo debe realizarse el tratamiento a largo plazo.

Esta falta de consenso en cuanto al diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PKU queda reflejada en un estudio multicéntrico europeo publicado en 2010<sup>132</sup>. En él se aprecia que aproximadamente en la mitad de los centros que participaron en el estudio (53,5%) realizaban sistemáticamente un test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> a sus pacientes con PKU, pero no existía un método común para la realización del test ni para su interpretación. El método más frecuentemente utilizado era la administración de una única dosis de BH<sub>4</sub> en 24h (61,1%), aunque no especificaban si tras una sobrecarga de Phe o tras varios días de dieta sin restricción proteica.

En cuanto a la interpretación del resultado del test existe una discrepancia mayor aún. El grupo mayoritario (34,4%) considera respuesta positiva un descenso de Phe >30% a las 24 horas de la administración de BH<sub>4</sub>, seguido de aquellos que consideran que la respuesta debe ser >30% a las 8 horas de BH<sub>4</sub>. Sólo el 12,5% indicaron que para que el resultado de la prueba fuera positivo exigían un descenso de Phe a las 24 h >50%<sup>125</sup>.

En este estudio también se muestra la falta de consenso para definir los distintos fenotipos a partir de las cifras de Phe en el *screening* neonatal. Prácticamente todos (78%) coincidían en que la PKUC presentaba Phe >20 mg/dL al diagnóstico, sin embargo al definir los fenotipos intermedios (PKUM, PKUS, HFAB) apenas existía concordancia entre los distintos centros<sup>131</sup>.

Otro punto conflictivo, al no existir un criterio común, es el de las cifras de Phe a partir de las cuales estaría indicado iniciar un tratamiento de restricción proteica, por ejemplo el grupo alemán que participó en este estudio no inicia el tratamiento de los pacientes con PKU hasta que el paciente no alcanza los 10 mg/dL de Phe<sup>133</sup>. Este dato ha sido un punto muy discutido en el artículo, ya que es bien conocido que el paciente con PKUC puede mostrar síntomas cuando las cifras de Phe son >4 mg/dL<sup>134</sup>, aunque el grupo mayoritario (36,6%) iniciaba el tratamiento dietético si la Phe >6 mg/dL.

Toda esta diversidad dificulta enormemente la realización de estudios multicéntricos, que serían la solución para la investigación de una patología de tan baja prevalencia, como es la PKU.

Vamos a valorar en esta Tesis Doctoral los datos y los estudios realizados en la UMNI del Hospital Infantil de los H.H.U.U. Virgen del Rocío en los últimos 30 años (1979-2009).

El ser centro de referencia para el tratamiento de esta patología durante esos años en la Comunidad Andaluza, que cuenta con una población de 8.221.080 habitantes<sup>118</sup>, ha hecho que se atiendan en este período 169 pacientes con HFA. Este tamaño muestral, ha puesto a nuestro alcance el poder diseñar estudios que nos permitieran conocer con mayor profundidad cual es el comportamiento de la PKU fenotípica y genotípicamente en Andalucía, consiguiendo a través del estudio molecular acercarnos a la antropología andaluza.

El hecho de disponer de una población con esa envergadura nos ha permitido valorar la eficacia de un nuevo diseño del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, que simplifica el test ya descrito y más comúnmente utilizado, poniendo al alcance del paciente poder realizar esta prueba, para optar a un tratamiento que mejoraría su calidad de vida, sin tener que quedar ingresado unos días en el hospital.

Por último y dada la tendencia a creer, porque aún no hay estudios científicos que corroboren esta hipótesis, que por el hecho de tener una alimentación exclusivamente con proteínas naturales el paciente está mejor nutrido que el que tiene que combinar esas proteínas con proteínas exentas de Phe, se ha comparado la situación nutricional de los pacientes con HFA y con alimentación sin restricción proteica por realizar tratamiento con BH<sub>4</sub>, antes del inicio de la terapia con BH<sub>4</sub> y al año de la misma.

Introduciéndonos en los aspectos relacionados con el fenotipo y el genotipo, ya en 1999 Desviat et al. lo describieron por regiones en España<sup>59</sup>. Dado que la población andaluza considerada en ese estudio constaba de 96 pacientes con HFA por déficit de PAH, y actualmente el total de pacientes con HFA en nuestra muestra asciende a 169, consideramos de interés reevaluar el fenotipo de la región andaluza.

En la actualidad el fenotipo más frecuente en la población andaluza es el de PKUC. Este dato discrepa del estudio de Desviat et al. (1999) en el que el fenotipo más

frecuente, en Andalucía y en toda España, era la HFAB. Este cambio ha podido deberse por un lado al aumento de la muestra y por otro a que los pacientes con HFAB hayan dejado de acudir a consulta por no precisar ningún tipo de tratamiento dietético.

De todos los pacientes con HFA sólo el 1,18% fue debida a defectos enzimáticos en la síntesis y reciclaje del cofactor, en concreto DHPR, lo que indica la baja incidencia de este tipo de HFA.

Para definir el fenotipo de un paciente con HFA, en los últimos 20 años se ha empleado la clasificación de Güttler<sup>56</sup>, que cataloga los distintos tipos de HFA en función de la tolerancia de Phe en la dieta a los 5 años de edad.

En 2008, J van Spronsen et al.<sup>135</sup> publicaron un artículo en el que defendían que la tolerancia de Phe en un paciente con HFA podía quedar perfectamente definida a los 2 años de edad, al no existir diferencias estadísticamente significativas entre la tolerancia a los 2 años y a los 5 años de edad. Descartan la posibilidad de determinar la tolerancia en edades más tempranas por tener los niños menores de 2 años una elevada velocidad de crecimiento y mayor frecuencia de infecciones.

Al estudiar el fenotipo de nuestra población hemos apreciado varias circunstancias que discrepan con este estudio: de cara a determinar qué edad es mejor para definir la tolerancia de Phe, no coincidimos con el planteamiento que hacen ellos de la mayor frecuencia de procesos infecciosos en menores de 2 años de edad, ya que en nuestra muestra ha sido entre los 2 y los 6 años, coincidiendo con el inicio de la escolaridad, cuando hemos apreciado mayor número de procesos intercurrentes.

Por otro lado, si bien es cierto que el niño presenta una velocidad de crecimiento acelerada en los dos primeros años de vida, también lo hace durante la adolescencia y todos los autores coinciden en determinar la tolerancia de Phe en la dieta en etapas muy anteriores a la misma.

Tras valorar la tolerancia de los pacientes en función de las edades, observamos que ésta se mantiene estable a partir del primer mes de vida. También hemos visto que la tolerancia presenta una relación significativa con las cifras de Phe al diagnóstico, por lo que este último dato perfectamente podría definir el fenotipo, y por tanto la tolerancia de Phe en la dieta que presentará el paciente.

Las cifras de Phe al diagnóstico que hemos tenido en cuenta para esta valoración, son las que corresponden a la determinación de Phe realizada el primer día que acude el niño a la consulta para iniciar el estudio de HFA, y no las que presentó en la prueba del talón realizada entre el 5º y 7º día de vida o entre el 3º y el 5º desde que se inició el cribado neonatal expandido en Andalucía, ya que la Phe de la 1ª prueba podía estar falseada al no ser adecuada la alimentación del neonato.

Esta determinación se ha tomado porque consideramos que la alimentación del neonato con 15-20 días de vida, que es cuando suelen venir por vez primera a la consulta, ya suele estar consolidada. No obstante, en el 93% de los casos no hubo diferencias significativas entre ambos valores.

Para el análisis de la correlación entre las cifras de Phe al diagnóstico y la tolerancia de Phe en la dieta, de hecho se empleó la tolerancia de todos los pacientes, incluidos los menores de 5 años, por lo que consideramos que las cifras de Phe al diagnóstico podrían ser útiles para definir la tolerancia y por tanto el fenotipo del paciente.

También se ha observado que con la clasificación de Güttler, los mínimos de tolerancia de Phe en nuestra población no eran considerados en el estudio estadístico, al establecer que los pacientes con PKUC presentan tolerancias de Phe entre 250-350 mg/día, mientras que entre nuestros pacientes un 36% tenía una ingesta inferior a 250 mg de Phe al día, por lo que no podían ser clasificados sin modificar los intervalos de tolerancia de Phe al día.

Por otro lado, la clasificación de Güttler superados los 600 mg de Phe al día incluye a todos los pacientes en un mismo grupo, pero en la práctica clínica de nuestra unidad, la actitud es distinta entre un paciente que tolera 600 mg de Phe al día y otro que tiene una tolerancia >800 mg de Phe al día. Estos últimos generalmente hacen una dieta con escaso control proteico o ninguno en algunos casos, mientras los primeros sí precisan controlar la ingesta de PNAVB.

Estos motivos son los que nos llevaron a modificar la clasificación de Güttler añadiendo un nivel que recoja todos los pacientes con tolerancias de Phe inferiores a 250 mg de Phe al día, que como se ha comentado con anterioridad, en nuestra población este grupo constituye un 36% del total de HFA estudiadas, y a fraccionar los pacientes con tolerancias superiores a 600 mg al día de Phe en dos grupos. Uno estaría constituido

por aquellos pacientes que realizan una dieta con Phe entre 600 y 800 mg al día que aunque presentan una tolerancia elevada tienen que controlar la ingesta de PNAVB y otro grupo para aquellos pacientes que toleran más de 800 mg de Phe al día y que en su mayoría no precisan más control proteico que el que conlleva realizar una alimentación adecuada a su edad.

Consideramos que con esta modificación podemos clasificar con más especificidad a nuestros pacientes, facilitándonos de esta manera el poder ofrecerles un pronóstico, en cuanto a la tolerancia, más concreto.

Para hacer una correcta valoración del genotipo en nuestra población, hay que considerar que el análisis de las bases moleculares de la PKU a nivel mundial ha llevado a la identificación de más de 500 mutaciones del gen *PAH* recopiladas por la *PAH Mutation Analysis Consortium* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

La gran heterogeneidad genética es la base de la gran diversidad clínica y bioquímica de este trastorno del metabolismo. Actualmente es evidente, a partir de los estudios de expresión *in vitro* y del aumento del conocimiento a partir de los estudios de la relación genotipo-fenotipo, que las diferentes mutaciones ejercen distintos efectos sobre la actividad y estabilidad de la enzima PAH, permitiendo predecir el pronóstico de cada paciente según la combinación de mutaciones que presenta.

Al analizar genótipicamente la población andaluza con déficit de PAH, se observó una gran variabilidad en el espectro de mutaciones observándose 71 distintas, de las cuales sólo 8 de ellas se expresaban en más del 3% (más de 10 pacientes) de la población con HFA. Además, hay que tener en cuenta que sólo la mutación más frecuente, IVS10nt11g>a, constituía más del 10% de la población, presente en el 10,9% de los casos.

El elevado número de mutaciones trae asociado el hecho de que el 87% de los genotipos hayan sido heterocigotos. Sólo un 13% de la muestra fue homocigota para una mutación concreta.

La homocigosis de algunas mutaciones ha sido útil para valorar cómo se comportan de cara a determinar el fenotipo del paciente, es el caso de la mutación L258P, una mutación nueva descrita por primera vez en Andalucía y que el hecho de que se

presente en homocigosis nos permite, como veremos más adelante, hacer una mayor aproximación a la actividad enzimática que determina al no estar influenciada por otra mutación.

Por otro lado, indicador también de la gran heterogenicidad genotípica, es el hecho de que sólo estén repetidos un 15% de los genotipos, entre éstos el 40% eran familiares (Tabla 20).

Esta diversidad mutacional de la población con HFA andaluza difiere de la de otras poblaciones cercanas y otros países europeos. Por ejemplo, en el norte de Europa, las mutaciones más frecuentes son IVS12nt1 y R408W, detectándose en el 60% de los cromosomas PKU<sup>136</sup>, sin embargo, en Andalucía, es preciso agrupar las 8 mutaciones más frecuentes para alcanzar el 49% de la población con HFA.

Otro ejemplo es la población PKU de Marruecos, que a pesar de tratarse de otro continente, es un grupo muy cercano geográficamente, y también presenta un espectro de mutaciones muy diferente al observado en nuestra población de estudio. En Marruecos la mutación más frecuente es la G352fsdelG que se observa en el 62,5% de los genes PKU de un grupo de 20 familias con HFA de este país del norte de África<sup>137</sup>. Sin embargo, en la población PKU andaluza las 2 mutaciones más frecuentes (IVS10nt11g>a y S349P) no alcanzan conjuntamente ni el 20% de la muestra y además la mutación G352fsdelG, referida como la más frecuente en Marruecos, sólo la hemos observado en el 1,36% de mutaciones.

La mutación más frecuente es IVS10nt-11g>a, la mayoritaria en toda la población mediterránea y en concordancia con la mayoría de los estudios de esa región. No obstante, en nuestro estudio fue mucho menos frecuente que en la población de Calabria (Italia) donde se observó hasta en el 45% de los pacientes con HFA<sup>138</sup>. Destacar que en el país mediterráneo donde se observó una menor frecuencia de dicha mutación fue Túnez en el que sólo afectaba al 5% de los alelos de los PKU del país<sup>139</sup>.

También es relevante el hecho de que la mutación descrita como la más frecuente de la raza caucásica, IVS12nt1g>a, en nuestro estudio fue la novena mutación en frecuencia, pero con una incidencia aproximada del 2,5% de los pacientes PKU. Esta mutación fue hallada hasta en el 12% de los pacientes PKU de Bélgica<sup>140</sup>.

Si es verdad que la variabilidad genética en los países del Sur de Europa es mucho más amplia que en los países del Norte del continente, observándose grupos y mutaciones muy heterogéneos<sup>141</sup>.

En España las 3 mutaciones más frecuentes (IVS10nt11g>a, I65T Y V388M) sólo afectan a un 30% de los alelos mutantes<sup>54</sup>. La gran heterogeneidad genética que se ha observado en el resto de las comunidades españolas es similar a la observada en Andalucía, si bien con ellas nuestra Comunidad sólo coincide en la mutación más prevalente, la IVS10nt11g>a, aunque también variando en la frecuencia con respecto al resto de las regiones.

Desviat et al. (1999)<sup>59</sup>, describen el genotipo de los pacientes con HFA en España, indicando los más prevalentes, en las distintas áreas geográficas: Comunidades centrales, Noroeste (Galicia), Sur de España (Andalucía), y Este (Cuenca Mediterránea) entre ellas. En dicho estudio se apreció que la IVS10nt11g>a era la mutación más frecuente en el territorio nacional pero su distribución, como ya hemos comentado, no era homogénea. En Andalucía constituía el 8,3% de la población, mientras que por ejemplo en la Cuenca Mediterránea era del 12,5%, en el Noroeste el 11,5% y el centro de España el 9%. En nuestra región era la 3ª mutación más frecuente, sin embargo en la actualidad hemos observado que es la más prevalente, afectando al 10,9% de los alelos mutantes.

La mutación A403V, que era la segunda en frecuencia global del estudio de Desviat et al. (1999) afectando al 8%, era en ese estudio la más frecuente de Andalucía (14,6%). Sin embargo, en la actualidad es la octava en frecuencia correspondiendo sólo al 3,8%. Esta variación puede tener la misma justificación que el cambio de fenotipo comentado con anterioridad, ya que la actividad residual de PAH que codifica la mutación A403V es del 100%, por lo que se asocia a los fenotipos más suaves de la HFA. Ésto podría justificar que se haya perdido el seguimiento de estos pacientes. En el estudio de Desviat et al. (1999) esta mutación estaba presente en 14 pacientes en Andalucía y actualmente sólo afecta a 10 casos, de los cuales 7 han nacido en los últimos 5 años motivo por el que no pudieron ser considerados en el estudio de Desviat et al.(1999), lo que indica que al menos 11 pacientes más tienen esta mutación en Andalucía y por tanto HFA.

La mutación V388M que era la segunda en frecuencia con el 10,4% no ha variado mucho con respecto al estudio actual presentándose como la tercera en frecuencia y observándose en el 7,5% de la población PKU andaluza.

La mutación S349P, que hoy día es la segunda en frecuencia en nuestra muestra, no queda reflejada en el estudio de Desviat et al. (1999) como mutación frecuente en ninguna de las regiones estudiadas. Esta mutación ha sido detectada como una de las más frecuentes en el Norte de África<sup>142</sup>.

Este cambio que se ha producido en la frecuencia de esta mutación también puede estar implicado en el cambio en la distribución de los fenotipos respecto a estudios anteriores, ya que al igual que la mutación más frecuente presenta una actividad enzimática residual nula.

El resto de las mutaciones presentan frecuencias inferiores al 5% de la población, y exceptuando la I65T y la R261Q con una prevalencia del 4,4% y la R261P y A403V con una representación del 4,1 y el 3,8%, respectivamente, su frecuencia no sobrepasa el 1-2% de la muestra.

Cabe destacar de estas últimas mutaciones que la I65T, quinta en frecuencia en la actualidad en la población andaluza, es mucho más prevalente en otras áreas del territorio nacional, detectándose en el 10% y el 9,5% del área mediterránea (tercera en frecuencia) y del centro de España (primera en frecuencia) respectivamente.

Así mismo se debería tener en cuenta el cambio en la prevalencia de la mutación R261Q en Andalucía, que en el estudio de Desviat et al. (1999) no fue detectada en la población andaluza con HFA y actualmente es la sexta en orden de aparición afectando al 4,4% de los pacientes de nuestro estudio. Esta mutación que era extraordinariamente frecuente en Galicia<sup>59</sup>, donde sigue siendo la segunda en frecuencia con el 10,3%<sup>143</sup>, ha visto aumentada su prevalencia de manera muy significativa en Andalucía. Tal vez la presencia de movimientos migratorios poblacionales pueda justificar el aumento de esta mutación.

Desviat et al. (1999) reflejaban que la población andaluza podía tener una fuerte influencia árabe al observarse en su estudio que las mutaciones A403V y D415N fueron encontradas con una frecuencia del 14,6% y 7,3%. Hacían notar en ese estudio que la prevalencia de estas mutaciones era mucho mayor en esta región que en el resto del

territorio nacional, especialmente en Galicia donde entre ambas sólo alcanzaban el 1,3% de la población PKU gallega, y si se había observado con frecuencia en la población del norte de África. Sin embargo, en la actualidad dichas mutaciones sólo corresponden al 5,5% de los PKU de Andalucía, correspondiéndole a la A403V, octava en frecuencia, el 3,8% y a la D415N el 1,7%.

Sería razonable pensar que los datos observados en las distintas regiones españolas, y en nuestro estudio en la actualidad, no deberían discrepar mucho de lo que se tendrían que obtener del estudio de la población PKU del otro país que constituye la península Ibérica, Portugal. Sin embargo, esto no es así, ya que en Portugal se ha observado que el 62% de los pacientes PKU presentan sólo 4 mutaciones distintas (IVS10nt-11g>a, R261Q, V388M, R270K)<sup>144</sup> lo cual no coincide con lo encontrado en el resto de áreas de la península Ibérica.

Con respecto a Andalucía, territorio limítrofe con el sur de Portugal, hay que resaltar que la mutación más frecuente en ambas regiones es la misma IVS10nt-11g>a. Además la segunda y tercera en frecuencia en la población PKU portuguesa (R261Q, V388M) son la tercera y sexta en frecuencia en la actualidad en Andalucía.

Llama la atención el hecho de que la V388M, descrita por primera vez en Portugal, y una de las más frecuentes en España, tenga también una alta prevalencia en países latinoamericanos, Chile y Brasil<sup>145,146</sup> principalmente, que fueron colonias de España y Portugal respectivamente, mientras que prácticamente no se detecta en el resto de Europa.

Siete de las mutaciones encontradas en nuestro estudio son nuevas y corresponden a: R155C, G289R, E66K, P122S, L258P, D145N e I421T, añadiendo una mayor variabilidad genética y un mayor número de mutaciones a la población PKU andaluza.

Para valorar el comportamiento de estas 7 nuevas mutaciones, dado que hoy día no suelen realizarse estudios enzimáticos de PAH, se ha hecho una aproximación, a partir de las cifras de Phe al diagnóstico, la tolerancia de Phe en la dieta y la respuesta al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> así como de la mutación acompañante.

La mutación R155C se presentó en heterocigosis junto a otra mutación nueva, la G289R: al ser ambas mutaciones nuevas y de efecto funcional desconocido, *a priori* no podría saberse cuál de las dos, o las dos, son responsables de la respuesta a BH<sub>4</sub> y

el fenotipo suave del paciente, pero viendo que G289R en el hermano de este caso, no resulta en un genotipo con respuesta positiva al cofactor, podemos asumir que R155C es una mutación suave asociada a la respuesta a BH<sub>4</sub>.

La G289R sería por tanto una mutación severa o moderada, ya que en el hermano del caso anterior se presentó en heterocigosis con la G272X que determina una actividad enzimática residual del 0%.

Como desconocemos la respuesta real de R155C, pero sí conocemos la G272X, podemos deducir que o bien la mutación R155C es una mutación muy suave, capaz de suplir el déficit total de actividad de PAH por G289R, o bien esta última tiene una actividad residual media que según a que mutación acompañe se comportará de una forma u otra.

La mutación L258P se presentó en homocigosis; por este motivo podemos concluir que probablemente se trata de una mutación severa, ya que aunque la paciente presentó 9 mg/dL de Phe al diagnóstico, la tolerancia era de 360 mg al día de Phe y respondió un 22% a BH<sub>4</sub> por lo que fue una respuesta negativa y tras la sobrecarga de Phe para el Test de BH<sub>4</sub> ascendió hasta 19,07 mg/dL de Phe.

El paciente portador de la mutación E66K junto a la S349P tuvo unas cifras de Phe al diagnóstico de 11,66 mg/dL, tuvo una respuesta positiva al test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> (55,67%), y toleraba antes de realizar tratamiento con BH<sub>4</sub> 400 mg al día de Phe. Dado que la mutación S349P determina una actividad enzimática del 0%, es evidente que el fenotipo suave de este paciente se debe a la actividad residual determinada por E66K, que debe determinar una actividad enzimática elevada y ser por tanto una mutación muy suave. Además E66K está en el dominio regulador de la proteína PAH, en el extremo amino terminal, donde se localizan muchas mutaciones responsables de la respuesta a BH<sub>4</sub>.

D145N/P122S: Ambas mutaciones son nuevas por lo que no podemos saber si son suaves o severas, pero dado que el paciente presentó cifras de Phe al diagnóstico de 4,5 mg/dL, experimentó un descenso de Phe del 87% a las 24 horas de la administración de BH<sub>4</sub> y realiza una dieta sin restricción proteica, junto al hecho de que mutaciones en el mismo aminoácido (D145V y P122Q respectivamente) también se han asociado a

respuesta positiva, podemos concluir que probablemente ambas mutaciones sean suaves.

La mutación I421T se presentó junto a la mutación R241H, de efecto suave, por lo que aunque la paciente presentó una Phe al diagnóstico de 5 mg/dL, una respuesta a BH<sub>4</sub> del 57% a las 24 horas, y no precisa restricción proteica más que durante los procesos infecciosos intercurrentes, no podemos asegurar que el comportamiento de esta mutación también sea suave.

En cuanto a la actividad enzimática asociada a cada mutación y por tanto determinante en gran medida del fenotipo del paciente, es interesante el hecho de que el 41,5% de las mutaciones estuvieran asociadas a un funcionamiento nulo o muy disminuido de la enzima PAH, el 30,9% a una actividad residual elevada, y el 20% fueran moderadas. Esta distribución de mutaciones coincide con los fenotipos detectados en la población andaluza con HFA, ya que la más frecuente ha sido la PKUC, seguida de la PKUM, mientras que las mutaciones de efecto moderado, son las menos frecuentes en nuestra población. Esto puede ser debido a que la mayoría de los pacientes con fenotipo moderados eran portadores de una mutación suave y otra severa, compensando entre ellas la actividad residual final y por tanto el fenotipo del paciente.

Es también interesante que, aunque existe una relación significativa entre el genotipo y el fenotipo, en 8 de los 19 genotipos repetidos el fenotipo no fue el mismo (Tabla 21), lo que viene a confirmar lo descrito con anterioridad acerca de la variabilidad individual en el fenotipo<sup>49,50,51,147,148,149</sup>. Estos estudios defienden que pueden influir múltiples factores en las variaciones fenotípicas de la PKU, como la absorción intestinal, el metabolismo hepático de la Phe ingerida, el ratio de absorción de las Phe en las proteínas, el gradiente de Phe en su paso a través de la BHE, la relación de las mutaciones con BH<sub>4</sub> (que aunque funciona como cofactor también protege a la PAH de la degradación proteolítica), así como las interacciones del gen *PAH* con otros *loci*.

Esta teoría también se sustenta en el hecho de que cinco pacientes que presentaban en homocigosis la mutación S349P, para la que se ha descrito una actividad residual del 0%, su fenotipo fuera moderado en vez de clásico como habría cabido esperar.

El hecho de confirmarse el haber perdido el seguimiento de algunos pacientes, tras la comparación del estudio del genotipo de la población PKU andaluza en 1999 con el estudio realizado en el momento actual, nos lleva a considerar que pueden existir mujeres en edad fértil diagnosticadas de HFAB y que actualmente no están controladas. También puede darse el caso de mujeres fértiles nacidas en los años anteriores a dar cobertura completa al *screening* neonatal de HFA, o al descenso de la cifras de Phe al diagnóstico de 3 a 2,5 mg/dl, que en Andalucía tuvo lugar en 2004. Estas mujeres podrían tener HFAB, que no repercute en su vida diaria, pero que sí podría afectar al embrión durante el embarazo.

Esta posibilidad hace que deba considerarse el hacer una determinación de Phe a todas las mujeres en edad fértil, incluyendo incluso a las que por edad ya debieron hacerse el *screening* neonatal, a las mujeres con antecedentes de abortos de repetición y a las madres de niños con cardiopatía, retardo del crecimiento intrauterino, y/o anomalías faciales.

Con este fin sería recomendable crear un protocolo de prevención y diagnóstico del SPKUM en Andalucía y a nivel Nacional, divulgando este hecho en las Unidades de Neonatología, Cardiología Pediátrica, y sobre todo Planificación Familiar y Ginecología, ya que la situación ideal es detectar estas mujeres con HFA antes de quedar embarazadas<sup>92-96</sup>.

Como conclusión de la valoración del fenotipo y el genotipo de los pacientes con HFA de la población andaluza, destacar que la gran heterogenicidad de mutaciones descritas en nuestro estudio y la escasa prevalencia de cada una de ellas no parece un hallazgo exclusivo de esta Comunidad sino más bien un rasgo característico de la PKU en todo el territorio español, diferenciándolo de otras poblaciones territorialmente cercanas.

Esta gran variabilidad, podría estar en relación con los antecedentes históricos de España y, especialmente, de Andalucía y su localización geográfica, como punto de unión de dos continentes, Europa y África. Hemos apreciado en este estudio que existe una proximidad genética entre Andalucía y el Norte de África, determinada por la prevalencia de la mutación S349P, segunda en nuestra muestra y una de las mutaciones más frecuentes en el Norte de África, así como la mayor frecuencia de las mutaciones

A403V y D415N en Andalucía comparada con el resto de España, también detectadas como habituales en esa región del continente africano.

En relación a la terapia con BH<sub>4</sub> la falta de consenso anteriormente reflejada en cuanto al diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PKU, nos obliga a adentrarnos en este campo y aportar la experiencia que hemos adquirido tras el estudio de nuestra muestra.

La BH<sub>4</sub> es un medicamento huérfano que puede servir a algunos pacientes afectados de HFA por déficit de PAH que presentan una respuesta variable a la administración oral del mismo, de modo que pueden liberalizar e incluso abandonar la dieta con ingesta limitada en Phe.

Generalmente la identificación de pacientes sensibles a BH<sub>4</sub> se realiza con un test de sobrecarga con el fármaco. Aunque ha pasado más de una década desde que Kure<sup>122</sup> hizo notar que existía un grupo de pacientes con HFA por déficit de PAH que podrían beneficiarse con su uso, aún no existe acuerdo unánime en relación con la metodología e interpretación de resultados a la hora de llevar a cabo el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

El método para la realización del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> recogido en el protocolo de AECOM para manejo de la PKU en el año 2007<sup>150</sup> consistía en:

1. Durante los dos días anteriores y durante las 24 horas de la prueba, los pacientes toman una alimentación sin restricción proteica y sin la administración de productos exentos de Phe.

Durante esos dos días, previos al ingreso, se toman muestras de sangre en papel a los pacientes cada 8 horas para constatar el aumento en los niveles de Phe al abandonar la dieta.

2. Se administra 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> en una única dosis.
3. En situación basal y a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 horas tras la ingesta del fármaco se extrae sangre seca en papel para determinación de Phe y Tyr<sup>150</sup>.

La prueba se realiza mediante ingreso hospitalario y con canalización de una vía venosa periférica para la extracción de muestras.

Otra alternativa también muy empleada es la administración de una dosis única de 100 mg/Kg de Phe, dando a las 3 horas la sobrecarga con 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub>. Las extracciones en este caso se realizan a las horas anteriormente descritas en pacientes PKU<sup>150</sup>.

Ambos protocolos son los que se han empleado tradicionalmente para la selección de pacientes PKU con déficit de PAH, susceptibles de ser tratados con BH<sub>4</sub>.

En los dos casos el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> se considera positivo si los niveles de Phe basales (con la modalidad de dieta libre dos días antes de la administración de BH<sub>4</sub>) o a las 3 horas de la sobrecarga con Phe, disminuyen >30% a las 8 horas o ≥50% a las 24 horas tras la ingesta de BH<sub>4</sub>.

Casi todos los estudios realizados sobre el tratamiento con BH<sub>4</sub>, en los que también se recoge el método empleado para la prueba de selección de los pacientes susceptibles de ser tratados con el cofactor, han utilizado muestras pequeñas, (n=20<sup>151</sup>, n=36<sup>143</sup>, n=30<sup>152</sup>...)

En 2002 se publicó un estudio en el que se valoraron 1919 pacientes con HFA a los que se había realizado la sobrecarga con BH<sub>4</sub> (1988 – 2002)<sup>153</sup>. En él se administraba 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> 30 minutos antes de una comida, a niños con edades comprendidas entre una semana y 4,6 años de vida, aunque la mediana de edades fue 3 semanas de edad. Se determinaban niveles de Phe basales y a las 4h y 8h tras la ingesta oral de BH<sub>4</sub>, en algunos casos refieren que también se determinó a las 12 h y a las 24 h pero estas últimas no fueron incluidas en el estudio. Se consideraba positivo cuando la Phe en plasma descendía constantemente entre las 0 h y las 4 h y entre las 4 h y las 8 h tras la administración de BH<sub>4</sub> al menos un 5%. Esta prueba la empleaban para diferenciar las HFA por déficit de PAH de las debidas a alteraciones en la síntesis o reciclaje del cofactor. Según indican en la discusión de este trabajo, tras la publicación de Kure et al. sobre los efectos de BH<sub>4</sub> en los pacientes con déficit de PAH decidieron hacer un estudio retrospectivo de los 1730 pacientes con déficit de PAH a los que habían realizado previamente la sobrecarga con BH<sub>4</sub>, de cara a reclasificarlos en función de las respuestas obtenidas. Llegaron a la conclusión de que el test debía realizarse siempre con niveles de Phe basales >6,6 mg/dL, 3 horas después de una comida y que debían determinarse neopterinas y biopterinas en orina antes del inicio del test. Tras la

administración de 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> el paciente debía continuar con su alimentación habitual y determinar Phe y Tyr a las 0, 4, 8 y 24 h. Se recogería una segunda muestra de orina entre las 4 y las 8 h y debería determinarse la actividad de DHPR en algún momento durante la realización de la prueba. Indican que en aquellos pacientes con cifras inferiores a 6,6 mg/dL de Phe o que ya estuvieran realizando una dieta restringida en Phe debería administrársele una dosis de 100 mg/Kg de Phe 3 horas antes de la administración del cofactor<sup>98</sup>.

Recientemente, también, se ha publicado un trabajo en el que se valora una nueva metodología para la realización del test de sensibilidad de BH<sub>4</sub><sup>154</sup>. La muestra de este estudio consta de 17 pacientes, a los que se suspende la dieta restringida en Phe y suplementada con aminoácidos 6 días antes del primer día de la administración de BH<sub>4</sub>, debiendo realizar una dieta con 50 mg/Kg/día de Phe hasta el final del estudio. Los días -3 y -1 fueron analizados los niveles de Phe antes de administrar BH<sub>4</sub>. Administraron BH<sub>4</sub> los días 0, 7 y 14 en dosis de 10, 20 ó 30 mg/Kg de BH<sub>4</sub> al tratarse de un estudio randomizado doble ciego. Se realizaron determinaciones de Phe a las 4, 8, 12, 16, 24 horas los días 0 y 4, 8, 12, 16 y 24 y también se comprobó que la absorción del fármaco había sido correcta. Tampoco en este estudio se determina si a largo plazo ha sido real la respuesta que se obtuvo en la prueba.

Ante esta situación el Dr. Pérez Pérez diseñó el test que hemos aplicado para la valoración de la respuesta a BH<sub>4</sub> en nuestros pacientes con HFA con déficit de PAH. Su objetivo fue que el test fuera más cómodo para el paciente y su familia, disminuyendo el número de determinaciones analíticas, evitando el ingreso y que el paciente tuviera que tomar alimentos que pudiera seguir teniendo restringidos en un futuro, aumentando aún más la dificultad de una correcta adhesión a la dieta restringida en Phe, sin que se afectara la efectividad de test.

En los últimos años este tipo de test se ha ido extendiendo<sup>122,123</sup>, aunque sigue sin haber consenso en las horas a las que debe extraerse la muestra, la interpretación de la respuesta a BH<sub>4</sub> ni se ha descrito en la literatura hasta qué punto ha sido realmente predictivo el resultado o no.

La mayoría de los centros utilizan el test combinado con una sobrecarga de Phe de 100 mg/Kg, seguida a las 3 horas de una única dosis de 20 mg/Kg, de BH<sub>4</sub><sup>120-122</sup>. En

este caso el resultado depende de las cifras de Phe a las 8 ó a las 24 h de la ingesta de BH<sub>4</sub>. Otros centros han utilizado, al parecer también con éxito, dosis de 10 mg/Kg de BH<sub>4</sub> o han prolongado el test administrando BH<sub>4</sub> durante 3 ó 7 días consecutivos, porque es posible que algunas HFA que no responden a una única dosis de BH<sub>4</sub> puedan hacerlo cuando se administra durante más tiempo. En este caso la respuesta se considera positiva cuando la Phe en plasma se estabiliza en concentraciones inferiores a las consideradas tributarias de tratamiento dietético<sup>155</sup>.

Nosotros, al igual que Baldellou et al. (2006)<sup>151</sup>, consideramos que este último tipo de test es más bien un ensayo terapéutico, que de hecho es el que hemos utilizado con dosis de 20 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub> en aquellos pacientes con resultado negativo en el test combinado para verificar el resultado del mismo.

El test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, detallado anteriormente, se ha realizado, sin incidencias, en 115 pacientes, y ha resultado útil para identificar los pacientes respondedores, ya que salvo 3 resultados dudosos que se discutirán con posterioridad, todos los demás han tenido respuestas concordantes con su fenotipo y su genotipo.

No se ha realizado cuantificación de biopterinas, con objeto de verificar la absorción de BH<sub>4</sub>, ya que no parece que exista una buena correlación entre la respuesta al test y la concentración de pterinas en la orina tras la sobrecarga<sup>156</sup>. Por otra parte, la BH<sub>4</sub> se administró en la consulta por lo que quedaba asegurada la ingesta completa de la dosis administrada.

A todos los pacientes con resultado positivo en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y que realizaban dieta restringida en proteínas se les administró el fármaco, pudiendo liberalizar la alimentación hasta el punto de no precisar suplementos de aminoácidos sin Phe, lo que confirma el resultado positivo de la prueba realizada.

Un caso no respondió al tratamiento a pesar de descender las cifras de Phe un 77,8% a las 24 horas, de tener un fenotipo moderado (13 mg/dL de Phe al diagnóstico), concordante con las cifras de Phe a las 3 horas de la sobrecarga con Phe (11,38 mg/dL) y un genotipo con una mutación que podría responder a BH<sub>4</sub> (V388M). Finalmente se suspendió el tratamiento y se ha atribuido la ausencia de respuesta a los múltiples procesos intercurrentes que presentó el paciente durante los 6 meses que estuvo

realizando tratamiento con BH<sub>4</sub> ya que este período coincidió con el inicio de la escolarización.

Hemos observado en 3 pacientes con PKUS, que tenían una dieta restringida en proteínas, por lo que precisaron tratamiento con BH<sub>4</sub> para realizar una alimentación sin restricción proteica alguna, que a los 2 años en dos casos y al año y medio en el tercero se pudo suspender el tratamiento sin que fuera preciso volver a restringir las proteínas de la alimentación. Este hecho viene a confirmar la hipótesis de que uno de los mecanismos de acción de la BH<sub>4</sub> puede ser que actúe como una chaperona estabilizando la enzima PAH<sup>157</sup> (Datos de los 3 pacientes en color rosa en la tabla 28).

No precisaron restricción proteica 22 pacientes por tener una HFAB, pero durante los procesos infecciosos si presentaban cifras de Phe superiores a 6 mg/dL, por lo que tenían que controlar la alimentación en ese momento. Esto llevó a realizarles el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> y al presentar una respuesta positiva utilizan el fármaco exclusivamente cuando están enfermos.

A todos los pacientes con resultado negativo en el test de BH<sub>4</sub> se les realizó una prueba con 20 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub> y PNAVB en la cantidad correspondiente a la recomendada para su edad por la OMS, durante una semana. Sólo en dos casos se obtuvo respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub>, tanto uno como otro presentaron en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> un descenso entre el 40-50% de Phe a las 24 horas.

A la vista de estos resultados podríamos concluir que serían positivos exclusivamente aquellos test con una respuesta superior al 50% a las 24 horas de la administración de BH<sub>4</sub>, y que sería recomendable la realización de una prueba terapéutica a aquellos con respuesta entre el 40 y el 50%, ya que de los 5 pacientes que tuvieron un descenso de Phe en este rango dos respondieron finalmente al tratamiento con BH<sub>4</sub> tras una semana de terapia con el mismo, y los 3 restantes no.

Estos tres últimos (146, 147, 29) respondieron 40% a las 24 horas de la administración de BH<sub>4</sub>. Tanto el caso 146 como el 147 tuvieron niveles de Phe al diagnóstico acordes a los obtenidas tras la sobrecarga con Phe para la realización del test (Caso 146: 18 y 17,7 mg/dL y Caso 147: 24 y 22 mg/dL de Phe, respectivamente) y con sus genotipos S349P/R261P en el caso 146 e IVS10nt11g>a en homocigosis en el 147.

Sin embargo, en el caso 29 no existió concordancia entre los dos niveles de Phe, ya que al diagnóstico tuvo cifras de 12 mg/dL de Phe y tras la sobrecarga llegó a 24 mg/dL. Esto pudo ser debido a que no estuviera realizando una alimentación adecuada en el momento del diagnóstico y realmente no fuera una PKUM sino una PKUC, pero por otro lado esto discreparía del genotipo de la paciente que era homocigoto para la mutación V388M, de efecto moderado al tener una actividad residual del 43%, que es el porcentaje de respuesta que obtuvo tras la sobrecarga de Phe y la administración de BH<sub>4</sub>.

Esta misma situación se dio en el caso 21 en el que la paciente presentó al diagnóstico niveles de 9 mg/dL de Phe, pero tras la sobrecarga con 20 mg/Kg de Phe ascendieron hasta 19 mg/dL. El porcentaje de respuesta tras la administración de BH<sub>4</sub> fue del 22%, lo que nos ha llevado a predecir que la actividad residual determinada por esta nueva mutación fuera escasa.

Hemos apreciado que el genotipo tiene un papel determinante en la respuesta a BH<sub>4</sub>, ya que en la gran mayoría de casos, en el 95,5%, al menos una de las dos mutaciones estaba asociada o potencialmente asociada a respuesta a BH<sub>4</sub> (Tabla 28).

La presencia de una mutación asociada potencialmente o asociada a respuesta a BH<sub>4</sub> indica una mayor probabilidad de que el paciente sea sensible a BH<sub>4</sub> pero no de una manera tan marcada como la ausencia de la misma a su insensibilidad. De hecho el 26% de los pacientes que eran portadores de al menos de una de estas mutaciones presentaron un test negativo y sólo el 73% restante tuvo un resultado favorable a la administración de BH<sub>4</sub>.

Esto refleja la mayor importancia de la ausencia de mutaciones asociadas a respuesta a BH<sub>4</sub> como marcador de posible falta de respuesta a BH<sub>4</sub> que su presencia como indicador de sensibilidad.

Entre los pacientes que presentaban las dos mutaciones sin respuesta asociada a BH<sub>4</sub> ninguno presentó respuesta positiva, y de los portadores de una de estas mutaciones sólo el 28% tuvo un resultado favorable estando el alelo mutado asociado a mutaciones con una actividad residual entre el 47 y el 80%.

En un estudio realizado por Trefz et al. (2009) sobre la importancia del genotipo en la PKU sensible a BH<sub>4</sub><sup>158</sup> concluyen que es difícil predecir la respuesta a BH<sub>4</sub> en

pacientes con déficit de PAH a partir del genotipo, ya que han obtenido resultados distintos en pacientes con el mismo genotipo. Patean que en estos resultados anómalos pueden influir variantes como la absorción intestinal individual de BH<sub>4</sub>, el tener el paciente un proceso intercurrente que incremente el catabolismo proteico, o variaciones en el protocolo de realización del test, ya que al ser un estudio multicéntrico no habían realizado el mismo test todos los individuos incluidos en el estudio.

En contra de lo reflejado en este estudio, no hemos apreciado respuestas distintas a BH<sub>4</sub> en pacientes cuya genética era igual, a pesar de haber observado en nuestro grupo fenotipos distintos para un mismo genotipo. La respuesta al cofactor ha sido equiparable entre los genotipos iguales en todos los casos, al contrario de lo que se recoge en el trabajo de Lidner et al. de 2001<sup>159</sup>.

Podemos concluir que los resultados del test realizado son concordantes con el genotipo del paciente, que por tanto podría ser un buen predictor de la respuesta a BH<sub>4</sub>.

En cuanto al genotipo volver a resaltar que es más predictiva del resultado la presencia de una mutación no asociada a respuesta a BH<sub>4</sub> que el hecho de ser portador de una mutación asociada a BH<sub>4</sub>.

También ha habido concordancia entre los resultados obtenidos en el test aplicado a nuestros pacientes y la respuesta real al tratamiento con el cofactor.

Estos resultados nos muestran que el test de sensibilidad que hemos realizado no sólo nos sirve para determinar la respuesta a BH<sub>4</sub>, sino que nos aporta información sobre el fenotipo real del paciente al confirmar que el fenotipo adjudicado por las cifras de Phe al diagnóstico concuerda con los niveles de Phe tras la sobrecarga y por otro lado podría aportarnos información sobre la actividad residual de las mutaciones cuya actividad se desconoce, sobre todo en aquellos casos en que se encuentren en homocigosis.

Este sería el caso de las mutaciones IVS4nt+5g>a y la Q304Q, ambas en homocigosis en nuestro estudio y con porcentajes de respuesta a BH<sub>4</sub> del 21,96% y 11,6% respectivamente, así como la nueva mutación L258P ya comentada anteriormente.

También hemos observado que todos los pacientes con cifras de Phe al diagnóstico superiores a 24 mg/dL tuvieron resultados negativos en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, y que en el 95% de los casos con cifras <12 mg/dL el resultado fue positivo. De aquí se puede concluir que las cifras de Phe al diagnóstico son un buen predictor de la respuesta a BH<sub>4</sub> y podríamos plantear, siguiendo a Baldellou<sup>151</sup>, administrar BH<sub>4</sub> directamente a aquellos pacientes con cifras de Phe <12 mg/dL al diagnóstico y que requieren restricción en Phe para mantener un buen control metabólico y limitar el test combinado de Phe/ BH<sub>4</sub> a aquellos pacientes con cifras de Phe entre 12 y 24 mg/dL, ya que en nuestro grupo no hemos encontrado resultados positivos para cifras de Phe al diagnóstico >24 mg/dL.

Dado que las cifras de Phe al diagnóstico guardan una relación directa con la respuesta a BH<sub>4</sub>, se podría plantear hacer la sobrecarga combinada de Phe/BH<sub>4</sub> para iniciar el tratamiento en aquellos pacientes con Phe al diagnóstico >12 mg/dL y que precisan dieta restringida en Phe<sup>151</sup>.

Sin embargo, esta opción aún siendo válida desde nuestro punto de vista, presenta varias limitaciones: Si la prueba terapéutica fuera finalmente negativa el paciente podría haber mantenido cifras elevadas de Phe durante una semana ó 10 día con el subsecuente daño neurológico que esto conllevaría, esto podría evitarse realizando analíticas diarias al paciente, pero eso supone un contratiempo aún mayor que la realización del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, de un día de duración con sólo 5 determinaciones analíticas, dos en la consulta y tres en el domicilio.

Hay que tener en cuenta el gasto que conlleva la realización de un ensayo terapéutico de forma sistemática, aunque sea para una subpoblación de pacientes con HFA, dado el elevado coste del fármaco.

Por último, este ensayo terapéutico sólo podría realizarse en aquellos pacientes que tengamos certeza de que se van a ajustar a las indicaciones nutricionales dadas en la consulta, ya que el hecho de estar tomando el fármaco puede prestarse a una relajación excesiva de la dieta que no corresponda a la dosis administrada de BH<sub>4</sub>, llevando al paciente a tener un mal control metabólico.

Por todos estos motivos, consideramos preferible la realización de un test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> como el que hemos realizado y contrastado con los resultados de este

estudio, por tratarse de una prueba simple que sólo precisaría acudir a la consulta una mañana coincidiendo con una revisión rutinaria, ya que el resto de determinaciones serían extraídas en sangre seca y remitidas por correo desde el domicilio, evitando de esta forma los riesgos de la prueba terapéutica, empleada en este estudio únicamente como método de control de los resultados obtenidos con el test de sensibilidad aplicado a nuestros pacientes.

Hay que especificar que aún no hay experiencia suficiente sobre los posibles efectos secundarios del tratamiento mantenido con dosis farmacológicas en estos pacientes, pues no deben extrapolarse los descritos para el tratamiento de las HFA por defecto de la síntesis o reciclaje del cofactor, ya que aunque el resultado en ambas patologías es la HFA, la etiopatogenia no es común.

BH<sub>4</sub> es cofactor de las hidroxilasas de Phe, Tyr y Tryp, por lo que desde este punto de vista puede tener efectos beneficiosos para regular la síntesis y función de neurotransmisores de este tipo de pacientes<sup>160</sup>, pero también podría desencadenar trastornos del funcionamiento del SNC por la repercusión que una dosis alta y mantenida puede tener en la síntesis y en el efecto de las catecolaminas y aminos biógenas en las células neuronales<sup>161</sup>. También interviene en la síntesis de NO y en la función del endotelio vascular, donde tampoco se conoce como influiría un tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub><sup>162,163,164</sup>.

En nuestros pacientes se ha iniciado siempre el tratamiento con una dosis de 5 mg/Kg/día repartida en 3 dosis mientras se utilizó 6R-Tetrahydrobiopterine (Shircks Laboratories, Switzerland®), o en una única dosis al día desde Enero de 2009 que se introdujo Sapropterina (Merck Serono®) en nuestro hospital, de acuerdo con la farmacocinética<sup>165,166</sup>.

Esto se hizo con la intención de detectar la mínima dosis eficaz y evitar en la medida de lo posible los efectos adversos que de este tratamiento pudieran derivarse.

Las dosis que han precisado nuestros pacientes son superponibles a las de otros grupos y confirman una vez más que el tratamiento con BH<sub>4</sub> es individual y dosis-dependiente<sup>167,168</sup> (Tabla 30).

Actualmente no se han detectado efectos secundarios a corto plazo, pero no ha pasado tiempo suficiente para poder descartarlos, ya que por ejemplo, de nuestra muestra no hay ningún paciente con déficit de PAH que lleve más de 2 años de tratamiento con BH<sub>4</sub>.

No podemos olvidar que la restricción proteica en la dieta de los pacientes fenilcetonúricos, orientada a mantener los niveles de Phe en el rango previsto según tolerancia individual, tiene como contrapunto la aparición de deficiencias nutricionales<sup>64,65,66,169,170</sup>, de ahí la importancia de realizar una monitorización exhaustiva desde el punto de vista clínico, dietético y analítico.

Al estandarizarse el tratamiento con BH<sub>4</sub> nos planteamos hasta qué punto el cambio en la alimentación mejoraría el estado nutricional de los pacientes con HFA que dejaban de realizar una dieta restringida en Phe por presentar una respuesta positiva a BH<sub>4</sub>.

El primer paso fue buscar en la literatura trabajos que describieran las ventajas de una dieta liberalizada por el uso de BH<sub>4</sub> comparándola con la dieta restringida en Phe que generalmente requieren estos pacientes.

Llamó la atención que en algunos de los trabajos publicados se hacía referencia a la mejora de la calidad de vida del paciente y de su familia por la liberación de la dieta, y en un trabajo a la mejoría del comportamiento del paciente, atribuido, en cierto modo, a la disminución de la presión psicosocial que conlleva la restricción dietética en estos pacientes<sup>151</sup>, pero sólo encontramos un trabajo que hacía mención a la valoración nutricional de los pacientes con PKU tras los cambios en la nutrición por la ingesta de BH<sub>4</sub><sup>171</sup>.

En este estudio indican que la alimentación natural comparada con la fórmula exenta de Phe, favorece el aumento de los niveles de selenio en sangre, que la BH<sub>4</sub> no afecta al desarrollo pondoestatural del paciente, en cuanto a parámetros antropométricos y nutricionales y que tras 12 meses de tratamiento el CI se mantuvo. No se analizó en este trabajo la evolución de las proteínas nutricionales en plasma.

Nosotros hemos querido valorar si la calidad de la alimentación repercute en el perfil nutricional de los pacientes con HFA.

Por este motivo nos planteamos comparar la situación nutricional del grupo de pacientes que realizaba tratamiento con BH<sub>4</sub> antes del inicio del tratamiento, cuando

realizaban una dieta restringida en Phe y suplementada con aminoácidos, y tras un año sin restricción alguna de proteínas naturales.

Seleccionamos finalmente para la valoración nutricional de estos pacientes, el estudio de las proteínas plasmáticas por ser indicadores del estado nutricional, que se modifican con rapidez, por ejemplo la vida media de la prealbúmina y la transferrina es de 2-3 días y 8-9 días respectivamente, por lo que pueden utilizarse como marcadores rápidos del estado proteico visceral<sup>172</sup>, mientras los datos antropométricos y las vitaminas y oligoelementos precisan déficits nutricionales severos para apreciar alteraciones leves.

Tras comparar los niveles de transferrina, prealbúmina, albúmina y P.L.R en los pacientes que realizan tratamiento con BH<sub>4</sub> antes de iniciar dicho tratamiento, y por tanto realizando una alimentación restringida en PN, y al año de haber aumentado la ingesta de dichas proteínas por estar tomando BH<sub>4</sub>, hemos apreciado que desde el punto de vista estadístico no existe diferencias significativas entre los niveles de estas proteínas antes y después de la modificación de la dieta por la ingesta de BH<sub>4</sub> ( $p=0,17$ ;  $p=0,157$ ;  $p=0,626$  y  $p=0,306$  respectivamente).

La transferrina se mantuvo dentro del rango de normalidad en todos los casos, detectándose una modificación leve entre antes y después de la ingesta de BH<sub>4</sub> en un único caso que presentó niveles de transferrina ligeramente por encima del límite mayor de la normalidad (400 mg/dL: normal 200-360 mg/dL).

La prealbúmina también estaba, antes y después del cambio en la nutrición, en el rango de referencia, si bien es cierto que experimentó un ligero incremento tras la liberalización de la ingesta de proteínas naturales (Tabla 34), posiblemente por ser de todas las proteínas nutricionales plasmáticas la más sensible a las modificaciones de la alimentación, aunque dichos cambios no fueron estadísticamente significativos ni relevantes a nivel clínico.

Respecto a la albúmina no sólo no hubo diferencias significativas sino que los niveles tras el aumento de los niveles de PN estaban incluso ligeramente más bajos, como podemos apreciar en el gráfico 20 tres casos extremos, dos de ellos por exceso y uno por defecto, pero en cualquiera de los 3 casos seguían manteniéndose en el intervalo de la normalidad.

Finalmente el comportamiento de la P.L.R ha sido muy similar al de la albúmina ya que se ha estrechado el rango de los niveles de P.L.R tras el incremento de la ingesta de

PN, y aunque existen 4 casos extremos, 3 por exceso y uno por defecto, han seguido situándose en el rango de los valores de referencia para esta proteína.

Los valores de las cuatro proteínas plasmáticas, durante todo el tiempo que estos pacientes realizaron dieta restringida en PN con suplemento de aminoácidos, estuvieron dentro del rango que indica normalidad.

El no tener más que un estudio con una muestra inferior a la nuestra<sup>171</sup>, no nos permite hacer comparaciones de nuestros resultados con los de otros trabajos.

La ausencia de investigaciones en este sentido nos lleva a plantear la posibilidad de que no es que no se hayan realizado, sino que al no existir diferencias relevantes no se hayan publicado, ya que con frecuencia en la literatura sólo se recogen estudios con resultados positivos.

Por lo que podríamos concluir, a la vista de los datos de nuestro estudio, que la nutrición de los pacientes con HFA basada en la restricción de PN con suplemento óptimo de aminoácidos, es tan adecuada como la alimentación sin limitaciones en la ingesta proteica.

Sería conveniente, no obstante, la realización de nuevos estudios que valoren otros aspectos derivados de la nutrición como la existencia de cambios en la mineralización ósea de los pacientes en tratamiento con BH<sub>4</sub> al poder tomar la cantidad de leche o derivados para su edad y sexo, y nuevos estudios de valoración de la calidad de vida independientemente de las repercusiones nutricionales que puedan derivarse de este tratamiento.

También hay que considerar la limitación del corto período de tiempo que ha transcurrido desde el inicio del tratamiento con BH<sub>4</sub>, y del tamaño de la muestra, ya que aunque para estudios de una enfermedad rara se considera que la muestra es adecuada si  $n > 20$ , sería conveniente ampliar la muestra y volver a valorar en un período de 5 - 10 años.

## **8. CONCLUSIONES**

## 8. CONCLUSIONES

1. El fenotipo más frecuente en la población andaluza es el de PKUC. Andalucía presenta una gran heterogeneidad genotípica dado que se han observado 71 mutaciones distintas, siendo la más frecuente la IVS10nt11g>a.
2. La mutación S349P, que hoy día es la segunda en frecuencia en nuestro estudio y es una de las más frecuentes en el Norte de África, así como la presencia de las mutaciones A403V y la D415N, características también de esta zona del continente africano, que presentan una prevalencia mayor en Andalucía que en el resto del país, muestra la influencia árabe que ha tenido nuestra Comunidad.
3. Existe una relación genotípica entre la población PKU andaluza y la de Portugal al observarse coincidencia en la mutación más frecuente, IVS10nt-11g>a, y que la segunda y tercera en frecuencia en la población PKU portuguesa (R261Q, V388M) son la tercera y sexta en frecuencia en la actualidad en Andalucía.
4. Existe una gran diferencia genotípica entre la población PKU andaluza y la PKU del resto de Europa, especialmente de los países del Norte, esta diferencia también se aprecia con el resto de las comunidades españolas aunque en menor medida. Las tres mutaciones más frecuentes en España (IVS10nt11g>a, I65T Y V388M) están presentes entre las más frecuentes de Andalucía. Nuestra Comunidad coincide en la mutación más prevalente en España, la IVS10nt11g>a, aunque variando en la frecuencia con respecto al resto de las regiones. La 2ª y 3ª en frecuencia en España, I65T Y V388M, son la 5ª y 3ª respectivamente en la población estudiada.
5. El genotipo tiene un papel determinante en la respuesta a BH<sub>4</sub>, ya que en la gran mayoría de casos, el 95,5%, al menos una de las dos mutaciones está asociada o potencialmente asociada a respuesta a esta medicación. Sin embargo, su presencia no es un buen indicador de la posible sensibilidad al BH<sub>4</sub>. Por el contrario, la ausencia en un paciente de mutaciones asociadas a respuesta a BH<sub>4</sub> es un potente marcador de posible falta de respuesta a este tratamiento.
6. La tolerancia proteica presenta una relación significativa con las cifras de Phe al diagnóstico, por lo que este último dato perfectamente podría definir el fenotipo,

y por tanto la tolerancia de Phe en la dieta que presentarán los pacientes así como constituir un buen predictor de la posible respuesta a BH<sub>4</sub>.

7. Existe concordancia entre los resultados obtenidos en el test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> aplicado a nuestros pacientes y la respuesta real al tratamiento con el cofactor, demostrada por presentar el paciente niveles de Phe adecuados con una ingesta de proteínas nutricionales acorde a la CDR por la OMS para su edad. Podemos considerar, por tanto, válido este nuevo método para la selección de pacientes susceptibles de ser tratados BH<sub>4</sub>. Aporta una mayor comodidad para el paciente, evitaría de esta forma los posibles riesgos derivados de una prueba terapéutica y no precisa hospitalización.
8. Los puntos de corte para la valoración del test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> consideramos que deben establecerse de la siguiente manera: resultado positivo si se produce un descenso de Phe de más del 50% a las 24 horas de la administración de la sobrecarga de Phe, dudoso cuando se produce un descenso de Phe del 40 al 50% y negativo si se produce un descenso de Phe de menos del 40% a las 24 horas de la administración de la sobrecarga de Phe. Este último grupo no precisaría realizar prueba terapéutica de ensayo, ya que en el 100% de los casos no se varió su respuesta tras la aplicación de la misma, quedando esta limitada al grupo que responde entre el 40 – 50%.
9. El test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> nos proporciona información sobre el fenotipo real del paciente al confirmar que el fenotipo adjudicado por las cifras de Phe al diagnóstico concuerda con los niveles de Phe tras la sobrecarga. Así mismo podría aportarnos información sobre la actividad residual de las mutaciones cuya actividad se desconoce, sobre todo en aquellos casos en que se encuentren en homocigosis.
10. El tratamiento con BH<sub>4</sub> es individual y dosis-dependiente. Consideramos que la repuesta a BH<sub>4</sub> observada en los 3 pacientes con PKUS, que precisaron dieta restringida en Phe y ser tratados con BH<sub>4</sub> para realizar una alimentación sin restricción proteica alguna y a los que se pudo retirar la terapia con el cofactor entre 1,5 y 2 años después del inicio del fármaco sin que fuera preciso volver a restringir las proteínas de la alimentación, puede ser debida a la estabilización de la enzima PAH por BH<sub>4</sub>, que habría actuado en este caso como chaperona de la

enzima. No se ha detectado efectos secundarios a corto plazo, pero es necesario un seguimiento de confirmación.

11. No existen diferencias significativas entre los niveles de la prealbúmina, albúmina, transferrina y P.L.R antes y después de la modificación de la dieta por la ingesta de BH<sub>4</sub>. La nutrición proteica de los pacientes HFA con restricción de PN y suplemento de aminoácidos es tan adecuada como la alimentación sin limitaciones en la ingesta de PN.
12. Dado que se ha comprobado en este estudio la existencia de pacientes con HFA que actualmente no están siendo controlados, sería recomendable crear un protocolo de prevención y diagnóstico del SPKUM en Andalucía y a nivel Nacional, divulgando este hecho en las Unidades de Neonatología, Cardiología Pediátrica, y sobre todo Planificación Familiar y Ginecología, ya que la situación ideal es detectar estas mujeres con HFA antes de quedar embarazadas.

## **9. RESUMEN**

## 9. RESUMEN

**Objetivos:** Determinar el fenotipo y genotipo de la población con HFA de Andalucía. Valorar la utilidad de un nuevo test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> en pacientes con HFA por déficit de PAH. Analizar si existen diferencias nutricionales entre PKU con dieta restringida en PN y PKU con ingesta de PN adecuada a la CDRP por la OMS para su edad, por estar realizando tratamiento con BH<sub>4</sub>.

**Material y Método:** En una primera fase descriptiva observacional se determinó el fenotipo de los pacientes a partir de los niveles de Phe al diagnóstico de la PKU y mediante la tolerancia de Phe en la dieta. El estudio del genotipo de los PKU se realizó mediante DGGE y secuenciación directa del DNA genómico.

El test de sensibilidad a BH<sub>4</sub> se realizó, sin necesidad de ingreso hospitalario, sin restricción proteica y realizándose en consulta una sobrecarga oral con 100 mg/Kg de Phe y a las 3 horas administración de una dosis única de BH<sub>4</sub> de 20 mg/Kg, vía oral con controles de los niveles de Phe a las 0, 7, 12 y 24 horas tras la ingesta de BH<sub>4</sub>. Las últimas 3 determinaciones se extraen en sangre seca en papel en el domicilio del paciente y se remiten por correo.

Para la determinación del estado nutricional se determinaron los niveles de prealbúmina, albúmina, transferrina y P.R.L en pacientes con PKU antes de iniciar el tratamiento con BH<sub>4</sub>, realizando una dieta restringida en Phe, y al año de iniciarse la terapia con este fármaco con dieta sin restricción en PN.

**Resultados:** Se determinaron el fenotipo y el genotipo de 165 y 147 pacientes con déficit de PAH respectivamente. El fenotipo más frecuente en la población andaluza fue la PKUC (40% de las HFA). Además, se observó que un grupo de pacientes no quedarían reflejados en la clasificación de Güttler por lo que se agruparon en una versión modificada de ésta, creando un grupo para los pacientes que toleran menos de 250 mg de Phe al día (35,2% de HFA) y otro para aquellos con una tolerancia superior a 800 mg de Phe al día (14,1% de HFA). Destacar que los niveles de Phe al diagnóstico se han mostrado como un buen indicador del fenotipo de nuestros pacientes.

Se observaron 71 mutaciones siendo las más frecuentes IVS10nt11-g>a (10,9%), S349P (8,2%) y V388M (7,5%). Se han detectado 7 mutaciones nuevas. Todos estos

datos le confieren una gran heterogeneidad a la población con HFA andaluza. Se ha apreciado como esta diversidad genética es similar a la apreciada con anterioridad en el resto de España en comparación con otras poblaciones próximas.

Después de realizar 118 test de sensibilidad a BH<sub>4</sub>, y de excluir 3 por presentar vómitos durante la prueba, se ha valorado este nuevo test que mostró ser una herramienta cómoda y eficaz para detectar los pacientes con HFA por déficit de PHA susceptibles de realizar dicho tratamiento. Una disminución de más del 50% de los niveles de Phe a las 24 horas de la toma de la BH<sub>4</sub> sería un resultado positivo (41,7% de casos), un descenso del 40-50% sería dudoso con necesidad de realizar una prueba terapéutica (4,3% de casos) y negativo si fuera menor del 40% (52,9% de casos).

El fenotipo y el genotipo se pueden mostrar como buenos indicadores a la hora de valorar una posible sensibilidad al tratamiento con BH<sub>4</sub> en los pacientes con HFA.

El perfil nutricional de los pacientes con HFA, valorando la prealbúmina, albúmina, transferrina y P.L.R, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre realizar dieta restringida en Phe con un suplemento adecuado de aminoácidos exentos de Phe y tener una ingesta de PN adecuada a la CDRP para la edad del paciente por estar realizando tratamiento con BH<sub>4</sub>, al año de aumentar la ingesta de PN.

**Conclusiones:** En los casos de HFA de nuestro estudio la PKUC es el fenotipo más frecuente. Se ha mostrado una gran diversidad genética en los pacientes con HFA. El nuevo test de sensibilidad es un método eficaz de determinar qué pacientes con HFA pueden beneficiarse de tratamiento con BH<sub>4</sub>. No se observan diferencias nutricionales entre pacientes con restricción proteica y aquellos que han realizado tratamiento con BH<sub>4</sub> con “liberalización” dietética.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/612349>.
- <sup>2</sup> Pites J, Benninger C, Schmidt H, Scheffner D, Bickel H. Long-term development of intelligence (IQ) and EEG in 34 children with phenylketonuria treated early. *Eur J Pediatr* 1998;147:361-367.
- <sup>3</sup> Welsh M, Pennington B. Phenylketonuria. In: Yeates KO, Ris MD, Taylor HG, editors. *Pediatric neuropsychology*. New York: Guildford Press; 2000. P. 275-299.
- <sup>4</sup> Rosenberg LE. Legacies of Garrod's brilliance. One hundred years-and counting. *J Inher Metab Dis* 2008;31:574-9.
- <sup>5</sup> Cotton RGH, Scriver CR. Proof of disease causing mutation. *Hum Mutat* 1998;12:1-32.
- <sup>6</sup> Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, editores. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667-1724.
- <sup>7</sup> Ministerio de Sanidad y Política Social. *Estrategias en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud*. Sanidad, 2009.
- <sup>8</sup> Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L, Ojembarrena E, Aquino L. Enfermedades congénitas del metabolismo: generalidades, grupos clínicos y algoritmos diagnósticos. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Madrid: Ergon; 2006. p. 63-98.
- <sup>9</sup> Folling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994;407:4-10.
- <sup>10</sup> Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. *J Biol Chem* 1947;169:651-6.
- <sup>11</sup> Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of Phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children and a scientist. *Pediatrics* 2000;105:89-103.
- <sup>12</sup> Guthrie R, Susie A. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 2:338-343.
- <sup>13</sup> Rivas M, Cáceres A, Mora M, Rivas G. Fenilcetonuria: Bases moleculares e implicaciones sociales. *Medisan* 2003;7:89-99.

- <sup>14</sup> Speer A, Bollman R, Michel A, Neumann R, Bommer C, Hanke R et al. Coutelle C. Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by linked restriction fragment length polymorphism analysis. *Prenat Diagn* 1986;6:447-50.
- <sup>15</sup> Davenport HW. Digestión y Absorción Intestinal de Proteínas. En: Davenport HW, editor. *Fisiología de la Digestión*. Chicago: Interamericana; 1968. p. 197-203.
- <sup>16</sup> Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667-1724.
- <sup>17</sup> Blau N, Beat T. Tetrahydrobiopterine in biomedical research. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:1-2.
- <sup>18</sup> Rezvani I. Trastornos del metabolismo de los aminoácidos. En: Behrman RE, Kliegman RM, Jonson HB, editores. *Tratado de pediatría Nelson*. 17 ed. Madrid: Elsevier; 2004. p. 398-402.
- <sup>19</sup> Zschoche J, Hoffman M. Disorders of phenylalanina and tyrosina metabolism. En: Zschoche J, Hoffman M, editores. *Vademecum metabolicum*. 2 ed. Schattauer; 2004. p.71-72.
- <sup>20</sup> Rutas metabólicas. Sociedad española de errores innatos del metabolismo. Disponible en <http://www.eimaep.org>.
- <sup>21</sup> Keis R. Comments in vivo proton magnetic resonante spectroscopy in phenylketonuria. *Eur J Pediatric* 2000; 159: S126-S128.
- <sup>22</sup> Kaufman S, Fisher DB. Purification and some physical properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver. *J Biol Chem* 1970; 245:4745.
- <sup>23</sup> Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 1999;67:308-16.
- <sup>24</sup> Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke KR, Rodl W et al. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994;263:1444-6.
- <sup>25</sup> Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999;68:103-25.
- <sup>26</sup> Konecki D, Lichter-Konecki U. 2001;GenBank AF4044777.
- <sup>27</sup> Pey AL. Efecto de mutaciones sobre la estructura-función de la proteína fenilalanina hidroxilasa. Mecanismos moleculares responsables de la respuesta a tetrahidrobiopterina en Fenilcetonuria. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. 2004.

- <sup>28</sup> The maternal phenylketonuria collaborative study: a status report. *Nutr Rev* 1994;52:390-393.
- <sup>29</sup> Meinster A. Phenylpyruvic oligophrenia. *Pediatrics* 1958;21:1021-31.
- <sup>30</sup> Poser CM, van Bogaert L. Neuropathologic observations in phenylketonuria. *Brain* 1959;82:1-9.
- <sup>31</sup> MacCready RA. Admissions of phenylketonuric patients to residential institutions before and after screening programs of the newborn infant. *J Pediatr* 1974;85:383.
- <sup>32</sup> Estrov Y, Scaglia F, Bodamer OA. Psychiatric symptoms of inherited metabolic disease. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23:2-6.
- <sup>33</sup> Huttenlocher PR. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr* 2000;159:S102-6.
- <sup>34</sup> Partington MW. The early symptoms of phenylketonuria. *Pediatrics* 1961;27:465-73.
- <sup>35</sup> Seashore MR, Friedman EG, Novelty RA, Bapat V. Loss of intellectual function in children with phenylketonuria after relaxation of dietary phenylalanine restriction. *Pediatrics* 1985;75:226-232.
- <sup>36</sup> Holtzman NA, Kronmal RA, van Doorninck W, Azen C, Koch R. Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *N Engl J Med* 1986;314:593-8.
- <sup>37</sup> Levy HL, Waisbren SE. PKU in adolescents: rationale and psychosocial factors in diet continuation. *Acta Paediatr Suppl* 1994;407:92-7.
- <sup>38</sup> Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:333-46.
- <sup>39</sup> Campistol J, Lambruschini N, Gómez L, Gutiérrez A, Fusté E, Vilaseca MA. Hiperfenilalaninemia. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas*. Madrid: Ergon; 2009. p. 423-441.
- <sup>40</sup> Ormazábal A, Artuch R, Vilaseca MA, García-Cazorla A, Campistol J. Pathogenetic mechanisms in phenylketonuria: disorders affecting the metabolism of neurotransmitters and the antioxidant system. *Rev Neurol* 2004;39:956-61.
- <sup>41</sup> Spronse FJV, Dijk TV, Smit GPA. Large daily fluctuation in plasma tyrosine in treated patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1996;64:916-21.
- <sup>42</sup> Tam SY, Roth RH. Mesofrontal opaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions? *Biochemical Pharmacol* 1997;53:441-53.

- <sup>43</sup> Kaufman S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *J Pediatr* 1989;114:895-900.
- <sup>44</sup> Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Campistol L, Lambruschini N, Cambra FJ et al. Antioxidant status in hyperphenilalaninemia. *Clin Chim Acta* 1998;276:1-9.
- <sup>45</sup> Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J. Decreased serum ubiquinone-10 concentration in PKU. *Am J Clin Nutr* 1999;70:892-5.
- <sup>46</sup> Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR. Expression analysis of phenylketonuria mutations: effects on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem* 2000;275:29737-29742.
- <sup>47</sup> Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR. In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat* 1998;11:4-17.
- <sup>48</sup> Tyfield LA, Zschocke J, Stephenson A, Cockburn F, Harvie A, Bidwell JL et al. Discordant phenylketonuria phenotypes in one family: the relationship between genotype and clinical outcome is a function of multiple effects. *J Med Genet* 1995;32:867-70.
- <sup>49</sup> Guldberg P, Levy HL, Koch R, Berlin CM Jr, Francois B, Henriksen KF et al. Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency: inheritance and expression of the hyperphenylalaninemia. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:645.
- <sup>50</sup> Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997;61:1309-17.
- <sup>51</sup> Desviat LR, Perez B, García MJ, Martínez-Pardo M, Baldellou A, Arena J et al. Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur J Hum Genet* 1997;5:196-202.
- <sup>52</sup> Lichter-Konecki U, Rupp A, Konecki DS, Trefz FK, Schmidt H, Burgard P. Relation between phenylalanine hydroxylase genotypes and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of hyperphenylalaninaemic disorders. German Collaborative Study of PKU. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:362-365.
- <sup>53</sup> Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L 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;63:71-79.

- <sup>54</sup> 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;60:95-102.
- <sup>55</sup> Guttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand* 1980; 280:1.
- <sup>56</sup> National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Phenylketonuria: screening and management. *Pediatrics* 2001;108:972-982.
- <sup>57</sup> Bartholome K, Lutz P, Bickel H. Determination of phenylalanine hydroxylase activity in patients with phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *Pediatr Res* 1975;9:899-903.
- <sup>58</sup> Trefz FK, Bartholomé K, Bickel H, Lutz P, Schmidt H, Seyberth HW. In vivo residual activities of the phenylalanine hydroxylating system in phenylketonuria and variants. *J Inherit Metab Dis* 1981;4:101-102.
- <sup>59</sup> Desviat LR, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain. Molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 1999;7:386-392.
- <sup>60</sup> Martínez-Pardo M, Marchante C, Dalmau J, Pérez M, Bellón C. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. *An Esp Pediatr Suppl* 1998;114:3-8.
- <sup>61</sup> Cockburn F, Barwel BE, Brenton P, Chaple J, Clark B, Curzon G et al. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1993;68:426-427.
- <sup>62</sup> Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999;158:46-54.
- <sup>63</sup> Sanjurjo P, Baldellou A, Aldámiz-Echevarría L. Nutrición y errores innatos del metabolismo. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas*. Madrid: Ergon; 2006. p. 211-228.
- <sup>64</sup> Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr* 2000;136:545-547.
- <sup>65</sup> Vilaseca MA, Briones P, Ferrer I, Campistol J, Riverola A, Castillo P et al. Controlled diet in phenylketonuria may cause serum carnitine deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1993;16:101-4.

- <sup>66</sup> Darling G, Mathias P, O'Regan M, Naughten E. Serum selenium levels in individuals on PKU diets. *J Inherit Metab Dis* 1992;15:769-73.
- <sup>67</sup> Vlaardingerbroek H, Hornstra G, de Koning TJ, Smeitink JA, Bakker HD, de Klerk HB et al. Essential polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocytes of children with inborn errors of amino acid metabolism. *Mol Genet Metab* 2006;88:159-65.
- <sup>68</sup> MacDonald A, Lilburn M, Cochrane B, Davies P, Daly A, Asplin D et al. A new low-volume protein substitute for teenagers and adults with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:127-35.
- <sup>69</sup> Macdonald A, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall SK, Rylance G et al. Protein substitutes for PKU: what's new?. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:363-71.
- <sup>70</sup> MacDonald A, Lilburn M, Davies P, Evans S, Daly A, Hall SK et al. Ready to drink' protein substitute is easier is for people with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:526-31.
- <sup>71</sup> Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thony B. Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther*. 2008;16:673–681.
- <sup>72</sup> Sarkissian CN, Shao Z, Blain F. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;A 96:2339-2344.
- <sup>73</sup> Liu J, Jia X, Zhang J, Xiang H, Hu W, Zhou Y. Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artif Cells Blood Substit Immobil biotechnol* 2002;30:243-257.
- <sup>74</sup> Sarkissian CN, Gamez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:20894–20899.
- <sup>75</sup> Koch R, Moseley KD, Yano S. Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol Genet Metab* 2003;79:110-113.
- <sup>76</sup> Matalon R, Surendran S, Matalon KM. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. *Pediatrics* 2003;112:1570-1574.
- <sup>77</sup> Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:732–738.

- <sup>78</sup> Muntau AC, Roschinger W, Habich M. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002;347:2122-2132.
- <sup>79</sup> Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2004;82:101-111.
- <sup>80</sup> Burgard P, Schmidt E, Rupp A. Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155:33-38.
- <sup>81</sup> Camfield CS, Joseph M, Hurley T. Optimal management of phenylketonuria: a centralized expert team is more successful than a decentralized model of care. *J Pediatr* 2004;145:53-7.
- <sup>82</sup> Smith I, Beasley MG, Ades AE. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990;65:472-478.
- <sup>83</sup> Smith I, Beasley MG, Ades AE. Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1991;66:311-316.
- <sup>84</sup> Burgard P, Link R, Schweitzer-Krantz S. Phenylketonuria: evidence-based clinical practice. Summary of the roundtable discussion. *Eur J Pediatr* 2000;159:163-168.
- <sup>85</sup> Lundstedt G, Johansson A, Melin L, Alm J. Adjustment and intelligence among children with phenylketonuria in Sweden. *Acta Paediatr* 2001;90:1147-1152.
- <sup>86</sup> Cleary MA, Walter JH, Wraith JE, White F, Tyler K, Jenkins JP. Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change. *J Pediatr* 1995;127:251-255.
- <sup>87</sup> Feldmann R, Denecke J, Pietsch M, Grenzebach M, Weglage J. Phenylketonuria: no specific frontal lobe-dependent neuropsychological deficits of early-treated patients in comparison with diabetics. *Pediatr Res* 2002;51:761-765.
- <sup>88</sup> Thompson AJ, Smith I, Brenton D, Youl BD, Rylance G, Davidson DC et al. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1990;336:602-605.
- <sup>89</sup> Kerr GR. The free amino acids of serum during development of *Macaca mulatta*. II. during pregnancy and fetal life. *Pediatr Res* 1968;2:493-500.
- <sup>90</sup> Huntley CC, Stevenson RE. Maternal phenylketonuria. Course of two pregnancies. *Obstet Gynecol* 1969;34:694-700.

- <sup>91</sup> Discussion of Armstrong MD. The relation of biochemical abnormality to the development of mental defect in phenylketonuria. Columbus Ohio: Ross Laboratories 1957.
- <sup>92</sup> Lenke RR, Levy HL. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N Engl J Med* 1980;303:1202-1208.
- <sup>93</sup> Rouse B, Matalon R, Koch R, Azen C, Levy H, Hanley W et al. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes. *J Pediatr* 2000;136:57-61.
- <sup>94</sup> Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon K, Matalon R, Rouse B et al. The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002. *Pediatrics* 2000;112:1523-1529.
- <sup>95</sup> Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon R, Rouse B, Trefz F et al. Maternal phenylketonuria: an international study. *Mol Genet Metab* 2000;71:233-239.
- <sup>96</sup> Levy HL, Waisbren SE, Güttler F, Hanley WB, Matalon R, Rouse B et al. Pregnancy experiences in the woman with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatrics* 2003;112:1548-1552.
- <sup>97</sup> Soltesz G, Harris D, Mackenzie IZ, Aynsley-Green A. The metabolic and endocrine milieu of the human fetus and mother at 18-21 weeks of gestation. I. Plasma amino acid concentrations. *Pediatr Res* 1985; 19:91-93.
- <sup>98</sup> Walter JH, Lee PJ, Burgard P. Hyperphenylalaninaemia. En: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 4 ed. Germany: Springer; 2006. p. 221-232.
- <sup>99</sup> Ponzzone A, Guardamagna O, Spada M, Ferraris S, Ponzzone R, Kierat L et al. Differential diagnosis of hyperphenylalaninaemia by a combined phenylalanine tetrahydrobiopterin loading test. *Eur J Pediatr* 1993;152:655-661.
- <sup>00</sup> Hyland K, Surtees RA, Heales SJ, Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr Res* 1993;34:10-14.
- <sup>01</sup> Smith I, Hyland K, Kendall B. Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency. *J Inher Metab Dis* 1985;8:39-45.
- <sup>02</sup> Hyland K. Abnormalities of biogenic amine metabolism. *J Inher Metab Dis* 1993;16:676-690.

<sup>03</sup> Spada M, Ferraris S, Ferrero GB, Sartore M, Lanza C, Perfetto F et al. Monitoring treatment in tetrahydrobiopterin deficiency by serum prolactin. *J Inherit Metab Dis* 1996;19:231-233.

<sup>04</sup> Schuler A, Kálmánchey R, Barsi P, Somogyi CS, Törös I, Váradi I et al. Deprenyl in the treatment of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:329-332.

<sup>05</sup> Ponzzone A, Spada M, Ferraris S, Dianzani I, de Sanctis L. Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment. *Med Res Rev* 2004;24:127-150.

<sup>06</sup> National Research Council. Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances. 10<sup>a</sup> ed. Washington DC. National Academy Sciences, 1989.

<sup>07</sup> Food and Nutrition Board. Dietary references intakes. *Nutrition reviews* 1997;55:319-326.

<sup>08</sup> Food and Nutrition Board. Uses of dietary reference intakes. *Nutrition reviews* 1997;55:327-331.

<sup>09</sup> Nutrition American Academy of Pediatrics: Nutrition in infancy and childhood. En: *Pediatric nutrition handbook*. Illinois, American Academy of Pediatrics. Pub. Department. 1985.

<sup>0</sup> Committee on Nutrition American Academy of Pediatrics. Protein. En: Kleinman R, editor. : *Nutrition in infancy and childhood*. En: *Pediatric nutrition handbook* 4 ed. Illinois, American Academy of Pediatrics. Pub. Department 1998;185-195.

ESPGAN: Committee on Nutrition. Recommendation for the composition of follow formula and Beikost. *Acta Paediatr Scand* 1981. sup. 282.

<sup>2</sup> Aggett PJ, Bresson J, Haschke F, Hernell O, Koletzko B, Lefeber HN et al. ESPGAN: Committee on Nutrition. Recommended Dietary Allowances (RDAs), Recommended Dietary Intakes (RDIs), Recommended Nutrient Intakes (RNIs) and Population References Intakes (PRIs) are not “recommended intakes”. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 1997;25:236-241.

<sup>3</sup> World Health Organ Ser Tech Per. 2007;935:1-265.

<sup>4</sup> An evaluation of infant growth. A summary of analyses performed in preparation for the WHO Expert Committee on Physical Status: the use and interpretation of anthropometry in infants. Geneva. World Health Organization. 1994 WHO/NUT/94.8.

<sup>5</sup> Martínez MJ, Hernández M. Necesidades nutricionales en la primera infancia. En: Hernández M, editor. *Alimentación infantil*. 3 ed. Madrid: Díaz de Santos;2001. p. 47-56.

- <sup>6</sup> John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;25;19:408.
- <sup>7</sup> Guldberg P, Güttler F. Broad-range' DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res.* 1994;11;22:880-1.44
- <sup>8</sup> [www.ine.es](http://www.ine.es)
- <sup>9</sup> The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York, [updated 2009 March; cited 2009 April]. Available from: <http://www.ommbid.com>.
- <sup>20</sup> Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 2002;360:55–57.
- <sup>21</sup> Brown AS, Fernhoff PM, Waisbren SE, Frazier DM, Singh RRohr F, Morris JM et al, Rasmussen SA. Barriers to successful dietary control among pregnant women with phenylketonuria. *Genet. Med* 2002;4:84–89.
- <sup>22</sup> Kure S, Hou DC , Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375–378.
- <sup>23</sup> Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A et al. Optimizing the use of sapropterin BH<sub>4</sub> in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009;96:158–163.
- <sup>24</sup> Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria, *Arch Dis Child* 1993;68:426–427.
- <sup>25</sup> Burgand P, Bremer HJ, Buhrdel P, Clemens PC, Monch E, Przyrembel H et al. “Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997” *Eur J Pediatr* 1999;158:46-54.
- <sup>26</sup> Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, Ogier de Baulny H et al. Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: the French guidelines, *Arch. Pediatr* 2005;12:594–601.
- <sup>27</sup> Schweitzer-Krantz S, Burgard P. Survey of national guidelines for the treatment of phenylketonuria, *Eur J Pediatr* 2000;159:S70–S73.
- <sup>28</sup> van Spronsen FJ, Ahring KK, Gizewska M. PKU-what is daily practice in various centres in Europe? Data from a questionnaire by the scientific advisory committee of the European Society of Phenylketonuria and Allied Disorders. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:58–64.

- <sup>29</sup> van Spronsen FJ, Burgard P. The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood: the need for a new guideline. *J Inher Metab Dis* 2008;31:673–679.
- <sup>30</sup> Ruiz M, Sánchez-Valverde F, Dalmau J, Gómez L. Tratamiento nutricional de los Errores Innatos del Metabolismo. Madrid. Ed Ergon. 2007;116-140.
- <sup>31</sup> Baldellou A, Ruiz-Echarri MP, Salazar MI. Recomendaciones para el tratamiento dietético de la fenilcetonuria. Un problema no resuelto. *An Esp Pediatr* 1999;51:625-628.
- <sup>32</sup> Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, Macdonald A et al. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab* 2010;99:109-115.
- <sup>33</sup> Weglage J, Ullrich K, Pietsch M, Funders B, Zass R, Koch HG. Untreated nonphenylketonuric-hyperphenylalaninaemia: intellectual and neurological outcome. *Eur. J. Pediatr* 1996;155:S26–S28.
- <sup>34</sup> Schmidt E, Burgard P, Rupp A. Effects of concurrent phenylalanine levels on sustained attention and calculation speed in patients treated early for phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr* 1996;S82–S86.
- <sup>35</sup> van Spronsen FJ, van Rijn M, Dorgelo B, Hoeksma M, Bosch AM, Mulder MF et al. Phenylalanine tolerance can already reliably be assessed at the age of 2 years in patients with PKU. *J Inher Metab Dis* 2009;32:27–31.
- <sup>36</sup> Guldborg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Genomics* 1993; 17:141–146.
- <sup>37</sup> Dahri S, Desviat LR, Pérez B, Leal F, Ugarte M, Chabraoui L. Mutation analysis of phenylketonuria patients from Morocco: High prevalence of mutation G352fsdelG and detection of a novel mutation p.K85X. *Clinical Biochemistry* 2010; 43:76-81.
- <sup>38</sup> Dianzani I, Giannattasio S, de Sanctis L, Marra E, Ponzzone A, Camaschella C et al. Genetic history of phenylketonuria mutations in Italy. *Am J Hum Genet* 1994;55:851-3.
- <sup>39</sup> Khemir S, Tebib N, Cherif W, Nassrallah F, Esseghir N, Jemaa R et al. Preliminary investigation of the mutation spectrum of PKU in Tunisian patients. *J Inher Metab Dis* 2008;31:78.
- <sup>40</sup> Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Guttler F, Lou H et al. Multiple origins for phenylketonuria. *Europe Am J Hum Genet* 1992;51:1355–1365.
- <sup>41</sup> Zschocke J. Phenylketonuria Mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003;21:345–356.

- <sup>42</sup> Weinstein M, Eisensmith RC, Abadie V, Avigad S, Lyonnet S, Schwartz G et al. A missense mutation, S349P, completely inactivates phenylalanine hydroxylase in north African Jews with phenylketonuria. *Hum Genet* 1993;90:645-9.
- <sup>43</sup> Bóveda MD, Couce ML, Castiñeiras DE, Cocho JA, Pérez B, Ugarte M et al. The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: Evaluation of response and subsequent treatment. *J Inher Metab Dis* 2007;30:812.
- <sup>44</sup> 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;35:301-304.
- <sup>45</sup> Desviat LR, Pérez B, De Lucca M, Cornejo V, Schmidt B, Ugarte M. Evidence in Latin America of recurrence of V388M, a phenylketonuria mutation with high in vitro residual activity. *Am J Hum Genet* 1995;57:337-42.
- <sup>46</sup> Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Schmidt B, Loghin-Grosso N, Giugliani R et al. Mutation analysis of phenylketonuria in south Brazil. *Hum Mutat* 1996;8:262-4.
- <sup>47</sup> Scriver CR and Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-272.
- <sup>48</sup> Dipple KM and McCabe ER. Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am. J. Hum. Genet* 2000;66:1729-1735.
- <sup>49</sup> Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr* 2002;140: 502-506.
- <sup>50</sup> Martínez-Pardo M, Bélanger-Quintana A, García MJ, Desviat L, Pérez B, Ugarte M. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. En: Sanjurjo P, editor. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los errores innatos del metabolismo. 2007. p. 39-65.
- <sup>51</sup> Baldellou A, Salazar MI, Ruiz-Echarri MP, Campos C, Desviat LR, Ugarte M. Tratamiento de la hiperfenilalaninemia por déficit de fenilalanina hidroxilasa con tetrahydrobiopterina. ¿Cuándo y cómo? *An Pediatr* 2006;64:146-52.
- <sup>52</sup> Burlina A, Blau N. Effect of BH4 supplementation on phenylalanine tolerance. *J Inher Metab Dis* 2009;32:40-45.
- <sup>53</sup> Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Gen Met* 2002;77:304-313.

- <sup>54</sup> Lindner M, Gramer G, Garbade SF, Burgard P. Blood phenylalanine concentrations in patients with PAH-deficient hyperphenylalaninaemia off diet without and with three different single oral doses of tetrahydrobiopterin: Assessing responsiveness in a model of statistical process control. *J Inher Metab Dis* 2009;32:514–522.
- <sup>55</sup> Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N et al. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Pediatr Res* 2004;55:425-30.
- <sup>56</sup> Perez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gómez L et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem* 2004;37:1083-90.
- <sup>57</sup> Pey AL, Pérez B, Desviat LR, Martínez MA, Aguado C, Erlandsen H et al. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 2004;24:388-99.
- <sup>58</sup> Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2009;32:22-6.
- <sup>59</sup> Lindner M, Haas D, Mayatepek E, Zschocke J, Burgard P. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Mol Genet Metab* 2001;73:104-6.
- <sup>60</sup> Koch R, Guttler F, Blau N. Mental illness in mild PKU responds to biopterin. *Mol Genet Metab* 2002;75:284-6.
- <sup>61</sup> Choi HJ, Kim SW, Lee SY, Hwang O. Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterin: A possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *J Neurochem* 2003;86:143-52.
- <sup>62</sup> Werner ER, Gorrent ACF, Heller R, Werner-Felmayer G, Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: Mechanistic and pharmacological aspects. *Exp Biol Med* 2003;228:1291-302.
- <sup>63</sup> Antoniadou C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunnington C et al. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2007;116:2851-9.
- <sup>64</sup> Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner ER. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Curr Drug Metab.* 2002;3:159-73.
- <sup>65</sup> Fiege B, Ballhausen D, Kierat L, Leimbacher W, Goriounov D, Schirks E et al. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Mol Genet Metab* 2004;81:45-51.

- <sup>66</sup> Zurflüf MR, Fiori L, Fiege B, Ozen I, Demirkol M, Gärtner KH et al. Pharmacokinetics of orally administered tetrahydrobiopterin in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2006;29:725-731.
- <sup>67</sup> Steinfeld R, Kohlschutter A, Ullrich K, Lukacs Z. Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2004;27:449-53.
- <sup>68</sup> Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo M, Birk Moller L, Blau N. Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2004;81:137-9.
- <sup>69</sup> Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, Guillemin C, Ducros V, Arnaud J et al. Selenium glutathione peroxidase (GSHPx), and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 1992;207:137-142.
- <sup>70</sup> Acosta PB, Yannicelli S. Plasma micronutrient concentrations in infants undergoing for phenylketonuria. *Biol Trace Elem Res* 1999;67:75-84.
- <sup>71</sup> Lambruschini N, Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Artuch R, Gassió R. Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy. *Mol Genet Metab* 2005;86:S54-60.
- <sup>72</sup> Martínez MA, Morales MJ, Arbones MJ, Bellido D. Valoración del estado nutricional. En: Bellido D, de Luis DA, editores. *Manual de Nutrición y Metabolismo*. España: Díaz de Santos; 2006. p.3-12.

## **11. ANEXO**



### CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE ANTE TESTIGO

D. \_\_\_\_\_, madre/ padre/ tutor de

\_\_\_\_\_

DECLARO QUE:

D. \_\_\_\_\_ como Médico especialista en  
\_\_\_\_\_, en presencia del testigo D/Dña.

\_\_\_\_\_ con D.N.I. n°

\_\_\_\_\_ me comunica la posibilidad de que mi hijo reciba  
medicación con

\_\_\_\_\_

Se me informa del tipo de medicación que es, de su mecanismo de acción, de los riesgos y beneficios que se pueden obtener y de la alternativa de otros tipos de tratamiento.

Soy consciente de que esta medicación aún no está autorizada y de que puede tener algún efecto adverso no descrito anteriormente. Asumo su posible presentación a cambio de un posible beneficio para el tratamiento de la enfermedad. de mi hijo.

El recibir la medicación es voluntaria y puedo renunciar a su administración en el momento que yo estime adecuado .

Fdo.:

Sevilla, de \_\_\_\_\_ de 2.00

