

Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**“AVANCES EN EL DIAGNOSTICO,  
TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE  
PACIENTES CON  
DEFICIENCIA DE FENILALANINA  
HIDROXILASA”**

Memoria presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA  
por la licenciada  
**AMAYA BELANGER QUINTANA**

Dirigida por la Dra. Mercedes Martínez Pardo  
Tutelada por el Prof. Luis Madero López

Año 2008

Esta tesis ha sido llevada a cabo en la Unidad de Enfermedades Metabólicas perteneciente al Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, con la colaboración de la Fundación para la Investigación Biomédica de dicho hospital y del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid dirigida por la Prof. M. Ugarte. Parte del trabajo ha sido financiado mediante la beca FIS 02/118 del Instituto Carlos III. También se ha recibido financiación de laboratorios BioMarin para el protocolo de estudio PKU-006.

**A Nicolás**

**INFORME DE LA DIRECTORA y TUTOR**  
**DE LA TESIS DOCTORAL**

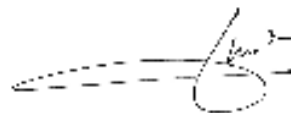
La Dra. **D<sup>a</sup> Mercedes Martínez-Pardo Casanova**, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, como Directora de la Tesis, y el Dr. **D. Luis Madero López**, habilitado para Catedrático y Profesor Titular del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, como Tutor.

CERTIFICAMOS: Que **D<sup>a</sup> Amaya Bélanger Quintana**, Licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Pediatría, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “AVANCES EN EL DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE FENILALANINA HIDROXILASA” para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid.

Consideramos que el estudio cumple las características de relevancia científica, originalidad, metodología de investigación y correcto análisis estadístico para poder optar al grado de TESIS DOCTORAL.

Y que para así conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado como DIRECTORA y TUTOR de esta Tesis Doctoral.

Madrid, a 10 de Junio de 2008



Dra. Mercedes Martínez-Pardo Casanova

Dr. Luis Madero López

## AGRADECIMIENTOS

Cuando me embarqué en la aventura que supone hacer una Tesis Doctoral, ya me advirtieron que terminarla sería difícil, pero aquí estoy, dando los últimos retoques. Ni que decir tiene que en mi vida ha habido muchos cambios, y no habría sido capaz de llegar a buen puerto sin la ayuda y el apoyo de mucha gente a mi alrededor. Algunos han estado ahí, al pie del cañón, de principio a fin. Otros me han dado unas palabras de aliento durante una conversación de pasillo o en una cena. A todos, GRACIAS.

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Mercedes Martínez-Pardo, Merche, por haberme enseñado tantas cosas. Antes de conocerla el metabolismo ni existía. Cuando la conocí el metabolismo me pareció imposible y abrumador, pero su trabajo concienzudo, incansable y extraordinariamente amoroso para con unos pacientes que el resto de nosotros rechazábamos me llamó la atención. No sé cómo ha conseguido que una de las asignaturas que menos me gustaron de la carrera se haya convertido en mi pasión. Nunca ha perdido la curiosidad, la capacidad de sorprenderse. Conmigo lo que tampoco ha perdido ha sido la paciencia. Me ha enseñado mucho sobre metabolismo, mucho sobre pediatría, mucho sobre profesionalidad, pero, sobre todo, mucho sobre la vida. Es una gran amiga.

Tengo que agradecer al Dr. Madero su pronta aceptación de la Tutoría de esta Tesis Doctoral, y su rápida respuesta a cuantos requerimientos he tenido que hacerle.

Ni que decir tiene que sin la colaboración del CEDEM este trabajo no se habría llevado a cabo. Todos, pero sobre todo la Dra. M<sup>a</sup> José García, me han dado su apoyo y me han mostrado y explicado sus conocimientos sobre fenilcetonuria y muchas otras enfermedades metabólicas que ellos han estudiado durante años y sobre las que siguen investigando con el fin de mejorar la vida de unos pacientes que generalmente no tienen la suerte de conocer. Su dedicación y buen hacer son un ejemplo.

Imprescindible ha sido el Servicio de Estadística del Hospital Ramón y Cajal, sobre todo Javier Zamora y Alfonso Muriel. Muchas gracias por vuestra disponibilidad, por enseñarme “algo de estadística”, por ayudarme en el arduo trabajo de ordenar y sacar conclusiones de una montaña de datos, por estudiar para que mis resultados fueran más representativos.

¡Tengo a tantos a quien agradecer!

Al personal de enfermería de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal, siempre tan atento con los pacientes, pero que no lo ha sido menos conmigo, a pesar de “esas cosas tan raras” que les pido.

A mis compañeros en el Ramón y Cajal, la Clínica Moncloa y el Carlos III, por todo lo que he aprendido junto a ellos.

A los pacientes con enfermedades metabólicas, por confiarme su salud, uno de los bienes más preciados que todos tenemos. En este caso el agradecimiento es en especial a los pacientes fenilcetonúricos y sus familias, que son los que verdaderamente luchan día a día contra esta enfermedad, y de los que he recibido tantas muestras de apoyo y cariño tanto profesional como personal.

A mi amiga Titi, por animarme en los momentos difíciles, por ser esa voz de la conciencia que tanta falta me hacía. No puedo nombrar aquí a todos mis amigos, que han sido parte fundamental de este trabajo. Todos han contribuido a lo largo de este tiempo a que pudiese trabajar y estudiar, y me animaron a no rendirme. Ellos saben que les quiero y que les estaré eternamente agradecida.

Finalmente, a mi familia, por ser ese árbol en mi vida que siempre me da apoyo y cobijo, que me nutre, protege y del que saco mi energía. Por alentarme, por no recriminarme nunca las horas de ausencia, por quererme tanto. A Nicolás, el sol de mi vida. A Javier, por apoyarme siempre, por ser mi otra mitad, y a sus padres por aceptarme como una hija. A mis padres y a mi hermano, que fueron los primeros en animarme a querer saber más sobre todo si sirve para ayudar a otros, y sin los cuales no sería quien soy.

## **RESUMEN**

En esta Tesis Doctoral se recogen los resultados de varios estudios prospectivos y retrospectivos en los que han participado 212 pacientes con deficiencia de fenilalanina hidroxilasa en un periodo de 30 años. Unas condiciones estandarizadas han permitido realizar un adecuado diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia y demostrar una buena correlación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico, la tolerancia a fenilalanina y el genotipo. La libre administración de proteínas de bajo valor biológico ha mejorado la calidad de vida de los pacientes y, junto con una administración frecuente de los productos sin fenilalanina, ha permitido un buen control metabólico. Se ha podido medir en qué grado distintos factores afectan al control metabólico de los pacientes y su evolución neurológica. También se han identificado y tratado a largo plazo aquellos casos respondedores a tetrahydrobiopterina, cofactor de la PAH, lo que ha permitido eliminar o relajar su dieta.

**Palabras clave:** fenilcetonuria (PKU), fenilalanina hidroxilasa (PAH), tetrahydrobiopterina (BH4), dieta, coeficiente intelectual.

## **SUMMARY**

This Doctoral Thesis compiles the results of several prospective and retrospective studies in which 212 phenylalanine hydroxylase deficient patients have participated over the course of 30 years. Making the diagnosis in standard conditions has permitted an adequate differential diagnosis of hyperphenylalaninemia, and has allowed us to demonstrate a good correlation of phenylalanine levels at diagnosis with phenylalanine tolerance and genotype. Free administration of low biological value natural proteins has raised the patients quality of life and, together with a frequent administration of phenylalanine-free products, has rendered good metabolic control. We have measured in what degree different factors affect metabolic control and neurological outcome. We have identified and long-term treated those cases with a positive response to tetrahydrobiopterin, cofactor of PAH, which has allowed us to eliminate or relax dietary restrictions.

**Key words:** phenylketonuria (PKU), phenylalanine hydroxylase (PAH), tetrahydrobiopterin (BH4), diet, neurological outcome.

## **ABREVIATURAS**

<b>AECOM</b>	Asociación para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo
<b>BH<sub>2</sub></b>	7,8-Dihidrobioppterina
<b>BH<sub>4</sub></b>	(6R)-L-eritro-5,6,7,8-Tetrahidrobioppterina
<b>cc</b>	Centímetro cúbico
<b>CEDEM</b>	Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares. U. Autónoma
<b>CI</b>	Coeficiente intelectual
<b>CIR</b>	Crecimiento intrauterino retardado
<b>DHPR</b>	Dihidrobioppterina reductasa
<b>dl</b>	Decilitro
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Dx</b>	Diagnóstico
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>ESPGAN</b>	European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition
<b>g</b>	Gramo
<b>GTP-CH</b>	Guanosintrifosfato-ciclohidrolasa
<b>h</b>	Horas
<b>5HIAA</b>	Ácido 5-hidroxiindolacético
<b>HIV</b>	Ácido homovanílico
<b>HPA</b>	Hyperphenylalaninemia (Hiperfenilalaninemia benigna)
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LRN</b>	Longitud del recién nacido
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHP</b>	Mild Hyperphenylalaninemia (Hiperfenilalaninemia benigna)
<b>ml</b>	Mililitro
<b>μmol</b>	Micromol
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>5OHI</b>	5-Hidroxiindolacético
<b>PAH</b>	Fenilalanina hidroxilasa
<b>PC</b>	Perímetro cefálico
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>PKU</b>	Phenylketonuria (Fenilcetonuria)
<b>PNAVb</b>	Proteínas naturales de alto valor biológico
<b>PNBVB</b>	Proteínas naturales de bajo valor biológico
<b>PRN</b>	Peso del recién nacido
<b>PTS</b>	6-piruviltetrahidrobioppterina sintasa
<b>PXPhe</b>	Proteínas sin fenilalanina
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>SP</b>	Sepiapterina reductasa
<b>Tyr</b>	Tirosina



## INDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1. Sistema de Hidroxilación de la Fenilalanina.....	3
1.2. Estructura, Función y Regulación de la PAH.....	4
1.3. Gen PAH. Expresión de Mutaciones. Correlación Fenotipo/Genotipo.....	6
1.4. Manifestaciones Clínicas de la Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.....	7
1.5. Diagnóstico Diferencial de la Hiperfenilalaninemia. Detección neonatal.....	12
1.6. Tratamiento de la Fenilcetonuria.....	15
1.7. Seguimiento Clínico y Bioquímico de los Pacientes Fenilcetonúricos	19
1.8. Respuesta a Tetrahidrobiopterina (BH <sub>4</sub> ) en Pacientes PKU.....	20
2. <u>OBJETIVOS</u> .....	23
3. <u>PACIENTES, MATERIAL Y METODOS</u> .....	24
3.1. Ampliación del Protocolo de Diagnóstico Diferencial de la Hiperfenilalaninemia.....	26
3.2. Investigación de Nuevas Posibilidades Terapéuticas Dietéticas.....	32
3.2.1. Estudio a Corto Plazo de la Repercusión de las Proteínas Naturales de Bajo Valor Biológico (PNBVVB) en el Control Metabólico de Pacientes PKU.....	32
3.2.2. Estudio a Corto Plazo de la Repercusión del Número de Tomas de Proteínas Sin Fenilalanina (PXPhe) en el Control Metabólico de Pacientes PKU.....	34

3.2.3. Estudio a Largo Plazo de los Factores Determinantes en el Control Metabólico y el Desarrollo Físico y Mental de Pacientes con Deficiencia de PAH.....	35
3.3. <b>Investigación de Nuevas Posibilidades Terapéuticas Farmacológicas...</b>	42
3.3.1. Protocolo para la Valoración de la Respuesta <i>in vivo</i> a una Sobrecarga Puntual de Tetrahidrobiopterina (BH <sub>4</sub> ) en Pacientes con Deficiencia de PAH.....	42
3.3.2. Protocolo para la Valoración de la Respuesta <i>in vivo</i> a una Sobrecarga Prolongada de Tetrahidrobiopterina (BH <sub>4</sub> ) en Pacientes con Deficiencia de PAH .....	45
3.3.3. Evaluación del Tratamiento a Largo Plazo con BH <sub>4</sub> en Pacientes con Deficiencia de PAH.....	46
3.4. <b>Material y Métodos de los Análisis Bioquímicos.....</b>	48
4. <b><u>RESULTADOS</u></b> .....	51
4.1. <b>Resultados de la Ampliación del Protocolo de Diagnóstico Diferencial de la Hiperfenilalaninemia.....</b>	51
4.1.1. Resultados del Diagnóstico Diferencial de la Hiperfenilalaninemia.....	51
4.1.1.1. Diagnóstico final de los pacientes estudiados por hiperfenilalaninemia.....	51
4.1.1.2. Datos clínicos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia.....	53

4.1.1.3. Datos antropométricos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia.....	55
4.1.1.4. Datos analíticos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia.....	56
4.1.1.5. Sobrecargas de BH <sub>4</sub> al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia.....	58
4.1.1.6. Estudios genéticos de los pacientes con hiperfenilalaninemia.....	59
<b>4.1.2. Resultados de la Determinación del Fenotipo de Pacientes con Deficiencia de PAH a Partir de los Niveles de Fenilalanina al Diagnóstico.....</b>	<b>59</b>
4.1.2.1. Correlación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con la tolerancia a fenilalanina en pacientes con deficiencia de PAH.....	60
4.1.2.2. Comprobación del efecto de otra patología añadida en la relación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico y el fenotipo.....	61
4.1.2.3. Comprobación del efecto de la edad en los niveles de fenilalanina al diagnóstico.....	62
4.1.2.4. Predicción del fenotipo a partir de los niveles de fenilalanina al diagnóstico.....	64
4.1.2.5. Correlación entre el fenotipo y el genotipo de los pacientes con deficiencia de PAH.....	67
<b>4.2. Resultados de la Investigación de Nuevas Posibilidades Terapéuticas Dietéticas.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.1. Estudio a Corto Plazo de la Repercusión de las Proteínas Naturales de Bajo Valor Biológico (PNBVB) en el Control Metabólico de Pacientes PKU.....</b>	<b>75</b>

4.2.1.1. Repercusión de las PNBVB en el control metabólico de los pacientes PKU mayores de un año de edad.....	76
4.2.1.2. Repercusión de las PNBVB en el control metabólico de los pacientes PKU durante el primer año de vida.....	78
<b>4.2.2. Estudio a Corto Plazo de la Repercusión del Número de Tomas de Proteínas Sin Fenilalanina (PXPhe) en el Control Metabólico de Pacientes PKU.....</b>	<b>80</b>
<b>4.2.3. Estudio a Largo Plazo de los Factores Determinantes en el Control Metabólico y el Desarrollo Físico y Mental de Pacientes con Deficiencia de PAH.....</b>	<b>81</b>
4.2.3.1. Control metabólico de pacientes con deficiencia de PAH.....	83
4.2.3.2. Factores que afectan el control metabólico de los pacientes con deficiencia de PAH.....	86
4.2.3.3. Evolución de la dieta de los pacientes con deficiencia de PAH.....	91
4.2.3.4. Controles analíticos nutricionales de los pacientes con deficiencia de PAH.....	94
4.2.3.5. Desarrollo antropométrico de pacientes con deficiencia de PAH.....	95
4.2.3.6. Evolución neurológica de los pacientes con deficiencia de PAH.....	113
<b>4.3. Resultados de la Investigación de Nuevas Posibilidades Terapéuticas Farmacológicas.....</b>	<b>125</b>
<b>4.3.1. Resultados del Protocolo para la Valoración de la Respuesta <i>in vivo</i> a una Sobrecarga Puntual de Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) en Pacientes con Deficiencia de PAH.....</b>	<b>125</b>
4.3.1.1. Relación de la respuesta a BH <sub>4</sub> con el fenotipo del paciente.....	127
4.3.1.2. Relación de la respuesta a BH <sub>4</sub> con el genotipo del paciente.....	132

4.3.1.3. Relación de la respuesta a BH <sub>4</sub> con la edad del paciente.....	135
4.3.1.4. Absorción de la BH <sub>4</sub> durante una sobrecarga puntual.....	136
<b>4.3.2. Resultados del Protocolo para la Valoración de la Respuesta <i>in vivo</i> a una Sobrecarga Prolongada de Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) en Pacientes con Deficiencia de PAH.....</b>	<b>137</b>
<b>4.3.3. Evaluación del Tratamiento a Largo Plazo con Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) en Pacientes con Deficiencia de PAH...</b>	<b>139</b>
4.3.3.1. Relación del tratamiento a largo plazo con el grado de respuesta durante la sobrecarga puntual con BH <sub>4</sub> .....	142
4.3.3.2. Relación de las dosis diarias necesarias durante el tratamiento a largo plazo el tipo de respuesta durante la sobrecarga puntual con BH <sub>4</sub> .....	146
4.3.3.3. Relación de la evolución durante el tratamiento a largo plazo con el fenotipo / genotipo del paciente.....	146
4.3.3.4. Efectos adversos e inconvenientes encontrados durante el tratamiento a largo plazo con BH <sub>4</sub> .....	148
<b>5. <u>DISCUSIÓN</u>.....</b>	<b>150</b>
<b>5.1. Discusión sobre las Mejoras en el Diagnóstico Diferencial de la Hiperfenilalaninemia.....</b>	<b>151</b>
<b>5.2. Discusión sobre la Investigación de Nuevas Posibilidades de Tratamiento Dietético.....</b>	<b>159</b>
<b>5.3. Discusión sobre la Investigación de Nuevas Posibilidades de Tratamiento Farmacológico.....</b>	<b>167</b>
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u>.....</b>	<b>172</b>
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....</b>	<b>174</b>
<b>8. <u>PUBLICACIONES</u>.....</b>	<b>189</b>

## **1.- INTRODUCCION**

La fenilcetonuria (phenylketonuria o PKU) es una enfermedad genética que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo (OMIM 261600). Se debe a una deficiencia en la función de la fenilalanina hidroxilasa (fenilalanina 4-monooxigenasa, PAH, EC.1.14.16.1), primera enzima limitante en el catabolismo de la fenilalanina. Su deficiencia da lugar a una acumulación de fenilalanina en sangre y tejidos (hiperfenilalaninemia) y a un aumento en la eliminación de sus metabolitos en orina (fenilcetonuria).

La fenilalanina (Phe) es un aminoácido esencial que compone aproximadamente el 5% de las proteínas de origen natural y que se absorbe a nivel intestinal de forma competitiva con otros aminoácidos neutros <sup>(1)</sup>. La hidroxilación de la fenilalanina consume aproximadamente el 60-75% de la Phe procedente de la dieta y de la degradación tisular de proteínas, mientras que el 25-40% restante se utiliza para la regeneración de proteínas endógenas <sup>(2)</sup>.

Hiperfenilalaninemia es un término genérico dado a una concentración de fenilalanina plasmática elevada de forma persistente sobre la distribución normal de los valores en plasma. Los valores normales de la fenilalanina en plasma, independientemente de la edad, son aproximadamente de 60  $\mu\text{mol/L}$  (1mg/dl). Los niveles varían a lo largo del día pero dentro de límites muy estrechos. Los niveles de la fenilalanina en sangre y los distintos tejidos tienen escasas diferencias y se encuentran siempre en equilibrio homeostático <sup>(3,4)</sup>. Los individuos con un defecto en el sistema de hidroxilación de la fenilalanina tienen niveles en sangre superiores a 120  $\mu\text{mol/L}$  (2mg/dl), siendo más elevados cuanto menor sea la actividad residual de las enzimas implicadas <sup>(5)</sup>. Los niveles elevados de fenilalanina actúan por diferentes mecanismos como tóxicos cerebrales produciendo muerte o apoptosis neuronal progresiva, dando lugar a diferentes grados de alteración en el desarrollo cognitivo de las personas afectas<sup>(5)</sup>. La manifestación clínica más importante de la hiperfenilalaninemia es por tanto el retraso mental moderado-severo. También se puede acompañar de palidez de piel, eccemas pruriginosos y un olor característico a ratones o paja mojada de las

secreciones corporales cuando los niveles de fenilalanina son extremadamente elevados y se transforman en fenilacético.

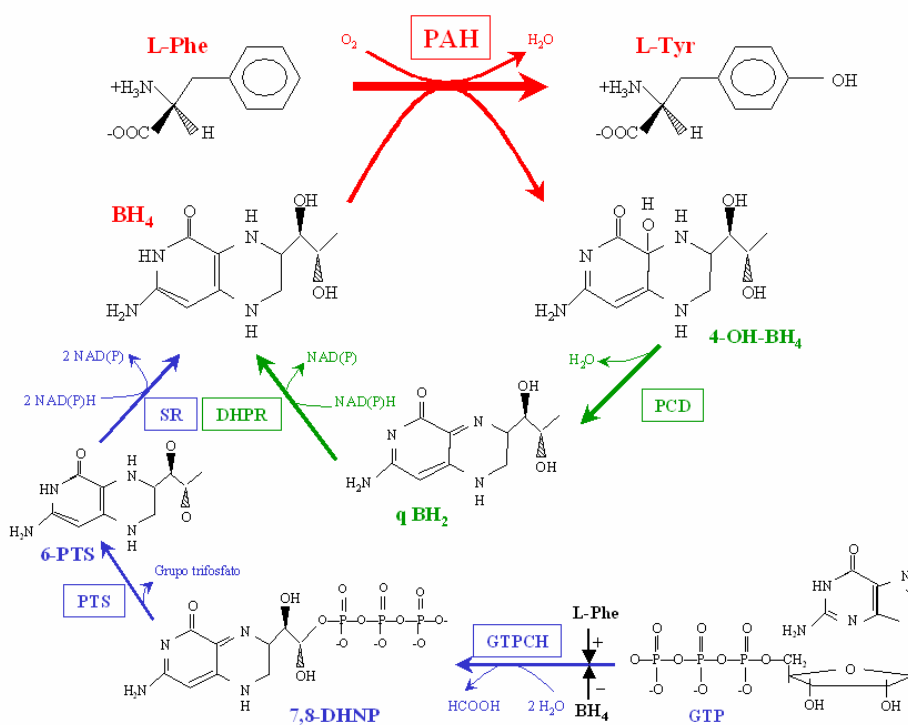
Cualquier defecto en la actividad del sistema de hidroxilación de la fenilalanina puede dar lugar a una hiperfenilalaninemia, pero aproximadamente el 98% de las hiperfenilalaninemias están asociadas a deficiencias en la función de la fenilalanina hidroxilasa. Estudios poblacionales han permitido establecer la incidencia mundial de fenilcetonuria en 1 por cada 12.000 recién nacidos vivos, aunque su distribución en distintas poblaciones no es uniforme <sup>(5)</sup>. En 1982 se determinó por primera vez la incidencia de PKU en España en 1:10.000 recién nacidos vivos, lo que permite estimar que el número de portadores sanos es de 1 por cada 50 habitantes <sup>(6)</sup>.

La primera descripción de la enfermedad fue hecha por Asbjörn Fölling en 1934, al estudiar dos hermanos con retraso mental que excretaban en orina cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico, por lo que llamó a esta patología Idiocia Fenilpirúvica <sup>(7)</sup>. En 1939 Penrose confirmó la enfermedad, a la que rebautizó como Fenilcetonuria, y describió su herencia autosómica recesiva <sup>(8)</sup>. En 1947, Jervis postuló que el defecto metabólico de la fenilcetonuria consistía en la imposibilidad de oxidar la fenilalanina a tirosina, y en 1953 demostró la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa en el hígado de un paciente <sup>(9,10)</sup>. Ese mismo año Bickel consiguió un hidrolizado de proteínas bajo en fenilalanina y pudo tratar a varios pacientes con una dieta que redujo los niveles de fenilalanina en sangre. Esta dieta consiguió una mejoría del desarrollo mental y del comportamiento de los pacientes, incluso previniendo totalmente el daño neurológico si el tratamiento se iniciaba en el periodo neonatal <sup>(11)</sup>. A partir de ese momento se inician los programas de detección precoz de la hiperfenilalaninemia y se extiende su tratamiento mediante dietas limitadas en fenilalanina <sup>(12-15)</sup>. La cantidad de fenilalanina que cada paciente tolera en su dieta fue el parámetro utilizado por Güttler en 1980 para determinar la severidad de cada caso y clasificarlos en distintos fenotipos <sup>(16)</sup>.



## 1.1.- SISTEMA DE HIDROXILACION DE FENILALANINA

El sistema de hidroxilación de la fenilalanina es la primera etapa en el catabolismo de este aminoácido. La enzima PAH cataliza la parahidroxilación del aminoácido L-fenilalanina (L-Phe) para dar L-tirosina (L-Tyr), en presencia de tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofactor y de oxígeno molecular como cosustrato (Figura 1.1).



**Figura 1.1.- Sistema de hidroxilación de la fenilalanina.** El ciclo catalítico de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) en presencia de su cofactor natural  $BH_4$  se expresan en rojo, las rutas principales de biosíntesis de  $BH_4$  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  $BH_4$  sobre la etapa limitante en la biosíntesis del cofactor. Abreviaturas:  $BH_4$ : (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; 4-OH- $BH_4$ : 4 $\alpha$ -carbinolaminotetrahidrobiopterina; q-BH<sub>2</sub>: 7,8-dihidrobiopterina quinoinoide; 6-PTS: 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; 7,8-DHNP: 7,8-dihironeopterina trifosfato; PCD: 4 $\alpha$ -carbinolaminotetrahidrobiopterina-deshidratasa; DHPR: dihidrobiopterina reductasa; SR: sepiapterina reductasa; PTS: 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina sintasa; GTPCH: GTP-ciclohidrolasa I.

La PAH requiere una adecuada concentración de  $BH_4$  ( $K_m$ ), por lo que su actividad depende del funcionamiento de las dos enzimas que regeneran el cofactor a partir de su forma reducida, la 4 $\alpha$ -carbinolamin-deshidratasa (PCD) y la dihidropterina reductasa (DHPR), así como de la actividad de las distintas enzimas que componen la ruta de biosíntesis intracelular de  $BH_4$ . La primera enzima de esta ruta de biosíntesis es la GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), que es activada por la Phe e inhibida por su producto final, la  $BH_4$  (Figura 1.1) <sup>(5)</sup>.

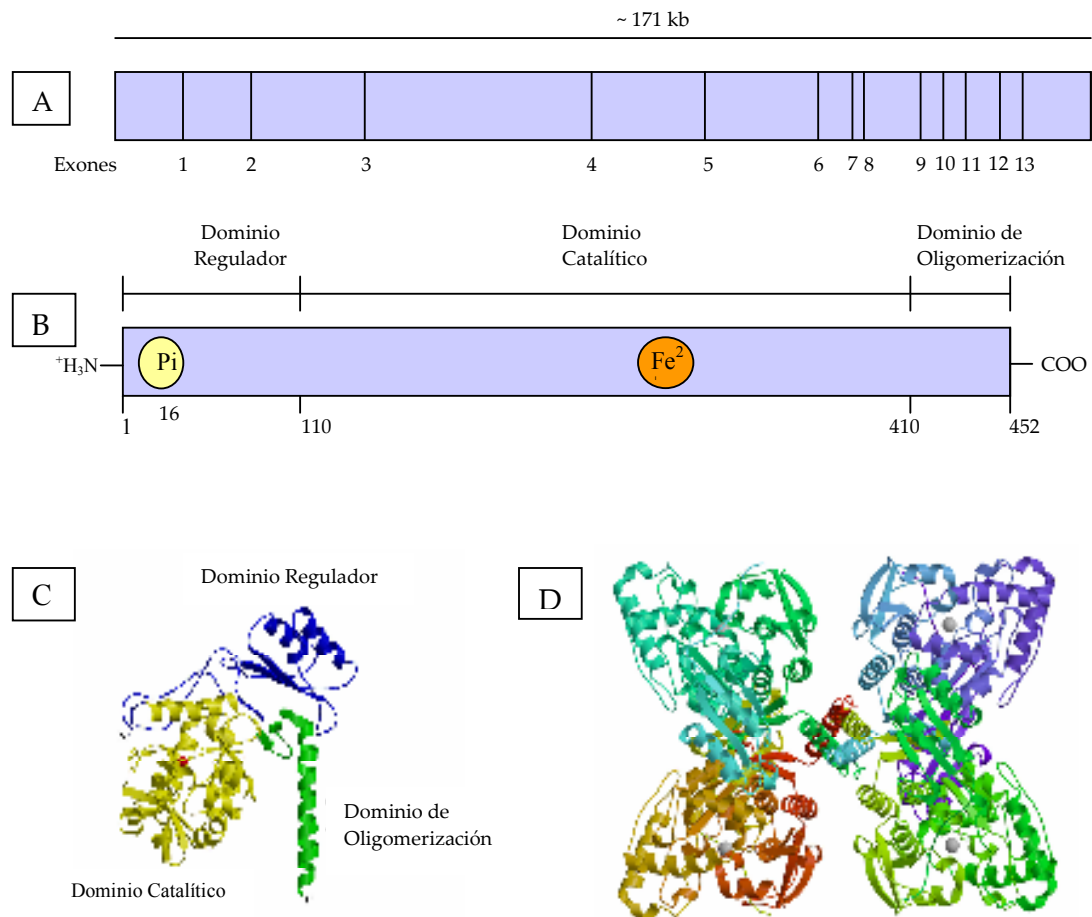
El acúmulo de fenilalanina activa otras rutas metabólicas alternativas que producen unos metabolitos indetectables en condiciones normales <sup>(5)</sup> y que se eliminan por orina y distintos fluidos corporales. Uno de ellos es el ácido fenilacético, que da el olor característico de los pacientes, y otro el ácido fenilpirúvico detectado por Fölling.

## **1.2.- ESTRUCTURA, FUNCION Y REGULACION DE LA PAH**

La enzima PAH forma parte de la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, que utilizan la  $BH_4$  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>(17)</sup>. En humanos se expresa fundamentalmente en el hígado, aunque algunos estudios indican que también se expresa minoritariamente en el riñón <sup>(18)</sup> y en los melanocitos <sup>(19)</sup>. Distintos estudios han demostrado la existencia de tres dominios funcionales en la proteína (Figura 1.2) <sup>(5,20-22)</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  $BH_4$ , 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 1.2.- Organización estructural del gen y la proteína PAH.** A) Estructura del gen *PAH*; B) Estructura primaria de la proteína *PAH*, donde se localizan los dominios funcionales, el átomo de hierro y el sitio de fosforilación (Ser16); C) y D) Modelos tridimensionales propuestos para la *PAH* en forma monomérica (C) y tetramérica (D). Tomado de: Pey, 2004; Erlandsen y Stevens, 1999; Konecki y Lichter-Konecki, 2001; Scriver y Kaufman, 2001.

### **1.3.- GEN PAH. EXPRESION DE MUTACIONES. RELACION GENOTIPO / FENOTIPO**

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 (Figura 2) <sup>(5,21)</sup>. 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>(5)</sup>.

Hasta el momento se han identificado a nivel mundial 532 mutaciones asociadas a PKU, aunque continuamente se hallan nuevas variantes alélicas. La mayoría son mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (missense), aunque también las hay de tipo unión intrón-exón (splice), sin sentido o stop (nonsense) y silentes, así como mayores mutaciones como deleciones o inserciones (<http://www.pahdb.mcgill.ca/>). Se han identificado mutaciones en todos los exones, pero la mayoría se localiza en el exón 7, probablemente por tratarse de una región altamente conservada del dominio catalítico de la enzima <sup>(23)</sup>. Existe un porcentaje entre el 1 y el 10% de alelos PKU que no han podido ser caracterizados y que afectan a la región del promotor, a señales de poliadenilación, a regiones intrónicas o son deleciones no detectables por las técnicas habituales de estudio de mutaciones <sup>(5)</sup>.

El mecanismo más frecuente a través del cual las mutaciones del gen *PAH* ejercen sus efectos patogénicos es la inestabilidad conformacional de la proteína, lo que la confiere menor solubilidad, menor estabilidad térmica y mayor predisposición a la degradación proteolítica <sup>(24-26)</sup>. Los estudios de expresión *in vitro* han permitido en muchos casos correlacionar el defecto funcional de las mutaciones con el fenotipo de los pacientes <sup>(27)</sup>. Las mutaciones que confieren una actividad residual alta *in vitro* están generalmente asociadas a los fenotipos más 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 para las que no se observa una relación entre la actividad residual observada *in vitro* y el fenotipo

del paciente. 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. Además se han descrito pacientes, incluso hermanos, con un mismo genotipo pero diferentes fenotipos clínicos <sup>(28,29)</sup>. Esta inconsistencia genotipo-fenotipo impide, hasta ahora, predecir con total fiabilidad la gravedad del fenotipo en los pacientes PKU a partir del genotipo<sup>(29-31)</sup>.

## **1.4.- MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA DEFICIENCIA DE FENILALANINA HIDROXILASA**

### **1.4.1.- CLINICA DE LA FENILCETONURIA**

La manifestación clínica más importante de la PKU es una alteración en el desarrollo cognitivo que puede llegar a ser extremadamente intensa, con automutilaciones y trastornos psiquiátricos semejantes a la esquizofrenia <sup>(32-35)</sup>. Los mecanismos a través de los cuales el incremento en los niveles de fenilalanina causan la muerte neuronal no se conocen con exactitud, aunque existen evidencias en animales que sugieren que se puede producir una alteración en la mielinización y en la diferenciación celular, así como una inhibición en el transporte proteico a través de la barrera hematoencefálica que ralentizaría la síntesis de proteínas y neurotransmisores a nivel del sistema nervioso central <sup>(5,36,37)</sup>.

El daño producido por la hiperfenilalaninemia no se manifiesta de forma aguda, sino que es necesario un acúmulo prolongado o reiterativo para que se puedan observar las alteraciones neurológicas. Por este motivo los pacientes PKU son clínicamente normales hasta el final de la lactancia, en la que se comienza a apreciar su retraso psicomotor <sup>(38)</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>(39-42)</sup>. En la resonancia magnética cerebral (RMC) sólo se aprecian

las lesiones típicas de hiperintensidad en sustancia blanca periventricular en T2 cuando los niveles de fenilalanina se han mantenido por encima de  $660 \mu\text{mol/L}$  ( $11 \text{ mg/dl}$ ) al menos durante 6 meses <sup>(43-46)</sup>.

El grado de afectación del sistema nervioso central es muy variable y depende de los niveles de fenilalanina que tenga el paciente y que son el resultado del grado de actividad residual de PAH, del tipo de dieta que siga el paciente, de la absorción de fenilalanina a nivel intestinal, del grado en el que cruza la barrera hematoencefálica <sup>(47)</sup>, de la presencia de procesos intercurrentes, etc. Los resultados son también heterogéneos ya que no se pueden olvidar todos los demás factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo cognitivo de una persona.

Los niveles de fenilalanina a partir de los cuales hay riesgo de daño neurológico han sido y son motivo de controversia. Muchos grupos utilizan niveles de  $600 \mu\text{mol/L}$  ( $10 \text{ mg/dl}$ ) como corte por encima del cual se debe tratar a los pacientes, pero se han descrito alteraciones cognitivas menores tales como hiperactividad o dificultades en el aprendizaje en pacientes con valores de fenilalanina inferiores <sup>(48)</sup>. Actualmente se tiende a intentar mantener los niveles de fenilalanina lo más cerca posible de la normalidad ( $<120 \mu\text{mol/L}$ ), sobre todo durante la infancia temprana. Posteriormente se admiten como aceptables niveles más altos con el fin de permitir cierta relajación de la dieta.

Cada país ha desarrollado su propio protocolo para el seguimiento de la fenilcetonuria <sup>(49-54)</sup>. Como se puede observar en la Tabla 1.1, no hay consenso en cuanto a los valores máximos de fenilalanina que se consideran adecuados a cada edad, y estos pueden ser muy variables.

	<i>España</i>	<i>Inglaterra</i>	<i>Francia</i>	<i>Alemania</i>	<i>E.E.U.U.</i>
Inicio tratamiento	>360µmol/L (> 6mg/dl)	>420µmol/L (> 7mg/dl)	>600µmol/L (> 10mg/dl)	>600µmol/L (> 10mg/dl)	>600µmol/L (> 10mg/dl)
0-6 años	<360µmol/L (<6mg/dl)	<360µmol/L (<6mg/dl)	<300µmol/L (<5mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)	<360µmol/L (<6mg/dl)
6-9 años	<540µmol/L (<9mg/dl)	<540µmol/L (<9mg/dl)	<300µmol/L (<5mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)	<360µmol/L (<6mg/dl)
9-12 años	<630µmol/L (<10,5mg/dl)	<540µmol/L (<9mg/dl)	<900µmol/L (<15mg/dl)	<900µmol/L (<15mg/dl)	<360µmol/L (<6mg/dl)
>12 años	<630µmol/L (<10,5mg/dl)	<900µmol/L (<15mg/dl)	<1200µmol/L (<20mg/dl)	<1200µmol/L (<20mg/dl)	<630µmol/L (<10,5mg/dl)
Embarazo	<240µmol/L (<4mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)	<240µmol/L (<4mg/dl)

**Tabla 1.1.- Niveles plasmáticos de fenilalanina 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.**

La edad a la que se produce el acúmulo de fenilalanina parece tener también una importancia crucial para determinar el grado de afectación neurológica. Los primeros meses de vida el cerebro humano completa su proceso de crecimiento y diferenciación, y es en este periodo en el que la hiperfenilalaninemia produce mayores trastornos, produciendo retrasos cognitivos que pueden llegar a ser muy severos. En niños mayores y adolescentes, dejar el tratamiento los predispone a sufrir dificultades en el aprendizaje. En cambio, un paciente adulto puede abandonar la dieta sin sufrir síntomas o reduciéndose éstos a falta de concentración o irritabilidad, aunque ocasionalmente se han descrito cambios importantes del comportamiento y paranoias. Para evitar los síntomas se recomienda mantener el tratamiento durante toda la vida <sup>(39-42)</sup>.

Asimismo, la capacidad de recuperación del daño cerebral depende de la edad a la que se instaure el tratamiento, consiguiendo mayores beneficios cuanto más precoz sea. Para evitar completamente la afectación neurológica es necesario comenzar el tratamiento durante el periodo neonatal. Cuando el diagnóstico es tardío se observa cierta mejoría de la capacidad intelectual, el comportamiento y la sociabilidad si se trata a estos pacientes, pero en estos casos siempre se mantiene alguna limitación. Actualmente se tiende a iniciar el tratamiento incluso en pacientes de edades avanzadas <sup>(55,56)</sup>. Las lesiones observadas en la resonancia magnética desaparecen si se

mantiene el tratamiento durante al menos un año, aunque puedan persistir las secuelas neurológicas<sup>(43-46)</sup>.

Las alteraciones cutáneas<sup>(57)</sup> y el olor a ratones se presentan cuando los niveles de fenilalanina en sangre son superiores a 900  $\mu\text{mol/L}$  (15mg/dl), y son rápidamente reversibles al disminuir esas cifras.

#### **1.4.2.- HIPERFENILALANINEMIA BENIGNA (Hyperphenylalaninemia o HPA, Mild Hyperphenylalaninemia o MHP)**

Antes de disponer del diagnóstico genético se describió esta enfermedad como una entidad diferenciada de la fenilcetonuria. Se trata de pacientes que tienen niveles de fenilalanina en sangre ligeramente elevados por encima de la normalidad (entre 120 y 600  $\mu\text{mol/L}$ ), a pesar de lo cual su desarrollo psicomotor es normal y no requieren tratamiento dietético<sup>(16,58)</sup>. Posteriormente se ha visto que en realidad se trata de pacientes con mutaciones en el gen *PAH*, pero cuyas enzimas resultantes mantienen una alta actividad residual. Esto permite un catabolismo de la fenilalanina cercano a la normalidad, impidiendo el acúmulo excesivo de fenilalanina y su neurotoxicidad. En muchas clasificaciones sigue apareciendo por tradición esta entidad como una enfermedad diferenciada, pero ya que se trata de una deficiencia en la función de la *PAH*, en esta Tesis Doctoral se denominará fenilcetonuria con fenotipo benigno.

A pesar de su aparente benignidad, se ha descrito en estos pacientes alteraciones menores del comportamiento tales como hiperactividad con mayor frecuencia que en la población normal. Asimismo, la falta de diagnóstico de estos casos puede dar lugar a síndromes de hiperfenilalaninemia materna en los hijos de las mujeres afectas<sup>(59)</sup>. También es necesario realizar el diagnóstico de estos niños para poder dar a sus familias un consejo genético adecuado, ya que pueden ser portadores de mutaciones más severas y tener en su descendencia o entre sus familiares casos de fenilcetonuria clásica<sup>(60)</sup>.



### **1.4.3.- SINDROME DE HIPERFENILALANINEMIA MATERNA**

Unos niveles elevados de fenilalanina en la sangre de la madre durante el desarrollo intrauterino de sus hijos no sólo tienen efectos devastadores a nivel cerebral, sino que pueden dar lugar a malformaciones cardíacas y renales. También son frecuentes en estas mujeres los abortos de repetición <sup>(59,61-65)</sup>. La homeostasis de la fenilalanina hasta la semana 27 de gestación depende exclusivamente de la capacidad materna para metabolizarla, y por lo tanto son los hijos de madre PKU los que pueden verse afectados por este síndrome, independientemente de su propia capacidad funcional. Para evitar estas importantes complicaciones las madres deben seguir, desde el momento de la concepción, un estricto tratamiento que evite niveles superiores a 180 µmol/L (3mg/dl) <sup>(61-65)</sup>. Se utilizan estos niveles porque se supone que el feto puede llegar a doblar los niveles maternos.

En el año 1995 se puso en marcha el Programa para la Detección de Hiperfenilalaninemia Materna en la Comunidad de Madrid, que pretende diagnosticar a todas aquellas mujeres en edad fértil con niveles elevados de fenilalanina y que no hayan sido diagnosticadas con anterioridad.

El Síndrome de Hiperfenilalaninemia Materna debe entrar en el diagnóstico diferencial de todo paciente con retraso mental de cualquier grado y/o microcefalia. Es importante tener en cuenta que para diagnosticarlo la única prueba útil es la determinación de los niveles de fenilalanina en la madre, y no en el niño.

## **1.5.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA HIPERFENILALANINEMIA. DETECCION NEONATAL**

La fenilcetonuria era una de las causas más frecuentes de retraso mental. En el momento en que se encontró un tratamiento para prevenir las alteraciones cognitivas si se iniciaba de forma precoz existía una razón para buscar de forma masiva pacientes PKU durante el periodo neonatal. Con este fin Guthrie y Susi desarrollaron en 1963 un método que permitía la determinación de fenilalanina con muestras de sangre del talón de recién nacidos <sup>(66)</sup>. Los programas de detección precoz de esta enfermedad junto con los de hipotiroidismo congénito, son los más extendidos en países desarrollados. El método utilizado es variable, y se utilizan ensayos microbiológicos, cromatográficos, fluorométricos y más recientemente la determinación mediante tandem-masas. En España el primer programa de detección precoz se organizó en Granada en 1968 por el Dr. Mayor Zaragoza y la Dra Ugarte, y desde entonces se ha desarrollado hasta cubrir a toda la población. Actualmente hay 21 centros de detección precoz que dependen de las consejerías de Salud de las distintas Autonomías (Figura 1.3).

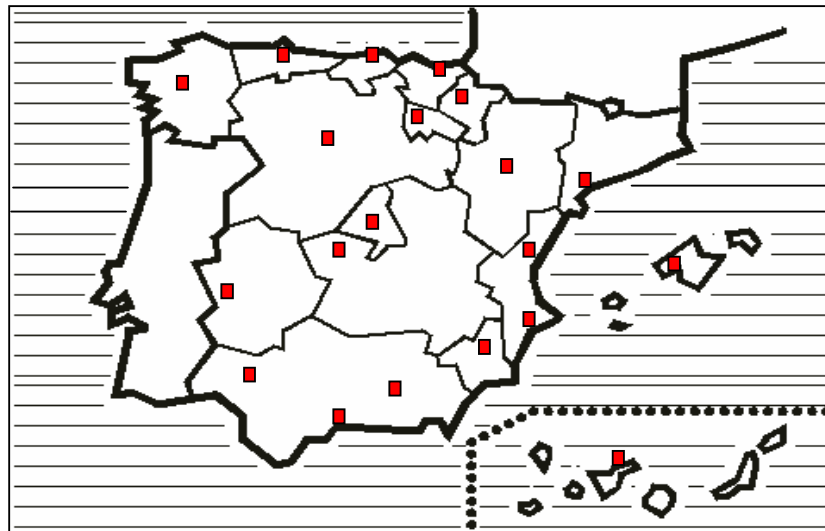
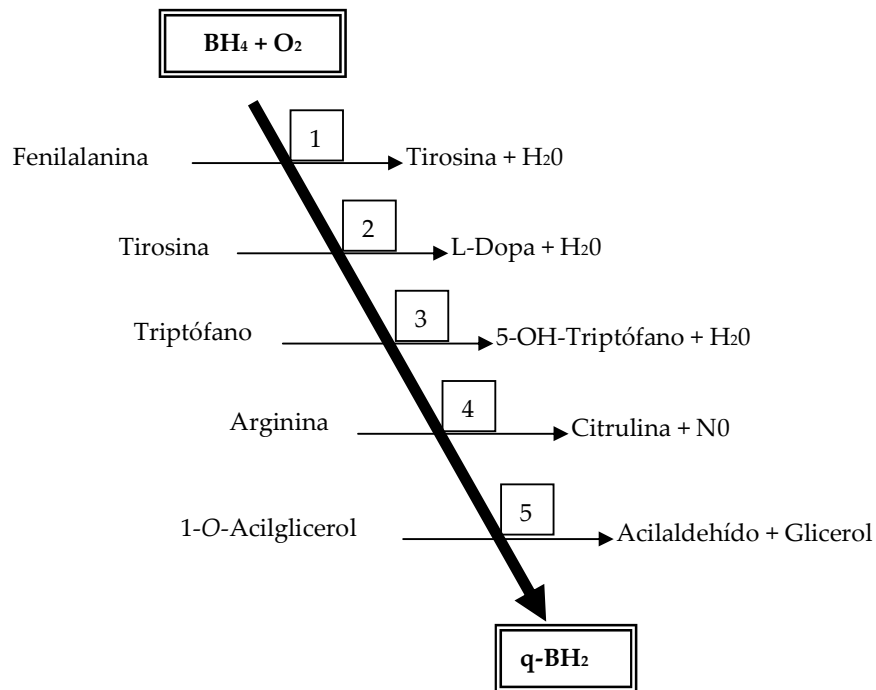


Figura 1.3.- Centros de Detección Precoz de Fenilcetonuria en España.

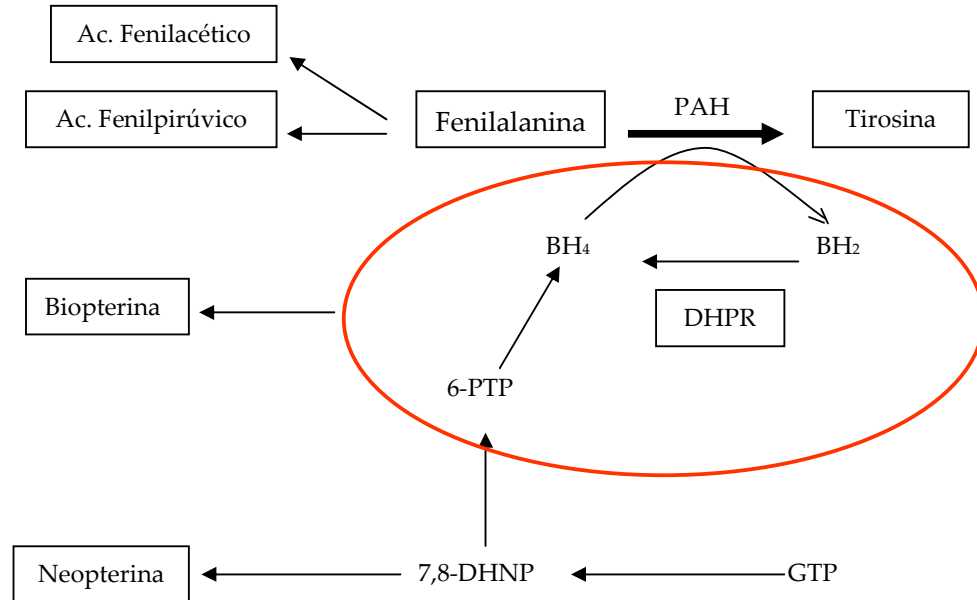
En la Comunidad de Madrid, la detección precoz de hiperfenilalaninemia se instauró en el año 1978, y consiste en la obtención de una muestra de sangre en papel S&S entre el 5º y 10º día de vida de todos los niños nacidos en la Comunidad. Se escoge esta edad por suponer para entonces una adecuada ingesta proteica. Las muestras se remiten por correo al centro de Detección Precoz de Minusvalías del Hospital Gregorio Marañón. En caso de que la muestra sea positiva, se confirma en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Universidad Autónoma de Madrid. Desde el año 1979 todos los casos con hiperfenilalaninemia se remiten a la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal para su diagnóstico definitivo, tratamiento y seguimiento a largo plazo.

La fenilalanina se acumula en sangre y tejidos cuando existe una disfunción en su sistema de hidroxilación. Como ya se ha comentado anteriormente, la gran mayoría de los casos se deben a deficiencias de la enzima PAH, pero un pequeño porcentaje de pacientes sufren hiperfenilalaninemia como consecuencia de alteraciones en la síntesis o regeneración de su cofactor, la BH<sub>4</sub>. La tetrahidrobiopterina actúa no sólo como donante de electrones para la PAH, sino también para la tirosina hidroxilasa, la triptófano hidroxilasa y otra serie de enzimas (Figura 1.4), y su deficiencia afecta directamente la síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos <sup>(67)</sup>. Los pacientes con alteraciones en la síntesis o reciclaje de la BH<sub>4</sub> tienen una afectación neurológica más severa que los pacientes fenilcetonúricos, con distonías, alteraciones de motilidad ocular, hipoglucemias y trastornos del control de temperatura desde el periodo neonatal, y no responden clínicamente aunque sí disminuyen los niveles de fenilalanina en sangre al tratamiento dietético habitual de la fenilcetonuria. Históricamente se denominó a estos procesos en conjunto Hiperfenilalaninemia Maligna <sup>(68-71)</sup>. Su tratamiento consiste en aportes exógenos de BH<sub>4</sub>, L-Dopa y 5-OH-Triptófano pero su evolución no es tan satisfactoria como el de la fenilcetonuria <sup>(72,73)</sup>. Los protocolos de diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia deben ir encaminados a la diferenciación de cada defecto enzimático para poder instaurar un tratamiento acertado a cada caso de forma precoz, poder predecir la evolución de los pacientes con mayor precisión y poder ofrecer un consejo genético adecuado.



**Figura 1.4.- Reacciones enzimáticas mediadas por BH<sub>4</sub>:** 1) Fenilalanina hidroxilasa; 2) Tirosina hidroxilasa; 3) Triptófano hidroxilasa; 4) Oxido nítrico sintasa; 5) Gliceril-eter-monooxigenasa. BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina. q-BH<sub>2</sub>: quinonoil dihidrobiopterina (tomado de Blau et al, 2001).

En el año 1984, poco tiempo tras las publicaciones iniciales de Niederweiser y Matalon <sup>(74,75)</sup>, la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal y el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Universidad Autónoma de Madrid comenzaron el estudio de los metabolitos de la síntesis de BH<sub>4</sub> (pterinas: neopterina y biopterina) en orina (figura 1.5) y la medición de la actividad DHPR en sangre de todos los pacientes remitidos a estudio por hiperfenilalaninemia. A partir de 1985 realizan además una sobrecarga oral con BH<sub>4</sub> a los pacientes con sospecha de deficiencia en la síntesis del cofactor, ya que en estos casos se observa un rápido y mantenido descenso en los niveles de fenilalanina al recibir este aporte oral de BH<sub>4</sub> <sup>(76,77)</sup>. En el año 1998 la Asociación Española de Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM) adopta este protocolo para la realización del diagnóstico diferencial entre los distintos defectos enzimáticos que producen hiperfenilalaninemia <sup>(50)</sup>. Este protocolo es similar al recomendado en otros centros especializados <sup>(78)</sup>.



**Fig. 1.5.- Diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia.** En recuadro se representan las sustancias medidas para realizar dicho diagnóstico: fenilalanina y tirosina en plasma, actividad DHPR en sangre, ácidos orgánicos derivados del exceso de fenilalanina en orina, así como las pterinas. Estas últimas son subproductos de la síntesis de BH<sub>4</sub> y se dividen en neopterinas (procedentes de la degradación de la 7,8-DHNP) y biopterinas (procedentes de la degradación de sepiapterina, BH<sub>4</sub> y BH<sub>2</sub>).

## **1.6.- TRATAMIENTO DE LA FENILCETONURIA**

El objetivo del tratamiento de la fenilcetonuria es mantener los niveles de fenilalanina plasmáticos por debajo de unos niveles considerados peligrosos para el desarrollo y función cognitiva del paciente (ver tabla I). En 1993 el Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria de Inglaterra <sup>(49)</sup>, y en 1998 la AECOM <sup>(50)</sup>, establecen que todo paciente con unos valores en sangre superiores a 360  $\mu\text{mol/L}$  (6 mg/dl) debe ser tratado. Como ya hemos comentado con anterioridad, los niveles tomados como referencia en los distintos países para tomar la decisión de tratar o no pueden diferir <sup>(49-54)</sup>.

En España, los pacientes con niveles mantenidos entre 120 y 360  $\mu\text{mol/L}$  (2-6 mg/dl) se considera que tienen un fenotipo benigno y que no requieren tratamiento aunque sí deben ser monitorizados para valorar la aparición de alteraciones neurológicas menores o evitar el síndrome de hiperfenilalaninemia materna <sup>(50)</sup>.

El tratamiento habitual de la fenilcetonuria consiste en una limitación en la ingesta de fenilalanina. Ya que la fenilalanina es un aminoácido esencial, la restricción de su ingesta reduce la cantidad que llega al sistema catabólico donde actúa la PAH, pero es indispensable abastecer adecuadamente al organismo para la biosíntesis de proteínas endógenas. Para que el tratamiento tenga éxito debe iniciarse en los primeros meses de la vida y mantenerse durante el desarrollo hasta la madurez, aunque actualmente se recomienda mantenerlo durante toda la vida. La dieta, los niveles de fenilalanina, y el desarrollo psicomotor y general de cada paciente debe monitorizarse de forma individual y prolongada, ya que las necesidades terapéuticas se deben adaptar a cada etapa evolutiva <sup>(11,49-54,79-82)</sup>.

La cantidad de fenilalanina que cada paciente puede tolerar en su dieta depende de la actividad residual de PAH que tenga. En 1980 Güttler estableció unos fenotipos según la tolerancia a fenilalanina que se han mantenido con escasas variaciones hasta la actualidad <sup>(16,83)</sup>. Según esta clasificación, los pacientes fenilcetonúricos que requieren tratamiento pueden tener un fenotipo suave, moderado y severo (o grave). En la Tabla 1.2 se especifican los distintos fenotipos, con su tolerancia, y la frecuencia de cada uno de ellos en la población española <sup>(84)</sup>. Esta clasificación utiliza la tolerancia a fenilalanina a los 5 años de edad, ya que los requerimientos de fenilalanina varían según las necesidades para el crecimiento y por lo tanto disminuyen progresivamente. Esto supone que hasta que el paciente no alcanza los 5 años, no puede ser catalogado adecuadamente.

	Tolerancia a fenilalanina <sup>a</sup> (mg/Kg/día)	Tolerancia media a fenilalanina <sup>a</sup> (mg/día)	Frecuencia en España <sup>b</sup>
PKU grave	< 20	250 - 350	15,7%
PKU moderada	20 - 25	350 - 400	9,0%
PKU suave	25 - 50	400 - 600	23,0%
HFA ó MHP	> 50	> 600	52,3%

a) según Güttler, 1980; Güttler y Guldborg, 1996.

b) según Desviat et al, 1999.

**Tabla 1.2.- Clasificación de los pacientes con deficiencia de PAH según la tolerancia a fenilalanina a los 5 años de edad, junto con la frecuencia de estos fenotipos en la población española.**

La fenilalanina forma parte de todas las proteínas de origen natural, de las cuales supone aproximadamente un 5%. La mayoría de los grupos recomienda restringir todas las proteínas naturales en mayor o menor grado, según la tolerancia de cada paciente. Recientemente, el grupo de la Dra MacDonald ha demostrado en un pequeño grupo de pacientes que la liberalización en la dieta de frutas y verduras no modifica los valores de fenilalanina plasmáticos <sup>(85)</sup>. Las frutas, verduras, patatas y condimentos contienen proteínas naturales de bajo valor biológico (PNBVB). Estas proteínas tienen un contenido en metionina inferior al 7% y sufren menor grado de absorción a nivel intestinal, en contraposición con las proteínas naturales de alto valor biológico (PNAVB), con mayor proporción de metionina y mayor absorción. Las PNAVB son aquellas que componen carnes, pescados, huevos, leche y productos lácteos, cereales y legumbres.

La restricción en la ingesta de proteínas naturales para evitar un incremento en los niveles de fenilalanina conlleva una restricción en la ingesta de otros aminoácidos, vitaminas y oligoelementos. Para evitar la aparición de patología carencial secundaria es necesario suplementar la dieta de los pacientes con productos industriales que contengan estos nutrientes. Con este fin se han desarrollado múltiples fórmulas de aminoácidos exentas de fenilalanina y enriquecidas en tirosina que cumplen todos los requisitos de la ESPGAN. Muchas de ellas contienen además distintas cantidades de vitaminas, oligoelementos y ácidos grasos esenciales. La cantidad de este tipo de suplementos que es necesario aportar depende de los requerimientos de cada paciente

según su edad, velocidad de crecimiento, procesos intercurrentes, etc. En general se siguen las recomendaciones de la RDA y ESPGAN para los distintos nutrientes, y en especial para los aminoácidos, que está establecida en un mínimo de 3g de aminoácidos (2,8g de proteínas) por kilo y día en niños menores de 2 años y 2g de aminoácidos (1,7g de proteínas) por kilo y día a partir de entonces. A pesar de estos esfuerzos, se han descrito múltiples deficiencias de nutrientes en pacientes PKU, como de ácidos grasos esenciales, selenio, carnitina, etc <sup>(86-90)</sup>. Otro aspecto negativo de estas fórmulas especiales es el escaso éxito obtenido en eliminar el desagradable olor y sabor producido por su contenido en metionina, a pesar de los continuos esfuerzos de la industria farmacéutica para hacerlos más atractivos a los pacientes <sup>(91-93)</sup>.

Para compensar el enorme perjuicio psicológico y social que supone esta dieta, todas las asociaciones de pacientes PKU tienen una serie de sucedáneos de alimentos tales como leche, queso, galletas, pasta, arroz, etc preparados especialmente para ellos con bajo contenido en fenilalanina (<0,5g proteína/ 100g de producto) y que mejoran la palatabilidad de las comidas y aumentan la ingesta calórica.

El mayor inconveniente de estas dietas es la importante reducción en la calidad de vida de los pacientes y sus familias: los suplementos dietéticos que deben tomar tienen mal olor y peor sabor y es necesario tomar bastante volumen para cubrir las necesidades del niño, a lo que se suma la imposibilidad en muchos casos de tomar los alimentos habituales, tener que saber la composición de múltiples productos y la necesidad de pesar prácticamente todo lo que se come, lo que restringe de forma importante sus posibilidades de interacción social. Estos inconvenientes son los que provocan la falta de adhesión o el abandono del tratamiento, sobre todo a partir de la adolescencia o edad adulta <sup>(94-96)</sup>.



## **1.7.- SEGUIMIENTO CLINICO Y BIOQUIMICO DE LOS PACIENTES FENILCETONURICOS**

Todos los pacientes deben ser evaluados clínica y bioquímicamente de forma periódica para adaptar la dieta a sus niveles de fenilalanina, permitir un adecuado crecimiento y desarrollo psicomotor y evitar la aparición de patología carencial. Es importante realizar periódicamente una evaluación neurológica y psicológica completa y valorar la realización de pruebas de imagen y de neurofisiología.

El número de controles clínicos y analíticos debe hacerse de forma individualizada, dependiendo de la evolución de cada paciente. En los primeros años de la vida y en mujeres embarazadas se debe realizar un seguimiento exhaustivo, mientras que en fenotipos suaves y en adultos puede no ser tan estricto.

En España se siguen las directrices del Protocolo de Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento de las Hiperfenilalaninemias propuesto por la AECOM en 1998 y que se expone de forma resumida en la Tabla 1.3 <sup>(50)</sup>.

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

**Tabla 1.3.- 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.

## **1.8.- RESPUESTA A TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES PKU**

La tetrahydrobiopterina actúa como cofactor de la enzima PAH induciendo cambios conformacionales en su centro activo y regulador. En el año 1983, los laboratorios Shircks, en Suiza, comenzaron a producir una tetrahydrobiopterina sintética (6-metil-tetrahydrobiopterina), con capacidad para interactuar con el centro activo pero sin inhibir el centro regulador debido a las diferencias en su cadena lateral <sup>(97)</sup>. Este producto estaba pensado para el tratamiento de los pacientes con deficiencia del cofactor, y era el utilizado en las sobrecargas orales de BH<sub>4</sub> en neonatos.

Históricamente, la realización de sobrecargas orales de BH<sub>4</sub> estaba restringido a aquellos casos en los que era necesario hacer un diagnóstico diferencial entre las deficiencias de PAH y los defectos en la síntesis del cofactor. Los pacientes con defectos en la síntesis de BH<sub>4</sub> tienen una rápida normalización de los niveles de fenilalanina plasmática tras la ingesta oral de dosis moderadas de BH<sub>4</sub> (aproximadamente 4 horas después de la administración de 2,5-10 mg/Kg). Sin embargo, ante posibles errores en el diagnóstico de pacientes con deficiencia de DHPR y coincidiendo con una mejora en la comercialización del producto, se recomendó a partir de 1993 la administración de dosis de superiores de BH<sub>4</sub> (hasta 20 mg/kg) en los protocolos diagnósticos <sup>(78)</sup>.

En 1999 Kure et al describen de forma detallada cuatro casos de pacientes con mutaciones en el gen *PAH* con una disminución de los niveles de fenilalanina durante una sobrecarga prolongada con BH<sub>4</sub> <sup>(98)</sup>. Casos similares aislados habían sido descritos con anterioridad <sup>(99)</sup>, pero fue este trabajo el que atrajo la atención de la comunidad internacional sobre el potencial terapéutico de la BH<sub>4</sub> en pacientes PKU. Desde entonces numerosos estudios han obtenido resultados prometedores, pero se puso de manifiesto una importante variabilidad en la respuesta a BH<sub>4</sub> de unos pacientes a otros <sup>(99-109)</sup>.

En la mayoría de los estudios publicados se ha observado que la frecuencia de respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub> es superior en pacientes con fenotipos leves, aunque hay autores que critican el hecho de que la mayoría de los estudios se hayan centrado en estos pacientes <sup>(99-109)</sup>. También hay artículos, aunque más escasos, que refieren respuestas positivas en pacientes con fenotipos graves <sup>(110-111)</sup>. La heterogenicidad en la clasificación de los pacientes y en el tipo de protocolo utilizado para valorar la respuesta a BH<sub>4</sub> (dosis, edad, tiempo de observación, dieta concomitante, grado de respuesta considerado positivo, etc) hace difícil establecer comparaciones entre los estudios disponibles.

También se ha intentado establecer una adecuada correlación entre el genotipo y la respuesta a BH<sub>4</sub>. Las mutaciones detectadas en los pacientes PKU cuya respuesta ha sido descrita como positiva se encuentran recopiladas en la base de datos <http://www.bh4.org/biopku.html>. Mediante estudios *in vitro* se han propuesto varios mecanismos moleculares que podrían explicar la respuesta al tratamiento con cofactor, entre los que se incluyen mejoras en la estabilización de la PAH y su mRNA, y el aumento de su transcripción <sup>(112-115)</sup>. Se han descrito pacientes con igual genotipo y diferente respuesta al cofactor y también hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes son heterocigotos y sus mutaciones pueden dar lugar a distintos mecanismos de interacción con el análogo. Actualmente, y como ocurría con el fenotipo, aunque hay mutaciones que siempre dan lugar a respuestas positivas al tratamiento, en la mayoría de los casos no se puede establecer una relación directa entre el genotipo de los pacientes y su respuesta al tratamiento con BH<sub>4</sub> <sup>(116)</sup>.

Dos estudios han analizado la farmacocinética de la BH<sub>4</sub> administrada oralmente en individuos sanos, indicando que los valores máximos y la vida media del cofactor en plasma tras una sobrecarga varían sensiblemente de unos individuos a otros, sugiriendo importantes diferencias a nivel de su absorción intestinal <sup>(117,118)</sup>. Este dato ha venido a sumarse a los conocimientos anteriores y que hacen suponer que la respuesta a BH<sub>4</sub> es un proceso multifactorial y difícilmente predecible. Por lo tanto

continúa siendo imprescindible realizar una prueba de sobrecarga para valorar un posible tratamiento a largo plazo con cofactor.

Hasta el momento se han publicado pocos trabajos describiendo los resultados del tratamiento a largo plazo pero los resultados son esperanzadores, consiguiéndose un importante aumento en la tolerancia a fenilalanina <sup>(110,111,119-123)</sup>. En algunos casos el tratamiento exclusivo con BH<sub>4</sub> permite seguir una dieta completamente normal. Salvo un caso de irritación local tras su administración sublingual <sup>(124)</sup>, no se han descrito efectos secundarios. También se ha postulado su utilidad para evitar el síndrome de hiperfenilalaninemia materna <sup>(125)</sup>, pero la falta de experiencia obliga a ser cautos en cuanto a los posibles efectos teratogénicos de la BH<sub>4</sub>. En el único caso descrito de su utilización en una mujer embarazada, se ha utilizado con éxito <sup>(126)</sup>.

En los últimos años, la implicación de la tetrahidrobiopterina en el metabolismo del óxido nítrico ha hecho que se proponga como tratamiento en campos tan dispares como la sepsis, las miocardiopatías y las alteraciones del endotelio vascular, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer, enfermedades genitourinarias como la criptorquidia, etc <sup>(127-132)</sup>. Estos hallazgos, junto con los resultados observados en los pacientes PKU, han impulsado a laboratorios BioMarin (USA) a conseguir la comercialización del producto. Bajo su patrocinio se han realizado estudios multicéntricos, internacionales, controlados con placebo y a doble ciego, en pacientes PKU tanto adultos como niños, con el fin de observar su eficacia y seguridad. La tetrahidrobiopterina sintética utilizada por este laboratorio es el dihidroclorato de sapropterina. Los resultados hasta el momento de estos estudios han sido satisfactorios <sup>(133,134)</sup>.

Aún así, la experiencia de todos los grupos sigue siendo escasa, por lo que es preciso continuar haciendo estudios para definir las dosis idóneas y la inocuidad del medicamento.

## **2.- OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo ha sido realizar una adecuada caracterización clínica de los pacientes fenilcetonúricos de la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal con el propósito de aplicar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que mejoren su calidad de vida y permitan hacer una adecuada correlación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico, la tolerancia máxima a fenilalanina y el genotipo. Con este fin se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. **Mejorar el protocolo de diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia**, de forma que permita un adecuado tratamiento dietético ó farmacológico desde el periodo neonatal, así como una buena correlación genotipo/fenotipo.
  
2. **Investigar nuevas posibilidades terapéuticas dietéticas.**
  - a. Estudiar la repercusión a corto y largo plazo de los distintos tipos de proteínas naturales (alto y bajo valor biológico) y de las proteínas especiales sin fenilalanina, así como otros factores que puedan afectar al control metabólico de los pacientes con deficiencia de PAH.
  - b. Observar la repercusión de la dieta en el desarrollo físico y mental de los pacientes con deficiencia de PAH seguidos en nuestro centro.
  
3. **Investigar nuevas posibilidades terapéuticas farmacológicas:** desarrollo de un protocolo diagnóstico para investigar la respuesta a BH<sub>4</sub> en pacientes con deficiencia de PAH y correlación de la respuesta *in vivo* con el fenotipo y genotipo. Observación de la evolución de los pacientes tratados a largo plazo con BH<sub>4</sub>.

### **3.- PACIENTES, MATERIAL Y METODOS**

Para llevar a cabo los objetivos de esta Tesis Doctoral se realizaron varios estudios, que se describen detalladamente a continuación y que fueron los siguientes:

1) **Mejoras en el protocolo de diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia:**

- a. Ampliación del protocolo para el diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia.
- b. Estudio para verificar la posible relación de los valores de fenilalanina al diagnóstico con la tolerancia posterior a fenilalanina (fenotipo) en pacientes con deficiencia de PAH.

2) **Investigación de nuevas posibilidades terapéuticas dietéticas:**

- a. Estudio a corto plazo de la repercusión de la ingesta de proteínas naturales de bajo valor biológico (PNBVB) en el control metabólico de pacientes PKU.
- b. Estudio a corto plazo de la repercusión del número de tomas diarias de proteínas sin fenilalanina (PXPhe) en el control metabólico de pacientes PKU.
- c. Estudio a largo plazo de los factores determinantes en el control metabólico y el desarrollo físico y mental de pacientes con deficiencia de PAH.

3) **Investigación de nuevas posibilidades terapéuticas farmacológicas:**

- a. Desarrollo de un protocolo para la valoración de la respuesta *in vivo* a una sobrecarga puntual de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) en pacientes con deficiencia de PAH.
- b. Resultados de un protocolo para la valoración de la respuesta a una sobrecarga prolongada de BH<sub>4</sub> en pacientes con deficiencia de PAH.
- c. Evaluación del tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub> en pacientes PKU.



Los individuos incluidos en los distintos estudios fueron pacientes con deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (PAH) diagnosticados y/o tratados en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Salvo los casos identificados en el estudio del diagnóstico diferencial de hiperfenilalaninemia y que no participaron en el resto de los estudios, ninguno de los pacientes tenía deficiencias en la síntesis del cofactor BH<sub>4</sub> ni en la actividad DHPR.

Todos los pacientes y/o sus tutores legales dieron su consentimiento informado para la realización de las distintas pruebas que requería cada estudio.

La prueba de sobrecarga de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y el tratamiento a largo plazo con este medicamento, al tratarse de un fármaco en experimentación clínica en pacientes con deficiencia de PAH, contó además con el consentimiento del Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal.

A continuación se refieren los pacientes y la metodología de los estudios clínicos realizados como parte de esta Tesis Doctoral. Los materiales y la metodología de los estudios bioquímicos y genéticos se describen escuetamente al final de este apartado ya que no fueron realizados directamente por el doctorando, sino en laboratorios especializados en dichas pruebas.

Los estudios estadísticos se llevaron a cabo utilizando hojas de cálculo Excel, y analizando los datos mediante pruebas estadísticas apropiadas a cada caso con los programas SPSS 12.0 y STATA 9.0.

### **3.1.- AMPLIACION DEL PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA HIPERFENILALANINEMIA**

#### **3.1.1.- PACIENTES**

En este estudio se incluyeron todos los pacientes remitidos a nuestro centro entre los años 1979 y 2004 por haber tenido niveles sanguíneos de fenilalanina  $>120 \mu\text{mol/L}$  ( $>2 \text{ mg/dl}$ ). La determinación del nivel de fenilalaninemia se podía haber realizado por varios motivos:

- a) Como parte del Programa de Detección Precoz de Minusvalías Psíquicas (screening neonatal) puesto en marcha a partir de 1979. La Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal es la unidad de referencia para todos los pacientes nacidos en la Comunidad de Madrid. Entre los años 1981 y 2001 también fue unidad de referencia para los pacientes de la Comunidad de Castilla-La Mancha. Ocasionalmente fueron remitidos pacientes de otras comunidades.
- b) Como parte del Programa de Detección de Hiperfenilalaninemia Materna puesto en marcha en la Comunidad de Madrid en 1998, en el que se mide la Phe en sangre materna durante el primer trimestre de la gestación.
- c) Pacientes en los que se determinó el nivel de fenilalanina al ser estudiados por retraso psicomotor.
- d) Sujetos estudiados por tener un familiar diagnosticado de hiperfenilalaninemia.

#### **3.1.2.- METODOLOGIA CLINICA**

Desde el año 1979 se siguió el siguiente protocolo para el diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia (protocolo establecido como norma por la AECOM en 1998):

- Recogida de datos: Realización de historia clínica, exploración física y medidas antropométricas.
  
- Alimentación: Comprobación de que el paciente ingería una cantidad mínima de 2,5 g de proteínas/kg/día (en neonatos equivalente a 500-700 mg de fenilalanina al día) durante al menos los 3 días previos a la toma de muestras. Esta cantidad es la recomendada por la ESPGAN (European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition). Esta comprobación se realizó validando la dieta y, en caso de lactancia materna, determinando la ingesta láctea pesando al paciente en varias ocasiones antes y después de las tomas.
  
- Obtención de muestras para estudios bioquímicos:
  - Niveles de aminoácidos en plasma: 3-4 cc de sangre en tubo de heparina de litio, centrifugadas para obtener el plasma.
  - Aminoácidos y ácidos orgánicos en orina: 70-100 cc de orina.
  - Actividad DHPR: 4 gotas de sangre en papel S&S.
  - Pterinas: estudiadas en la muestra de orina desde 1984. A partir del año 2000 se amplió el estudio a las muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo. Con este fin las muestras de orina, plasma y LCR se manipularon en ausencia de luz para evitar la degradación de las pterinas y se mantuvieron congeladas hasta el momento de su procesamiento.
  - Neurotrasmisores dopa y serotoninérgicos: estudiados en la tercera y cuarta fracción de líquido cefalorraquídeo.
  - Comprobación de la existencia de alteraciones hepáticas (incluyendo hiperbilirrubinemia neonatal) o infecciones que pudieran alterar las cifras de fenilalanina al diagnóstico, independientemente de que los pacientes tuvieran síntomas clínicos de alguna de estas alteraciones o no. Con este objetivo se realizaron hemograma, bioquímica básica

incluyendo transaminasas y proteína C reactiva y urocultivo al diagnóstico.

En mujeres con hiperfenilalaninemia detectada en el embarazo no se realizaron punciones lumbares ni sobrecargas de BH<sub>4</sub> ante las molestias que conllevan estas pruebas.

En los familiares directos de los pacientes el estudio consistió únicamente en la valoración de fenilalanina en sangre en papel de filtro, además de la determinación del genotipo.

- Obtención de muestras para el estudio genético:

Para el estudio de las mutaciones responsables de cada enfermedad se extrajo sangre total para la determinación del genotipo al paciente y sus familiares directos. La determinación del genotipo se hizo de forma progresiva a los pacientes seguidos en la Unidad de Enfermedades Metabólicas pero no necesariamente en el momento del diagnóstico.

- Sobrecarga de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>):

Desde el año 1984 se realizaron sobrecargas con 7,5 mg/Kg de tetrahidrobiopterina en dosis única sólo en caso de sospecha de deficiencia de BH<sub>4</sub>. En estos casos se determinaba la fenilalanina basal, 4 horas y 8 horas post-ingesta de BH<sub>4</sub>, valorando también pterinas en fracciones urinarias basal (-12 a 0 horas), 0-4 horas, 4-8 horas y 8-24 horas. A partir del año 1998 se hizo este tipo de sobrecarga a todos los pacientes en el momento del diagnóstico con una dosis única de 7,5-10 mg/kg de BH<sub>4</sub>. En el año 2002 se comenzó a aplicar el protocolo expuesto en la página X, con dosis única de 20 mg/kg y recogida de muestras en las siguientes 24 horas. Las sobrecargas prolongadas de BH<sub>4</sub> no se realizaron en ningún caso como parte del diagnóstico diferencial.

### **3.1.3.- METODOLOGIA ESTADÍSTICA**

El estudio se dividió en dos grandes apartados:

#### **3.1.3.1.- Ampliación del protocolo de diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia**

Estudio descriptivo de los pacientes estudiados por hiperfenilalaninemia, tanto de aquellos con deficiencia de PAH como de aquellos con deficiencia de síntesis o reciclaje del cofactor BH<sub>4</sub>:

- Diagnóstico final de los pacientes con hiperfenilalaninemia.
- Incidencia de las distintas enfermedades.
- Datos clínicos en el momento del diagnóstico.
- Medidas antropométricas (peso, talla y perímetro cefálico).
- Datos analíticos.
- Sobrecargas de BH<sub>4</sub> realizadas en el momento del diagnóstico.
- Estudio genético de los pacientes con hiperfenilalaninemia.

#### **3.1.3.2.-Determinación del fenotipo de pacientes con deficiencia de PAH a partir de los niveles de fenilalanina al diagnóstico**

Actualmente, como determinación de la severidad de cada paciente se utiliza la tolerancia a fenilalanina. Esta tolerancia se define como la cantidad de fenilalanina que se permite ingerir a cada paciente en un momento dado para evitar un aumento perjudicial de sus niveles de fenilalanina en sangre. En 1981 Güttler et al. separaron a los pacientes en 4 grupos o fenotipos según su tolerancia a fenilalanina a los 5 años de edad, clasificación que es aceptada a nivel internacional (ver Tabla 1.2 de la Introducción). En nuestra Unidad se añade un quinto grupo que comprende a aquellos pacientes que pueden llevar una dieta normal o prácticamente normal pero que

precisan suplementos de proteínas sin fenilalanina para mantener niveles de fenilalanina no perjudiciales y que denominamos Fenilcetonuria Muy Suave.

La ingesta de proteínas diaria se calculó según las dietas remitidas por los pacientes en forma miligramos de Phe/kg/día (medida utilizada habitualmente a nivel internacional). También se hicieron las comparaciones midiendo la tolerancia en forma de gramos diarios de proteínas naturales de alto valor biológico (PNAVB), valor utilizado en nuestra Unidad.

Este estudio tuvo como objetivo correlacionar de forma retrospectiva la tolerancia a fenilalanina de cada paciente entre los 2 y 5 años (fenotipo) con los niveles de fenilalanina que tuvo al diagnóstico (Phe Dx) y si existen factores que pudieran alterar la relación entre la Phe Dx y la estimación del fenotipo al diagnóstico.

Para determinar la correlación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico en los pacientes con PAH y su posterior tolerancia a fenilalanina (fenotipo) se llevaron a cabo varios estudios:

- Correlación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico con la tolerancia a fenilalanina. Para hacer esta correlación se utilizaron pruebas no paramétricas (Rho de Spearman) tomando únicamente los datos de los pacientes diagnosticados durante el periodo neonatal y en los que no concurrían otras circunstancias que teóricamente pudieran alterar los niveles al diagnóstico (fiebre, alteraciones hepáticas, prematuridad, etc).
- Comprobación del efecto de otra patología añadida en la relación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico y el fenotipo: comparación mediante pruebas no paramétricas (Rho de Spearman).

- Comprobación del efecto de la edad en los niveles de fenilalanina de pacientes sin tratamiento y su relación con el fenotipo. Se hicieron 2 estudios:
  - Correlación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con el fenotipo en pacientes con diagnóstico tardío. Comparación mediante pruebas no paramétricas de la correlación Phe Dx / fenotipo en pacientes con edad al diagnóstico superior a 2 meses. En caso de edad al diagnóstico superior a los 5 años, se utilizó como tolerancia a fenilalanina determinante del fenotipo aquella que tuviera el paciente estando sano un año tras el inicio del tratamiento, para evitar la variabilidad de los ensayos terapéuticos iniciales.
  - Correlación mediante pruebas no paramétricas de los niveles de un mismo paciente en el periodo neonatal y en una edad posterior (entre los 18 meses y los 35 años) tomando una dieta normal durante 48 horas (se utilizó el control basal de la prueba de sobrecarga de BH<sub>4</sub>).

Una vez verificada la relación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico y el fenotipo se buscó la mejor fórmula para predecir dicha relación en el futuro. Mediante análisis discriminantes y tablas de contingencia se obtuvieron fórmulas matemáticas y rangos de fenilalanina al diagnóstico con un buen poder predictivo para el fenotipo posterior.

Finalmente se ha hecho una descripción del genotipo de los pacientes, clasificados por fenotipos según los niveles al diagnóstico.

### **3.2.- INVESTIGACION DE NUEVAS POSIBILIDADES TERAPEUTICAS DIETETICAS**

#### **3.2.1- ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA REPERCUSION DE LA INGESTA DE PROTEINAS DE BAJO VALOR BIOLOGICO (PNBVB) EN EL CONTROL METABOLICO DE PACIENTES PKU**

##### **3.2.1.1.- Pacientes**

En este estudio sólo participaron pacientes tratados con dieta limitada en fenilalanina (pacientes PKU). El estudio se dividió en dos partes según el tipo de pacientes incluido:

- A) *Pacientes durante el primer año de vida:* Se estudiaron todos aquellos pacientes PKU diagnosticados en periodo neonatal en nuestra Unidad entre los años 1997 y 2003. Fueron excluidos aquellos pacientes en los que fue necesaria una modificación en el aporte de PNAVVB durante el primer año de vida. El estudio incluyó 18 pacientes, 11 mujeres y 7 varones. Sus fenotipos fueron: 7 PKU suave, 3 PKU moderada y 8 PKU severa.
  
- B) *Pacientes mayores de un año de edad:* Se estudiaron pacientes PKU con edades comprendidas entre los 2 y los 19 años de vida. Estos pacientes fueron reclutados entre aquellos que mandaban niveles de fenilalanina y controles dietéticos frecuentes. Los pacientes no fueron escogidos teniendo en cuenta su buen o mal control metabólico. Fueron excluidos aquellos casos en los que fue necesaria una modificación en el aporte de PNAVVB o de proteínas sin fenilalanina durante los dos años en que duró el estudio. Se incluyeron 15 pacientes, 10 mujeres y 5 varones. Los fenotipos de estos pacientes fueron: 4 PKU suave, 9 PKU moderada y 2 PKU severa.



### 3.2.1.2.- Metodología Clínica

Como se refirió anteriormente, el estudio se dividió en dos partes según los pacientes incluidos. Ambos estudios se realizaron de forma prospectiva.

- A) Pacientes durante el primer año de vida: Durante los 6 primeros meses de vida los pacientes tomaron sólo PNAVb en forma de fórmula maternizada en cantidad correspondiente al fenotipo de cada paciente. En los siguientes 6 meses se introdujeron los alimentos con PNBVB. Independientemente del fenotipo del paciente se aportaron 7-8g diarios de PNBVB en forma de 400g de patata pelada, 200g de verduras y 200g de fruta. Esto supone un aumento de 350 - 400mg de fenilalanina diarios. La cantidad total de PNAVb no se modificó en este segundo periodo, aunque se suministraron en forma de leche, yogur, cereales y huevo. El aporte de proteínas sin fenilalanina durante todo el año fue de 3 g/kg/día repartidos en 7-8 tomas diarias. Los controles de fenilalanina se realizaron en muestras de sangre en papel remitidas por los padres al laboratorio cada 7 días. La cuantificación de las dietas así como el control de parámetros clínicos se realizó en la consulta de forma mensual.
- B) Pacientes mayores de un año de edad: Se estudió la diferencia entre el control bioquímico de los pacientes durante un primer año en el cual se limitó la ingesta tanto de PNAVb como de PNBVB en mayor o menor medida según el fenotipo, con el control conseguido en el siguiente año, en el que se liberalizó completamente la ingesta de PNBVB en todos los pacientes. El aporte de PNAVb y de proteínas sin fenilalanina no se modificó a lo largo del estudio. Los controles dietéticos y las muestras de sangre en papel para fenilalanina fueron remitidas mensualmente por los pacientes. El incremento en la cantidad de fenilalanina ingerido en forma de PNBVB se determinó a partir de la validación de estas dietas escritas.

### **3.2.1.3.- Metodología Estadística**

Se utilizaron pruebas no paramétricas (test de Wilcoxon) para comparar, en ambos grupos de pacientes, las medianas de los niveles de fenilalanina antes y después de la introducción o liberalización de las PNBVB. También se comparó mediante estas pruebas el porcentaje de controles de cada paciente que superaba el nivel máximo considerado adecuado para cada edad, antes y después de la modificación dietética. Para obviar los sesgos producidos por la comparación de medianas se hicieron estudios de correlación de los valores de cada paciente mediante pruebas no paramétricas de Fisher.

### **3.2.2.- ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA REPERCUSION DEL NÚMERO DE TOMAS DIARIAS DE PROTEINAS SIN FENILALANINA (PXPHE) EN EL CONTROL METABOLICO DE PACIENTES PKU**

#### **3.2.2.1.- Pacientes**

En este estudio participaron 15 pacientes PKU, 9 mujeres y 6 varones, con edades comprendidas entre los 2 y los 14 años, y con los siguientes fenotipos: 5 PKU suave, 5 PKU moderada y 5 PKU severa. Se reclutaron de forma aleatoria entre los pacientes que acudieron a consulta.

#### **3.2.2.2.- Metodología Clínica**

Estudio prospectivo en el que se comparó el control metabólico de los pacientes durante una semana en la que se repartieron las proteínas sin fenilalanina en 3-4 tomas diarias, con los niveles de Phe durante la siguiente semana, en la que las PXPhe se tomaron en 5-8 tomas repartidas a lo largo del día. La cantidad total de PXPhe no se modificó durante el estudio, y correspondía al requerido según la edad del paciente.

Tampoco se hicieron cambios en la cantidad de PNAVB que tomaba cada caso. Los niveles de Phe se tomaron de forma diaria por la mañana en papel de filtro.

### **3.2.2.3.- Metodología Estadística**

Se utilizaron pruebas no paramétricas (test de Wilcoxon) para comparar las medianas de los niveles de fenilalanina obtenidas en los dos periodos a estudio, así como para comparar el grado de descenso de los niveles de fenilalanina con el grado de aumento en el número de tomas. La correlación entre los datos de cada paciente se hizo con un estudio T de Student.

### **3.2.3.- ESTUDIO A LARGO PLAZO DE LOS FACTORES DETERMINANTES EN EL CONTROL METABOLICO Y EL DESARROLLO FISICO Y MENTAL DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

#### **3.2.3.1.- Pacientes**

En este estudio se incluyeron todos los pacientes con deficiencia de PAH tratados en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal desde el año 1979 hasta el 2004. Se excluyeron aquellos pacientes en los que el periodo de seguimiento fue inferior a un año, así como aquellos en los que el seguimiento se realizó de forma esporádica.

#### **3.2.3.2.- Metodología Clínica**

Se recogieron de forma retrospectiva los siguientes datos de los pacientes:

- Datos demográficos: edad, sexo, antecedentes personales y familiares.

- Datos diagnósticos:
  - Niveles de Phe, Tyr, pterinas y en su caso neurotransmisores al diagnóstico.
  - Edad al diagnóstico.
  - Genotipo.
  
- Datos terapéuticos: El seguimiento por parte de los pacientes de este tratamiento se monitorizó mediante la validación de las dietas remitidas por los pacientes a la consulta. Durante el periodo de estudio el tratamiento recomendado a los pacientes consistió en una dieta restringida en fenilalanina realizada de la siguiente manera:
  - *Proteínas naturales de alto valor biológico (PNAVB):* restringidas hasta conseguir unos niveles de fenilalanina en sangre adecuados para la edad del paciente. A partir del año 2000 se recomendó a los pacientes eliminar completamente las PNAVB durante los procesos febriles.
  - *Proteínas naturales de bajo valor biológico (PNBVB):* limitadas junto con las PNAVB hasta el año 1994. A partir de ese momento las PNBVB se dieron de forma libre, sin ninguna restricción. No se tuvo en cuenta ni la edad ni el fenotipo del paciente, y no se limitaron durante los procesos febriles.
  - *Proteínas especiales sin fenilalanina (PXPhe):* el aporte de estas proteínas se modificó con la edad según las recomendaciones de la Asociación Española de Errores Congénitos del Metabolismo: 3g/kg/d hasta los 2 años; 2,5g/kg/d de 2 a 9 años; 2g/kg/d de 9 a 12 año; 1,5g/kg/d (máximo 85-100g/d) en adelante. El número de tomas diarias en las que se recomendó repartir las PXPhe antes de 1994 fue de 6-7 durante el primer año de vida y posteriormente 3-4. A partir de 1994 las recomendaciones fueron: 7-8 durante la lactancia y 5-6 posteriormente.

- Datos para la valoración del control metabólico: se registraron todos los niveles de Phe recogidos en papel S&S a lo largo del tiempo y remitidos al laboratorio por los pacientes. La cantidad de controles recomendada fue, según la edad: de 0 a 6 meses, semanal; de 6 meses a 2 años, quincenal; de 2 años en adelante mensual. El número de controles podía variar según requerimientos médicos. Se tuvo en cuenta la presencia de fiebre o alergia en el momento de la toma. Se consideraron niveles adecuados:
  - < 6 años: niveles inferiores a 6 mg/dl (360  $\mu$ mol/L). Hasta 1994 se consideraron adecuados: <9 mg/dl.
  - 6 – 9 años: niveles inferiores a 9 mg/dl (540  $\mu$ mol/L)
  - > 9 años: niveles inferiores a 10,5 mg/dl (630  $\mu$ mol/L)
  
- Datos antropométricos: Peso y talla al nacer, al diagnóstico, 6 meses de vida, 12 meses y posteriormente de forma anual. Perímetro cefálico al nacer y al diagnóstico. El índice de masa corporal (IMC) se calculó a partir de estos datos. La talla final en los adolescentes se consideró aquella que no aumentó en más de 2 cm en los últimos 2 años, una vez se había alcanzado un estadio puberal Tanner tipo IV.
  
- Datos para la valoración del estado nutricional: Estudio hematológico y bioquímico a los 3 años de vida que incluyó hemograma, bioquímica básica, perfil hepático, perfil lipídico, albúmina, CPK, calcio, fósforo, hierro, ferritina, cobre, zinc, vitaminas A y E y carnitina libre.
  
- Valoración neurológica:
  - *Estudios de neuroimagen:* resonancia magnética (RM) realizada a todos los pacientes a los 9 años de edad.
  - *Estudio neurofisiológico:* a todos los pacientes se hizo un electroencefalograma (EEG) a los 9 años de edad). Durante los años

1992-94 se realizaron también potenciales evocados auditivos (PEAT), visuales (PEV) y somatosensoriales (PESS).

- *Determinaciones del coeficiente intelectual (CI)* a los 18 meses, 3 años, 6 años, 9 años y 13-14 años de vida realizadas en el Centro de Salud Mental de Niños y Adolescentes por el Dr. Alamán y la Dra. Loriga. Dado que los distintos estudios están preparados para determinar el CI a una determinada edad, y que si se realizan a otras edades pueden modificar los resultados, se han registrado sólo aquellas pruebas completadas a las edades indicadas con un margen de 6 meses. Según la edad del paciente se utilizaron los siguientes exámenes:

- 18 meses: Brunete-Lezine
- 3 años: McCarthy
- 6 años: WISC, Goodenough, Bender, Lecto-escritura
- 9 años: WISC-R, Goodenough, Raven Color, Terman-Merrill-R, Lecto-escritura
- 13-14 años (final): WISC-R, Goodenough, Raven, Bender, Lecto-escritura.

- Datos socio-familiares:

- Talla de ambos progenitores.
- Nivel socio-económico calculado según la profesión de ambos progenitores y dividida en 5 grupos: <600€/mes, 600-1000€/mes, 1000-1500€/mes, 1500-3000€/mes y >3000€/mes.
- Coeficiente intelectual de los progenitores calculado subjetivamente por los médicos de la consulta tomando en consideración el nivel de estudios, la profesión y el grado de progresión profesional de los padres, su integración social y la facilidad en la comprensión de la enfermedad y el tratamiento de su hijo. Se dividió en 5 grupos: bajo, normal-bajo, normal, normal-alto y alto.

- Interés de los padres en la enfermedad y la evolución de su hijo. Calculado subjetivamente por los médicos de la consulta y valorado del 1-5. Se tuvo en cuenta el número de controles anuales del nivel de fenilalanina, la constancia en la remisión de las dietas escritas, la puntualidad en acudir a las citas y la preocupación por los niveles y la progresión de su hijo.

### **3.2.3.3.- Metodología Estadística**

Con estos datos se llevaron a cabo varios estudios de forma retrospectiva:

- Estudio descriptivo de los pacientes PAH tratados en nuestra Unidad.
- Estudios sobre el control metabólico de los pacientes:
  - *Estudio descriptivo* del control de los pacientes según su fenotipo.
  - *Comparaciones entre los niveles de fenilalanina media y porcentaje de malos controles* entre los distintos rangos de edad y los distintos fenotipos: se utilizaron análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples.
  - *Determinación de los factores que afectan el control metabólico de los pacientes:* las pruebas estadísticas clásicas asumen que las observaciones son independientes entre sí; nuestra muestra estaba compuesta por los 11925 controles de fenilalanina recogidos en sangre en papel y remitidos por los 154 pacientes a lo largo de los años (el rango del número de controles fue entre 10 y 188 por paciente). Para estos estudios se utilizaron técnicas GEE (Generalized Estimating Equations) que son las recomendadas en análisis de regresión de medidas repetidas<sup>(135)</sup> mediante el programa estadístico STATA 9.0. Mediante estas técnicas se pudo comparar el control metabólico de los pacientes con distintos

factores que pudiesen alterar los niveles de fenilalanina en sangre. Los factores estudiados fueron: factores dietéticos (trasgresiones dietéticas, ingesta de proteínas de bajo valor biológico, número de tomas diarias de PXPhe), enfermedades intercurrentes (fiebre y alergia), factores intrínsecos del paciente (sexo, edad y fenotipo) y factores familiares (nivel intelectual, nivel socioeconómico e interés en la enfermedad de sus hijos). Se estudiaron separadamente y posteriormente, para observar las posibles interacciones entre distintos factores, se hizo un modelo de regresión conjunto entre la fiebre, alergia, trasgresiones, edad y fenotipo.

- Observaciones sobre la evolución de la dieta de los pacientes: Descripción de la evolución de la tolerancia a proteínas naturales de alto valor biológico según rangos de edad y fenotipo. Comparación mediante pruebas paramétricas (prueba T de Student) entre la tolerancia en la adolescencia y edad adulta con la tolerancia a los 3-5 años de edad (tomada como referencia habitual) como datos puntuales y como rangos de tolerancia.
- Control analítico nutricional de los pacientes: Descripción y análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples de los análisis hematológicos y bioquímicos de los pacientes para observar si existen diferencias con los valores normales.
- Estudios del desarrollo antropométrico en pacientes PAH: Estudio descriptivo de la ganancia de peso, talla e índice de masa corporal (IMC) de los pacientes. Descripción de los percentiles obtenidos en nuestra población de pacientes. Obtención de los Zscore para los valores de cada paciente y comparación mediante análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples de dichos valores con la normalidad. Comparación mediante pruebas paramétricas (prueba T de Student) de la talla final de los pacientes con su talla esperada (talla media familiar).



- Estudios sobre la evolución neurológica de los pacientes:
  - *Clínica neurológica:* descripción de los síntomas de los pacientes.
  - *Pruebas de imagen y neurofisiología:* Descripción de los resultados.
  - *Evolución del CI a distintas edades:* estudio descriptivo y comparación entre los resultados globales del CI a distintas edades mediante análisis de varianza univariante con comparaciones múltiples contrastadas mediante una prueba de Student-Newman-Keuls. Comparación mediante pruebas T de Student del nivel manipulativo con el verbal a distintas edades. Descripción y análisis de varianza univariante (pruebas de efectos inter-sujetos, comparaciones múltiples) de la evolución del CI según el fenotipo y según la edad al diagnóstico de cada paciente.
  - *Estudio de factores que afectan el resultado del CI final de los pacientes PKU:* los factores estudiados fueron: edad al diagnóstico (descripción y comparación con una prueba T de Student entre el CI de pacientes con diagnóstico tardío con aquellos diagnosticados precozmente); niveles de fenilalanina al diagnóstico (se utilizaron pruebas no paramétricas, Rho de Spearman, para correlacionar los niveles de Phe Dx con el último CI de cada paciente); control metabólico de los pacientes (comparación mediante una prueba T de Student para muestras independientes entre el CI obtenido por los pacientes nacidos antes de 1991 y después de 1994); sexo (análisis mediante prueba T de Student para muestras independientes) y repercusión del nivel socio-económico, el coeficiente intelectual y el interés de los padres en el coeficiente intelectual final de los pacientes (análisis de varianza univariante con comparaciones múltiples).

### **3.3.- INVESTIGACION DE NUEVAS POSIBILIDADES TERAPEUTICAS FARMACOLOGICAS**

#### **3.3.1- PROTOCOLO PARA LA VALORACION DE LA RESPUESTA *IN VIVO* A UNA SOBRECARGA PUNTUAL DE TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Este estudio estuvo financiado mediante una beca FIS 02/118 del Instituto Carlos III.

##### **3.3.1.1.- Pacientes**

Se estudiaron dos tipos de pacientes:

- Neonatos nacidos en la Comunidad de Madrid a partir del año 2002 en los que se incluyó la sobrecarga de BH<sub>4</sub> como parte del diagnóstico diferencial de su hiperfenilalaninemia.
- Pacientes con deficiencia de PAH en los que no se realizó sobrecarga de BH<sub>4</sub> en el momento del diagnóstico y seleccionados por tener un fenotipo o un genotipo con posibilidades de responder a BH<sub>4</sub> en base a publicaciones previas.

##### **3.3.1.2.- Metodología Clínica**

###### **3.3.1.2.1.- Determinación del descenso en los niveles de Phe tras la ingesta de BH<sub>4</sub>**

El grado de respuesta a BH<sub>4</sub> en pacientes PKU (niveles de Phe al diagnóstico >360µM), tanto durante el periodo neonatal como en edades posteriores, se realizó administrando de forma oral una dosis única de 5,6,7,8 -BH<sub>4</sub> (Laboratorios Shircks,

Jona, Suiza) a 20mg/Kg (dosis máxima administrada 1g) y midiendo los niveles de Phe y Tyr en muestras de sangre en papel basal, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 horas tras la ingesta del fármaco. La prueba se realizó mediante ingreso hospitalario y con canalización de una vía venosa periférica para la extracción de muestras. Durante los dos días previos y durante las 24 horas de la prueba, los pacientes tomaron una alimentación normal, sin restricción proteica y sin la administración de productos proteicos sin fenilalanina. A lo largo de los dos días previos al ingreso y de forma ambulatoria los pacientes tomaron muestras de sangre en papel cada 8 horas para constatar el aumento en los niveles de Phe al abandonar la dieta.

En pacientes MHP (niveles de Phe al diagnóstico  $<360\mu\text{M}$ ) se consideró que sus niveles de Phe a pesar de llevar una dieta normal eran excesivamente bajos para observar una respuesta cuantificable. Por este motivo se decidió realizar el estudio mediante una prueba combinada: el 1º día se efectuó una sobrecarga con una dosis única de 100mg de fenilalanina/Kg exclusivamente y al día siguiente una segunda sobrecarga con fenilalanina a la que 3 horas después siguió la sobrecarga con 20 mg/Kg de  $\text{BH}_4$ . Las extracciones fueron en ambas curvas a las horas anteriormente descritas en pacientes PKU. Se compararon las dos curvas con objeto de diferenciar el descenso espontáneo de fenilalaninemia que tienen los pacientes MPH por su alta actividad PAH residual con el descenso que pudiera deberse al aumento de actividad PAH debida a la  $\text{BH}_4$ .

Se consideró positiva una reducción superior al 30% de los niveles de fenilalanina entre las 4 y las 8 horas tras la ingesta de  $\text{BH}_4$  respecto del valor basal. Una reducción similar entre las 12 y las 16 horas tras la toma del fármaco se consideró una respuesta lenta. En el caso de los pacientes MHP la reducción de los niveles de fenilalanina debería ser más rápida en la curva con  $\text{BH}_4$ .

### **3.3.1.2.2.- Determinación de la farmacocinética de la BH<sub>4</sub> administrada de forma oral.**

Los comprimidos de BH<sub>4</sub> se administraron en todos los casos de forma oral, acompañados de agua o zumo en niños mayores y de leche en el caso de los neonatos. Se pudieron tomar enteros o disueltos en el líquido. En unos casos la ingesta fue aislada, mientras que en otros se hizo coincidiendo con la toma de otros alimentos.

Se tomaron muestras de plasma para la determinación de pterinas de forma basal, 4, 8 y 24 horas tras la ingesta de los comprimidos de BH<sub>4</sub> (sólo basal y 8h post-BH<sub>4</sub> en neonatos). Se valoró la concentración de neopterina, biopterina y % de biopterina del total de pterinas a los diferentes tiempos indicados, para verificar la absorción de la BH<sub>4</sub> administrada de forma oral, el punto de máxima concentración sanguínea y la velocidad de eliminación.

### **3.3.1.2.3.- Determinación de las mutaciones genéticas que confieren respuesta a BH<sub>4</sub>.**

En aquellos pacientes en los que no se conociera previamente se recogió sangre total para el estudio del genotipo, con el objetivo de correlacionar la respuesta a BH<sub>4</sub> con determinadas mutaciones.

### **3.3.1.3.- Metodología Estadística**

Todos los estudios se realizaron de forma prospectiva. Los resultados son descriptivos.

### **3.3.2.- PROTOCOLO PARA LA VALORACION DE LA RESPUESTA IN VIVO A UNA SOBRECARGA PROLONGADA DE TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Este estudio se engloba dentro del protocolo PKU-006 patrocinado por laboratorios BioMarin <sup>(136)</sup>. Es un estudio en fase 3, randomizado, multicéntrico, a doble ciego y controlado con placebo para estudiar la eficacia de 20 mg/Kg de Phenoptin para aumentar la tolerancia en pacientes fenilcetonúricos que llevan una dieta restringida en fenilalanina. La sobrecarga prolongada con tetrahidrobiopterina fue parte del screening previo a dicho estudio, realizada con el fin de escoger aquellos pacientes susceptibles de recibir el tratamiento a largo plazo. En esta Tesis Doctoral sólo se incluyen los datos de los pacientes estudiados en nuestra Unidad.

#### **3.3.2.1.- Pacientes**

Fueron incluidos pacientes fenilcetonúricos en tratamiento con una dieta restringida en fenilalanina de entre 4 y 12 años de edad, con una tolerancia a fenilalanina inferior a 1000 mg/día (20 g PNAVb/día). Fue requisito que en los 6 meses previos a la sobrecarga el nivel medio de fenilalanina fuera inferior a 480 µmol/L, y que en una muestra tomada como screening el nivel de fenilalanina fuera asimismo inferior a ese nivel. Fueron también motivo de exclusión la presencia de alteraciones hepáticas o neurológicas, y el uso de inhibidores de la síntesis de folatos o de levodopa.

#### **3.3.2.2.- Metodología Clínica**

Se hizo una evaluación clínica y se tomaron niveles basales de fenilalanina, tras lo cual recibieron durante una semana 20 mg/Kg de Phenoptin (dihidroclorato de sapropterina) en una dosis única matutina. Al cabo de la semana se tomaron de nuevo niveles de fenilalanina, y se consideró una respuesta positiva un descenso de los

niveles de fenilalanina mayor del 30% respecto al basal y que los niveles hubieran descendido por debajo de 300  $\mu\text{mol/L}$ .

Durante la semana de la sobrecarga los pacientes continuaron con su tratamiento dietético habitual, sin cambios ni en la ingesta de PNAVb ni en la de suplementos proteicos sin fenilalanina.

### **3.3.2.3.- Metodología Estadística**

El estudio se realizó de forma prospectiva. Los resultados son descriptivos.

### **3.3.3.- EVALUACION DEL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Los pacientes seleccionados, el tratamiento y los estudios estadísticos fueron diferentes según si se siguió el protocolo habitual de nuestra Unidad ó si se siguió el protocolo del estudio PKU-006.

#### **3.3.3.1.- Pacientes**

A) *Protocolo de nuestra Unidad*: Para el tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub> fueron seleccionados aquellos pacientes que habían tenido una respuesta favorable en la prueba de sobrecarga puntual de BH<sub>4</sub> y que requerían una dieta restringida en fenilalanina y/o suplementos de proteínas especiales sin fenilalanina para mantener unos niveles de Phe en sangre adecuados. Fueron excluidos aquellos pacientes que no precisaban dieta.

B) *Protocolo PKU-006*: Fueron seleccionados aquellos pacientes con un descenso significativo (superior al 30% y con niveles en el día 8 inferiores a 300  $\mu\text{mol/L}$ ) de los niveles de fenilalanina en la sobrecarga prolongada de  $\text{BH}_4$ .

### 3.3.3.2.- Metodología Clínica

A) *Protocolo de nuestra Unidad*: Todos los pacientes incluidos en el protocolo de tratamiento a largo plazo fueron tratados inicialmente con 10 mg/Kg/día de  $\text{BH}_4$  repartidas en dos dosis y con una dieta sin restricción proteica y sin suplementos de proteínas sin fenilalanina. Durante los primeros días y mientras se realizaban ajustes en el tratamiento se obtuvieron de forma ambulatoria muestras de sangre en papel para la determinación de Phe 2-3 veces diarias. La toma de muestras y los controles en consulta se fueron espaciando según el control y la edad de cada paciente. Los cambios en el tratamiento se realizaron según los niveles de fenilalanina con el objetivo de mantener los niveles de Phe por debajo del máximo recomendado para la edad de cada paciente. Dado su alto coste, se intentó utilizar la mínima dosis posible de  $\text{BH}_4$ .

B) *Protocolo PKU-006*: Los pacientes continuaron con su dieta habitual (restricción en PNAVB + suplemento de productos sin fenilalanina) y tomaron a diario una dosis matutina en ayunas de unos comprimidos, que podían contener 20 mg/Kg de  $\text{BH}_4$  o un placebo. Cada 15 días los pacientes acudieron a consultas para tener una evaluación clínica, entregar una encuesta dietética y realizarse una analítica con hemograma, bioquímica, niveles de fenilalanina en plasma y sistemático de orina. Estas muestras fueron enviadas y analizadas en los laboratorios LKF de Raisdorf (Alemania). Dependiendo de los niveles de fenilalanina, la ingesta de proteínas naturales (en forma de una leche en polvo estándar) podía mantenerse sin cambios o aumentar. La duración total del estudio fue de 14 semanas.

En ambos protocolos, aparte del control bioquímico, se vigiló la aparición de efectos secundarios y se observó la evolución de parámetros pondo-estaturales y

psicológicos. También se tuvo en cuenta la opinión de pacientes y familiares sobre los cambios sufridos en su calidad de vida.

### **3.3.3.3.- Metodología Estadística**

A) *Protocolo de nuestra Unidad*: Estudio prospectivo para evaluar la eficacia y seguridad de la tetrahidrobiopterina en el tratamiento de pacientes que precisan dieta debido a su deficiencia en fenilalanina hidroxilasa. Se trata de un estudio descriptivo.

B) *Protocolo PKU-006*: Estudio prospectivo, en fase 3, multicéntrico, randomizado y controlado con placebo para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con 20 mg/kg de tetrahidrobiopterina en pacientes fenilcetonúricos que llevan una dieta restrictiva. En esta Tesis Doctoral se describen los resultados obtenidos por los pacientes seguidos en nuestra Unidad. Los resultados del estudio multicéntrico fueron presentados en la reunión de la SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) en Septiembre del 2007 y se encuentran aún pendientes de publicación.

## **3.4.- MATERIAL Y METODOS DE LOS ANÁLISIS**

### **BIOQUÍMICOS**

La determinación de pterinas, aminoácidos en sangre, fenilalanina y tirosina en papel y el análisis genético han sido realizados en el laboratorio del Centro de Estudio de Enfermedades Moleculares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, dirigido por la Dra. M. Ugarte.

Los niveles de neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo fueron determinados por la Dra. M. Mena, del Servicio de Investigación del Hospital Ramón y Cajal.



### **3.4.1.- DETERMINACION DE AMINOACIDOS**

Hasta 1994 los niveles de aminoácidos se realizaron por autoanalizador de aminoácidos en muestras de sangre en papel a través de cromatografía en capa fina. Los resultados eran semicuantitativos y sólo permitía tener sólo un número reducido de controles de los pacientes.

A partir de 1994 la determinación de fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) en plasma se realizó fluorométricamente mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa (HPLC). El sistema HPLC utilizado fue el modelo HP1100 de Agilent Technologies con detector de fluorescencia. Las muestras fueron inyectadas en una columna de HPLC zorbax eclipse XDB-C18, , 250 × 4.6mm, I.D. de 5 µm de tamaño de partícula. La Phe y Tyr se detectaron por su fluorescencia natural a  $\lambda_{EX}$  215nm y  $\lambda_{EM}$  283nm. Según el método descrito por Allen et al <sup>(137)</sup>.

Este método fue adaptado para muestras de sangre total remitidas en papel de filtro y que permitía que los pacientes pudieran hacerse controles de forma ambulatoria. Los aminoácidos fueron eluidos de las muestras en papel de filtro con ácido perclórico y posteriormente filtradas e inyectadas en la columna de HPLC. Esta adaptación fue validada comparando los valores obtenidos de papel de filtro con los de muestras de plasma de pacientes y controles.

### **3.4.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DHPR**

La determinación de la actividad DHPR se hizo según la metodología propuesta por Arai y colaboradores <sup>(138)</sup>.

### **3.4.3.- DETERMINACION DE PTERINAS**

Las muestras de plasma, orina y LCR para el estudio de pterinas se recogieron en frío y se mantuvieron aisladas de la luz y congeladas hasta el momento de su

procesamiento. El análisis de pterinas en plasma y orina se efectuó mediante HPLC, utilizando la columna descrita con anterioridad. Las pterinas fueron detectadas por su fluorescencia a  $\lambda_{EX}$  360nm y  $\lambda_{EM}$  440nm. El método empleado fue el propuesto por Fukushima y Nixon <sup>(139)</sup>.

#### **3.4.4.- ANALISIS GENETICOS**

Los análisis genéticos fueron realizados mediante DGGE y secuenciación directa <sup>(140)</sup>. El DNA genómico de los pacientes y sus familiares se extrajo de sangre total <sup>(141)</sup>. Se utilizó DGGE de rango amplio para localizar las mutaciones <sup>(142)</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).

#### **3.4.5.- DETERMINACION DE NEUROTRASMISORES DOPAMINÉRGICOS Y SEROTONINÉRGICOS**

Los metabolitos de neurotransmisores dopa y serotoninérgicos determinados fueron: 3-metoxi-DOPA, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, triptófano, ácido hidroxindolacético y ácido homovanílico. La determinación se realizó utilizando muestras de 3-4<sup>o</sup> fracción de líquido cefalorraquídeo, fluorométricamente mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) asociada a un detector electroquímico, según el método publicado por la Dra. Mena <sup>(143)</sup>.

## **4.- RESULTADOS**

## **4.1.- RESULTADOS DE LA AMPLIACION DEL PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DE LA HIPERFENILALANINEMIA**

### **4.1.1.- RESULTADOS EN EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA HIPERFENILALANINEMIA**

Este estudio se diseñó para conocer la eficacia del protocolo existente y si la ampliación de dicho protocolo permitía un mejor diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia, tanto de aquellos pacientes con deficiencia de PAH como de los casos con deficiencias en la síntesis ó reciclaje del cofactor BH<sub>4</sub>. En ambos casos se pretende, con el diagnóstico adecuado, instaurar de forma precoz un tratamiento específico para minimizar el daño neurológico derivado de cada enfermedad.

#### **4.1.1.1.- Diagnóstico final de los pacientes estudiados por hiperfenilalaninemia**

En el periodo comprendido entre 1979 y 2004 se estudiaron por hiperfenilalaninemia en nuestra Unidad un total de 137 pacientes con edades comprendidas entre los 10 días y los 38 años. El diagnóstico final de dichos pacientes fue:

- Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa (PAH): 131 pacientes.
- Deficiencia transitoria de PAH: 2 pacientes.
- Deficiencia de Dihidrobiopterina Reductasa (DHPR): 1 paciente.
- Deficiencia en la síntesis de BH<sub>4</sub>:
  - 2 pacientes con deficiencia de PTS.
  - 1 paciente con deficiencia transitoria de PTS.

Los 131 pacientes con deficiencia de PAH se diferenciaron, según la edad al diagnóstico, en:

- Neonatos (0-2 meses de vida): 112 pacientes.
- Pacientes diagnosticados a partir de los 2 meses de vida: 20 pacientes.
  - Pacientes con retraso psicomotor: 6 casos.
  - Familiares estudiados tras el diagnóstico de un hijo o hermano: 8 pacientes.
  - Mujeres embarazadas detectadas mediante el protocolo de prevención de la Hiperfenilalaninemia Materna: 6 mujeres.

De los pacientes con deficiencia de PAH, 82 mujeres y 50 varones, 98 pertenecían a la Comunidad de Madrid, 24 a la Comunidad de Castilla-La Mancha y 10 a otras Comunidades Autónomas.

El total de recién nacidos con deficiencia de PAH en la Comunidad de Madrid, tomando los datos de los 10 años previos, fue de 2 a 7 nuevos pacientes por año, lo cual da una tasa media de 8 pacientes por cada 100.000 nacidos vivos (0,8:10.000 nacidos vivos). Estos datos indican que la tasa de portadores en la Comunidad de Madrid es de 1:60 habitantes. Los datos de natalidad y población en la Comunidad de Madrid se han obtenido del Instituto Nacional de Estadística ([www.ine.es](http://www.ine.es)). La incidencia en otras Comunidades no se ha calculado ya que no tenemos constancia de que remitieran a nuestro centro todos los niños detectados mediante el screening neonatal.

Durante el periodo de estudio no hubo casos de falsos negativos en nuestra población a estudio. Los pacientes con diagnóstico tardío corresponden a pacientes que nacieron antes de la implantación universal del screening neonatal, o pacientes nacidos en comunidades o países en los que el protocolo de diagnóstico precoz no es universal y que posteriormente se trasladaron a nuestro medio.

El tratamiento de las mujeres con hiperfenilalaninemia benigna detectadas mediante el protocolo de Hiperfenilalaninemia Materna permitió a estas mujeres tener hijos sanos, incluso en más de una ocasión, cuando anteriormente habían tenido abortos de repetición. Una paciente con niveles de fenilalanina superiores a 20 mg/dl

(1200  $\mu\text{mol/l}$ ) decidió poner fin al embarazo de forma reglada ante el riesgo de malformaciones fetales. Por desgracia, no tenemos constancia de que este protocolo se aplique a todas las mujeres de forma universal en nuestra Comunidad.

En los 25 años recogidos sólo se han detectado cuatro pacientes con deficiencia en la síntesis o reciclaje del cofactor, lo que indica la baja incidencia de estas enfermedades. Únicamente una de las pacientes con deficiencia de PTS grave pertenecía a la Comunidad de Madrid. Los otros tres pacientes fueron remitidos desde otras regiones españolas: un paciente con deficiencia de PTS grave procedía de Andalucía, el paciente con deficiencia transitoria de PTS era de Castilla-La Mancha y la paciente con deficiencia de DHPR fue remitida desde Castilla-León.

#### **4.1.1.2.- Datos clínicos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia**

Los 112 pacientes con deficiencia de PAH diagnosticados durante el periodo neonatal eran neurológicamente normales tanto al nacimiento como en el momento del estudio entre los 15 y 30 días de vida. Noventa pacientes estaban completamente asintomáticos. Los 22 pacientes restantes presentaban síntomas no relacionados con su enfermedad de base, sino con otra patología intercurrente. Catorce niños tuvieron hiperbilirrubinemia, que en todos los casos fue transitoria. Hubo 6 pacientes en los que se detectó bacteriuria asintomática. Una paciente desarrolló una sepsis de origen urinario por E. Coli como consecuencia de la cual se le diagnosticó, además de una deficiencia de PAH, una galactosemia por deficiencia de galactosa 1 fosfato uridil transferasa. Un paciente tuvo sangrados durante las extracciones para la realización del diagnóstico, y en él se confirmó la coexistencia de una hemofilia A.

Aunque se considera diagnóstico tardío el realizado con una edad superior a los 2 meses de vida, la edad de los pacientes con deficiencia de PAH detectados posteriormente al periodo neonatal fue muy superior, entre los 15 meses y los 35 años

de edad. Según referían todos los pacientes tuvieron un nacimiento y periodo neonatal sin incidencias reseñables. La clínica al diagnóstico fue variable según su edad, motivo de estudio y sobre todo según su tolerancia a fenilalanina:

- Pacientes estudiados por retraso mental: 6 pacientes con edades al diagnóstico entre 4 y 32 años. Todos presentaban graves trastornos cognitivos, del habla y el comportamiento. Estos pacientes tenían siempre una tolerancia baja a fenilalanina.
- Familiares de pacientes: Al hacer los estudios familiares se detectaron 8 casos. Dos niños, ambos de 3 años y medio de edad, tenían un discreto retraso psicomotor y posteriormente se observó que tenían una baja tolerancia a fenilalanina. Los 6 pacientes restantes, con edades entre los 15 meses y los 35 años, estaban asintomáticos, llevaban una vida normal y tenían una alta tolerancia a fenilalanina.
- En el caso de las 6 mujeres embarazadas, el único síntoma previo solía ser el haber sufrido abortos de repetición. Dos de ellas, aquellas con poca tolerancia a fenilalanina que no tenía un diagnóstico previo, tenían un coeficiente intelectual bajo aunque llevaban una vida normal.

Las dos niñas con deficiencia transitoria de PAH estuvieron hasta el diagnóstico, y durante todo su periodo de observación, asintomáticas, con buena ganancia pondero-estatural y exploraciones neurológicas normales. Se detectaron al nacimiento y los niveles de fenilalanina se normalizaron espontáneamente a partir del cuarto mes de vida.

En el periodo de 1979 – 2004 sólo se hizo un diagnóstico de deficiencia de DHPR en una niña de 8 años de edad que tenía un grave retraso psicomotor, sin sostén cefálico y escasa respuesta al entorno, distonías y frecuentes crisis convulsivas con un electroencefalograma compatible con un síndrome de Lennox-Gastout. El tratamiento no consiguió mejorar la clínica de esta paciente, que falleció a los 15 años de edad.

Los dos pacientes con deficiencia de PTS nacieron por cesárea y eran pequeños para su edad gestacional. Ambos tuvieron desde el periodo neonatal episodios distónicos y dificultades para el control de la temperatura. En uno de los casos se evidenciaron varios episodios de hipoglucemia asintomática. En un caso el diagnóstico se realizó en edad neonatal pero por falta de disposición del medicamento no se inició el tratamiento hasta los 14 meses de edad. El otro paciente se nos remitió a los 7 meses de edad con el diagnóstico de fenilketonuria con mala evolución. En ambos casos el tratamiento se inició de forma tardía, pero se obtuvieron importantes mejorías en la clínica distónica, sin que ésta desapareciera completamente. El nivel intelectual de estos pacientes es ligeramente inferior a la normalidad. Uno de los pacientes falleció accidentalmente a los 12 años de vida. La otra paciente tiene actualmente 20 años de vida.

El paciente con deficiencia de PTS transitoria tuvo hipoglucemias durante el periodo neonatal. Fue tratado con tetrahidrobiopterina oral durante sus 6 primeros años de vida, con normalización de los parámetros analíticos que se detallan más adelante, permaneciendo completamente asintomático, sin tener ni al diagnóstico, ni durante su seguimiento, síntomas neurológicos de ningún tipo.

#### **4.1.1.3.- Datos antropométricos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia**

Los parámetros antropométricos de todos los pacientes diagnosticados durante el periodo neonatal se muestran en la Tabla 4.1. Los datos de los pacientes con deficiencia de PAH fueron similares a la normalidad, tanto al nacimiento como al diagnóstico, aunque los pacientes con mayor severidad tendieron a tener parámetros en percentiles más bajos. Los pacientes en los que el diagnóstico se hizo de forma tardía habían tenido una ganancia pondero-estatural y de perímetro cefálico dentro de parámetros normales. Las pacientes con deficiencia de PAH transitoria tuvieron asimismo parámetros normales.



Diagnóstico	PRN (Kg)	LRN (cm)	PC (cm)	Peso Dx (Kg)	Talla Dx (cm)	PC Dx (cm)	Clínica neonatal
Normalidad	3,5 ± 1,0	49 ± 3	31 - 36	4,1 ± 1,2	53 ± 3	37 ± 2,5	Asintomático.
Def. PAH Trans	4,4 / 3,1	52 / 48	34 / 33	5,2 / 4,1	56 / 51	37 / 36	Asintomático.
Def. PAH	3,23 ± 0,5	49 ± 2	34 ± 6	3,97 ± 0,3	53 ± 3	37 ± 2	Asintomático.
Def. DHPR	3,38	48	34	-----	-----	-----	Distonías.
Def. PTS	2,0 / 2,1	43 / 45	nd / 30	2,3 / 2,5	44,5 / 47	nd / 36	Hipoglucemia, distonías, trastornos temperatura.
Def. PTS Trans	3,1	51	34	3,8	53	36	Hipoglucemia.

nd: no determinado. PRN: peso al nacer. LRN: longitud al nacer. PC: perímetro cefálico al nacimiento. Peso Dx: peso al diagnóstico. Talla Dx: talla al diagnóstico. PC Dx: perímetro cefálico al diagnóstico.

**Tabla 4.1.- Clínica y medidas antropométricas en periodo neonatal de los pacientes con las distintas patologías diagnosticadas por hiperfenilalaninemia en nuestra Unidad.** Todos tienen unos datos antropométricos normales salvo los pacientes con deficiencia de PTS, que tuvieron un CIR simétrico.

Los dos casos de deficiencia de PTS fueron pequeños para su edad gestacional, con peso, talla y perímetro cefálico en el rango inferior de la normalidad (percentil 3). Esta desviación de la normalidad se mantuvo durante todo su desarrollo. El paciente con deficiencia transitoria de PTS tuvo un peso adecuado para su edad gestacional, pero se trataba de un hijo de madre con diabetes gestacional y en estos casos los niños suelen nacer con sobrepeso. Posteriormente su desarrollo siguió parámetros normales.

La paciente con deficiencia de DHPR tuvo unos datos antropométricos normales al nacimiento, incluido el perímetro cefálico. En la tabla no se muestran los datos al diagnóstico de la paciente con DHPR ya que se realizó a los 8 años de edad y no se pueden comparar con el del resto de los pacientes. Se observó que había tenido una ganancia de peso y talla aceptables pero presentaba una microcefalia con un perímetro cefálico inferior al percentil 3 para su edad.

#### **4.1.1.4.- Datos analíticos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia**

Los datos analíticos de todos los pacientes se incluyen en la Tabla 4.2. Los niveles de fenilalanina no fueron útiles para discriminar la etiología de la hiperfenilalaninemia. Los niveles de pterinas son la determinación más útil para

realizar un correcto diagnóstico diferencial, que debe completarse con una determinación de la actividad DHPR y una sobrecarga de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>).

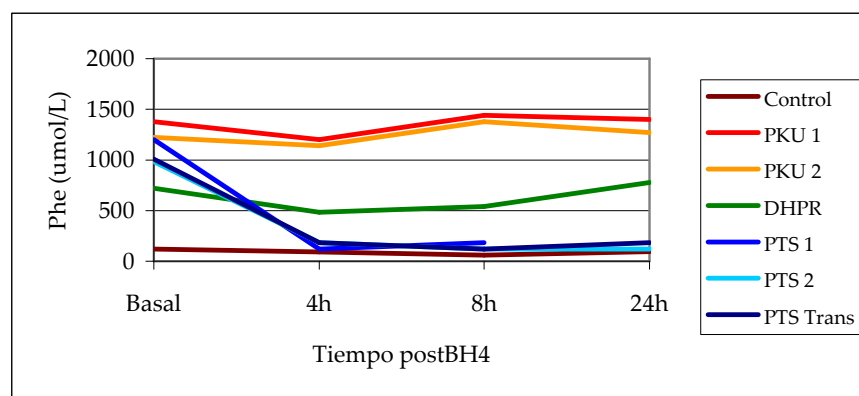
Desde el año 2000 al 2004 se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) a 20 de los neonatos diagnosticados de deficiencia de PAH. En ninguno de ellos se observó una disminución en los niveles de pterinas o neurotransmisores a nivel de sistema nervioso central. En cambio, tanto los pacientes con deficiencia de PTS como la paciente con deficiencia de actividad DHPR, sí presentaban disminución de los neurotransmisores dopa y serotoninérgicos y alteraciones en las pterinas. El paciente con deficiencia transitoria de PTS tenía una disminución de las biopterinas a nivel periférico, pero no se encontraron alteraciones de pterinas y neurotransmisores a nivel del sistema nervioso central.

	<b>Def. PAH</b>	<b>Def. PTS grave</b>	<b>Def. PTS transit</b>	<b>Def. DHPR</b>	<b>Normalidad</b>
<b><u>Niveles de Phe</u></b> ( $\mu$ mol/L) (mg /dl)	1037 $\pm$ 78,6 (150 $\pm$ 3228) 17,29 $\pm$ 13,01 (2,5 – 53,8)	984 / 1920 16,4 / 32	900 15	678 11,3	<120 <2
<b><u>Relación Phe/Tyr</u></b>	16,36 $\pm$ 14,91	41/ 42		41,85	< 2
<b><u>Pterinas en orina</u></b> <u>Neopterina(mmol/mol Cr)</u> <u>Biopterina(mmol/mol Cr)</u> <u>%Biopterinas</u>	9,12 $\pm$ 8,28 6,88 $\pm$ 8,44 45,04 $\pm$ 20,06	35 / 45 0 / 0 0 / 0	21 0,5 3,2	13,2 67,4 83,6	> 20
<b><u>Pterinas en plasma</u></b> Neopterina (nmol/L) Biopterina (nmol/L) %Biopterina	125,31 $\pm$ 93,54 (53,40 – 197,22) 32,14 $\pm$ 16,21 (19,68 – 44,61) 23,54 $\pm$ 6,98 (18,17 – 28,91)	nd nd nd	nd nd nd	nd nd nd	3 - 22 4 – 18 20 - 70
<b><u>Pterinas en LCR</u></b> Neopterina (nmol/L) Biopterina (nmol/L) %Biopterinas	38,82 $\pm$ 43,31 (5,52 – 72,12) 40,17 $\pm$ 21,03 (23,99 – 56,33) 54,49 $\pm$ 12,80 (44,65 – 64,32)	83,8 / 58,01 0,0 / 2,2 0,0 / 3,6	41,5 54,4 56,7	nd nd nd	9 – 40 10 – 50 32 - 87
<b><u>Neurotransmisores en LCR</u></b> Homovanílico (ng/ml) 5 OH Indolacético (ng/ml)	127,09 $\pm$ 38,09 (97,81 – 156,38) 60,72 $\pm$ 28,84 (38,54 – 82,89)	nd nd	76 27,8	19 nd	107 $\pm$ 48 (59 – 155) 50 $\pm$ 23 (27 – 73)

Tabla 4.2.- Datos analíticos al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninamia.

#### 4.1.1.5.- Sobrecargas de BH<sub>4</sub> al diagnóstico de los pacientes con hiperfenilalaninemia

Durante el periodo 1984-1998 se realizaron sobrecargas con 7,5 mg/Kg de BH<sub>4</sub> a los dos pacientes con deficiencia de PTS, a la paciente con deficiencia de actividad DHPR y a dos pacientes con deficiencia de PAH en los que los resultados de los niveles de biopterinas en orina eran dudosos. Los resultados de estas sobrecargas se muestran en la Figura 4.1. Entre 1998 y 2002 se hizo una sobrecarga de BH<sub>4</sub> a 4 pacientes con deficiencia de PAH con una dosis máxima de 10 mg/Kg de tetrahidrobiopterina. En ninguno de estos pacientes se modificaron los niveles de fenilalanina. El paciente con deficiencia transitoria de PTS, estudiado durante este periodo, tuvo una respuesta similar a la de los pacientes con deficiencias graves de esta enzima, respondiendo a la BH<sub>4</sub> normalizando los niveles de fenilalanina a las 4 h post dosis de BH<sub>4</sub>. (Figura 4.1). A partir de 2002 se estudiaron 17 pacientes con deficiencia de PAH en edad neonatal, con sobrecargas de BH<sub>4</sub> de 20 mg/Kg. Algunos de éstos pacientes tuvieron un descenso significativo en los niveles de fenilalanina en sangre, aunque no tan drástico y mantenido como en los casos de deficiencia de BH<sub>4</sub>. Los resultados de estas últimas sobrecargas se describen con detalle más adelante.



**Figura 4.1.- Evolución de los niveles plasmáticos de fenilalanina tras una sobrecarga oral con BH<sub>4</sub> en pacientes con PKU, deficiencia de DHPR y deficiencia de PTS.** Se observa la falta habitual de respuesta en los pacientes PKU, mientras que los pacientes con deficiencia de PTS tienen una normalización rápida y mantenida de los valores de Phe en sangre. La paciente con deficiencia de DHPR tienen una respuesta inicial escasa y poco prolongada.

#### **4.1.1.6.- Estudios genéticos en los pacientes con hiperfenilalaninemia**

De los 131 diagnosticados en nuestra Unidad, se ha determinado el genotipo de 100 pacientes con deficiencia de PAH. En todos los casos estudiados se han encontrado mutaciones patológicas, aunque en 12 pacientes (12% de la muestra) no se ha podido determinar la segunda de las mutaciones causantes de la enfermedad. Los distintos genotipos y su importancia en la determinación de la gravedad de cada cuadro se describen más adelante.

La paciente con deficiencia de PTS tiene las mutaciones P87L / N52S en el gen PTS localizado en el cromosoma 11. En el segundo caso, procedente de Andalucía y que fallecido accidentalmente, no se pudo realizar el estudio genético.

La paciente con deficiencia de DHPR tenía las mutaciones G17R / Y16X en el gen DHPR localizado en el cromosoma 4.

En los pacientes con deficiencia de PAH y de PTS transitorias no se encontró ninguna mutación en los genes estudiados, lo cual corrobora la hipótesis de que se trata de niños normales en la que la elevación de los marcadores patológicos se debe a inmadurez, y no de que se trata de formas suaves de dichas enfermedades.

#### **4.1.2.- RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH A PARTIR DE LOS NIVELES DE FENILALANINA AL DIAGNOSTICO**

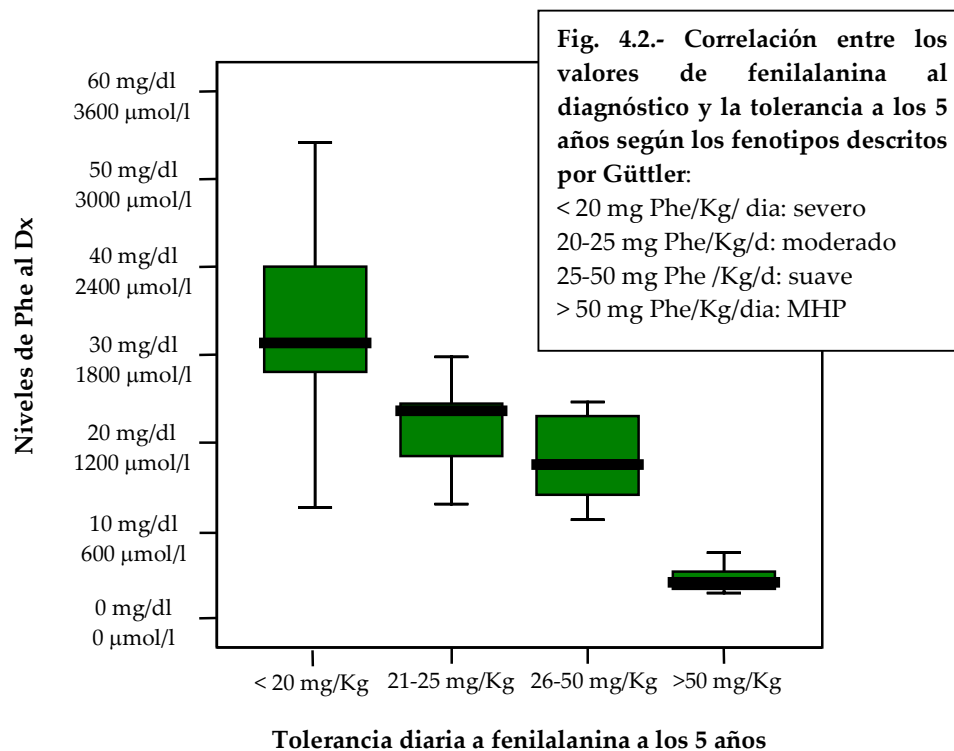
El objetivo de estos estudios fue determinar si los niveles de fenilalanina al diagnóstico en pacientes con deficiencia de PAH se correlacionaban con la severidad del cuadro de dichos pacientes, y si estos valores podían verse afectados por factores externos. Conociendo la severidad de cada caso desde el momento inicial se podría

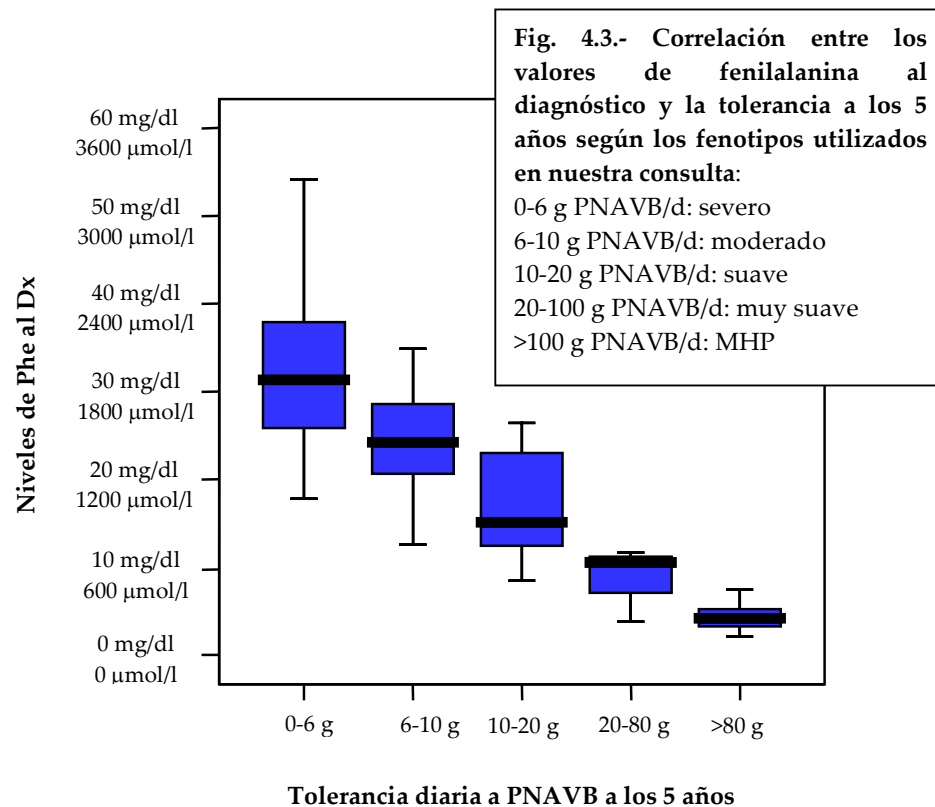
adecuar el tratamiento individualmente desde el diagnóstico, evitando distintos ensayos terapéuticos, y se podría informar adecuadamente a cada familia sobre la evolución de cada caso.

#### 4.1.2.1.- Correlación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con la tolerancia a fenilalanina en pacientes con deficiencia de PAH

Para evitar posibles sesgos producidos por la coincidencia con otras patologías asociadas, se utilizaron en este estudio únicamente los valores de los 90 pacientes en los que se realizó el diagnóstico en periodo neonatal y que se encontraban completamente asintomáticos. Se compararon retrospectivamente los niveles de fenilalanina al diagnóstico (pre-tratamiento) con la tolerancia.

La correlación entre la fenilalanina al diagnóstico y la tolerancia a los 5 años fue en ambos casos muy significativa ( $r = 0,908$ ;  $p < 0,0001$ ). Ver Figuras 4.2 y 4.3.





#### **4.1.2.2.- Comprobación del efecto de otra patología añadida en la relación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico y el fenotipo**

De los 112 pacientes diagnosticados de padecer una deficiencia de PAH en periodo neonatal, 90 estaban asintomáticos pero 22 tenían sobreañadidas otras patologías descritas anteriormente. El objetivo de este estudio era comprobar si estas patologías, sobre todo aquellas que pudieran producir fiebre o que incidieran en el metabolismo hepático, alteraban los valores de fenilalanina al diagnóstico y si esta alteración hacía que los niveles al diagnóstico ya no estuvieran en relación con la tolerancia posterior de dichos pacientes.

La fenilalanina al diagnóstico de estos pacientes también se correlacionó de forma significativa con la tolerancia a los 5 años ( $r = 0,906$ ;  $p < 0,0001$ ).

Por lo tanto es posible decir que la hiperbilirrubinemia neonatal y la bacteriuria asintomática, patologías éstas predominantes en nuestra serie, no alteran significativamente los niveles de fenilalanina al diagnóstico y que éstos siguen siendo válidos como factor predictivo del fenotipo. Dado que sólo una de nuestras pacientes tuvo una infección severa (sepsis de origen urinario) y que ninguno tuvo una patología hepática grave, no podemos descartar que estas alteraciones sí supongan cambios significativos en los valores de fenilalanina obtenidos en esas situaciones.

#### **4.1.2.3.- Comprobación del efecto de la edad en los niveles de fenilalanina de pacientes sin tratamiento y su relación con el fenotipo**

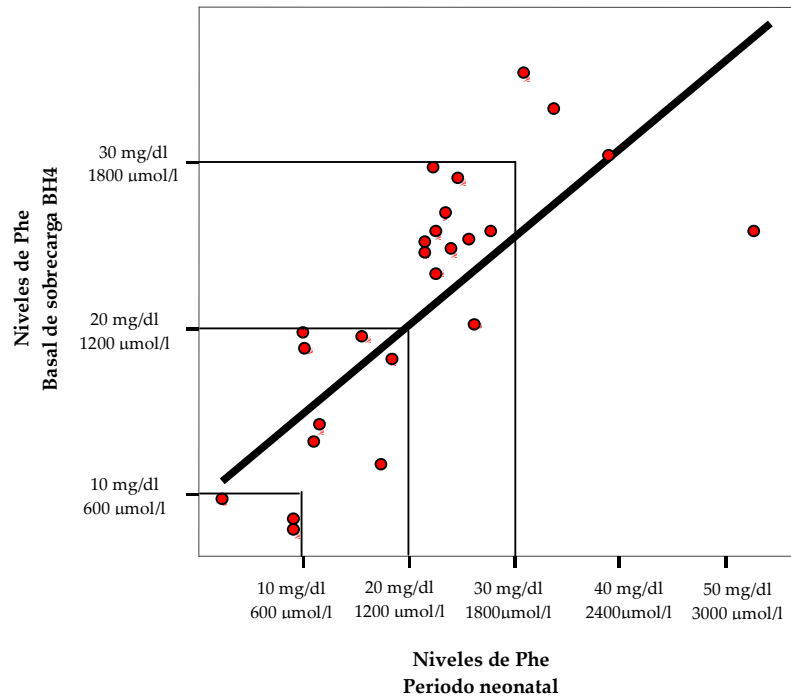
Para realizar esta comprobación se hicieron dos estudios diferentes:

##### **4.1.2.3.1.- Correlación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con el fenotipo en pacientes con diagnóstico tardío:**

En los 19 pacientes con diagnóstico a una edad superior a los 2 meses de edad (15 meses – 35 años), la correlación entre la fenilalanina al diagnóstico y la tolerancia fue significativa ( $r = 0,900$ ;  $p < 0,01$ ).

##### **4.1.2.3.2.- Comparación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico con los niveles del mismo paciente sin dieta en edades posteriores:**

En 25 pacientes se hizo una comparación de los niveles al diagnóstico en periodo neonatal (antes de iniciar el tratamiento) con los niveles de ese mismo paciente en edades posteriores (3-28 años) tras permanecer dos días con una dieta normal (sin restricción proteica ni suplementos especiales) para la sobrecarga de BH<sub>4</sub>. La cantidad de proteínas ingerida en ambos periodos fue de aproximadamente 2,5 – 3 g/Kg/día. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.



**Figura 4.4.- Comparación de los niveles de fenilalanina al diagnóstico en periodo neonatal, con los niveles tras 48h sin tratamiento de ese mismo paciente en edades posteriores.**

Se observa que ambos niveles están relacionados ( $r = 0,851$ ;  $p < 0,001$ ). Los niveles al diagnóstico tienden a ser superiores a los obtenidos posteriormente, pero en todos los casos salvo uno, ambos niveles están en el mismo rango de fenotipo para cada paciente, es decir, en ambos casos el paciente sería clasificado en el mismo fenotipo.

Las pequeñas diferencias en los niveles de fenilalanina posiblemente fueran debidas a que en periodo neonatal la determinación se llevó a cabo tras un periodo prolongado de ingesta normal de proteínas, mientras que para la sobrecarga de  $BH_4$  los pacientes sólo tomaron PNAVB de forma libre durante 48 horas. Como ya hemos especificado anteriormente, para hacer un diagnóstico lo más acertado posible lo ideal es que la ingesta proteica normal se mantenga al menos durante 3 días antes del estudio.



#### **4.1.2.4.- Predicción del fenotipo a partir de los niveles de fenilalanina al diagnóstico**

Teniendo en cuenta la alta correlación entre la fenilalanina al diagnóstico y la tolerancia, desarrollamos una fórmula mediante la cual, conociendo los niveles de Phe al diagnóstico se pudiera predecir el fenotipo, es decir, la tolerancia posterior de dicho paciente.

La fórmula obtenida mediante análisis discriminantes y utilizando los fenotipos descritos por Güttler fue:

$$\begin{aligned} 0,997 (\text{nivel Phe}) - 17,661 &= P \text{ severo} \\ 0,668 (\text{nivel Phe}) - 8,698 &= P \text{ moderado} \\ 0,514 (\text{nivel Phe}) - 5,707 &= P \text{ suave} \\ 0,151 (\text{nivel Phe}) - 1,762 &= P \text{ benigno} \end{aligned}$$

Introduciendo el nivel de fenilalanina se obtienen cuatro valores de P, siendo la P más elevada la que corresponde al fenotipo del paciente. Por ejemplo: para un nivel de Phe de 15mg/dl se obtiene una Psevero de -2,706; una Pmoderado de 1,332; una Psuave de 2,003 y una Pbenigno de 0,503. Por lo tanto el paciente tendría un fenotipo suave. Con esta fórmula el 81,1% de los pacientes estarían bien clasificados.

La fórmula obtenida utilizando los fenotipos utilizados en nuestra consulta fue:

$$\begin{aligned} 0,885 (\text{nivel Phe}) - 16,063 &= P \text{ severo} \\ 0,684 (\text{nivel Phe}) - 10,249 &= P \text{ moderado} \\ 0,454 (\text{nivel Phe}) - 5,414 &= P \text{ suave} \\ 0,247 (\text{nivel Phe}) - 2,738 &= P \text{ muysuave} \\ 0,116 (\text{nivel Phe}) - 1,860 &= P \text{ benigno} \end{aligned}$$

El porcentaje de pacientes correctamente clasificados con ella sería del 73,3%.

Sin embargo la utilización de estas fórmulas y gráficos matemáticos son de difícil aplicación a la práctica diaria, por lo que se intentó establecer unos valores arbitrarios de fenilalanina al diagnóstico que tuvieran una buena correlación con el

fenotipo posterior de los pacientes. Realizando varias tablas de contingencia el mejor resultado obtenido corresponde a los siguientes valores:

- Fenotipo benigno o MHP (tolerancia > 40 g PNAVB/día): un nivel de fenilalanina al diagnóstico entre 2,5 y 6 mg/dl (150-360  $\mu\text{mol/L}$ ) clasificaría correctamente a estos pacientes en el 98,2% de los casos.
- Fenotipo muy suave (tolerancia 22-40 g PNAVB/día): utilizando niveles al diagnóstico entre 6 y 10 mg/dl (360-660  $\mu\text{mol/L}$ ) el 50% de los pacientes estaría bien clasificado. Un 30% de estos pacientes tendría menor tolerancia a PNAVB, mientras que el 20% se comportaría como un fenotipo benigno.
- Fenotipo suave (tolerancia 11-21 g PNAVB/día): niveles de fenilalanina al diagnóstico entre 11 y 20 mg/dl (660-1260  $\mu\text{mol/L}$ ) predeciría adecuadamente esta tolerancia en el 57% de los casos, teniendo el resto de los pacientes una tolerancia menor.
- Fenotipo moderado (tolerancia 6-11 g PNAVB/día): estarían clasificados correctamente 53,3% de los pacientes con niveles entre 21 y 28 mg/dl (1260-1680  $\mu\text{mol/L}$ ), quedando el resto de los pacientes uniformemente distribuidos entre los que se comportarían como un fenotipo suave y aquellos que tendrían un fenotipo severo.
- Fenotipo severo (tolerancia < 6 g PNAVB/día): si utilizamos como diagnóstico niveles > 28 mg/dl (1680  $\mu\text{mol/L}$ ), clasificaríamos correctamente al 90% de los pacientes. En cambio, si el corte lo ponemos en 30 mg/dl (1800  $\mu\text{mol/L}$ ), sólo clasificaríamos correctamente al 80% de los pacientes.

Tanto con las fórmulas matemáticas como con los niveles elegidos de forma arbitraria se clasifican de forma más fiable los pacientes con fenotipos extremos. Los niveles al diagnóstico de los pacientes con fenotipos intermedios tienen mayor grado de superposición, como se puede observar en las figuras 4.2 y 4.3. Por lo tanto, los intentos de clasificación de estos pacientes a partir de los niveles al diagnóstico tienen más errores, sobre todo cuando estos niveles se encuentran próximos a los niveles de corte.

Se concluye que los niveles de fenilalanina al diagnóstico y la tolerancia posterior tiene una buena correlación estadística, independientemente de la edad del paciente y de la posible presencia de patología leve intercurrente, y por lo tanto es un buen factor de predicción para determinar el tratamiento de cada paciente. Como se ha dicho anteriormente, es posible que se cometan pequeños errores en la clasificación de pacientes con fenotipos intermedios. Contrariamente a lo que acabamos de demostrar con los niveles al diagnóstico, la cantidad de proteínas que se indica a un paciente que ingiera diariamente puede verse modificada por la presencia de enfermedades intercurrentes o por la frecuencia con la que el paciente incurra en trasgresiones al tratamiento.

Por este motivo, y ya que nos parece un valor menos expuesto a modificaciones por factores externos, a partir de este momento en esta tesis doctoral se ha determinado el fenotipo de cada paciente según los niveles de fenilalanina al diagnóstico, tomando como valores los siguientes:

- Fenotipo benigno (MHP): niveles entre 2,5 y 6 mg/dl (150 y 360  $\mu\text{mol/L}$ ).
- Fenotipo muy suave: niveles entre 6 y 10 mg/dl (360 y 660  $\mu\text{mol/L}$ ).
- Fenotipo suave: niveles entre 11 y 20 mg/dl (600 y 1260  $\mu\text{mol/L}$ ).
- Fenotipo moderado: niveles entre 21 y 28 mg/dl (1260 y 1680  $\mu\text{mol/L}$ ).
- Fenotipo severo: niveles al diagnóstico > 28 mg/dl (1680  $\mu\text{mol/L}$ ).

Según esta clasificación, los 131 pacientes con deficiencia de PAH diagnosticados en el período 1979-2004 tuvieron los siguientes fenotipos:

- Fenotipo benigno (MHP): 52 pacientes (40%); 8 de ellos con diagnóstico tardío, la mayoría como familiares o durante su embarazo.
- Fenotipo muy suave: 12 pacientes (10%), dos con diagnóstico tardío.
- Fenotipo suave: 14 (11%), 13 neonatos y una mujer embarazada.

- Fenotipo moderado: 30 (23%); 8 con diagnóstico tardío, una de ellas con motivo de su embarazo, dos hermanos de pacientes neonatales y el resto por retraso cognitivo.
- Fenotipo severo: 20 pacientes (16%), uno de forma tardía.

#### **4.1.2.5.- Correlación entre el fenotipo y el genotipo de los pacientes con deficiencia de PAH**

En el Centro de Enfermedades Moleculares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid se hicieron las determinaciones del genotipo en 120 pacientes diagnosticados de deficiencia de PAH en nuestra Unidad. El resto se trata de pacientes diagnosticados antes de la realización universal del genotipo y que actualmente se encuentran dados de alta, no acuden a la consulta o pertenecen a Comunidades en las que no se hace la prestación para la realización del genotipo de forma universal. En 18 casos no se pudo determinar la segunda mutación causante de la deficiencia de PAH, lo que supone un 12% del total.

Se han observado 62 mutaciones diferentes en nuestra población de enfermos. Por orden de frecuencia las que aparecen en mayor número de pacientes son la I65T, la A403V, la R261Q y la IVS10nt11.

En la Tabla 4.3 se muestran las distintas mutaciones encontradas y el fenotipo del paciente. En la mayoría de los casos las mutaciones se presentaron en heterocigosis. Dado que el fenotipo clínico resultante depende no sólo de la actividad residual de cada uno de los enzimas sino de la interacción entre ambas, intentar dilucidar la actividad residual que cada mutación produce exclusivamente por métodos clínicos no suele ser posible. En algunos casos sí se puede intuir la actividad residual, teniendo en cuenta que una mutación siempre se corresponde con un fenotipo. Es el caso de las mutaciones A403V, A300S, R176L y D415N, que siempre que se encuentran presentes determinan un fenotipo benigno, y por lo tanto suponen una actividad residual alta.

<b>Mutación</b>	<b>Nº Casos</b>	<b>Fenotipo</b>
L 15 / S 16 fs del CT	1	PKU severa
F 39 L	2	PKU suave
F39del	1	PKU severa
L 48 S	1	PKU suave
F55fs	1	PKU suave
D 59 Y	2	MHP
N 61 K	2	MHP
I 65 T	25	5 MHP 8 PKU suave 8 PKU moderada 4 PKU severa
R 68 S	1	PKU suave
E 76G	1	PKU muy suave
S 87 R	1	MHP
A 104 D	1	PKU suave
R 111 X	3	2 PKU moderada 1 PKU severa
P 122 Q	4	1 MHP 1 PKU muy suave 1 PKU suave 1 PKU severa
D 129 G	1	PKU muy suave
P 147 S	1	MHP
D151G	1	PKU severa
D 151 fs	1	MHP
A 165 T	1	MHP
R 176 L	7	MHP
R 176 X	2	1 MHP 1 PKU moderada
S196del 112bp	1	PKU moderada
Y 198 fs	2	PKU severa
Y 204 X	1	MHP
P211fsdelC	1	PKU moderada
G 218 V	2	MHP
D 222 G	2	1 MHP 1 PKU suave
V 230 I	1	MHP
R 243 Q	8	3 MHP 4 PKU moderada 1 PKU severa
R 243 X	5	2 PKU moderada 3 PKU severa
P244L	1	PKU suave
V 245 A	4	MHP
R 252 Q	1	PKU severa
R 252 W	1	PKU moderada
R 261 Q	12	4 MHP 3 PKU suave 4 PKU moderada 1 PKU severa
R 261 X	1	PKU moderada

<b>Mutación</b>	<b>Nº Casos</b>	<b>Fenotipos</b>
P 275 R	2	1 PKU suave 1 PKU severa
E 280 K	4	1 MHP 3 PKU severa
P 281 L	1	MHP
A 300 S	5	MHP
A 309 V	1	PKU moderada
L 311 P	2	1 PKU muy suave 1 PKU severa
L 348 V	3	1 PKU muy suave 1 PKU suave 1 PKU moderada
S 349 P	7	4 MHP 2 PKU muy suave 1 PKU severa
P 362 T	1	MHP
T380M	2	MHP
Y 387 H	1	PKU suave
V 388 M	9	4 PKU suave 5 PKU moderada
E 390 G	1	MHP
A 403 V	16	MHP
R 408 Q	1	PKU suave
R 408 W	2	PKU moderada
Y 414 C	6	3 MHP 1 PKU muy suave 2 PKU suave
D 415 N	2	MHP
T 418 N	1	PKU suave
<b>INTRONES</b>		
IVS 1 nt 5	11	4 MHP 1 PKU muy suave 2 PKU moderada 4 PKU severa
IVS 4 nt 5	3	1 PKU suave 2 PKU severa
IVS 7 nt 3	1	PKU suave
IVS 8 nt 7	3	PKU severa
IVS10nt3	1	PKU suave
IVS 10 nt 11	17	2 PKU suave 7 PKU moderada 8 PKU severa
IVS 12 nt 1	1	PKU suave
<b>2º mutación NO DETERMINADA</b>		
	18	4 MHP 2 PKU suave 7 PKU moderada 5 PKU severa

**Tabla 4.3.- Mutaciones encontradas en 120 pacientes con deficiencia de PAH diagnosticados en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal entre los años 1979 y 2004.**

En la tabla 4.4 se muestran los 88 genotipos distintos que se encontraron en nuestros pacientes y su fenotipo. Las actividades descritas para cada mutación corresponden con las que han sido determinadas *in vitro*, publicadas y recopiladas en la página de internet PAH database ([www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)). Hay que tener en cuenta que 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 fenilalanina o BH<sub>4</sub> y tienen finalmente una actividad prácticamente del 100%. Es el caso, por ejemplo, de la mutación R176L.

**Tabla 4.4.- Genotipo de los pacientes con deficiencia de PAH y su fenotipo.** En azul se señalan las mutaciones que aparecen en homocigosis. Actividad según la PAH database ([www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)).

Mutación A	Actividad A	Mutación B	Actividad B	Nº	Fenotipo
<b>T380M</b>		<b>T380M</b>		2	MHP
A403V	100%	I65T	30%	4	MHP
A403V	100%	D59Y	90%	2	MHP
A403V	100%	P122Q	22%	1	MHP
A403V	100%	P147S	20%	1	MHP
A403V	100%	A165T		1	MHP
A403V	100%	G218V	100%	2	MHP
A403V	100%	E280K	0%	1	MHP
A403V	100%	P362T		1	MHP
A403V	100%	Y414C	80%	1	MHP
A403V	100%	nd		2	MHP
A300S		R243Q	10%	1	MHP
A300S		R261Q	47%	2	MHP
A300S		D151fs		1	MHP
D415N	72-100%	R176X		1	MHP
D415N	72-100%	S349P	0%	1	MHP
E390G	85%	nd		1	MHP
S87R	82%	S349P	0%	1	MHP
V230I	50-65%	F39del	20%	1	MHP
V245A	63%	IVS1nt5		2	MHP
V245A	63%	R243Q	10%	2	MHP
R176L	20-40%	Y204X		1	MHP
R176L	20-40%	P281L	0%	1	MHP
R176L	20-40%	R261Q	47%	2	MHP
R176L	20-40%	S349P	0%	2	MHP
R176L	20-40%	Y414C	80%	1	MHP
N61K		IVS1nt5		2	MHP
Y414C	80%	D222G		1	MHP
E76G	85%	P122Q	22%	1	PKU muy suave
R408Q	84%	L311P	0%	1	PKU muy suave
D129G	26%	IVS1nt5		1	PKU muy suave
Y414C	80%	L348V	38%	1	PKU muy suave
<b>IVS10nt3</b>		<b>IVS10nt3</b>		1	PKU suave

R408Q	84%	I65T	30%	1	PKU suave
Y414C	80%	IVS4nt5		1	PKU suave
Y414C	80%	V388M	43%	1	PKU suave
L348V	38%	P275R		1	PKU suave
R68S	76%	IVS7nt3		1	PKU suave
A104D	26-67%	IVS12nt1	0%	1	PKU suave
F39L	50%	V388M	43%	1	PKU suave
F39L	50%	P122Q	22%	1	PKU suave
R261Q	47%	I65T	30%	1	PKU suave
R261Q	47%	Y387H		1	PKU suave
R261Q	47%	IVS10nt11	0%	1	PKU suave
T418N		IVS10nt11	0%	1	PKU suave
L48S	40%	I65T	30%	1	PKU suave
I65T	30%	I65T	30%	1	PKU suave
I65T	30%	P244L		1	PKU suave
I65T	30%	F55fs		1	PKU suave
I65T	30%	D222G		1	PKU suave
V388M	43%	V388M	43%	1	PKU suave
V388M	43%	I65T	30%	2	1 PKU suave 1 PKU moderada
V388M	43%	R252W	0%	1	PKU moderada
V388M	43%	IVS10nt11	0%	1	PKU moderada
V388M	43%	nd		1	PKU moderada
V388M	43%	R243Q	10%	2	PKU moderada
A309V	70%	IVS1nt5		1	PKU moderada
R261Q	47%	R111X		2	PKU moderada
R261Q	47%	R408W	0%	2	PKU moderada
R261Q	47%	IVS10nt11	0%	1	PKU moderada
R261Q	47%	I65T	30%	1	PKU moderada
L348V	38%	IVS1nt5		1	PKU moderada
I65T	30%	S196del122bp		1	PKU moderada
I65T	30%	P211fsdelC		1	PKU moderada
I65T	30%	IVS10nt11	0%	3	PKU moderada
R243Q	10%	R261X	0%	1	PKU moderada
R243Q	10%	nd		1	PKU moderada
R243X		R243X		1	PKU moderada
R243X		nd		3	1 PKU moderada 2 PKU severa
R176X		R176X		1	PKU moderada
I65T	30%	nd		5	1 MHP 2 PKU moderada 2 PKU severa
I65T	30%	R111X		1	PKU severa
I65T	30%	IVS4nt5		1	PKU severa
R261Q	47%	IVS4nt5		1	PKU severa
P122Q	22%	S349P	0%	1	PKU severa
F39del	20%	IVS10nt11	0%	1	PKU severa
R243Q	10%	IVS10nt11	0%	1	PKU severa
R243X		D151G		1	PKU severa
P275R		L311P	0%	1	PKU severa
R252Q	3%	IVS10nt11	0%	1	PKU severa
E280K	0%	E280K	0%	1	PKU severa
E280K	0%	L15/S16fsdelCT		1	PKU severa
E280K	0%	IVS8nt7		1	PKU severa
IVS1nt5		IVS10nt11	0%	2	PKU severa
IVS8nt7		Y198fs		2	PKU severa
IVS10nt11	0%	IVS10nt11	0%	3	PKU severa
IVS10nt11	0%	nd		3	2 PKU moderada 1 PKU severa

Como se puede observar, las mutaciones que determinan una actividad residual superior al 60-80% determinan fenotipos benignos / suaves, independientemente de la mutación que las acompañe, y son aquellas a las que nos referimos con anterioridad. En cambio, las mutaciones con actividad residual intermedia (40-70%) dependen de la mutación acompañante, y por lo tanto se pueden encontrar en pacientes diversos fenotipos, aunque en general siempre suavizando la acción de mutaciones más severas. Cuando se encuentran en homocigosis, estas mutaciones dan fenotipos suaves. Las mutaciones con actividad residual baja (<30%), salvo que se acompañen de mutaciones más suaves, determinan un fenotipo severo. La mayoría de las mutaciones en intrones corresponden a este último grupo, con la excepción de la mutación IVS10nt3C-T, descrita por primera vez en una de nuestras pacientes y que en homocigosis determina un fenotipo suave.

Sólo 10 pacientes fueron homocigotos para su mutación (Tabla 4.5). En estos casos la actividad residual del enzima PAH se puede suponer por el fenotipo del paciente, ya que no se ve modificado por la interacción distintas actividades residuales debidas a distintas mutaciones. Utilizando para clasificar el fenotipo de los pacientes los niveles de fenilalanina al diagnóstico, el fenotipo clínico resultante para nuestros pacientes homocigotos resultó en todos los casos coincidir con el predicho a nivel de laboratorio según la actividad residual de las proteínas resultantes de dicha mutación. Además, el fenotipo clínico fue el mismo en todos los pacientes que compartían la misma mutación, fueran familiares o no. Los hermanos homocigotos para la mutación T380M tuvieron un fenotipo benigno, los pacientes homocigotos para las mutaciones V388M e I65T tuvieron un fenotipo suave, mientras que aquellos con las mutaciones en los intrones (IVS10nt11 e IVS1nt5) tuvieron fenotipos severos. Como ya se ha dicho antes, la excepción es la paciente con la mutación IVS10nt3, que tiene un fenotipo suave.



Mutación	Nº Casos	Fenotipo
T 380 M	2	MHP
V 388 M	1	PKU suave
I 65 T	1	PKU suave
IVS 10 nt 3	1	PKU suave
R176X	1	PKU moderada
R243X	1	PKU moderada
E280K	1	PKU severa
IVS 10 nt 11	3	PKU severa

**Tabla 4.5.- Mutaciones del gen PAH que aparecen en homocigosis en nuestra muestra.**

Dado el alto número de mutaciones diferentes se intuye que el mismo genotipo se repite en contadas ocasiones, en nuestro caso únicamente en 18, siendo la mayoría de las repeticiones dentro de una misma familia. Los genotipos repetidos se muestran en la Tabla 4.6.

Mutación A	Mutación B	Nº Casos	Nº Familias	Fenotipo
A 403 V	G 218 V	2	1	MHP
A 403 V	I 65 T	4	3	MHP
A403V	D59Y	2	1	MHP
A 300 S	R 261Q	2	2	MHP
T 380 M	T 380 M	2	1	MHP
V 245 A	IVS 1 nt 5	2	1	MHP
V245A	R243Q	2	1	MHP
R 176 L	R 261 Q	2	1	MHP
R 176 L	S 349 P	2	1	MHP
N61K	IVS1nt5	2	1	MHP
I 65 T	V 388 M	2	2	1 PKU suave 1 PKU moderada
I 65 T	IVS 10 nt 11	3	2	PKU moderada
R 261 Q	R 408 W	2	2	PKU moderada
R 261 Q	R 111 X	2	1	PKU moderada
R 243 Q	V 388 M	2	1	PKU moderada
IVS 8 nt 7	Y 198 fs	2	1	PKU severa
IVS 10 nt 11	IVS 10 nt 11	3	2	PKU severa
IVS10nt11	IVS1nt5	2	1	PKU severa

**Tabla 4.6.- Genotipos repetidos en nuestros pacientes y sus fenotipos.**

Es llamativo que, contrariamente a lo publicado con anterioridad <sup>(5)</sup>, el mismo genotipo casi siempre da lugar a el mismo fenotipo, tanto dentro de la misma familia como en pacientes no relacionados. La única excepción a esta regla fue una paciente con genotipo V388M/I65T que por los niveles de fenilalanina al diagnóstico fue

clasificada como un fenotipo moderado pero que en su evolución tiene una tolerancia correspondiente a un fenotipo suave, al igual que el otro paciente con esta mutación.

En nuestra Unidad se han estudiado durante el periodo de seguimiento 23 familias con más de un miembro afecto. En la tabla 4.7 se describen el genotipo, los niveles de fenilalanina al diagnóstico de los distintos hermanos, su tolerancia a los 5 años y el fenotipo determinado por los niveles de fenilalanina al diagnóstico.

	Mutación A	Mutación B	Phe Dx 1 μmol/L	Phe Dx 2 μmol/L	Tol 1	Tol 2	Fenotipo	Observaciones
1	-----	-----	240	180	libre	libre	MHP	
2	T380M	T380M	126	168	libre	libre	MHP	
3	A403V	D59Y	156	240	libre	libre	MHP	
4	A403V	I65T	234	210	libre	libre	MHP	
5	A403V	G218V	246	360	libre	libre	MHP	
6	A403V	nd	270	150	libre	libre	MHP	
7	R176L	R261Q	180	222	libre	libre	MHP	
8	R176L	S349P	447	294	libre	libre	Muy suave MHP	
9	R243Q	V245A	258	144	libre	libre	MHP	
11	V245A	IVS1nt5	270	168	libre	libre	MHP	
12	V245A	R243Q	258	146	libre	libre	MHP	
14	N61K	IVS1nt5	300	210	libre	libre	MHP	
15	I65T	P244L	900	1050	-----	20	Suave	Hermana 1 diagnostico tardío. Tol 20 g PNAVB/día
16	I65T	nd	1450	1134	12	12	Moderado Suave	Hermano 2 diagnosticada con 4 días de vida.
17	R243Q	V388M	1200	1548	10	10	Moderado	
18	I65T	IVS10nt11	1380	1380	10	10	Moderado	
19	R111X	R261Q	1482	1740	8	8	Moderado Severo	
20	Y198fs	IVS8nt7	2406	1710	-----	4	Severo	Hermano 1diagnostico tardío. Tol 5 g PNAVB/día
21	IVS10nt11	IVS10nt11	-----	1710	-----	5	Severo	Hermana 1 con retraso mental severo. No sigue dieta.
22	IVS10nt11	IVS10nt11	1758	1842	4	4	Severo	
23	IVS10nt11	IVS1nt5	2250	1140	6	5	Severo Suave	Hermana 2 diagnosticada con 2 días de vida.

**Tabla 4.7.- Genotipo, niveles de fenilalanina al diagnóstico, tolerancia (en g PNAVB/día) a los 5 años y fenotipo predicho por los niveles de fenilalanina al diagnóstico de las familias diagnosticadas de deficiencia de PAH en nuestra Unidad.**

En esta tabla se incluyen aquellos pacientes en los que no se hizo o no se llegó a determinar alguna de las mutaciones, y que han sido excluidos de la tabla de genotipos repetidos, ya que verdaderamente se desconoce su fenotipo. Asimismo se han incluido los casos de 3 familias en las que el diagnóstico del primer hermano se hizo de forma tardía, se encuentran en centros de internamiento, no seguimos de forma regular y que no se han incluido en otros estudios, pero que sirven para ilustrar las similitudes dentro de una misma familia. En todos los casos los hermanos tuvieron la misma tolerancia a fenilalanina. En la mayoría de los casos este fenotipo se pudo predecir por los niveles de fenilalanina al diagnóstico. En cuatro casos hay diferencias en el fenotipo predicho entre los hermanos. En las familias 8 y 19, el error de clasificación se debe a que tuvieron niveles de fenilalanina al diagnóstico en el límite entre un fenotipo y otro: la hermana 1 de la familia 8 se comporta como su hermano, un MHP y no un paciente PKU muy suave; la hermana 2 de la familia 19 tiene un fenotipo moderado. En el caso de las familia 16 y 23, el “error” se produce porque el segundo hermano se diagnosticó con 5 días de vida, y por lo tanto la ingesta de proteínas de esta paciente no era la más adecuada para que los niveles de fenilalanina pudieran predecir el fenotipo.

Finalmente, es importante resaltar que utilizando como clasificación de fenotipo los niveles de fenilalanina al diagnóstico determinados según nuestro protocolo, la mayoría de los pacientes tuvieron fenotipos que coincidían con la actividad residual publicada para sus mutaciones, que no se vieron grandes incongruencias fenotipo/genotipo, y que, contrariamente a lo descrito en otras muestras, aquellos pacientes con el mismo genotipo (fueran de la misma familia o no) tuvieron fenotipos similares.

## **4.2.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DE NUEVAS POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS DIETÉTICAS**

### **4.2.1.- ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA REPERCUSION DE LA INGESTA DE PROTEINAS DE BAJO VALOR BIOLÓGICO (PNBVB) EN EL CONTROL METABOLICO DE PACIENTES PKU**

Los pacientes PKU toman su aporte proteico fundamental en forma de productos especiales exentos en fenilalanina, pero dado que este aminoácido pertenece al grupo de los aminoácidos esenciales una pequeña ingesta del mismo es necesaria. La fenilalanina se ingiere con las proteínas naturales. Los alimentos contienen una mezcla de proteínas naturales de alto (PNAVB) y bajo valor biológico (PNBVB), ambos con un contenido en fenilalanina del 5%. El tratamiento habitualmente incluye recomendaciones sobre la cantidad relativa de PNAVB y PNBVB que se deben administrar a cada edad.

Sabiendo que las PNBVB tienen un menor grado de absorción a nivel intestinal<sup>(1)</sup>, se diseñaron estos estudios para comprobar la repercusión del aporte libre, sin restricciones, de estas proteínas en niños PKU, ya que la ingesta libre de estas proteínas facilitaría el tratamiento, mejoraría la palatabilidad de las comidas, aumentaría la calidad de vida de los pacientes, y supondría una fuente inestimable de vitaminas y oligoelementos.

En estos estudios se comparó el control metabólico de los pacientes antes y tras la liberación total en la dieta de las proteínas de bajo valor biológico.

#### **4.2.1.1.- Repercusión de las PNBVB en el control metabólico de pacientes PKU mayores de un año de edad**

En este estudio se comparó el control metabólico de 15 pacientes durante un año en el que el aporte de PNBVB estuvo restringido según las pautas de tratamiento habituales (150 mg de Phe diarios, es decir, 6g de PNBVB, en forma de 100g de verdura y patatas + 100g de fruta diarias), con el control durante un 2º año en el que se permitió a los niños una ingesta libre de estas proteínas, sin modificaciones en el resto de la dieta e independientemente de su fenotipo. Durante este segundo año, y según las dietas remitidas por los pacientes, el aporte de fenilalanina diaria en forma de PNBVB supuso un aumento de entre 800 y 1200 mg Phe diarios respecto a la ingesta previa ya que tomaron aproximadamente 400g de patatas (12g PNBVB) + 100-200g de verdura (6g PNBVB) + 200g de fruta (6g PNBVB). Los resultados se muestran en la Tabla 4.8.

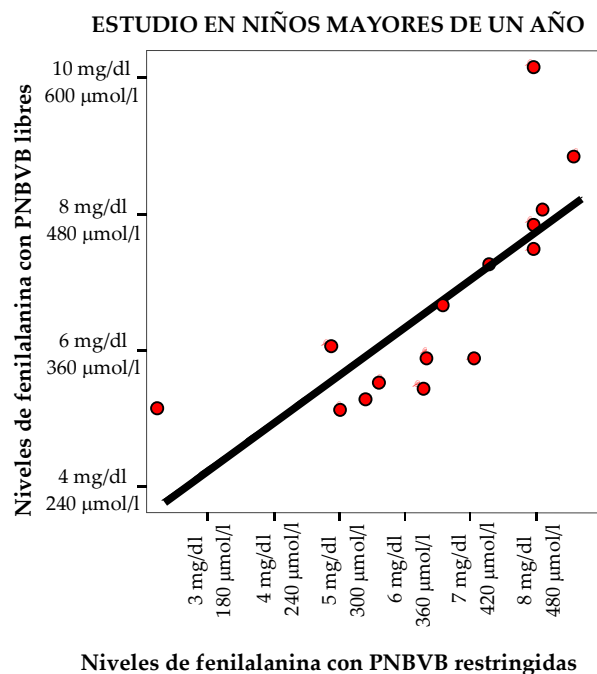
	Fenotipo	Edad (años)	PNAVVB (g/día)	Phe/día 1 (mg/Kg/d)	Phe/día 2 (mg/Kg/d)	Mediana 1 (mg/dl)	Mediana 2 (mg/dl)	% Mal control 1	% Mal control 2
1	Suave	4	16	52	76	6,4	6,0	50	40
2	Suave	7	16	39	53	6,3	7	0	0
3	Suave	7	14	37	55	8,0	7,5	25	8
4	Suave	8	14	34	57	5,5	8	0	0
5	Moderado	2	10	51	82	3,3	5,2	17	33
6	Moderado	3	10	34	50	5,1	5,1	25	17
7	Moderado	8	8	23	42	5,7	5,6	8	0
8	Moderado	9	9	22	45	4,9	6,1	0	0
9	Moderado	10	12	24	41	7,1	5,9	0	8
10	Moderado	10	12	24	41	7,4	7,3	0	0
11	Moderado	11	8	14	25	8,0	7,9	17	17
12	Moderado	16	12	14	26	8,2	8,1	25	0
13	Moderado	19	12	15	32	8,7	8,9	17	8
14	Severo	2	5	32	71	6,7	6,9	67	92
15	Severo	12	2	4	13	8,0	10,2	0	8

**Tabla 4.8.- Estudio para evaluar la repercusión de las PNBVB en el control metabólico de pacientes PKU mayores de un año de edad.** Se estudiaron las diferencias entre el tiempo 1 (PNBVB limitadas) con el tiempo 2 (PNBVB libres).

Se observa que a pesar del importante aumento en la cantidad de fenilalanina total ingerida, entre los controles de los pacientes mayores de un año de vida antes y después de liberalizar el consumo de PNBVB, no se obtuvieron diferencias

significativas ni en las medianas de los controles ( $p = 0,77$ ) ni en el porcentaje de controles fuera del rango considerado adecuada para cada edad ( $p = 0,92$ ).

La correlación entre los niveles del mismo paciente antes y después de la liberalización de la ingesta de PNBVB es alta, con una  $r = 0,883$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 4.5). Esto quiere decir que los niveles de los pacientes tienen en todos los casos una evolución similar, sin cambios significativos y que los resultados anteriores no se deben a que la mejoría de algunos pacientes minimice el empeoramiento de otros. Durante el estudio todos los pacientes tuvieron globalmente controles adecuados para su edad. De hecho se observa que en la mayoría de los casos el porcentaje de controles fuera del rango adecuado mejora con la nueva dieta.



**Fig. 4.5.- Correlación de los niveles de fenilalanina de cada paciente en los dos periodos a estudio durante la evaluación de la repercusión de las PNBVB en el control metabólico de los pacientes PKU mayores de un año de vida.**

Excepciones a lo anterior son los pacientes 1 y 14 en que los niveles fueron ligeramente superiores a lo deseable y su porcentaje de malos controles fue muy alto. En el paciente 5, a pesar de tener niveles absolutos adecuados, el porcentaje de malos controles también se eleva. Esto se debe a que estos pacientes sufrieron durante todo el

estudio frecuentes procesos febriles y como se demostrará más adelante la fiebre es un factor de riesgo muy importante para el control metabólico de pacientes PKU. Como en estos tres pacientes esta situación se mantuvo durante los 2 años a estudio, la correlación entre sus niveles antes y después de la introducción de la dieta libre en PNBVB es alta y muestra que este cambio dietético no modificó su control metabólico.

Con estos resultados llegamos a la conclusión de que el aporte de PNBVB no modifica sustancialmente los niveles de fenilalanina y por lo tanto se pueden administrar sin restricciones en los pacientes PKU, independientemente de su fenotipo.

#### **4.2.1.2.- Repercusión de las PNBVB en el control metabólico de pacientes PKU menores de un año de edad**

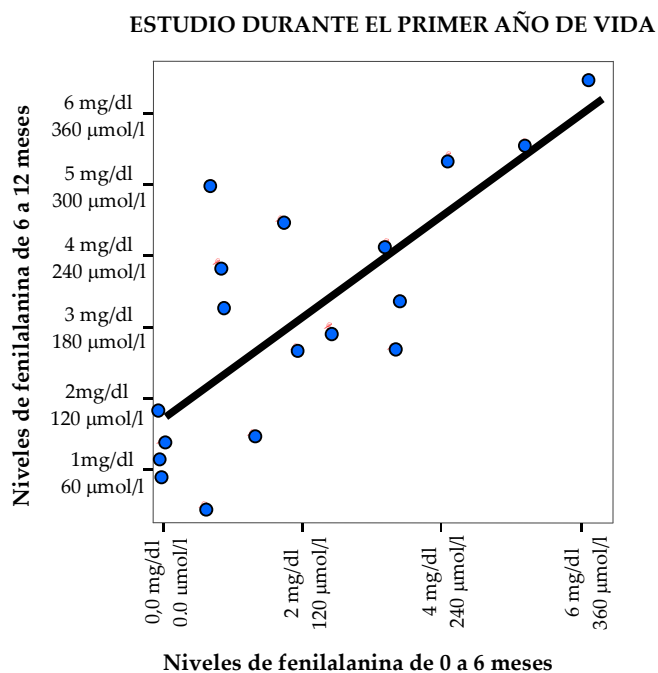
Durante el primer año de vida se produce un cambio fundamental en la dieta de los pacientes fenilcetonúricos, ya que en los 6 primeros meses únicamente toman proteínas de alto valor biológico (PNAV) en forma de leche, dieta que se complementa con PNBVB en forma de frutas y verduras a partir de esa edad. Por este motivo éste es un periodo adecuado para estudiar la repercusión de éstas últimas proteínas en el control metabólico de los pacientes PKU. Además se trata del periodo de la vida más importante en cuanto a desarrollo cerebral, y por lo tanto es imprescindible conocer todos los factores que puedan influir en el control de los pacientes en este momento tan delicado.

Sin que se introdujeran cambios en la cantidad de PNAV ni de productos especiales, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre la mediana de los niveles de fenilalanina durante los primeros 6 meses de vida (1,60 mg/dl) y la mediana de los siguientes 6 meses, en la que se introducen las PNBVB (3,15 mg/dl). Pero, como se puede intuir al observar las medianas, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,21$ ) entre los dos periodos al comparar el porcentaje de controles fuera del rango considerado adecuado para esa edad, que era de 6mg/dl (Tabla 4.9).

Fenotipo	PNAVB Dx - 12m (g/día)	PNBVB 6m - 12m (g/día)	Phe ingerida Dx- 6m (mg/día) (mg/Kg/día)	Phe ingerida 6m - 12m (mg/día) (mg/Kg/día)	Mediana controles Dx- 6m (mg/dl)	Mediana controles 6m - 12m (mg/dl)
Severo (8 niños)	3 - 6	7	150 - 300 24 - 70	500 - 650 50 - 92	1,3	2,8
Moderado (3 niños )	5 - 9	7	250 - 450 50 - 85	600 - 800 75- 106	0,5	2,2
Suave (7 niños)	8 - 15	7	400 - 750 75 - 131	750 - 1100 85 - 134	3,6	3,9

**Tabla 4.9.- Repercusión de las PNBVB en el control de pacientes PKU durante el primer año de vida:** datos de los pacientes, ordenados según fenotipo por Phe al diagnóstico, incluidos en el estudio de la. Se observa que a pesar de incrementar la cantidad de Phe ingerida, los pacientes siguieron teniendo un adecuado control de los niveles de Phe en sangre (<6 mg/dl).

Mediante un estudio de correlaciones no paramétricas confirmamos que los niveles de un mismo paciente en los dos periodos están correlacionados entre sí con una  $r = 0,738$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 4.6). Esto nos indica que la comparación de medianas realizada previamente es fiable, y no está sesgada por la muy buena evolución de unos pacientes, mientras que otros sí pudieran estar mal controlados. Indica asimismo que la evolución es similar en todos ellos, independientemente de su fenotipo.



**Fig. 4.6.- Correlación de los niveles de fenilalanina de cada paciente en los dos periodos a estudio durante la evaluación de la repercusión de las PNBVB en el control metabólico de los pacientes PKU menores de un año de vida.**



Se concluye que los pacientes estuvieron bien controlados en ambos periodos y por lo tanto la introducción de PNBVB no obliga a la reducción en la ingesta de otras proteínas para el adecuado tratamiento de estos pacientes. Hay que añadir que durante el periodo de estudio todos los pacientes tuvieron una ganancia pondero-estatural y un desarrollo psicomotor dentro de los parámetros normales.

#### **4.2.2.- ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA REPERCUSION DEL NÚMERO DE TOMAS DIARIAS DE PROTEINAS SIN FENILALANINA (PXPHE) EN EL CONTROL METABOLICO DE PACIENTES PKU**

Al aumentar el número de tomas de los productos especiales de proteínas sin fenilalanina (PXPhe) de 3-4 tomas diarias a 5-6 tomas diarias, sin aumentar su cantidad global de PXPhe ni modificar otros factores dietéticos, hubo un descenso significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de fenilalanina de los pacientes. Hubo un descenso medio de 3,4mg/dl (180mmol/L) de fenilalanina en sangre, con una correlación también significativa ( $r = 0,75$ ;  $p < 0,01$ ) entre los datos de cada paciente.

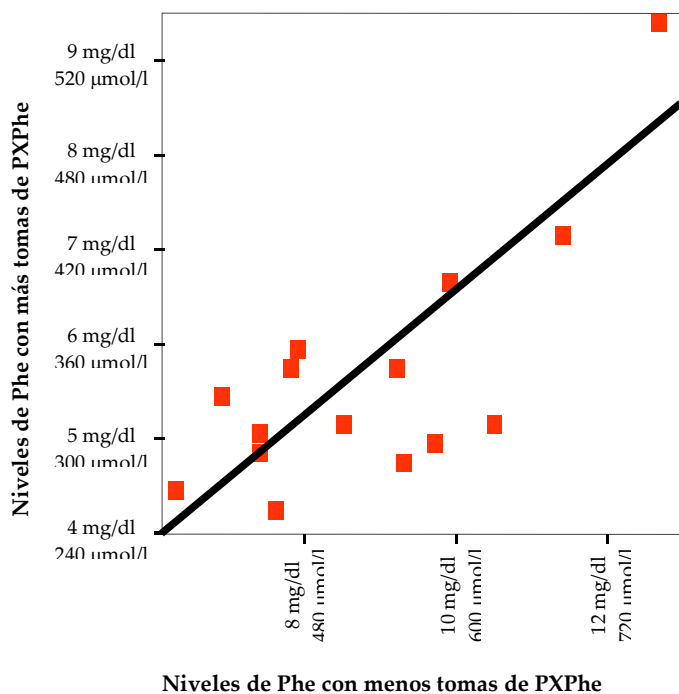


Figura 4.7. Correlación de los niveles de fenilalanina en pacientes con ingesta de PXPhe dividida en 3-4 tomas diarias (Media 1) respecto a los valores obtenidos en esos mismos pacientes al incrementar el número de tomas de PXPhe a 5-6 tomas diarias (Media 2).

No se observaron diferencias significativas al comparar el grado de descenso en los niveles de fenilalanina con grado de incremento en el número de tomas, es decir, no se observó un mayor descenso en los niveles de fenilalanina en los pacientes que dividieron la ingesta de PXPhe en un mayor número de tomas. Este resultado puede ser debido a que el grado de incremento en el número de tomas no fue similar en todos los pacientes, y dado el pequeño número de la muestra no se puede llegar a resultados estadísticamente significativos.

#### **4.2.3.- ESTUDIO A LARGO PLAZO DE LOS FACTORES DETERMINANTES EN EL CONTROL METABOLICO Y DESARROLLO FISICO Y MENTAL DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

En este apartado se estudiaron todos los pacientes con deficiencia de PAH tratados en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal y se observó su evolución clínica y analítica desde el año 1979 hasta el año 2004.

En total se incluyeron 160 pacientes, 85 mujeres y 75 varones, con edades al finalizar el estudio comprendidas entre los 12 meses y los 38 años. La mayoría fueron tratados desde su diagnóstico en nuestra consulta, siendo sólo veintiocho pacientes los remitidos tras un periodo de seguimiento inicial en otros centros. Los pacientes procedían en su mayoría de la Comunidad de Madrid (140), aunque 17 residían en la Comunidad de Castilla-La Mancha y 3 de otras comunidades.

El reparto de fenotipo según los niveles de fenilalanina al diagnóstico de nuestros pacientes fue de:

- Fenotipo benigno: 61 pacientes (38%).
- Fenotipo muy suave: 6 pacientes (4%).
- Fenotipo suave: 25 pacientes (15%).
- Fenotipo moderado: 35 pacientes (22%).
- Fenotipo severo: 33 pacientes (21%).

Según su edad al diagnóstico, realizado bien en nuestro centro o en otras unidades de referencia, los pacientes se dividieron en:

- Diagnóstico neonatal: 140 pacientes.
- Diagnóstico tardío: 20 pacientes.
  - Por retraso mental: 6 pacientes.
  - Por familiaridad: 8 pacientes.
  - Por hiperfenilalaninemia materna: 6 pacientes.

Las pacientes con hiperfenilalaninemia materna se trataron con 40-45 g PNAVB/día y 1 g PXPhe/Kg/día de. Tuvieron un buen control metabólico durante el embarazo y tuvieron niños normales. Posteriormente no realizaron seguimiento por lo que no se las incluyó en el resto de estudios.

El resto de estudios se llevó a cabo en pacientes con una ingesta restringida en PNAVB según su fenotipo, una ingesta libre en PNBVB y cantidad suficiente según su edad de PXPhe repartidas en el mayor número de tomas diarias posible.

Durante los 25 años observados se dieron de alta 16 varones MHP a partir de los 10 años, se controlan en otras consultas por cambio de domicilio 14 pacientes y se perdieron por diferentes motivos 23 pacientes (17 pacientes MHP de diversas edades, 5 pacientes PKU adultos y una paciente PKU con diagnóstico tardío que no mejoró tras dos años en tratamiento).

#### **4.2.3.1.- Control metabólico de pacientes con deficiencia de PAH**

Se tomaron los 11925 valores de fenilalanina remitidos por los 160 pacientes en los años a estudio y se valoró si con esos niveles el paciente en ese momento estaba bien o mal controlado. Para esto se tuvo en cuenta la edad del paciente y se tomaron como niveles de corte por encima de los cuales un paciente se considera mal controlado los propuestos por la AECOM:

- 0 - 6 años: hasta 360  $\mu\text{mol/L}$  (6 mg/dl). Hasta el año 1994 se consideraron adecuados niveles de hasta 600  $\mu\text{mol/L}$  (10 mg/dl).
- 6 – 9 años: hasta 540  $\mu\text{mol/L}$  (9 mg/dl). Hasta el año 1994 se consideraron adecuados niveles de hasta 600  $\mu\text{mol/L}$  (10 mg/dl).
- a partir de los 9 años: hasta 630  $\mu\text{mol/L}$  (10,5 mg/dl).

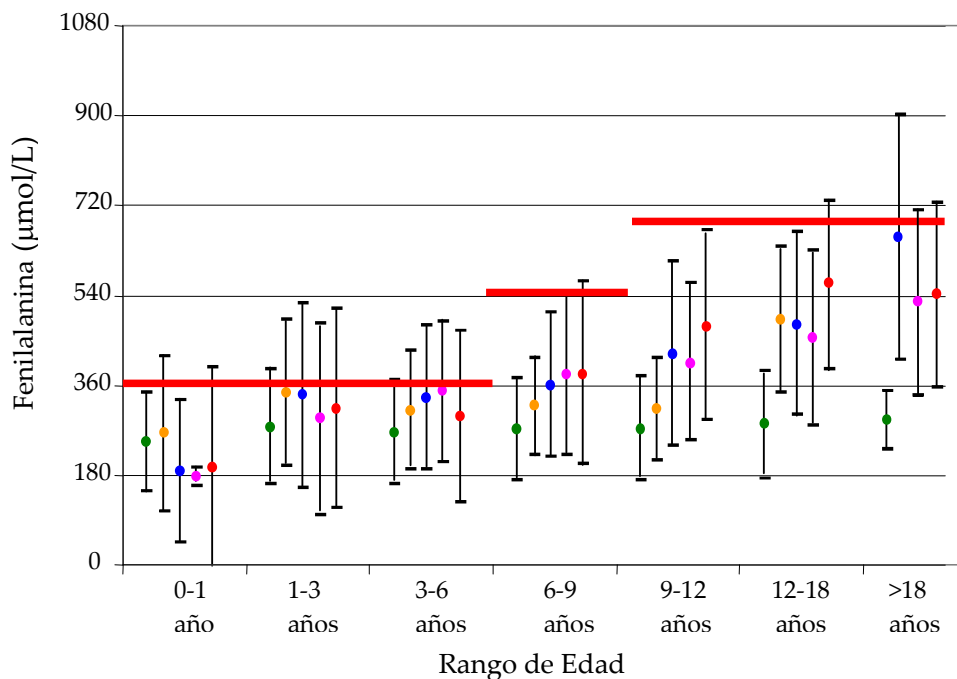
Los resultados se dividieron según rangos de edad en lactancia (0-12 meses de vida), preescolar (12-36 meses de vida), infancia temprana (3-5 años), infancia tardía (6-9 años), pre-adolescencia (9-12 años), adolescencia (12-17 años) y edad adulta (más de 18 años). Se escogieron estos rangos de edad en un intento de diferenciar los distintos momentos en la vida de los pacientes, en las que están expuestos a diferentes factores sociales y ambientales.

Globalmente, se observó que el control de los pacientes varía con la edad. En general, el control de los pacientes fue bueno, con fenilalaninas medias siempre por debajo del nivel considerado adecuado para cada edad. En la Tabla 4.10, Figura 4.8 y Figura 4.9 se representan los resultados del control metabólico de los pacientes con deficiencia de PAH recogidos con los criterios de control vigentes después de 1994. La fenilalanina media del periodo previo es superior (ya que se admitían niveles superiores), pero los niveles máximos registrados y el porcentaje de mal control para los distintos rangos de edad es similar entre ambos grupos, sin diferencias significativas.

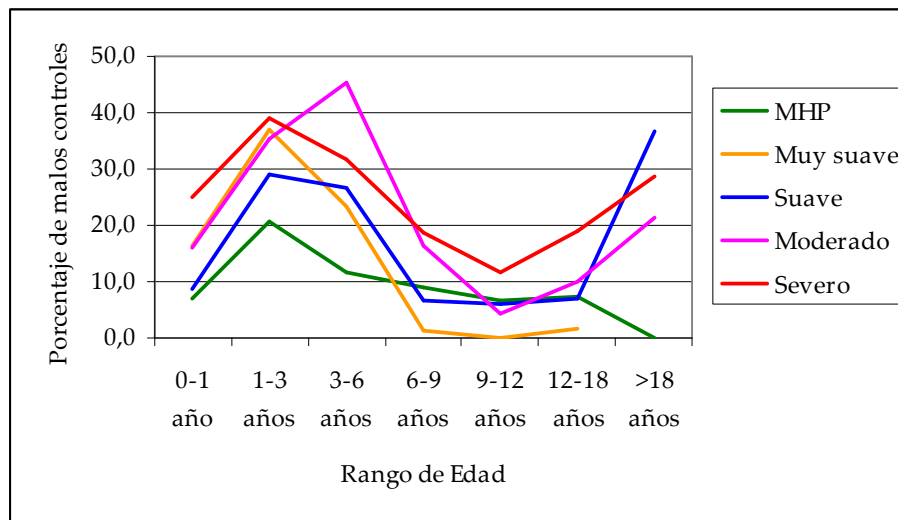
Utilizando un análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples para comparar el porcentaje de mal control en las distintas edades, se observaron diferencias significativas respecto a las demás edades ( $p < 0,001$ ) entre el periodo de 1-3 años y 3-6 años en todos los fenotipos. En los fenotipos suave, moderado y severo además hay diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en el rango de mayores de 18 años. Estas diferencias se deben a factores que se analizarán más adelante. A pesar de que el control de los pacientes en estos periodos parece peor, los niveles de fenilalanina media permanecen por debajo del nivel adecuado, lo que hace suponer que aunque hay un gran número de controles por encima del rango adecuado, están poco elevados y por lo tanto no hacen variar la media significativamente.

	Rango de Edad													
	0-1 años		1-3 años		3-6 años		6-9 años		9-12 años		12-18 años		> 18 años	
	T	SF	T	SF	T	SF	T	SF	T	SF	T	SF	T	SF
<b>MHP</b>														
Phe media	4,3	4,1	5,2	4,6	4,7	4,4	4,6	4,5	4,7	4,5	4,8	4,7	4,8	4,8
DS	1,9	1,6	2,4	1,9	2,1	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7	1,9	1,8	1,0	1,0
Max.	13,0	10,7	19,4	12,5	16,0	13,4	12,3	12,3	9,2	9,2	8,7	8,7	7,1	7,1
%	7,1	4,1	20,7	9,0	11,7	6,1	9,1	5,6	6,7	4,5	7,2	5,8	0	0
<b>M.Suave</b>														
Phe media	4,6	4,4	6,3	5,8	5,6	5,1	5,2	5,3	5,2	5,2	8,2	8,2		
DS	2,8	2,6	3,0	2,4	2,6	2,0	1,6	1,6	1,7	1,7	2,4	2,4		
Max.	13,0	10,5	19,8	16,0	17,0	11,8	17,0	11,7	10,0	10,0	19,0	19,0		
%	16,5	15,2	37,1	29,5	23,2	15,9	23,2	15,9	0	0	1,7	1,7		
<b>Suave</b>														
Phe media	3,3	3,1	6,0	5,7	5,9	5,6	6,1	6,0	7,2	7,0	8,1	8,0	10,9	10,9
DS	2,5	2,4	3,0	3,1	2,6	2,4	2,5	2,4	3,2	3,1	3,1	3,0	4,1	4,1
Max.	17,8	17,8	17,2	17,2	15,7	15,7	15,4	15,4	16,8	16,1	19,3	19,3	20,0	20,0
%	8,6	5,3	28,9	23,8	26,6	21,5	6,5	5,5	6,0	5,4	7,0	6,0	36,8	36,5
<b>Moderado</b>														
Phe media	3,5	2,9	5,9	4,9	7,0	5,8	7,0	6,3	7,2	6,7	8,1	7,6	9,9	9,0
DS	3,4	0,3	3,7	3,2	3,3	2,3	3,2	2,7	3,0	2,6	3,4	2,9	3,6	3,1
Max.	15,8	14,0	23,0	15,0	22,0	12,8	20,6	16,2	20,5	15,6	20,0	16,6	21,0	15,2
%	15,9	9,8	35,5	21,7	45,3	28,2	16,2	9,5	4,4	1,3	10,0	5,1	21,5	10,6
<b>Severo</b>														
Phe media	4,4	3,2	6,2	5,2	6,0	5,0	7,2	6,4	8,5	7,9	10,0	9,4	10,2	10,1
DS	4,5	3,3	3,9	3,3	4,0	3,0	3,7	3,0	3,7	3,2	3,3	2,8	3,8	3,3
Max.	28,0	19,0	25,0	17,5	26,5	26,5	22,0	20,0	24,9	23,0	22,7	21,0	18,0	18,0
%	25,1	11,6	38,9	24,1	31,7	20,8	18,8	10,3	11,8	7,2	19,0	11,9	28,7	24,1

**Tabla 4.10.- Control metabólico de los pacientes con deficiencia de PAH para cada rango de edad según su fenotipo.** Se muestran los niveles de fenilalanina media (mg/dl), desviación estándar (DS), nivel máximo de fenilalanina registrado y porcentaje de controles por encima del considerado adecuado para cada edad (%). Los distintos parámetros se muestran en dos grupos, uno que resume todos los controles recogidos (T) y otro en el que se han eliminado aquellos controles en los que el paciente sufría un proceso febril (SF).



**Figura 4.8.- Control metabólico a lo largo del tiempo según el fenotipo.** Se representa la media desviación estándar de los niveles de fenilalanina para cada fenotipo (verde MHP, amarillo Muy Suave, azul Suave, rosa Moderado y rojo Severo) para los distintos rangos de edad. Las líneas rojas representan el nivel máximo considerado adecuado para cada edad.



**Figura 4.9.- Porcentaje de controles por encima del rango adecuado en pacientes con deficiencia de PAH según edad y fenotipo.**

Respecto a las diferencias entre fenotipos, se observa que lógicamente los pacientes con un mejor control son los pacientes MHP, con niveles significativamente menores a los demás grupos ( $p < 0,0001$ ), salvo durante el periodo de 0-1 años, en que los niveles de los pacientes con fenotipos más severos fueron inferiores. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de fenilalanina medios ni el porcentaje de malos controles entre los fenotipos que precisaban dieta, en ninguno de los rangos de edad.

#### **4.2.3.2.- Factores que afectan el control metabólico de los pacientes con deficiencia de PAH**

Utilizando las técnicas GEE se pudo comparar el control metabólico de los 154 pacientes con distintos factores que pudiesen alterar los niveles de fenilalanina en sangre. De esta forma se obtuvieron una serie de odds ratio (OR) para distintos factores, los cuales indican la probabilidad de que por presentar ese factor el paciente en ese momento esté mal controlado, respecto a la posibilidad de estar mal controlado si no lo tuviera. Así se obtuvieron los siguientes resultados:

##### 1) Factores dietéticos:

- Transgresiones en la ingesta de proteínas de alto valor biológico:  
Como es de suponer, el hacer una trasgresión de la dieta, tanto el ingerir mayor cantidad de PNAVB como la falta de ingesta de proteínas sin fenilalanina, es el factor que más eleva la posibilidad de estar mal controlado (29,36 veces;  $p < 0,0001$ ). Para esta evaluación sólo se incluyeron los valores remitidos por los pacientes con fenotipos que precisan dieta, y sólo se pudieron comparar aquellos niveles en los que el paciente admitía haber realizado alguna trasgresión dietética. Esto supone cierto sesgo para el estudio porque es de suponer que en la mayoría de los casos los pacientes, sobre

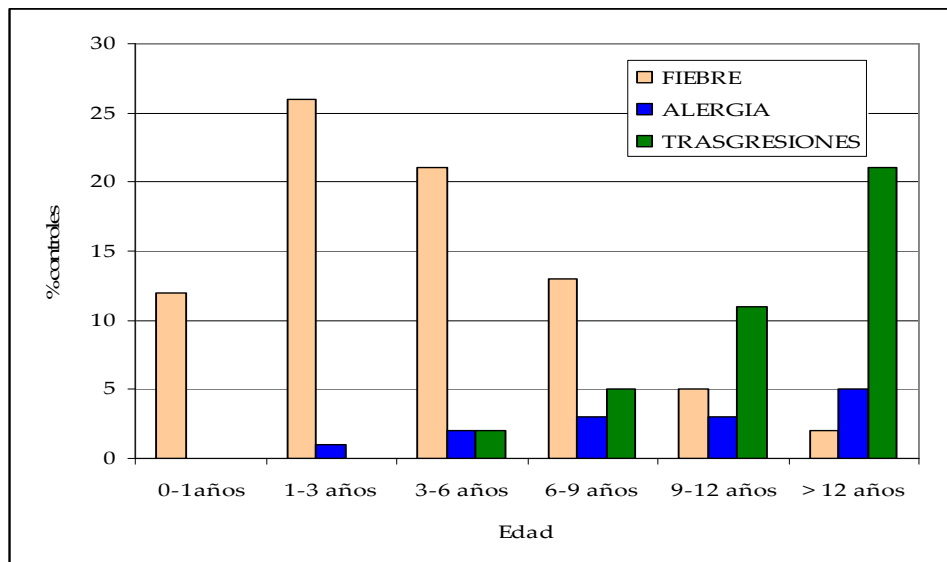
todo los adolescentes, no reconocen el realizar trasgresiones, y sólo “confiesan” aquellas que más elevan los niveles de fenilalanina en sangre. La frecuencia de trasgresiones aumenta con la edad de forma significativa ( $p < 0,001$ ), pero no se encontró una relación entre el número de trasgresiones y el fenotipo del paciente. El porcentaje de trasgresiones según el fenotipo fue del 2,9% en pacientes con fenotipo Muy Suave, 4,4% en los de fenotipo Suave, 5,7% en los de fenotipo Moderado y 3,4% en los Severos.

- Ingesta de proteínas de bajo valor biológico: Desde 1994 todos los pacientes tomaron de forma empírica las proteínas de bajo valor biológico de forma libre, mientras que previamente habían sido restringidas junto con las de alto valor biológico. Al igual que ocurre en el estudio a corto plazo, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el porcentaje de mal control entre los pacientes antes del año 1994 y después del año 1994 utilizando pruebas no paramétricas para la estadística. Utilizando técnicas GEE la odds ratio de mal control pre y post 1994 es de 0,03 ( $p < 0,0001$ ). Ambas técnicas corroboran que la ingesta libre de PNBVB no influye en el control metabólico de estos pacientes.
- Número de tomas de proteínas sin fenilalanina al día: El aumento en el número de tomas de PXPhe produjo una OR de 0,87 ( $p < 0,0001$ ). Esto quiere decir que tienen más probabilidad de estar mal controlados que aquellos con un menor nº de tomas diarias. Es una odds ratio pequeña, pero hay que tener en cuenta que todos los pacientes en nuestra Unidad reparten las PXPhe entre 4-6 tomas diarias, incluso hasta 8 tomas diarias durante la lactancia, y por lo tanto es difícil valorar diferencias entre ellos. Para esta comparación tiene mayor valor el estudio realizado a corto plazo comentado con anterioridad.



2) Enfermedades intercurrentes:

- Fiebre: La fiebre aumenta las posibilidades de mal control en 11,36 veces ( $p < 0,0001$ ) si los pacientes continúan con su alimentación habitual. A partir del año 2000 se recomendó a los pacientes eliminar las PNAVb completamente durante los días que durase el proceso febril. En estas situaciones la probabilidad de mal control con la fiebre sólo aumentaba en 1,57 veces ( $p < 0,0001$ ). Utilizando tablas de contingencia se observa que con fiebre y su dieta habitual, el 80,6% de los niveles estaba en el rango de mal control para la edad del paciente, mientras que si se reducían las PNAVb sólo el 30,2% de los valores superaban los rangos establecidos. Haciendo análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples, se observa una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre tanto la fenilalanina máxima como el porcentaje de mal control para todos los fenotipos hasta los 6 años. Esta tendencia incluye a los pacientes con fenotipo benignos. Teniendo en cuenta que la mayoría de los procesos febriles se producen en los primeros años de la vida, precisamente cuando interesa tener un mejor control de los niveles de fenilalanina, el controlar la ingesta de PNAVb durante estos periodos parece imprescindible para prevenir unos niveles que pudiesen ser perjudiciales para el desarrollo neurológico de los pacientes.
  
- Alergia: La alergia, una patología con una incidencia cada vez mayor en nuestro medio, aumenta las posibilidades de mal control en los pacientes PKU en 4,52 veces ( $p < 0,0001$ ). Sin tener en cuenta a los pacientes MHP la odds ratio aumenta hasta 5,30 ( $p < 0,0001$ ). En este caso también se ha recomendado reducir la ingesta de PNAVb durante estos procesos pero en el momento de finalización de recogida de datos los valores obtenidos en esta situación no eran suficientes para realizar estudios estadísticos fiables.



**Figura 4.10.- Porcentaje de controles tomados durante un proceso febril, alérgico o tras una transgresión dietética.** Se observa la frecuencia con la que se sufren procesos febriles durante los primeros años de vida, sobre todo entre los 9-10 meses y los 6 años. Las transgresiones dietéticas, en cambio, se producen cuanto mayor es el paciente. Los procesos alérgicos también aumentan con la edad, pero es un factor que se reconoce o se produce con menos frecuencia.

### 3) *Factores intrínsecos del paciente:*

- Sexo: Los varones tienen 1,35 veces ( $p < 0,0001$ ) mayores probabilidades de estar mal controlados que las mujeres. La diferencia es pequeña y posiblemente únicamente refleja el hecho de que los varones tienen una tendencia ligeramente mayor a realizar transgresiones dietéticas durante la adolescencia.
- Edad: Para hacer esta comparación la edad se dividió en 6 grupos: de 0 a 1 año (lactancia), de 1 a 3 años (preescolar), de 3 a 6 años (primaria), de 6 a 9 años (secundaria), de 9 a 12 años (preadolescencia) y mayor de 12 años (adolescencia y edad adulta). Estas divisiones se hicieron teniendo en cuenta las diferencias que se realizan en la dieta en los distintos periodos, así como la influencia de la escolarización y las relaciones sociales que se tienen a distintas edades. Utilizando tablas de

contingencia se observa que los periodos en los que los pacientes tienen más controles altos son entre el año y los 6 años, y posteriormente en la adolescencia (Figura 4.9). En la figura 4.10 se observa que estas edades son aquellas en las que los pacientes tienen más procesos febriles primero, y posteriormente comienzan a realizar trasgresiones dietéticas.

Para utilizar las técnicas GEE, como en los grupos de la variable edad no se puede asumir linealidad se ha utilizado en el análisis como variables indicadoras la edad de los lactantes (periodo en el que el número de muestras con niveles elevados es de un 2%, el más bajo de todos. De esta forma se obtuvieron unas OR (o riesgo de tener unos controles peores que en el periodo de lactancia) de 1,53 – 0,91 – 0,28 – 0,13 y 0,34 para los siguientes grupos de edad con unas  $p < 0,0001$  en todos los casos.

- Fenotipo: Los pacientes con fenotipo benigno tienen una OR de mal control de 0,04. Por definición, son los pacientes que con dieta normal tienen niveles inferiores a 6 mg/dl (buen control), y los niveles por encima de esa cifra suelen producirse exclusivamente en caso de fiebre. La OR del resto de los fenotipos es de 2,5, 2,3 y 1,7 para los fenotipos suave, moderado y severo respectivamente. Son OR bajas y que se deben a fiebre y a transgresiones dietéticas en su mayoría. La comparación entre ellas por pruebas no paramétricas no fue significativa. Por lo tanto se puede concluir que, con tratamiento, el fenotipo no influye en el control metabólico de los pacientes.

#### 4) Factores familiares:

- Nivel socioeconómico: La OR obtenida al comparar el control de los pacientes de familias con un nivel socioeconómico más alto con las de los otros cuatro grupos con niveles medios y bajos demostró que éste no es un factor determinante en el control metabólico de los

pacientes (la OR de mal control fue de 0,02 – 0,04 – 0,03 y 0,02 para niños con familias de recursos económicos decrecientes).

- Coeficiente intelectual: El coeficiente intelectual de los padres tampoco influyó en los controles metabólicos de sus hijos. La OR de mal control al comparar los niveles de los niños con padres más inteligentes con los niveles de niños con padres progresivamente menor capacidad intelectual fue de 0,01 – 0,02 – 0,03 – 0,02 respectivamente.
- Interés: El interés de los padres en la enfermedad y en realizar los controles y las visitas médicas con regularidad sí tiene repercusión en el buen control metabólico de sus hijos. Así, la OR al comparar el control de los hijos con padres de más interés con aquellos que realizan menos controles y acuden menos a la consulta fue de 0,04 – 0,12 – 0,78 y 1,3 respectivamente, con  $p < 0,0001$ .

#### **4.2.3.2.- Evolución de la dieta de los pacientes con deficiencia de PAH**

La dieta de los pacientes con deficiencia de PAH consistió en una dieta libre para los pacientes MHP, y en una dieta limitada en fenilalanina para el resto de fenotipos. La dieta en estos últimos casos la descomponemos en:

- Proteínas de alto valor biológico: Aquellas con alto contenido proteico y mejor absorción a nivel intestinal. Son aquellas tenidas en cuenta para el control metabólico de los pacientes y restringidas en mayor o menor grado según la tolerancia de los pacientes.
- Proteínas de bajo valor biológico y productos especiales sin proteínas: desde 1994 se toman de forma libre a todos los pacientes, independientemente de su fenotipo. En el estudio a corto plazo referido anteriormente se demuestra que

no intervienen en el control metabólico de los pacientes. A largo plazo, no encontramos diferencias significativas entre la media en los niveles de fenilalanina ni el porcentaje de malos controles entre el periodo anterior a 1994 y el posterior, lo que corrobora los resultados del estudio a corto plazo.

- Proteínas especiales sin fenilalanina: la cantidad de proteínas especiales sin fenilalanina se estableció según la edad del paciente (de 3 a 1,5 gramos/Kg/día según aumenta la edad), independientemente de su control metabólico. Así como anteriormente hemos hecho referencia a la importancia del número de tomas en las que se divide el producto, y que se confirma tanto en el estudio a corto plazo como en el estudio a largo plazo, la cantidad de producto se dió en cantidad suficiente para cubrir los requerimientos proteicos según indicaciones de la ESPGAN, no influida por el control metabólico. No se han hecho comparaciones entre los distintos productos comerciales dado que es frecuente realizar mezclas con distintos productos y a los pacientes de mayor edad se les deja elegir según sus gustos, siempre y cuando se cubran las necesidades proteicas.

Respecto a la ingesta de proteínas de alto valor biológico se observa que hay una ligera tendencia a aumentar el número de proteínas con el paso del tiempo, salvo en los pacientes con fenotipo severo, en los que tras un aumento inicial a lo largo de la infancia, cae de nuevo en la adolescencia (ver figura 4.11 y tabla 4.A). La diferencia entre la tolerancia a los 3-6 años (edad tomada habitualmente como referencia) y la tolerancia durante la adolescencia es significativa en todos los fenotipos ( $p < 0,001$ ) aunque en los pacientes severos lo que sea significativo sea la disminución de la tolerancia.

Existen excepciones que dan lugar a tolerancias a PNAVB máximas que no concuerdan con estos resultados, pero en la tabla 4.A y figura 4.11 se ve que para la mayoría de los pacientes se cumple la hipótesis de que los pacientes severos no pueden superar los 6-7 g PNAVB/día, los moderados toleran entre 6-12 g PNAVB/día, los

suaves toleran entre 10-20 g/día y los muy suaves pueden llevar una dieta normal pero sin un exceso de proteínas (1-2 g/Kg/día). Si se toman en consideración estos rangos de tolerancia, los pequeños cambios con el paso del tiempo no son significativos.

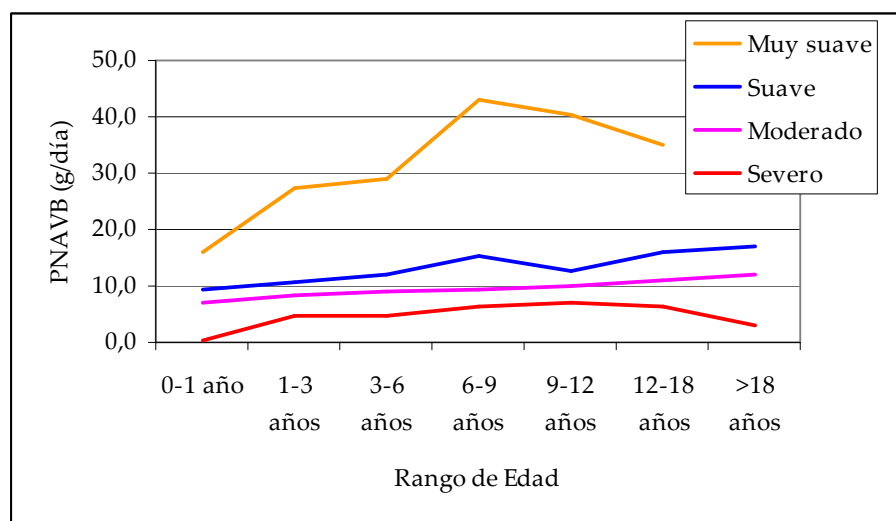


Figura 4.11.- Evolución de la tolerancia media a PNAVB según el fenotipo.

	Rango de Edad						
	0-1 años	1-3 años	3-6 años	6-9 años	9-12 años	12-18 años	> 18 años
<b>MHP</b>							
PNAVB media	Libre	Libre	Libre	Libre	Libre	Libre	Libre
PNAVB Max							
PNAVB Min							
<b>M.Suave</b>							
PNAVB media	16,0	27,3	29,1	43,0	40,4	35,0	
PNAVB Max	20,0	40,0	40,0	45,0	45,0	35,0	
PNAVB Min	0,0	15,0	15,0	15,0	12,0	35,0	
<b>Suave</b>							
PNAVB media	9,5	10,7	12,1	15,2	12,8	16,0	17,0
PNAVB Max	15,0	18,0	20,0	25,0	25,0	25,0	20,0
PNAVB Min	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	6,0	9,0
<b>Moderado</b>							
PNAVB media	7,0	8,5	9,0	9,3	10,0	11,1	12,0
PNAVB Max	14,0	19,0	14,0	14,0	20,0	20,0	20,0
PNAVB Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Severo</b>							
PNAVB media	0,3	4,8	4,6	6,2	7,0	6,3	3,0
PNAVB Max	1,0	15,0	15,0	15,0	14,0	12,0	10,0
PNAVB Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 4.11.- Datos de la evolución de la tolerancia a PNAVB en pacientes con deficiencia de PAH a lo largo del tiempo y según el fenotipo.

#### 4.2.3.3.- Controles analíticos nutricionales de los pacientes con deficiencia de PAH

Se realizaron análisis hematológicos y bioquímicos a 79 pacientes, 44 niñas y 35 varones, a los 3 años de edad. Sus fenotipos fueron 17 PKU benigna o muy suave, 15 PKU suave, 25 PKU moderada y 22 PKU severa. Los valores obtenidos se exponen en la Tabla 4.12.

	Normal	F. Benigno 14 pacientes	F. Suave 18 pacientes	F. Moderado 25 pacientes	F. Severo 22 pacientes
<b>Hb (g/dL)</b>	11 - 14	12,6 ± 1,5	13,2 ± 0,8	13,4 ± 1,0	13,0 ± 1,2
<b>Hcto (%)</b>	40 - 54	37,3 ± 3,9	38,3 ± 2,2	39,3 ± 2,4	38,3 ± 2,9
<b>VCM (fL)</b>	82 - 98	77,5 ± 9,7	83,4 ± 4,0	85,3 ± 5,6	82,7 ± 6,6
<b>Leu (10<sup>3</sup>/μL)</b>	4 - 11	9,3 ± 2,1	7,5 ± 2,1	7,6 ± 2,8	8,2 ± 2,2
<b>Pla<sub>q</sub> (10<sup>3</sup>/μL)</b>	140 - 450	297,8 ± 46,6	267,0 ± 66,8	279,4 ± 53,7	286,9 ± 76,2
<b>Glu (mg/dL)</b>	70 - 110	83,7 ± 6,8	83,4 ± 8,7	84,5 ± 9,9	83,2 ± 11,0
<b>Cr (mg/dl)</b>	0,3 - 1,3	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
<b>Urico (mg/dl)</b>	2,6 - 7,2	4,0 ± 0,7	3,1 ± 1,0	2,9 ± 0,6	2,9 ± 1,0
<b>Na (mEq/L)</b>	135 - 145	139,4 ± 0,9	139,6 ± 2,1	137,9 ± 2,3	139,6 ± 2,3
<b>K (mEq/L)</b>	3,5 - 5,3	4,7 ± 0,4	4,6 ± 0,4	4,6 ± 0,5	4,4 ± 0,3
<b>Ca (mg/dL)</b>	8 - 11	10,2 ± 0,5	10,2 ± 0,5	10,1 ± 0,5	10,2 ± 0,4
<b>P (mg/dl)</b>	2,7 - 6,0	4,9 ± 0,7	4,7 ± 0,9	4,7 ± 0,6	5,0 ± 0,5
<b>ProtT (g/dL)</b>	6,4 - 8,3	7,3 ± 0,4	7,2 ± 0,3	7,1 ± 0,5	7,4 ± 0,6
<b>BilT (mg/dl)</b>	0,3 - 1,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,8 ± 1,5	0,4 ± 0,1
<b>GOT (U/L)</b>	4 - 50	33,7 ± 7,9	31,7 ± 8,7	29,4 ± 9,2	32,4 ± 6,5
<b>GPT (U/L)</b>	5 - 40	20,7 ± 8,7	23,4 ± 6,3	20,8 ± 4,9	23,2 ± 7,1
<b>GGT (U/L)</b>	7- 50	10,6 ± 3,3	14,2 ± 4,0	12,7 ± 5,8	12,4 ± 3,8
<b>LDH (U/L)</b>	230 - 460	522,1 ± 138,9	444,0 ± 118,6	462,0 ± 207,5	428,0 ± 119,7
<b>Col (mg/dl)</b>	120 - 240	162,1 ± 35,3	154,7 ± 27,8	139,4 ± 25,0	136,7 ± 21,5
<b>Tg (mg/dl)</b>	25 - 200	73,4 ± 21,4	94,9 ± 47,6	80,1 ± 30,8	80,8 ± 26,1
<b>CPK (U/L)</b>	24 - 195	204,9 ± 208,0	112,6 ± 43,8	114,5 ± 69,4	132,6 ± 66,9
<b>Fe (μg/mL)</b>	50 - 150	-----	-----	101,8 ± 48,7	79,6 ± 25,8
<b>Ferrit (ng/mL)</b>	14 - 179	-----	39,8 ± 36,8	44,4 ± 10,7	16,5 ± 4,5
<b>Cu (μg/dL)</b>	70 - 150	105,3 ± 16,5	96,7 ± 12,9	88,1 ± 17,6	96,3 ± 20,0
<b>Zn (μg/dL)</b>	60 - 140	85,8 ± 15,8	91,1 ± 22,2	84,5 ± 12,1	88,7 ± 12,6
<b>Vit A (μg/dL)</b>	14- 83	22,3 ± 4,3	26,9 ± 6,8	23,8 ± 7,7	23,2 ± 7,9
<b>Vit E (μg/dL)</b>	417- 1670	619,6 ± 136,8	746,2 ± 192,6	652,1 ± 278,6	794,5 ± 194,9
<b>Carn L (μmol/L)</b>	40 - 60	39,9 ± 7,3	38,4 ± 5,5	38,2 ± 10,2	32,8 ± 7,4

Tabla 4.12.- Resultados analíticos a los 3 años de edad de pacientes con deficiencia de PAH.

Utilizando un análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de los distintos fenotipos al compararlos entre ellos o al compararlos con la normalidad.

No se hicieron estudios a otras edades de forma sistemática ya que los resultados a los 3 años fueron normales y los estudios ocasionales realizados a algunos pacientes a otras edades tampoco tuvieron resultados patológicos.

#### **4.2.3.4.- Desarrollo antropométrico de pacientes con deficiencia de PAH**

##### **4.2.3.4.1.- Talla**

Los percentiles de talla, peso e índice de masa corporal de los pacientes PKU según la edad y el sexo se muestran en las tablas 4.13 y 4.14. De los pacientes varones con fenotipo benigno sólo se obtuvieron datos hasta los 9 años dado que a esa edad son dados de alta. En el caso de las niñas MHP, aunque no son dadas de alta, a partir de esa edad acuden de forma esporádica, y por lo tanto a partir de entonces los datos fueron escasos y con poca fiabilidad estadística, así que no se utilizaron.

Los percentiles de talla según la edad de los pacientes PKU se muestran en la figura 4.12, donde se observa que no existen diferencias respecto a la talla de niños normales. Otra forma de estudiar la talla a las distintas edades de los pacientes PKU ha sido mediante la determinación del Zscore para cada paciente a cada edad. Un valor de Zscore de 0 equivale a un percentil 50 de la normalidad, siendo el rango normal entre 2 y -2 Zscore. En las tablas 4.15 y 4.16 se muestran los resultados de Zscore para pacientes MHP, PKU en conjunto y por fenotipos. Sólo se hizo estadística cuando el número de pacientes era igual o superior a 5, motivo por el que no se muestran los datos de pacientes PKU suaves a partir de los 13 años.



**Tabla 4.13- Tablas de Percentiles de Talla, Peso e Índice de Masa Corporal de Niñas con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.**

### NIÑAS PKU

EDAD	Longitud/Altura (cm)				Peso (Kg)				IMC (Peso/Talla <sup>2</sup> ) (Kg/m <sup>2</sup> )			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nacim.	45,00	49,00	52,75	2,17	2,57	3,18	4,22	0,45	11,62	12,80	14,24	0,81
6 meses	62,44	66,00	71,70	2,60	6,32	7,80	9,00	0,79	14,88	17,12	20,06	1,57
1 año	69,84	74,00	81,54	3,47	8,46	9,90	12,70	1,04	16,40	17,83	19,69	1,22
2 años	80,95	85,50	91,58	3,47	10,10	12,00	15,06	1,39	14,98	17,01	18,76	1,20
3 años	87,28	94,00	102,06	4,08	12,44	14,85	19,67	2,09	14,67	16,72	19,83	1,39
4 años	93,65	101,75	112,13	5,08	14,08	17,15	24,88	3,05	14,33	16,16	21,02	1,81
5 años	100,13	108,75	121,73	5,77	15,88	19,70	28,53	4,00	13,41	16,38	21,61	2,37
6 años	106,19	115,00	128,68	6,72	17,35	22,50	34,74	5,18	14,55	16,81	22,03	2,37
7 años	112,44	121,00	134,54	6,84	19,78	25,00	42,18	6,49	14,91	16,80	24,03	2,73
8 años	119,08	128,00	141,96	7,36	23,88	29,75	48,63	7,67	10,86	17,21	24,97	4,67
9 años	124,50	133,25	147,45	7,34	29,50	38,00	60,58	8,43	15,81	18,57	25,51	2,97
10 años	128,72	138,80	153,16	7,17	29,50	38,00	60,58	10,06	16,71	19,72	26,53	3,37
11 años	134,69	145,25	160,38	7,32	33,92	41,25	67,82	10,63	16,86	19,88	27,43	3,10
12 años	140,60	150,00	167,40	8,27	35,60	47,50	73,76	12,21	17,30	19,94	28,03	3,66
13 años	146,54	155,00	167,80	6,39	41,76	54,00	74,10	7,87	9,90	22,67	27,30	5,88
14 años	150,45	157,70	170,20	6,14	44,78	57,20	74,75	8,78	18,14	23,14	28,95	3,11
15 años	151,68	159,00	170,65	5,94	46,05	59,75	73,25	8,24	19,30	23,03	27,50	2,40
16 años	152,22	159,80	176,38	7,60	46,39	61,00	74,38	8,81	19,07	23,24	27,63	2,57
17 años	152,96	161,00	177,72	8,14	49,50	62,00	74,52	7,70	19,13	23,81	27,57	2,63
18 años	152,96	161,00	177,72	8,14	47,23	64,25	75,10	7,90	19,34	23,25	27,37	8,83

### NIÑAS MHP

EDAD	Longitud/Altura (cm)				Peso (Kg)				IMC (Peso/Talla <sup>2</sup> ) (Kg/m <sup>2</sup> )			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nacim.	48,00	50,00	53,72	1,83	2,49	3,25	3,60	0,34	10,69	12,88	14,43	1,22
6 meses	61,00	65,00	70,00	2,76	5,88	7,18	8,99	0,87	15,30	16,99	19,37	1,36
1 año	70,08	73,60	80,00	3,26	7,68	9,51	11,90	1,32	14,66	17,99	19,75	1,52
2 años	80,57	85,45	91,86	3,63	9,91	12,23	15,39	1,66	14,80	17,03	21,95	2,18
3 años	88,76	94,00	102,56	3,99	11,50	14,20	18,78	2,30	13,84	16,30	19,64	1,76
4 años	96,48	101,50	110,46	4,53	13,68	16,30	25,83	4,17	14,27	16,44	22,52	2,67
5 años	102,74	110,00	119,20	5,55	15,00	19,40	27,68	3,51	13,37	16,50	18,55	1,62
6 años	108,54	115,50	123,73	5,99	17,17	22,00	32,61	5,35	14,11	16,92	22,86	2,77
7 años	114,20	120,30	133,10	6,76	19,27	23,50	34,46	5,82	14,50	16,67	21,42	2,47
8 años	118,44	127,00	139,00	7,50	20,74	29,00	41,03	7,48	14,80	17,25	21,86	2,78
9 años	123,44	135,00	146,00	8,25	22,84	34,40	48,30	9,40	14,83	18,30	23,26	3,12

**Tabla 4.14.- Tablas de Percentiles de Talla, Peso e Índice de Masa Corporal de Niños con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.**

### NIÑOS PKU

EDAD	Longitud/Altura (cm)				Peso (Kg)				IMC (Peso/Talla <sup>2</sup> ) (Kg/m <sup>2</sup> )			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nacim.	44,38	50,00	53,62	2,87	2,25	3,32	4,04	0,56	10,46	13,02	15,53	1,55
6 meses	63,12	68,00	71,07	2,51	6,23	8,00	9,46	1,00	15,21	17,31	20,06	1,50
1 año	71,79	76,00	80,53	2,81	8,08	10,70	12,88	1,37	15,43	18,01	21,69	2,00
2 años	81,68	87,00	93,74	3,23	10,81	12,70	15,66	1,51	15,18	16,66	21,21	1,56
3 años	90,26	95,00	99,08	3,04	12,85	15,00	17,72	1,63	14,63	16,48	19,71	1,53
4 años	97,77	102,00	110,00	3,67	14,87	17,25	22,20	2,15	14,66	16,52	19,54	1,53
5 años	102,86	108,10	116,04	3,90	16,97	19,15	25,00	2,61	14,90	16,32	21,89	1,86
6 años	109,74	115,50	121,13	3,57	18,84	21,25	29,62	3,59	14,36	16,32	21,12	2,34
7 años	115,84	120,50	130,03	4,55	20,30	24,50	34,22	4,24	14,74	16,49	21,17	2,27
8 años	121,00	128,00	135,50	4,66	21,59	27,00	40,22	5,39	14,56	17,08	22,61	2,51
9 años	126,70	135,00	141,49	4,87	23,92	31,50	46,57	6,44	14,90	17,19	24,01	2,83
10 años	131,58	138,25	147,25	5,24	26,53	33,85	53,13	8,32	15,27	17,60	25,00	3,33
11 años	136,53	145,15	152,69	5,20	28,56	35,10	59,20	9,30	15,25	17,60	26,01	3,38
12 años	142,00	151,50	160,38	6,09	31,30	41,00	65,46	10,12	15,52	18,62	27,48	3,54
13 años	148,00	155,00	168,49	7,55	36,02	46,15	67,45	9,66	16,44	18,99	25,01	2,72
14 años	150,92	161,00	173,46	8,26	37,68	51,00	81,48	13,80	16,17	19,45	27,35	3,53
15 años	160,00	167,00	177,30	6,21	43,63	59,00	82,41	11,93	16,58	21,05	27,80	3,54
16 años	159,50	170,00	179,15	6,21	45,99	66,10	86,84	12,77	16,36	21,56	28,92	3,95
17 años	163,32	172,00	180,35	5,33	54,52	70,50	93,38	12,67	19,67	23,40	29,63	3,51
18 años	163,32	172,00	180,35	5,33	57,00	72,40	96,54	13,62	20,94	24,61	31,27	3,72

### NIÑOS MHP

EDAD	Longitud/Altura (cm)				Peso (Kg)				IMC (Peso/Talla <sup>2</sup> ) (Kg/m <sup>2</sup> )			
	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS	P3	P50	P97	DS
Nacim.	46,62	49,00	53,38	2,03	2,44	3,48	4,56	0,59	10,46	13,02	15,53	1,73
6 meses	64,32	68,00	79,76	5,21	6,90	8,10	9,80	0,88	15,21	17,31	20,06	1,68
1 año	71,26	75,50	79,00	2,43	8,53	10,05	11,44	0,96	15,43	18,01	21,69	1,19
2 años	81,29	87,70	94,08	3,80	10,78	12,75	14,60	1,33	15,18	16,66	21,21	0,96
3 años	90,53	94,75	101,39	3,77	13,41	15,35	17,60	1,46	14,63	16,48	19,71	1,13
4 años	97,45	101,00	109,60	4,04	14,18	16,75	19,99	1,81	14,66	16,52	19,54	1,01
5 años	103,36	108,00	117,63	4,87	17,37	20,00	25,26	2,78	14,90	16,32	21,89	1,17
6 años	109,39	115,00	125,44	5,22	19,12	22,00	30,01	3,61	14,36	16,32	21,12	1,42
7 años	114,48	120,50	132,99	6,28	21,05	24,50	35,14	5,32	14,74	16,49	21,17	2,42
8 años	117,81	127,00	139,14	7,79	23,77	28,00	40,46	6,58	14,56	17,08	22,61	3,03
9 años	125,72	133,00	145,46	8,41	27,60	32,50	45,45	7,72	14,90	17,19	24,01	3,29

Figura 4.12.- Evolución de la Talla ( $p50 \pm 2 DS$ ) de pacientes PKU (en rojo) respecto a la normalidad (en negro).

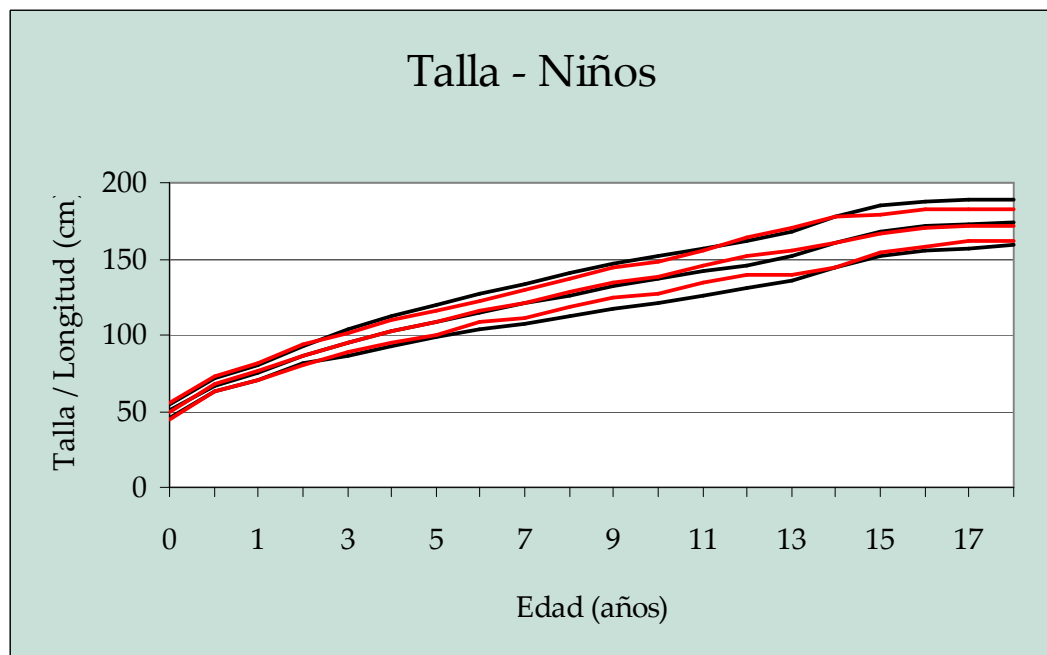
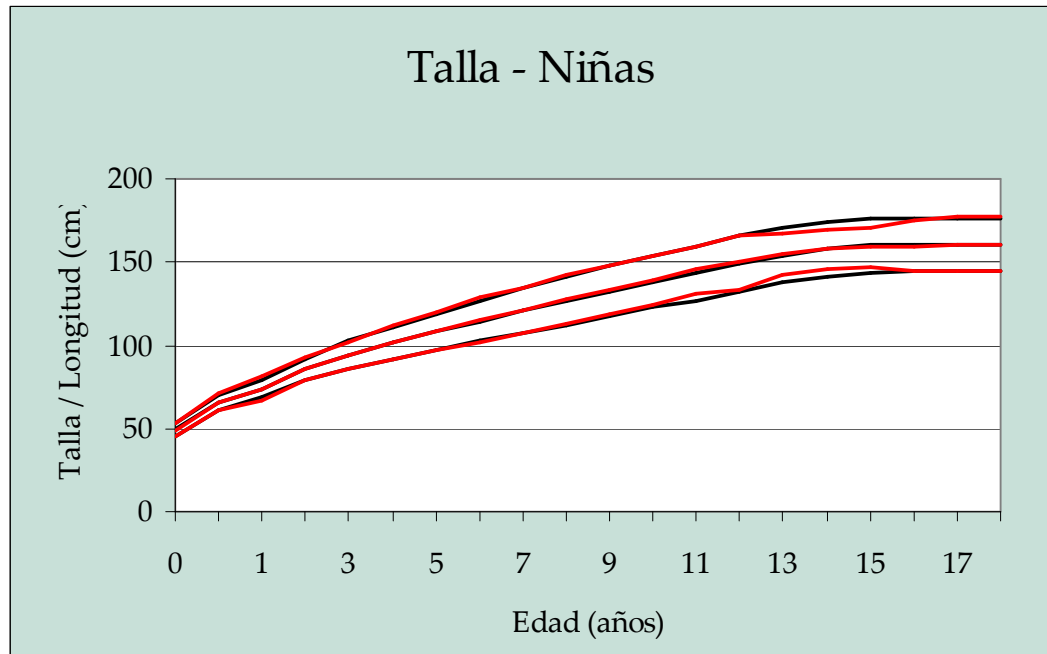


Tabla 4.15.- Zscore de Talla de Niñas con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	0,37	0,89	-0,12	1,05	-0,04	1,02	0,18	1,20	-0,49	0,90
6 meses	0,10	1,31	0,66	1,23	0,45	1,01	0,77	1,15	0,71	1,53
1 año	0,31	1,26	0,43	1,34	0,61	1,88	0,68	1,20	0,04	0,91
2 años	0,14	1,26	0,09	1,20	0,16	0,90	0,17	1,60	-0,06	0,96
3 años	0,16	0,94	0,18	0,96	0,29	0,50	0,12	1,20	0,17	1,01
4 años	0,26	0,98	0,31	1,10	0,19	0,59	0,31	1,38	0,38	1,04
5 años	0,39	1,05	0,42	1,09	0,53	0,91	0,32	1,19	0,47	1,19
6 años	0,30	0,93	0,33	1,09	0,04	0,76	0,38	1,19	0,48	1,26
7 años	0,40	1,01	0,33	1,02	-0,03	0,73	0,43	1,05	0,46	1,22
8 años	0,32	1,04	0,37	1,02	0,01	0,70	0,49	1,06	0,47	1,21
9 años	0,35	1,10	0,31	0,97	0,13	0,72	0,32	0,91	0,47	1,36
10 años			0,21	0,93	-0,17	0,61	0,32	0,80	0,34	1,23
11 años			0,37	0,88	-0,08	0,42	0,47	0,85	0,58	1,09
12 años			0,39	0,98	-0,10	0,54	0,29	0,90	0,85	1,17
13 años			0,25	0,76	0,10	0,58	0,08	0,81	0,54	0,84
14 años			0,03	0,74	0,05	0,57	-0,08	0,74		
15 años			-0,09	0,74	-0,06	0,60	-0,28	0,79		
16 años			-0,02	0,98	-0,03	0,71	0,13	1,33		
17 años			0,13	1,03	0,00	0,68	0,10	1,43		
18 años			0,12	1,03	0,00	0,68	0,09	1,43		

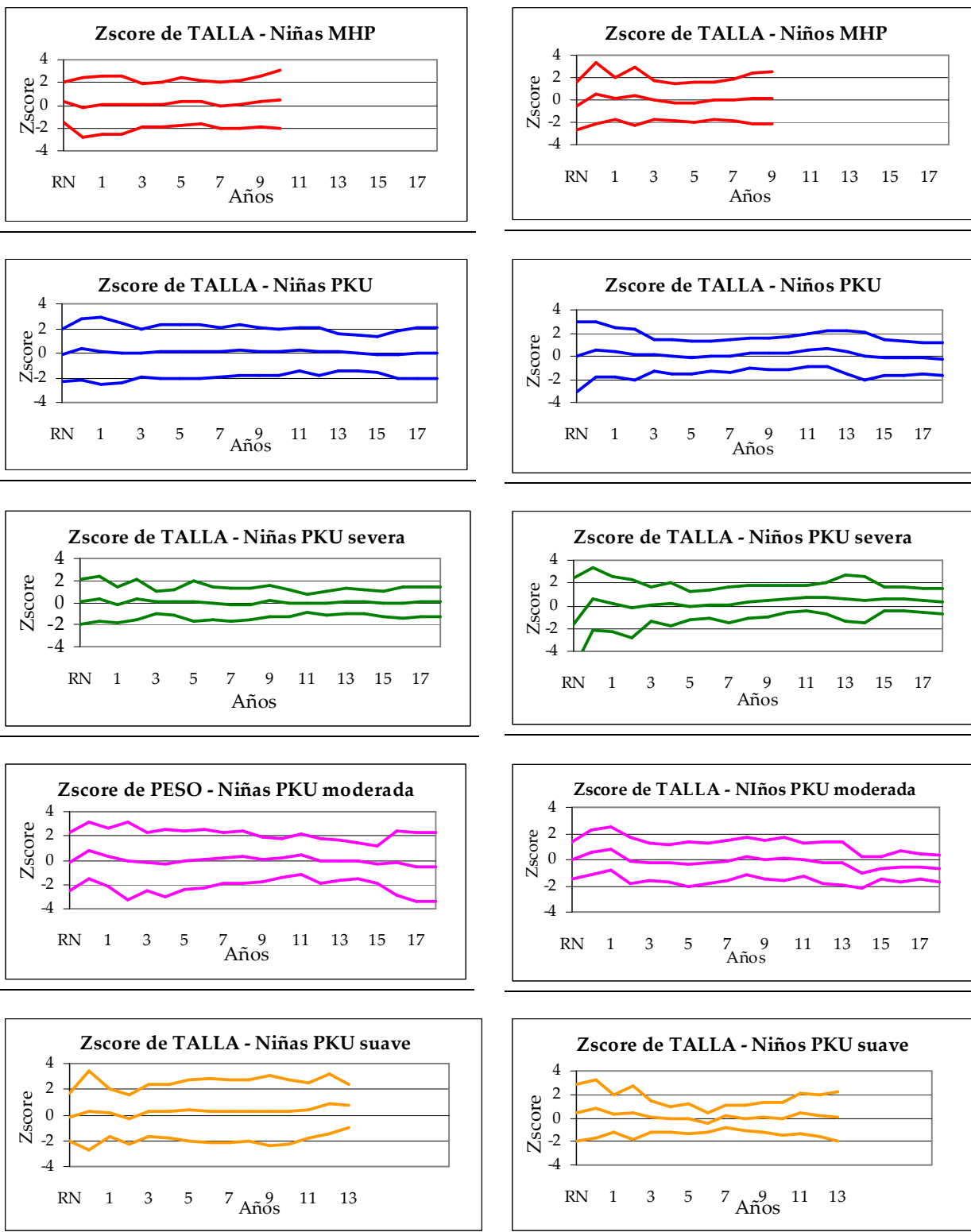
Tabla 4.16.- Zscore de Talla de Niños con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	0,52	0,02	0,51	0,03	0,50	0,04	0,52	0,01	0,52	0,02
6 meses	0,49	0,04	0,48	0,02	0,43	0,14	0,48	0,01	0,48	0,02
1 año	0,41	0,01	0,41	0,02	0,41	0,02	0,42	0,01	0,41	0,01
2 años	0,35	0,02	0,35	0,01	0,34	0,01	0,35	0,01	0,35	0,01
3 años	0,30	0,01	0,30	0,01	0,30	0,01	0,30	0,01	0,30	0,01
4 años	0,26	0,01	0,26	0,01	0,26	0,01	0,26	0,01	0,26	0,01
5 años	0,24	0,01	0,24	0,01	0,24	0,01	0,23	0,01	0,24	0,01
6 años	0,21	0,01	0,20	0,01	0,21	0,01	0,20	0,01	0,20	0,00
7 años	0,20	0,01	0,20	0,01	0,20	0,01	0,20	0,01	0,20	0,01
8 años	0,19	0,01	0,19	0,01	0,19	0,01	0,19	0,01	0,19	0,01
9 años	0,19	0,01	0,19	0,01	0,19	0,01	0,19	0,01	0,18	0,01
10 años			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11 años			0,17	0,04	0,19	0,01	0,18	0,01	0,18	0,01
12 años			0,17	0,01	0,17	0,01	0,16	0,01	0,17	0,01
13 años			0,14	0,01	0,14	0,01	0,14	0,01	0,14	0,01
14 años			0,12	0,01	0,12	0,01	0,12	0,00		
15 años			0,13	0,00	0,13	0,00	0,12	0,00		
16 años			0,15	0,01	0,15	0,00	0,14	0,00		
17 años			0,17	0,01	0,18	0,00	0,17	0,00		
18 años			0,16	0,01	0,17	0,00	0,16	0,00		

La media de las Zscore para todos los grupos de pacientes es siempre próxima a cero, con una desviación estándar mínima. Es lógico pues no haber encontrado diferencias significativas con la normalidad utilizando análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples.

La figura 4.13 muestra la evolución para las distintas edades de la media y desviaciones estándar del Zscore de los pacientes MHP, PKU en su conjunto y PKU por fenotipos. Al igual que en las tablas, no se observan importantes desviaciones de la normalidad.

**Figura 4.13.- Zscore de la Talla (p50 ± 2DS) de Pacientes con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.**



Finalmente, de los 98 pacientes PKU no MHP seguidos a lo largo de los últimos 20 años, 32 habían alcanzado la talla final, definida como aquella talla que no se modifica en los siguientes años más de 2 cm. Los resultados se muestran en la Tabla 4.17. Habían alcanzado dicha talla 17 mujeres y 15 varones: 11 con fenotipo suave, 11 moderados y 10 con fenotipo severo. La distribución de sexos por fenotipos fue equilibrada (6:5, 6:5 y 5:5 respectivamente). No se estudiaron las tallas finales de los pacientes con fenotipo MHP dado que los niños son dados de alta o no se tenían datos a partir de los 9 años, antes de alcanzar la talla final.

	Mujeres	Varones
Normalidad	1,60 ± 0,05 m	1,73 ± 0,05 m
Fenotipo Suave	1,62 ± 0,06 m	1,73 ± 0,02 m
Fenotipo Moderado	1,61 ± 0,11 m	1,68 ± 0,04 m
Fenotipo Severo	1,60 ± 0,05 m	1,76 ± 0,04 m

**Tabla 4.17.- Talla final de los pacientes PKU según su fenotipo.**

Al comparar la talla final de los pacientes PKU con la talla media familiar para cada uno de ellos, se observa una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ). Los pacientes crecen entre 2 y 4 cm más de su talla esperada, pero este incremento, aunque significativo en valores absolutos, entra dentro del intervalo de confianza de la talla familiar de  $\pm 5$  cm. Si se tiene esto en cuenta no se encuentran diferencias significativas entre la talla de los pacientes y su talla media familiar ( $p = 0,6$ ).

Por lo tanto se constata con los pacientes PKU, a pesar de seguir una dieta limitada en fenilalanina, tienen una evolución de talla normal y alcanzan la talla final que les corresponde por sus antecedentes familiares.

#### 4.2.3.4.2.- Peso

Los percentiles de talla, peso e índice de masa corporal de los pacientes PKU según la edad y el sexo se mostraron anteriormente en las tablas 4.13 y 4.14.

Los percentiles de peso según la edad de los pacientes PKU se muestran en la figura 4.14. También se ha estudiado el peso a las distintas edades de los pacientes PKU mediante la determinación del Zscore para cada paciente a cada edad. La interpretación de los resultados es igual que para los Zscore de talla (normal  $0 \pm 2$ ). Como se observa en las tablas 4.18 y 4.19, la media del Zscore para pacientes PKU es siempre próxima a cero, con una desviación estándar mínima. No se han encontrado diferencias significativas con la normalidad utilizando análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples salvo en las niñas PKU severas a partir de los 13 años y en los niños severos a partir de los 18 años, en los que el peso es significativamente superior a la normalidad ( $p < 0,001$ ).

La figura 4.15 muestra la evolución para las distintas edades de la media y desviaciones estándar del Zscore de los pacientes MHP, PKU en su conjunto y PKU por fenotipos. Al igual que en las tablas, no se observan importantes desviaciones de la normalidad hasta el final de la pubertad.

Estos resultados demuestran que los pacientes fenilcetonúricos, independientemente de su fenotipo, tienen un peso adecuado para su edad.



Figura 4.14.- Evolución del Peso ( $p50 \pm 2 DS$ ) de pacientes PKU (en rojo) respecto a la normalidad (en negro).

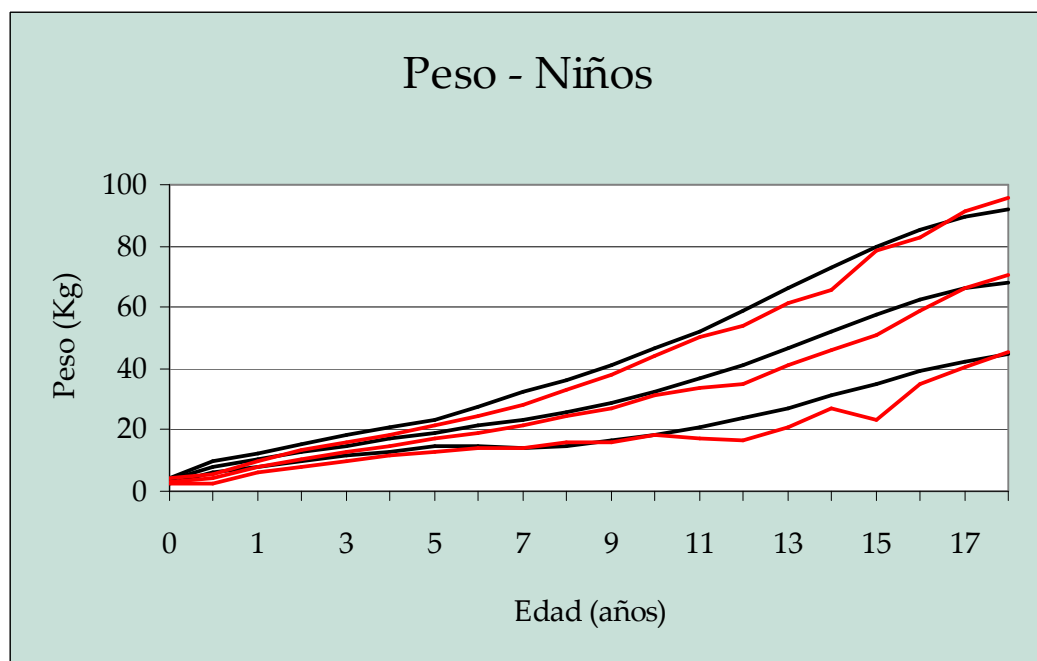
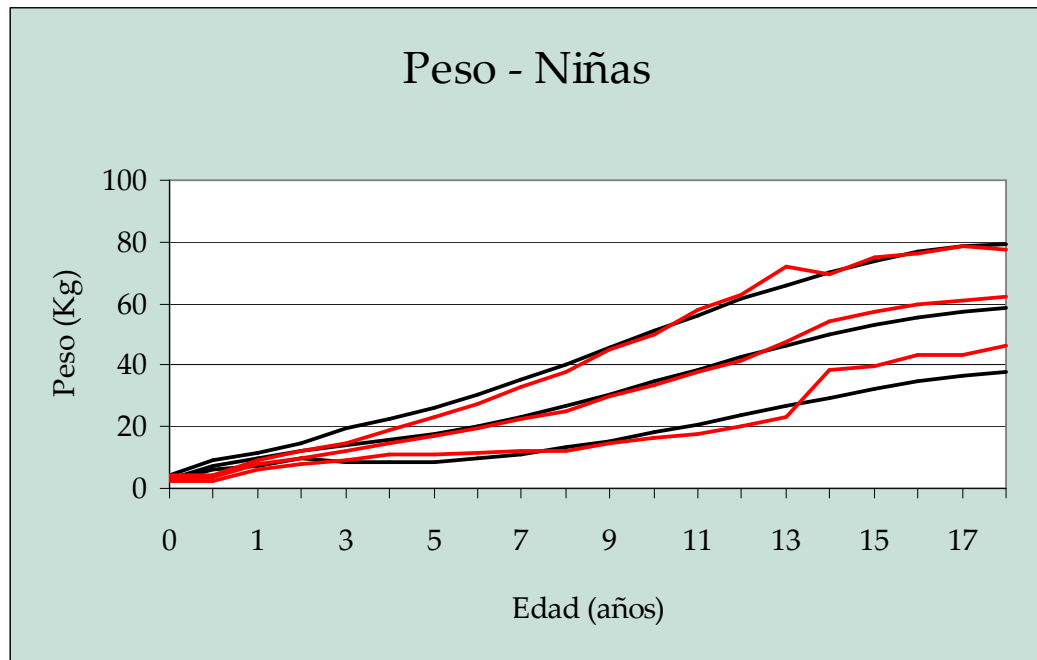


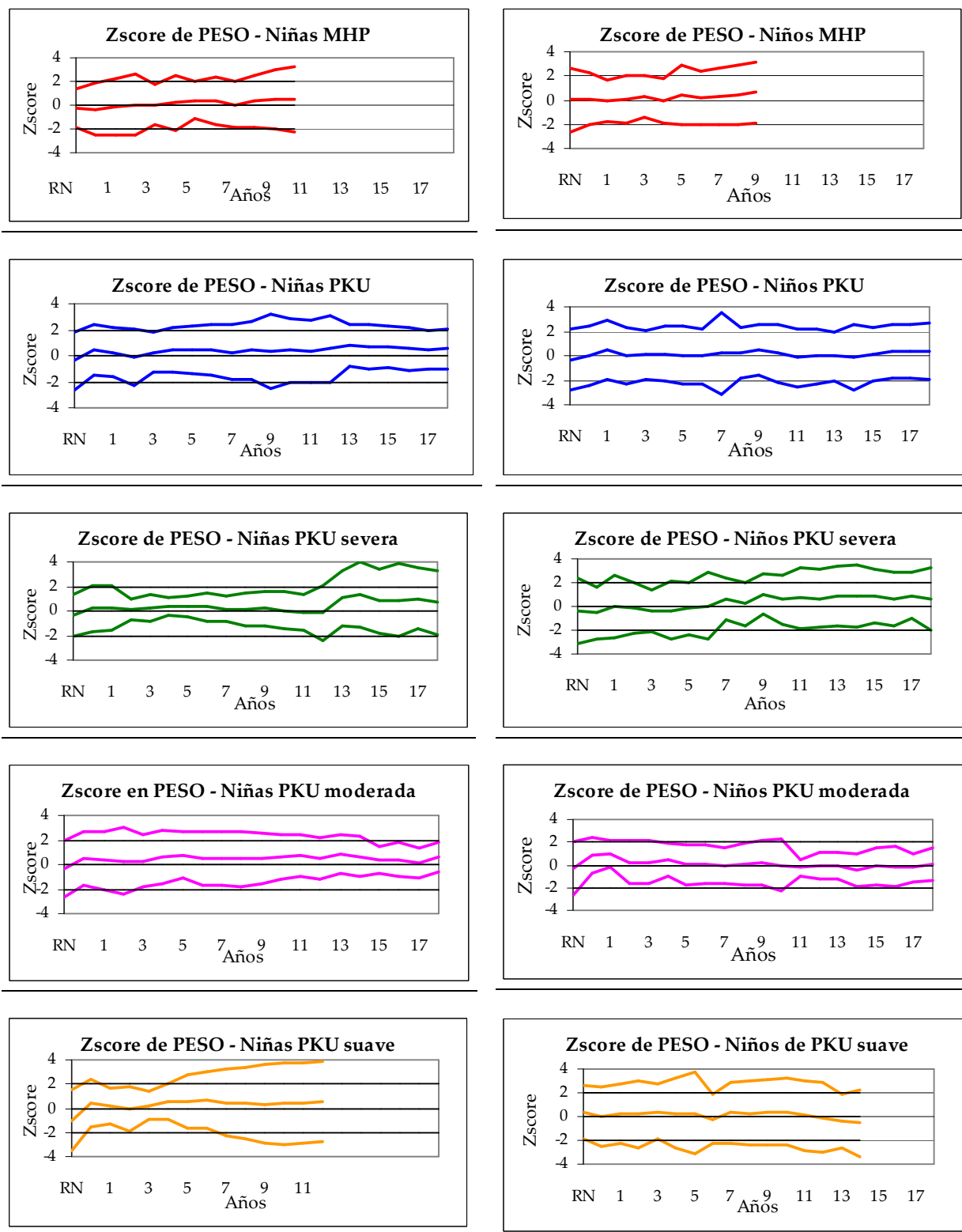
Tabla 4.18.- Zscore de Peso de Niñas con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

<b>Zscore PESO - NIÑAS</b>										
EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	-0,43	0,83	-0,50	1,10	-0,54	0,87	-0,22	1,17	-0,75	1,26
6 meses	-0,16	1,08	0,34	0,98	0,38	0,93	0,39	1,10	0,27	0,97
1 año	-0,01	1,19	0,36	0,94	0,53	0,91	0,37	1,17	0,21	0,75
2 años	0,32	1,27	0,19	1,06	0,14	0,42	0,53	1,35	0,08	0,92
3 años	0,18	0,84	0,36	0,76	0,28	0,53	0,47	1,04	0,29	0,59
4 años	0,70	1,17	0,63	0,85	0,32	0,35	0,79	1,11	0,61	0,72
5 años	0,56	0,79	0,67	0,91	0,39	0,41	0,66	0,96	0,88	1,10
6 años	0,67	1,02	0,66	0,99	0,34	0,58	0,66	1,07	0,90	1,15
7 años	0,47	0,96	0,62	1,07	0,26	0,53	0,63	1,08	0,87	1,37
8 años	0,45	1,09	0,65	1,12	0,38	0,67	0,63	1,12	0,92	1,47
9 años	0,49	1,24	0,52	1,42	0,41	0,67	0,75	1,02	0,89	1,63
10 años			0,64	1,22	0,15	0,75	0,80	0,93	0,78	1,70
11 años			0,61	1,20	0,00	0,71	0,77	0,86	0,84	1,64
12 años			0,74	1,30	0,23	1,13	0,66	0,85	1,20	1,68
13 años			0,87	0,80	0,97	1,12	0,84	0,80	0,83	0,66
14 años			0,85	0,86	1,03	1,32	0,84	0,79		
15 años			0,59	0,79	0,81	1,31	0,41	0,54		
16 años			0,49	0,84	0,73	1,46	0,41	0,70		
17 años			0,38	0,74	0,68	1,25	0,32	0,58		
18 años			0,30	0,77	0,35	1,29	0,43	0,61		

Tabla 4.19.- Zscore de Peso de Niños con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

<b>Zscore PESO - NIÑOS</b>										
EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	-0,10	1,32	-0,50	1,24	-0,86	1,40	-0,41	1,18	-0,13	1,12
6 meses	0,21	1,08	0,02	1,22	-0,75	1,09	0,73	0,79	0,36	1,27
1 año	-0,11	0,85	0,37	1,21	-0,12	1,31	1,13	0,58	0,34	1,23
2 años	-0,11	1,00	0,13	1,13	-0,23	1,07	0,22	0,96	0,61	1,40
3 años	0,33	0,89	0,14	0,99	-0,22	0,86	0,34	0,98	0,57	1,16
4 años	0,00	0,94	0,36	1,11	0,09	1,23	0,50	0,73	0,61	1,45
5 años	0,42	1,23	0,42	1,16	0,20	1,09	0,48	0,89	0,74	1,70
6 años	0,42	1,13	0,39	1,12	0,67	1,40	0,23	0,84	0,15	1,02
7 años	0,50	1,17	0,08	1,66	0,42	0,88	0,28	0,77	0,72	1,29
8 años	0,90	1,24	0,55	1,01	0,47	0,90	0,42	0,89	0,82	1,34
9 años	1,16	1,25	0,67	1,04	0,75	0,84	0,49	1,00	0,83	1,37
10 años			0,59	1,18	0,64	1,05	0,38	1,17	0,81	1,41
11 años			0,35	1,17	0,75	1,27	-0,27	0,34	0,72	1,49
12 años			0,33	1,14	0,70	1,24	-0,18	0,58	0,55	1,47
13 años			0,17	0,99	0,82	1,24	-0,11	0,60	-0,03	1,13
14 años			0,14	1,31	0,94	1,45	-0,54	0,73		
15 años			0,24	1,07	-0,06	3,01	-0,38	0,81		
16 años			0,18	1,10	1,09	1,10	-0,41	0,89		
17 años			0,37	1,07	1,28	0,97	-0,24	0,64		
18 años			0,40	1,16	1,36	1,30	-0,15	0,70		

**Figura 4.15.- Zscore del Peso (p50 ± 2DS) de Pacientes con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.**



#### 4.2.3.4.3.- Índice de Masa Corporal (IMC)

Los percentiles de talla, peso e índice de masa corporal de los pacientes PKU según la edad y el sexo se mostraron anteriormente en las tablas 4.13 y 4.14.

Los percentiles del Índice de Masa Corporal según la edad de los pacientes PKU se muestran en la figura 4.16. También se ha estudiado el IMC a las distintas edades de los pacientes PKU mediante la determinación del Zscore para cada paciente a cada edad. La interpretación de los resultados es igual que para los Zscore de talla (normal  $0 \pm 2$ ). Como se observa en las tablas 4.20 y 4.21, la media del Zscore para pacientes PKU es siempre próxima a cero, con una desviación estándar mínima. No se han encontrado diferencias significativas con la normalidad utilizando análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples salvo en las niñas PKU severas a partir de los 13 años y en los niños severos a partir de los 18 años, en los que el IMC es significativamente superior a la normalidad ( $p < 0,001$ ).

La figura 4.17 muestra la evolución para las distintas edades de la media y desviaciones estándar del Zscore de los pacientes MHP, PKU en su conjunto y PKU por fenotipos. Al igual que en las tablas, no se observan importantes desviaciones de la normalidad hasta alcanzar la edad adulta.

Estos resultados demuestran que los pacientes fenilcetonúricos, independientemente de su fenotipo, tienen un IMC adecuado para su edad.

Figura 4.16.- Evolución del Índice de Masa Corporal ( $p50 \pm 2$  DS) de pacientes PKU (en rojo) respecto a la normalidad (en negro).

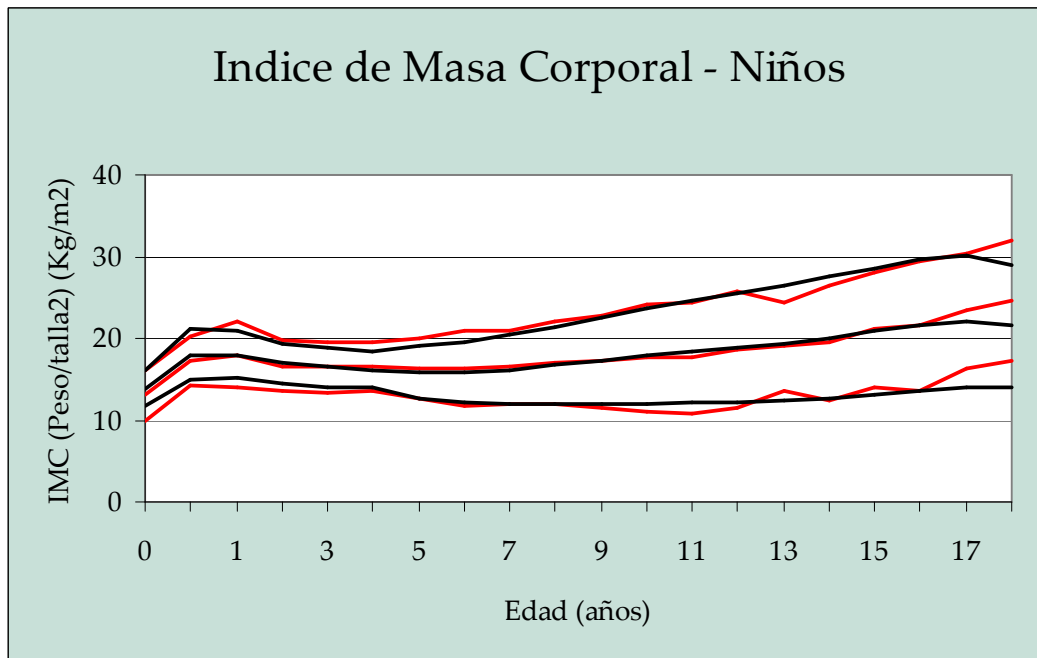
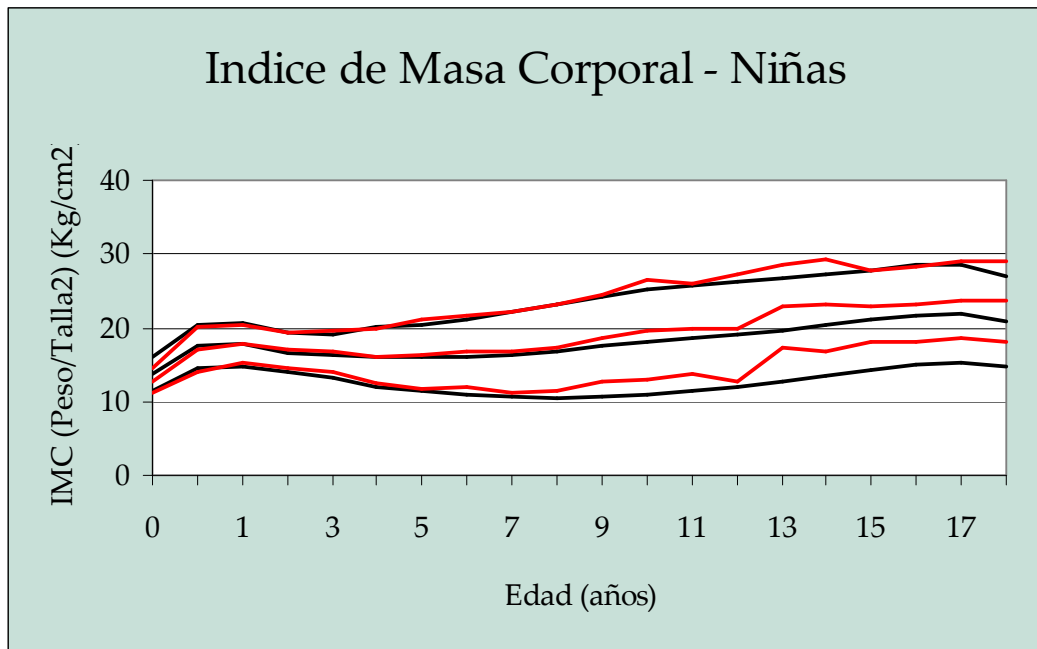


Tabla 4.20.- Zscore de IMC de Niñas con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

**Zscore IMC - NIÑAS**

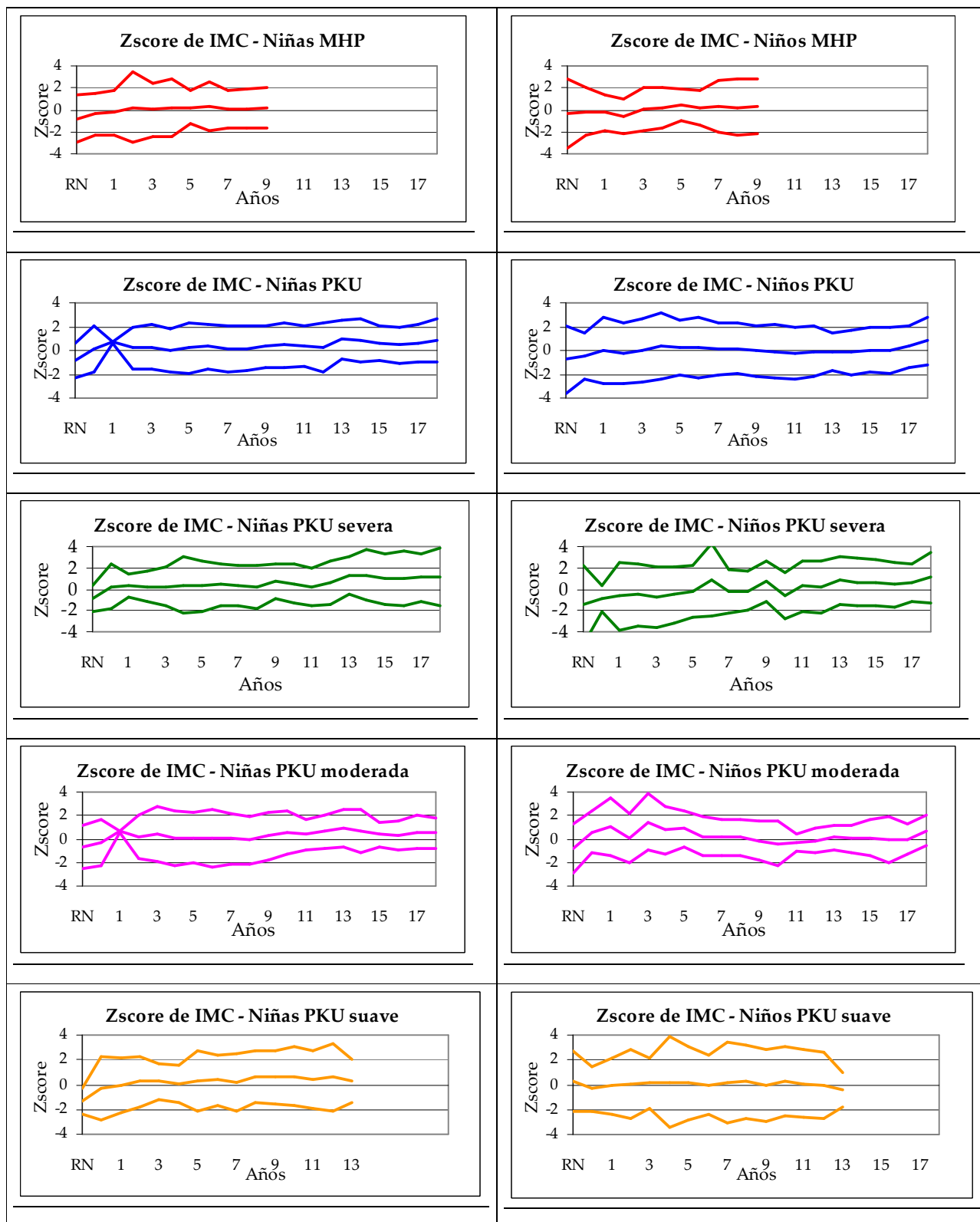
EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	-0,95	1,09	-0,92	0,72	-0,79	0,59	-0,72	0,93	-1,25	0,53
6 meses	-0,34	0,95	0,00	0,98	0,09	1,07	-0,17	1,00	-0,23	1,26
1 año	-0,33	1,02	0,67	0,05	0,17	0,56	0,65	0,03	0,23	1,12
2 años	0,36	1,60	0,13	0,88	0,05	0,70	0,19	0,90	0,12	1,03
3 años	0,02	1,20	0,32	0,95	0,09	0,92	0,58	1,19	0,20	0,71
4 años	0,46	1,33	0,38	0,90	0,69	1,33	0,70	1,15	0,30	0,73
5 años	0,13	0,73	0,40	1,07	0,44	1,20	0,48	1,08	0,66	1,22
6 años	0,58	1,11	0,48	0,95	0,70	0,98	0,62	1,24	0,59	1,03
7 años	0,28	0,87	0,47	0,96	0,74	0,97	0,43	1,06	0,71	1,17
8 años	0,34	0,88	0,48	0,93	0,75	1,00	0,42	1,03	0,75	1,06
9 años	0,35	0,92	0,61	0,87	0,75	0,80	0,70	0,99	0,68	1,05
10 años			0,60	0,95	0,69	0,93	0,76	0,93	0,64	1,18
11 años			0,50	0,87	0,46	0,86	0,66	0,65	0,60	1,16
12 años			0,57	1,04	0,59	1,02	0,58	0,71	0,77	1,34
13 años			0,82	0,83	1,26	0,90	0,95	0,80	0,59	0,86
14 años			0,90	0,92	1,05	1,21	0,97	0,92	0,66	0,73
15 años			0,65	0,71	0,86	1,18	0,57	0,53	0,53	0,31
16 años			0,53	0,76	0,78	1,31	0,36	0,59	0,60	0,37
17 años			0,48	0,79	0,86	1,11	0,45	0,70	0,26	0,69
18 años			0,76	0,89	0,95	1,37	0,45	0,64	0,79	0,69

Tabla 4.21.- Zscore de IMC de Niños con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa.

<b>Zscore IMC - NIÑOS</b>										
EDAD	MHP		PKU		PKU severo		PKU moderado		PKU suave	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Nacim.	-0,33	1,59	-0,70	1,42	-1,00	1,87	-0,66	1,05	-0,37	1,22
6 meses	-0,46	1,08	-0,35	0,97	-1,02	0,61	0,37	0,90	-0,15	0,90
1 año	-0,35	0,82	0,11	1,38	-0,24	1,58	0,66	1,22	0,07	1,13
2 años	-0,57	0,80	0,03	1,30	-0,26	1,47	0,09	1,03	0,42	1,40
3 años	0,23	0,97	0,27	1,32	-0,23	1,42	0,66	1,20	0,74	1,02
4 años	-0,02	0,92	0,56	1,41	-0,07	1,33	0,97	1,01	1,12	1,82
5 años	0,47	0,72	0,57	1,14	0,24	1,23	0,82	0,78	0,76	1,48
6 años	0,30	0,78	0,65	1,29	0,96	1,67	0,45	0,83	0,43	1,19
7 años	0,46	1,17	0,41	1,09	0,33	1,01	0,25	0,78	0,78	1,62
8 años	0,86	1,27	0,31	1,05	0,13	0,93	0,20	0,77	0,70	1,50
9 años	0,81	1,23	0,36	1,06	0,41	0,94	0,13	0,84	0,63	1,46
10 años			0,24	1,13	0,13	1,06	0,00	0,95	0,65	1,40
11 años			0,09	1,07	0,37	1,19	-0,44	0,35	0,47	1,37
12 años			0,19	1,05	0,48	1,21	-0,25	0,53	0,41	1,32
13 años			0,10	0,77	0,58	1,09	-0,04	0,52	-0,15	0,68
14 años			0,09	0,95	0,61	1,11	-0,25	0,61		
15 años			0,07	0,91	0,74	1,11	-0,22	0,75		
16 años			0,10	0,98	0,68	1,06	-0,13	0,99		
17 años			0,30	0,87	0,97	0,90	0,09	0,66		
18 años			0,89	0,99	1,57	1,21	0,64	0,64		



Figura 4.17.- Zscore del Peso ( $p50 \pm 2DS$ ) de Pacientes con Deficiencia de Fenilalanina Hidroxilasa (en color).



#### **4.2.3.5.- Evolución neurológica de los pacientes con deficiencia de PAH**

##### **4.2.3.5.1.- Clínica neurológica presentada por los pacientes PKU.**

Durante el periodo a estudio tuvimos 140 pacientes diagnosticados en el periodo neonatal, 112 diagnosticados en nuestra Unidad y 28 casos remitidos posteriormente desde otros centros. De los pacientes con diagnóstico en el periodo neonatal, 138 tuvieron un desarrollo psicomotor adecuado y tienen coeficientes intelectuales normales a lo largo de su vida. La evolución del cociente intelectual de todos ellos se describe en más detalle en otra sección de esta tesis doctoral.

Sólo 2 pacientes han presentado un retraso madurativo de etiología no filiada. Ambas pacientes tienen un fenotipo suave y tienen actualmente una edad de 21 y 26 años. Las dos fueron diagnosticadas en edad neonatal en otro centro y remitidas a nuestra consulta con 30 meses y 8 años de vida respectivamente. Siempre han tenido los niveles de fenilalanina por debajo de los niveles de riesgo neurológico para su edad, y su cociente intelectual, de 63 y 50, no ha variado a lo largo del tiempo a pesar del tratamiento. Las pruebas de imagen y de neurofisiología han sido normales. Con estos datos no es posible atribuir su retraso psicomotor a su fenilcetonuria.

Tuvieron síntomas compatibles con el síndrome de hiperactividad y déficit de atención 37 pacientes (24%), de los cuales 15 tenían fenotipo benigno (8,8% de la población MHP), 3 eran suaves, 10 moderados y 9 severos (20% de la población PKU).

Durante el periodo a estudio se han seguido 20 pacientes diagnosticados de forma tardía, de los cuales 14 tenían un fenotipo benigno. Los pacientes con un fenotipo benigno tenían al diagnóstico y mantuvieron unas habilidades psicomotoras normales. Los 6 pacientes diagnosticados de forma tardía y que precisaban dieta tuvieron en el momento de su diagnóstico un retraso psicomotor en todos los casos, pero éste era de gravedad variable, desde pacientes con un coeficiente intelectual en el

límite de la normalidad, a casos con coeficientes intelectuales de 20, sin habla y con manierismos e importantes alteraciones del comportamiento. En todos estos pacientes, y como se expone posteriormente en el apartado sobre coeficiente intelectual, la instauración del tratamiento mejoró el rendimiento en las pruebas psicomotoras y normalizó o mejoró su comportamiento e interacción social.

Dos pacientes con fenotipos moderado y severo, tuvieron una epilepsia mioclónica benigna. Debutaron a los 12 años de edad, con controles de electroencefalograma previos normales. Tras 5 años de tratamiento, éste se suspendió y ambas siguen sin alteraciones a la edad de 21 y 22 años.

En cuanto a los pacientes adultos, los que continuaron con el tratamiento sin interrupciones han permanecido asintomáticos. Dos pacientes que abandonaron el tratamiento en la adolescencia presentaron síntomas de ansiedad y depresión que tuvieron una discreta mejoría al reiniciar la dieta, pero sin desaparición total de los síntomas. La mejoría es sólo parcial probablemente en parte porque persisten los factores socio-económicos que propiciaron las alteraciones psicológicas, pero también en parte a que les es difícil cumplir estrictamente con el tratamiento. Otros pacientes adultos que abandonaron la dieta o la siguen de forma laxa no han tenido sintomatología.

#### **4.2.3.5.2.- Resultados de las pruebas de neuroimagen y neurofisiología**

A los 9 años se realizaron un electroencefalograma y una resonancia magnética cerebral a todos los pacientes, independientemente de su clínica o su fenotipo. En nuestra Unidad habían alcanzado esa edad en el año 2004, 70 pacientes, 21 con fenotipo benigno, 2 con fenotipo muy suave, 11 suaves, 22 moderados y 13 severos.

La resonancia magnética cerebral fue normal en la mayoría de los casos. En dos hermanos se encontraron quistes aracnoideos que no producían síntomas. En 7 pacientes se observó una leucodistrofia periventricular. Estos hallazgos corresponden a

2 pacientes con fenotipo severo, 4 moderados, y uno muy suave. Todos ellos se encontraban asintomáticos y sin clínica neurológica, pero coincidía la realización de la prueba de imagen con un periodo prolongado de mal control metabólico. En todos los casos la resonancia se normalizó al reducir los niveles de fenilalanina en sangre. Llamen la atención las resonancias de 2 pacientes con fenotipo benigno que tenían signos de una muy leve leucodistrofia periventricular, a pesar de tener los pacientes controles de fenilalanina adecuados en sangre. Estas imágenes pueden ser compatibles con pequeños retrasos en la mielinización que son normales hasta edades avanzadas, y que no se corresponden con lesiones neurológicas.

El electroencefalograma fue normal en todos ellos salvo en dos casos, uno con fenotipo benigno y otro con fenotipo severo, que presentaron descargas puntuales sin generalización secundaria. Estos dos pacientes se encontraban asintomáticos en el momento del estudio y posteriormente no han tenido clínica compatible con crisis convulsivas.

En 43 pacientes se llevaron a cabo además las siguientes pruebas neurofisiológicas: potenciales evocados auditivos, visuales y somatosensoriales. Estas pruebas se hicieron a 9 pacientes con fenotipo benigno, 2 muy suaves, 9 suaves, 14 moderados y 9 severos. En todos ellos, e independientemente de su fenotipo o control metabólico, las pruebas fueron normales. Por este motivo a partir del año 1994 no se realizaron estas pruebas de forma sistemática y no fue necesario hacerlas a ningún paciente ya que no tuvieron clínica compatible con alteraciones en estos estudios.

#### **4.2.3.5.3.- Evolución del Coeficiente Intelectual (CI) de los pacientes PKU**

Como ya se ha explicado en el apartado de Material y Métodos, a los 154 pacientes se les realizaron medidas repetidas del coeficiente intelectual a los 18 meses, 3 años, 6 años, 9 años y 13-14 años de vida (coeficiente intelectual final). Según la edad del paciente se utilizaron los siguientes exámenes:

- 18 meses: Brunete-Lezine
- 3 años: McCarthy
- 6 años: WISC, Goodenough, Bender, Lecto-escritura
- 9 años: WISC-R, Goodenough, Raven Color, Terman-Merrill-R, Lecto-escritura
- 13-14 años (CI final): WISC-R, Goodenough, Raven, Bender, Lecto-escritura.

Para evitar diferencias en los criterios de diferentes examinadores, todas las determinaciones se realizaron en el Centro de Salud Mental de Niños y Adolescentes por el Dr. Alamán a los 18 meses y por la Dra. Loriga en el resto de los tiempos.

El CI total de los pacientes (excluyendo aquellos con diagnóstico tardío) a las distintas edades utilizando medias marginales estimadas fue de:

- 18 meses:  $103,17 \pm 9,35$
- 3 años:  $107,41 \pm 12,10$
- 6 años:  $109,46 \pm 12,10$
- 9 años:  $101,69 \pm 15,84$
- 14 años:  $106,63 \pm 14,09$

Estas determinaciones se encuentran en todas las edades dentro del rango de la normalidad, que es de  $100 \pm 20$ . Hay pequeñas diferencias en la media a las distintas edades con un pico máximo en los resultados a los 6 años que resultó significativo con una  $p < 0,001$  en un estudio de varianza univariante con comparaciones múltiples contrastadas mediante la prueba de Student-Newman-Keuls. Entre los resultados a las otras edades estas diferencias no fueron significativas.

4.2.3.5.3.1.- Diferencias entre el CI verbal y manipulativo:

Para determinar el coeficiente intelectual global se hace una media entre los distintos parámetros estudiados, fundamentalmente las habilidades manipulativas y verbales. Para observar si los pacientes fenilcetonúricos tenían estos dos tipos de habilidades intelectuales compensadas o no se compararon los resultados en estas pruebas a las distintas edades (Tabla 4.22).

	Media	N	Desv. Típ.
CI manipulativo 18m	108.54	41	10.144
CI verbal 18m	95.63	41	13.283
CI manipulativo 3a	101.85	34	22.161
CI verbal 3a	95.62	34	20.983
CI manipulativo 6a	107.67	43	15.297
CI verbal 6a	104.95	43	17.082
CI manipulativo 9a	96.67	36	14.560
CI verbal 9a	102.08	36	16.036
CI manipulativo 14a	95.45	22	15.871
CI verbal 14a	98.45	22	21.102

**Tabla 4.22.- Resultados del CI manipulativo y verbal a las distintas edades de pacientes PKU con diagnóstico en edad neonatal.**

En pacientes PKU diagnosticados en edad neonatal tanto el coeficiente intelectual manipulativo como el verbal a las distintas edades fue normal ( $100 \pm 20$ ). Utilizando una prueba T de muestras relacionadas se compararon uno y otro y se observaron diferencias significativas a los 18 meses y 3 años a favor del CI manipulativo ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,002$  respectivamente), mientras que a los 9 años la relación se invierte ( $p < 0,039$ ).

Dado el escaso número de pacientes con diagnóstico tardío no se pudieron hacer comparaciones estadísticas similares.

4.2.3.5.3.2.- Evolución del coeficiente intelectual según el fenotipo del paciente:

También se quiso observar si el fenotipo podía influir en las habilidades intelectuales de los pacientes. Con este estudio se pretendía observar si los niveles de fenilalanina más o menos altos durante los primeros días de vida producían daños cuantificables a largo plazo. Además, aunque todos ellos llevasen tratamiento desde el periodo neonatal y los rangos de control fuesen similares, los pacientes con fenotipos más graves deben seguir dietas más restrictivas por lo que también se pretendía observar si este tipo de dietas influía de alguna manera en el resultado intelectual. Los resultados según el fenotipo y en los distintos tiempos de estudio se muestran en la Tabla 4.23.

En todos los grupos y en todas las edades los resultados de CI fueron compatibles con la normalidad. A los 9 y 14 años el número de pacientes con fenotipo muy suave no fue suficiente para realizar estudios comparativos y por eso no fueron incluidos en la Tabla 4.23. Utilizando un análisis de varianza univariante y comparaciones múltiples no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de los distintos fenotipos salvo a los 3 años, en los que el CI de los pacientes con fenotipo benigno tuvo un resultado significativamente superior al CI del resto de los grupos, con una  $p < 0,001$  respecto al fenotipo severo y una  $p < 0,05$  respecto al fenotipo muy suave.

Tiempo	Fenotipo	Media	Desv. típ.
18 meses	Benigno	105,36	10,298
	Muy suave	100,33	12,662
	Suave	101,77	11,001
	Moderado	104,25	6,482
	Severo	100,54	7,688
3 años	Benigno	115,79	8,140
	Muy suave	101,67	6,658
	Suave	103,13	16,470
	Moderado	106,00	11,950
	Severo	100,93	11,042
6 años	Benigno	114,18	14,209
	Muy suave	111,00	10,149
	Suave	106,64	12,364
	Moderado	111,47	11,070
	Severo	105,28	10,334
9 años	Benigno	107,09	17,897
	Suave	96,64	19,397
	Moderado	104,13	14,329
	Severo	99,54	10,413
14 años	Benigno	110,00	14,142
	Suave	89,87	23,841
	Moderado	101,82	13,797
	Severo	102,00	11,576

**Tabla 4.23.- Resultados del estudio de CI en las distintas edades y para los diferentes fenotipos.**

**4.2.3.5.3.3.- Evolución del coeficiente intelectual según la edad al diagnóstico del paciente:**

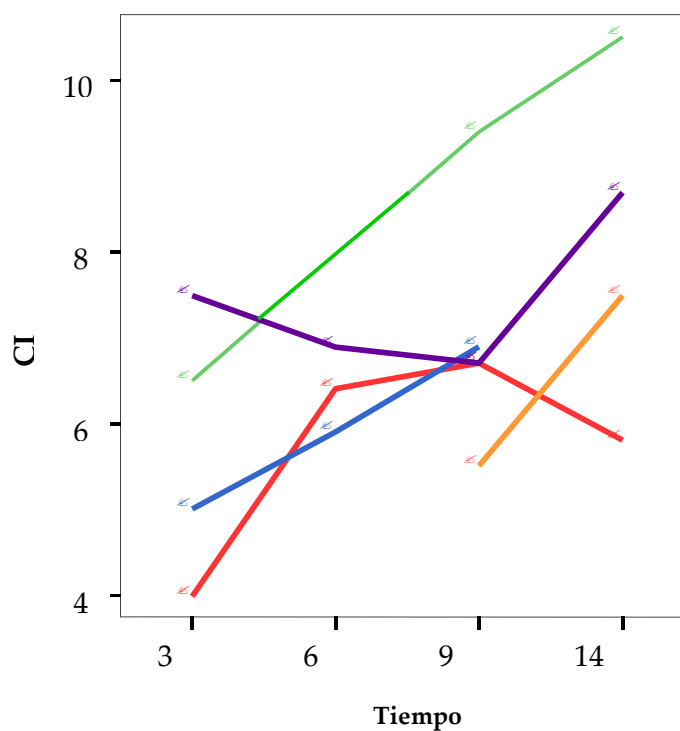
En los pacientes con diagnóstico precoz (menor a 61 días de vida) utilizando un análisis de varianza univariante (pruebas de efectos inter-sujetos, comparaciones múltiples) no se encontraron variaciones significativas entre los CI de cada paciente en los distintos tiempos, es decir, el CI no se modificó sustancialmente a lo largo de la vida de los pacientes.

En cambio, en los pacientes con un diagnóstico tardío (superior a los 61 días de vida), la diferencia sí es significativa con una  $p$  de 0,045. Para este estudio se incluyeron únicamente los 5 pacientes con diagnóstico tardío que aún no habían alcanzado el CI



final, que precisaban tratamiento, y en los que se podía objetivar la evolución de las pruebas psicométricas una vez iniciada la dieta. La evolución del CI de estos pacientes se puede observar en la figura 4.18.

En todos ellos se observa una clara mejoría del CI final respecto del inicial, llegando incluso en un caso a alcanzar un coeficiente intelectual final normal. Estos resultados demuestran que es beneficioso tratar a todos los pacientes aunque el diagnóstico se haga en edades avanzadas de la vida, porque aunque no se consiga una recuperación total de sus capacidades intelectuales siempre se obtiene una mejoría, que en algunos casos es sustancial.



**Figura 4.18.- Evolución del CI total de los pacientes con diagnóstico tardío una vez iniciado el tratamiento dietético.** En todos los casos se observa una mejoría progresiva del CI. La paciente representada en rojo tiene un CI final más bajo que en controles previos probablemente porque realizó el estudio durante un episodio febril.

#### 4.2.3.5.4.- Factores que afectan el CI final obtenido por los pacientes PKU

Mediante estos estudios se intentó identificar los distintos factores que pudieron influir en el coeficiente intelectual final obtenido por nuestros pacientes, con el fin de evitar en un futuro, en la medida de lo posible, aquellos que fueron en detrimento de su desarrollo cognitivo.

##### 4.2.3.5.4.1.- *Edad al diagnóstico:*

Como se puede extraer de los resultados anteriormente descritos, el CI intelectual final de los pacientes diagnosticados precozmente (menos de 61 días de vida) alcanzó en casi todos los casos valores normales, independientemente de su fenotipo. La media y desviación estándar de estos resultados fue de  $106,63 \pm 14,09$ . Las únicas excepciones son las 2 pacientes con fenotipo suave y que a pesar de tener controles de fenilalanina adecuados, tienen un retraso psicomotor de etiología no filiada.

Por el contrario, los pacientes PKU diagnosticados tardíamente y a pesar del tratamiento, no alcanzaron valores de CI en el rango de la normalidad salvo en un caso. La media del CI total final de estos pacientes fue de  $53,43 \pm 25,69$ .

La diferencia entre ambas medias utilizando una prueba T de Student para muestras independientes fue significativa con una  $p < 0,005$ . Esto indica que la edad al diagnóstico es uno de los factores determinantes del cociente intelectual final, a pesar del beneficio obtenido con el tratamiento incluso si el diagnóstico es tardío.

La figura 4.19 muestra el CI final obtenido por 164 pacientes PKU y MHP, según su edad al diagnóstico. Se considera normal un CI de 90 a 110.

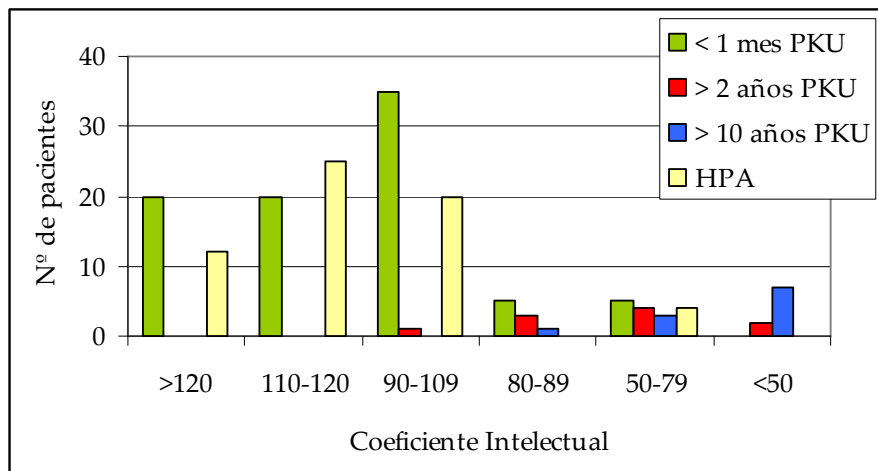


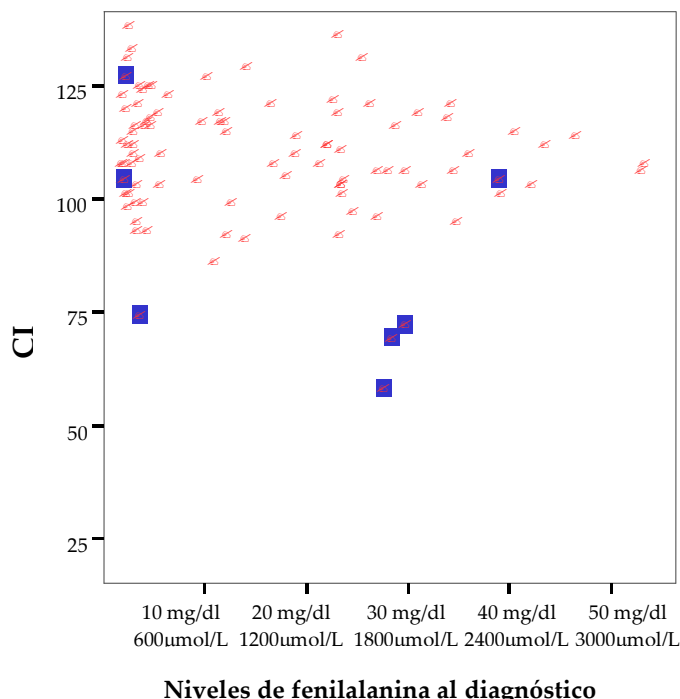
Figura 4.19.- Coeficientes intelectuales alcanzados por los pacientes según su edad al diagnóstico.

#### 4.2.3.5.4.2.- *Niveles de fenilalanina al diagnóstico (fenotipo):*

Anteriormente se han comentado los resultados de la comparación del CI total de los pacientes a las distintas edades, no encontrándose diferencias significativas en el CI final entre los distintos fenotipos si el tratamiento se iniciaba precozmente.

Utilizando pruebas no paramétricas (Rho de Spearman) se corrobora este resultado al encontrar un coeficiente de correlación entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico y el CI final de  $-0,161$  (no significativo). Ver figura 4.20.

En este último análisis se incluyeron los pacientes con diagnóstico tardío. Este resultado indica que el grado de elevación en los niveles de fenilalanina al diagnóstico no determina el coeficiente intelectual, incluso cuando el diagnóstico no se realiza en edad neonatal.



**Figura 4.20.- Correlación entre el CI final y los niveles de fenilalanina al diagnóstico.** En color rojo se muestran los valores de los pacientes con diagnóstico precoz, y en azul los de pacientes con diagnóstico tardío. En ambos casos la correlación no fue significativa.

#### 4.2.3.5.4.3.- Control metabólico:

Como ya se comentó en un apartado anterior, nuestros pacientes mantuvieron habitualmente los niveles de fenilalanina en rangos adecuados y sólo sufrieron elevaciones de estos niveles de forma puntual, sobre todo por procesos febriles. Algunos pacientes tienden a tener peor control metabólico de forma mantenida al realizar frecuentes transgresiones dietéticas, pero estos casos no fueron suficientes para poder hacer estudios estadísticos. Además, los pacientes comienzan a realizar transgresiones dietéticas de una forma generalizada a partir de la adolescencia, después o poco tiempo antes de la obtención del CI final.

Para poder comparar el efecto del control metabólico en un amplio grupo de pacientes se utilizaron los CI a los 9 años de los pacientes diagnosticados antes del año 1991 y en los que durante los primeros años de vida (hasta 1994) se consideraron adecuados niveles de hasta 10 mg/dl (n=44), y los pacientes diagnosticados

posteriormente, en los que el nivel de corte se estableció en 6 mg/dl (n=29). El CI final del primer grupo fue  $101,07 \pm 16,70$ , mientras que la del grupo de pacientes más joven fue  $106,28 \pm 14,84$ . La diferencia entre ambas medias utilizando una prueba T de Student para muestras independientes no fue significativa.

#### 4.2.3.5.4.4.- Sexo del paciente:

Teniendo en cuenta que los varones, sobre todo durante la adolescencia, tienden a tener peor control metabólico se quería saber si esto influía en su coeficiente intelectual final. El CI final de los varones fue  $102,12 \pm 16,01$  y el de las mujeres  $103,98 \pm 16,30$ . La diferencia entre ambas medias utilizando una prueba T de Student para muestras independientes no fue significativa.

#### 4.2.3.5.4.5.- Factores familiares:

El objetivo de estos estudios fue observar el impacto familiar en el resultado intelectual de nuestros pacientes. Para ello se estudió el coeficiente intelectual de los padres, el nivel socio-económico y el interés que ponían en la evolución de su hijo. Los tres factores se dividieron en 5 grupos y se comparó el CI final de los pacientes PKU diagnosticados en edad neonatal de cada grupo utilizando un análisis de varianza univariante (comparaciones múltiples). Con este método se observó que no existen diferencias significativas entre el CI final de los pacientes a pesar de tener padres con coeficientes intelectuales diversos, salvo en el caso de coeficientes intelectuales familiares muy bajos, cuyos hijos también tuvieron un CI bajo ( $p < 0,0001$ ). Un resultado similar se obtiene al comparar el CI de pacientes de diferente procedencia socio-económica: no hay diferencias entre los distintos estratos, salvo en el caso de las rentas más bajas, cuyos hijos tuvieron peores resultados en la determinación del coeficiente intelectual ( $p < 0,0001$ ). El interés de los familiares por la evolución de sus hijos no produjo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

### **4.3.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACION DE NUEVAS POSIBILIDADES TERAPEUTICAS FARMACOLOGICAS**

#### **4.3.1.- RESULTADOS DEL PROTOCOLO PARA LA VALORACION DE LA RESPUESTA IN VIVO A UNA SOBRECARGA PUNTUAL DE TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Durante el periodo 2002-2007 se estudiaron 63 pacientes, 35 mujeres y 28 varones, con los siguientes fenotipos:

- Hiperfenilalaninemia benigna (MHP): 6 pacientes.
- Fenilcetonuria muy suave: 4 pacientes.
- Fenilcetonuria suave: 24 pacientes.
- Fenilcetonuria moderada: 20 pacientes.
- Fenilcetonuria grave: 9 pacientes.

De estos, 18 eran pacientes en los que se realizó la sobrecarga como parte del diagnóstico diferencial en edad neonatal, mientras que 45 fueron pacientes mayores con edades comprendidas entre los 9 meses y los 35 años.

De los 63 pacientes que participaron en este estudio, 25 tuvieron un descenso significativo en sus niveles de fenilalanina. Dieciocho tuvieron una respuesta positiva con un descenso en sus niveles de fenilalanina a las 8 horas de la ingesta de la BH<sub>4</sub> superior al 30% respecto al nivel basal. En 7 pacientes la respuesta fue lenta, con una reducción significativa en los niveles de fenilalanina tras 16 horas de observación. Todos los pacientes permanecieron asintomáticos y sin efectos secundarios durante y en los días posteriores a la realización de la prueba. La Tabla 4.24 contiene los datos de todos los pacientes incluidos en esta fase del estudio de la respuesta *in vivo* a BH<sub>4</sub>.

**Tabla 4.24.- Datos de los pacientes con deficiencia de PAH en los que se realizó una sobrecarga puntual con BH<sub>4</sub>.** En azul, pacientes con respuesta positiva que siguieron tratamiento con BH<sub>4</sub> a largo plazo. En gris, pacientes con respuesta positiva pero que por distintos motivos no siguieron posteriormente tratamiento con BH<sub>4</sub>.

Ref.	Sexo	Edad	Phe (μM) al Dx	Fenotipo	Alelo 1	Alelo 2	% descenso de Phe
12876	M	10 años	192	MHP	I65T	nd	34
18930	M	Neonato	250	MHP	R176L	P281L	70
18811	V	Neonato	258	MHP	S87R	S349P	78
18801	M	Neonato	300	MHP	D415N	R176X	87
18447	M	Neonato	300	MHP	A300S	R261Q	39
12710	M	38 años	310	MHP	I65T	A300S	61
19548	M	31 años	420	PKU muy suave	IVS10nt3	IVS10nt3	31 (16h)
23395	M	Neonato	420	PKU muy suave	E76G	IVS4nt5	52
19068	V	12 años	500	PKU muy suave	E390G	IVS12nt1	62
21242	V	Neonato	533	PKU muy suave	D129G	IVS1nt5	93
11333	M	13 años	618	PKU suave	P122Q	E76G	62
12572	M	23 años	630	PKU suave	L311P	R408Q	21
14902	V	6 años	672	PKU suave	L48S	I65T	30 (16h)
12531	M	24 años	714	PKU suave	F55fs	I65T	- 14
24528	V	9 meses	738	PKU suave	Y414C	F39del	78
12525	M	17 años	744	PKU suave	IVS10	T418N	26
20115	V	Neonato	840	PKU suave	I65T	D222G	41
20136	V	Neonato	870	PKU suave	I65T	V388M	34
11332	V	12 años	890	PKU suave	Y414C	L348V	67
11648	V	16 años	890	PKU suave	R243Q	Y198fs	- 30
9501	V	18 años	900	PKU suave	V388M	V388M	- 7
12528	V	17 años	1000	PKU suave	Y414C	IVS4nt5	43
21964	V	Neonato	996	PKU suave	V388M	I65T	43 (16h)
10806	M	13 años	1050	PKU suave	IVS7nt3	R68S	21
12576	M	26 años	1060	PKU suave	I65T	P244L	33
12488	V	17 años	1080	PKU suave	R261Q	I65T	13
18236	M	Neonato	1130	PKU suave	R408Q	I65T	32 (16h)
16271	M	3 años	1140	PKU suave	V388M	F39L	37 (4h)
12895	M	8 años	1160	PKU suave	P275R	L348V	49
18091	M	Neonato	1188	PKU suave	Y387H	R261Q	10
9384	M	21 años	1320	PKU moderada	R261Q	I65T	4
17045	V	Neonato	1338	PKU moderada	R261X	R243Q	- 9
8438	V	18 años	1380	PKU moderada	IVS10	I65T	8
8439	V	18 años	1380	PKU moderada	IVS10	I65T	27
11942	V	10 años	1416	PKU moderada	R408W	R261Q	5
12526	M	26 años	1418	PKU moderada	P147S	P281fs	18
12569	M	9 años	1440	PKU moderada	S196fs	I65T	8
9529	M	17 años	1464	PKU moderada	R408W	R261Q	6
6292	M	26 años	1470	PKU moderada	I65T	P211fsdelC	18
12431	V	6 años	1476	PKU moderada	R252W	V388M	- 7
16714	V	Neonato	1476	PKU moderada	R243Q	nd	- 4
10869	M	16 años	1491	PKU moderada	R261Q	R111X	-8
9691	M	20 años	1500	PKU moderada	R261Q	R111X	12
12562	M	18 años	1530	PKU moderada	V388M	IVS10	5
12324	M	9 años	1584	PKU moderada	V388M	I65T	33 (16h)

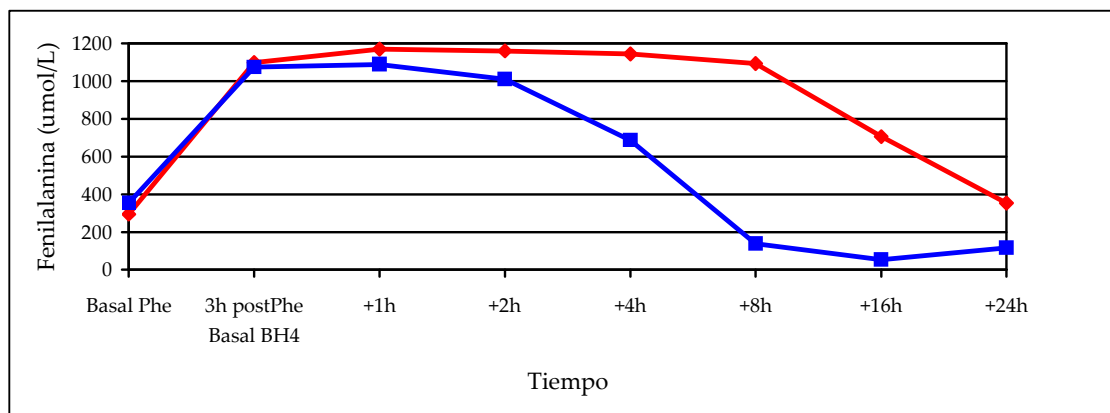
9632	V	27 años	1602	PKU moderada	R243X	R243X	5
11353	M	12 años	1632	PKU moderada	IVS1nt5	L348V	0
12556	V	24 años	1645	PKU moderada	P122Q	F39L	20
10637	M	13 años	1680	PKU moderada	IVS1nt5	A309V	39 (16h)
18149	M	Neonato	1740	PKU moderada	IVS1nt5	IVS4nt5	-12
23191	M	Neonato	1726	PKU moderada	V388M	R408W	28 (20h)
23636	V	13 años	1743	PKU severa	V388M	R408W	32
20384	V	Neonato	1842	PKU severa	IVS4nt5	R261Q	- 6
14661	M	6 años	1920	PKU severa	L311P	P275R	28
14116	V	6 años	1944	PKU severa	IVS10	nd	23
16060	M	4 años	2094	PKU severa	IVS4nt5	I65T	14
15618	M	Neonato	2400	PKU severa	delf39	IVS10	1
16020	M	Neonato	2580	PKU severa	----	----	- 30
11812	V	11 años	3240	PKU severa	nd	I65T	- 7
16550	M	3 años	3242	PKU severa	E280K	R158Q	13

#### **4.3.1.1.- Relación de la respuesta a BH<sub>4</sub> con el fenotipo del paciente**

##### **4.3.1.1.1.- Fenotipo benigno (MHP)**

Los pacientes MHP se estudiaron mediante una doble curva realizada durante 2 días consecutivos: el primer día sólo se les dio una sobrecarga de fenilalanina y el segundo día se aportó la misma cantidad de fenilalanina y 3 horas después BH<sub>4</sub> a 20mg/Kg. En ambos casos se observó una reducción de los niveles de fenilalanina. Este descenso podría ser secundario a la alta actividad PAH residual de estos pacientes, capaz de reducir los niveles de fenilalanina incluso sin la medicación, pero comparando las curvas obtenidas en estos pacientes con y sin tetrahidrobiopterina se observó que el descenso en los niveles de fenilalanina es más rápido (4-8 horas frente a 12-16 horas) y mayor (40-90% frente a 7-33%) con BH<sub>4</sub> que cuando sólo se administró fenilalanina. Por este motivo hemos considerado positiva la respuesta a tetrahidrobiopterina en todos nuestros pacientes MHP.





**Figura 4.21.- Evolución de los valores de fenilalanina del paciente MHP 18801 al realizar la sobrecarga de BH<sub>4</sub> mediante una doble curva:** la curva roja corresponde a la observada tras ingerir únicamente 100mg de fenilalanina vía oral; la curva azul corresponde a la observada tras ingerir la misma cantidad de fenilalanina y 3 horas después tomar 20mg/Kg de BH<sub>4</sub>. En este último caso se observa que el descenso en los niveles de fenilalanina es más acusado y se produce de forma más precoz, por lo que se considera al paciente sensible a BH<sub>4</sub>.

La Tabla 4.25 contiene los datos obtenidos en los pacientes MHP al hacer la doble curva tras administrar 100 mg de fenilalanina con y sin BH<sub>4</sub>. La figura 4.21 muestra las curvas del paciente 18801 como ejemplo del tipo de respuesta observado en pacientes MHP. Las curvas obtenidas en el resto de los pacientes MHP son superponibles a la del ejemplo.

Ref.	Genotipo	Phe (μM) +BH <sub>4</sub> /-BH <sub>4</sub> <sup>a</sup>		% reducción niveles Phe en sangre +BH <sub>4</sub> /-BH <sub>4</sub> <sup>a</sup>			
		-3h	0h	4h	8h	12h	20h
12876	I65T/nd	688 / nd	562 / nd	26 / nd	34 / nd	35 / nd	46 / nd
18930	R176L/P281L	277 / 194	585 / 735	50 / 0	70 / 22	82 / 43	83 / 62
18811	S87R/S349P	46 / 188	646 / 437	59 / 15	78 / 33	65 / 55	67 / nd
18801	D415N/176X	354 / 295	1074 / 1098	36 / 0	87 / 7	92 / 36	nd
18447	A300S/R261Q	267 / nd	1868 / nd	23 / nd	39 / nd	59 / nd	90 / nd
12710	I65T/A300S	649 / 410	1742 / 1420	35 / 11	61 / 17	75 / 35	87 / 54

nd: no determinado.

<sup>a</sup> En la sobrecarga combinada Phe/BH<sub>4</sub> (+BH<sub>4</sub>) la administración de BH<sub>4</sub> (tiempo 0) se realizó 3h después de la sobrecarga con Phe y los niveles de Phe en sangre se monitorizaron durante 24h. Durante la sobrecarga única con Phe (-BH<sub>4</sub>) los niveles de Phe se midieron en los mismos tiempos.

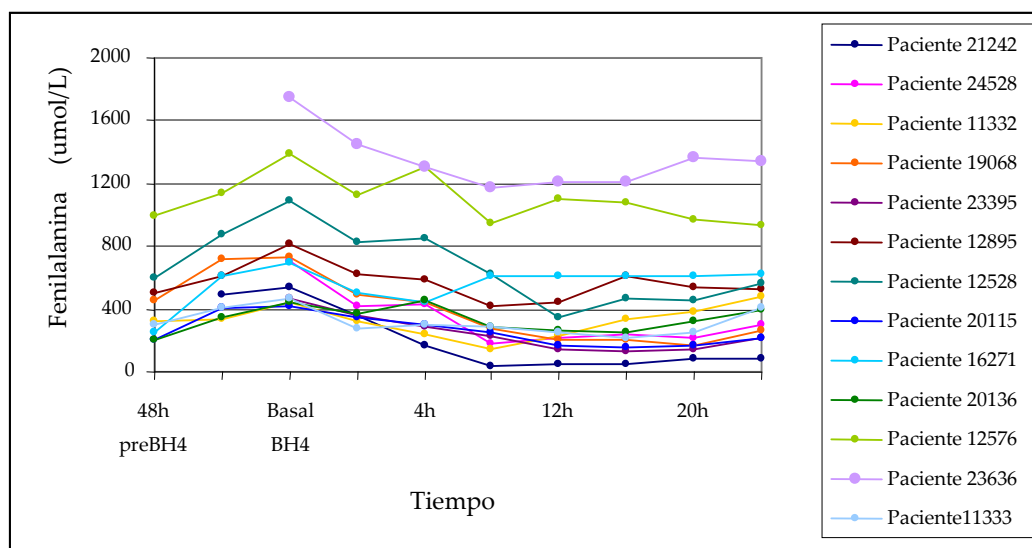
**Tabla 4.24.- Reducción de los niveles de Phe en pacientes MPH durante las sobrecargas de Phe y Phe/BH<sub>4</sub>.**

#### 4.3.1.1.2.- Fenotipos PKU

En los pacientes PKU se asumió que la menor actividad PAH residual no supondría una interferencia en la respuesta observada, y por este motivo se realizó una curva única con dieta libre y BH<sub>4</sub>. En nuestra serie, 11 de los 20 pacientes PKU con fenotipo suave o muy suave tuvieron una respuesta positiva a BH<sub>4</sub>. Uno de los pacientes con fenotipo muy suave, tres con fenotipo suave y tres con fenotipo moderado tuvieron una respuesta lenta.

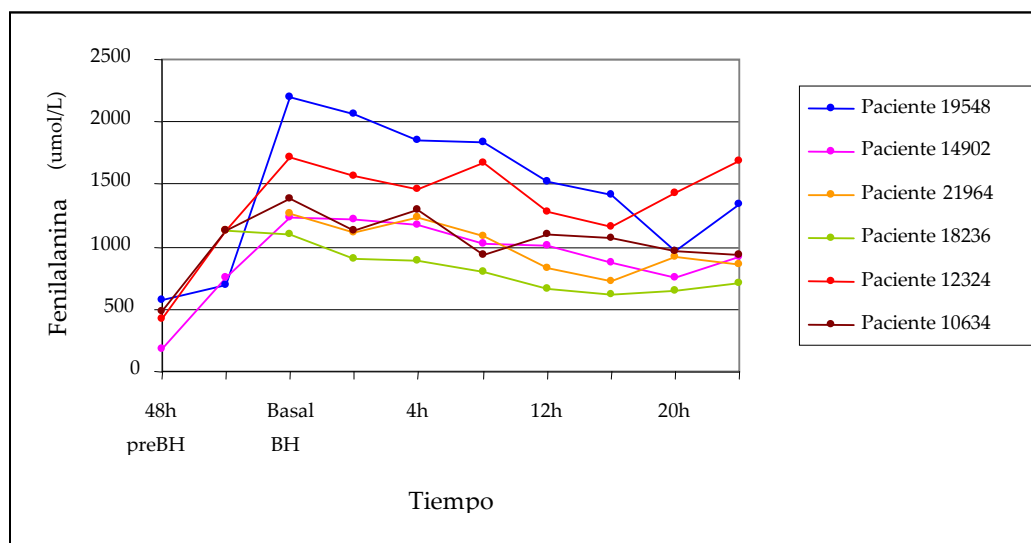
Las siguientes figuras muestran ejemplos de los distintos tipos de curva obtenidos tras la administración de BH<sub>4</sub> en pacientes PKU:

- 1) **Respuestas positivas:** La figura 4.22 muestra las curvas de los pacientes con descensos de los niveles de fenilalanina superiores al 30% a las 4-8h postBH<sub>4</sub>. Corresponden a 13 pacientes PKU, todos con fenotipo suave o muy suave, con la excepción del paciente 23636 que a pesar de tener un fenotipo severo tiene un descenso en sus niveles de fenilalanina de un 32%.



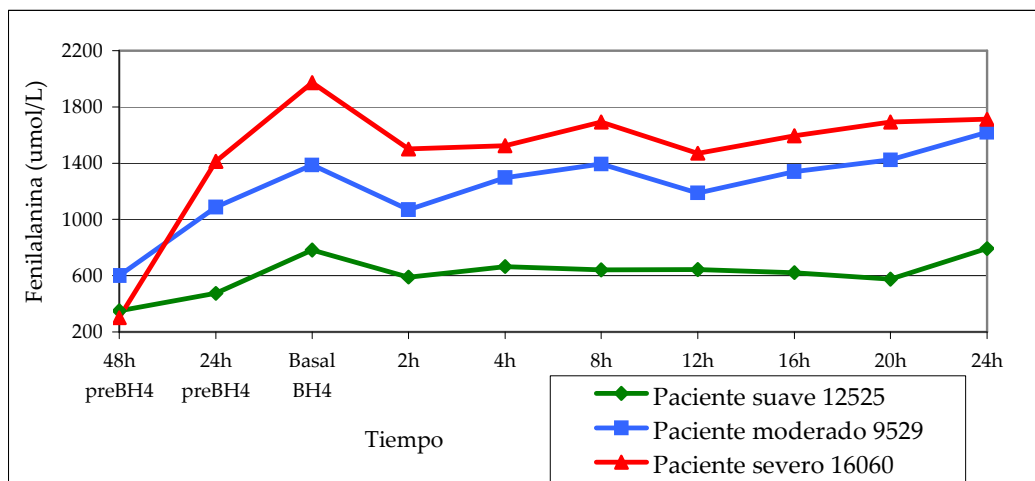
**Figura 4.22.- Respuestas *in vivo* positivas:** muestran descensos superiores al 30% de los niveles de fenilalanina a las 4-8h post BH<sub>4</sub>.

- 2) **Respuestas lentas:** La figura 4.23 muestra las curvas de los pacientes con un descenso superior al 30% de los niveles de Phe pero a las 16-20 horas tras la sobrecarga con BH<sub>4</sub>. Se produjo este tipo de respuesta en una paciente muy suave y tres con fenotipo suave y tres con fenotipo moderado.



**Figura 4.23.- Respuestas *in vivo* positivas lentas:** muestran descensos superiores al 30% de los niveles de fenilalanina a las 16-20h post BH<sub>4</sub>.

- 3) **Faltas de respuesta:** No se produjeron en estos casos cambios suficientes en los niveles de fenilalanina como para sospechar una acción eficaz del medicamento. Este es el caso de algunos pacientes con fenotipo suave y casi todos los pacientes con fenotipos moderado y severo salvo la respuesta positiva del paciente 23636 y las respuestas lentas descritas anteriormente. La figura 4.24 muestra como ejemplo las curvas de tres pacientes, cada uno con un fenotipo distinto, pero todos sin respuesta al tratamiento con tetrahidrobiopterina. Es de señalar que aunque con el tratamiento dietético los pacientes tienen niveles similares de fenilalanina (valores 48h preBH<sub>4</sub>), al liberalizar la dieta la fenilalanina aumenta alcanzando un máximo en cada paciente correspondiente con su fenotipo.



**Figura 4.24.- Falta de respuesta:** Evolución de los niveles de fenilalanina en tres pacientes en los que no se observó un descenso significativo de dichos valores tras la ingesta de BH<sub>4</sub>.

Aunque los mecanismos por los cuales la tetrahydrobiopterina induce una mejoría en la actividad de la PAH son múltiples y no están totalmente dilucidados, parece necesario que la enzima PAH del paciente tenga una cantidad y calidad suficiente como para interactuar con el medicamento administrado. Estas características de la PAH se traducen en la actividad residual de PAH, y clínicamente en el fenotipo de cada paciente. Nuestros resultados muestran que los pacientes con fenotipos benignos y suaves son aquellos en los que la respuesta *in vivo* a BH<sub>4</sub> es más factible. Aunque la respuesta no ha sido estrictamente lineal, en general, cuanto más suave es el fenotipo mejor es la respuesta *in vivo* a BH<sub>4</sub>, con descensos más acusados y más próximos a la normalidad en los niveles de fenilalanina. Ver Tabla 4.26.

Fenotipo	Pacientes estudiados	Pacientes con respuesta positiva
Benigno	6	6 (100%)
Muy suave	4	3 + 1 lenta (100%)
Suave	24	9 + 3 lentas (50%)
Moderado	21	0 + 3 lentas (14%)
Severo	9	1 (11%)

**Tabla 4.26.- Porcentaje de pacientes respondedores a BH<sub>4</sub> según su fenotipo.**

#### 4.3.1.2.- Relación de la respuesta a BH<sub>4</sub> con el genotipo del paciente

La Tabla 4.23 incluye las mutaciones de todos los pacientes que participaron en el estudio. Las mutaciones R176L, S87R y IVS10-3C>T no habían sido descritas con anterioridad a la publicación de nuestros resultados (Desviat et al, 2004).

Llamamos “sensibles a BH<sub>4</sub>” a aquellas mutaciones que confieren una respuesta positiva *in vivo* a la administración del medicamento. La mayoría de los pacientes son heterocigotos para cada mutación y esto dificulta la atribución de la respuesta positiva o negativa a un determinado cambio genético. Hemos clasificado las distintas mutaciones según su relación con una respuesta a BH<sub>4</sub> como:

1) **Mutaciones sensibles a BH<sub>4</sub>**: Hemos considerado que la respuesta a BH<sub>4</sub> se podía atribuir a una mutación determinada cuando:

a.- La mutación se encuentra en homocigosis. Es el caso de la mutación IVS10nt3c>t de la paciente 19548, que da lugar a una respuesta lenta. El resto de los pacientes homocigotos para otras mutaciones estudiados no tuvieron repuestas positivas tras la administración del medicamento, y por lo tanto se puede deducir que esas mutaciones no confieren por sí mismas sensibilidad a BH<sub>4</sub>.

b.- La mutación considerada “sensible” se encuentra en heterocigosis acompañando a una mutación que da lugar a proteínas truncadas o con graves cambios conformacionales y por lo tanto con nula actividad residual. En nuestra serie esta circunstancia se produce con las mutaciones: D129G, E390G, Y414C, D415N y A309V (ésta última da lugar a una respuesta lenta en el paciente 10637).

c.- La presencia de la mutación “sensible” siempre da lugar a una respuesta positiva tras la administración de BH<sub>4</sub>, independientemente de cuál sea la otra mutación acompañante, como por ejemplo la A300S.

2) **Mutaciones sensibles dependiendo de la mutación acompañante:** Hemos observado una serie de mutaciones que no cumplen los criterios anteriores, pero que acompañadas de otras mutaciones concretas sí dan lugar a una respuesta positiva a BH<sub>4</sub>. Son por ejemplo las mutaciones V388M, I65T y F39L. Los pacientes 20136, 12324 y 21964 tienen la combinación V388M/I65T, y todos tienen respuestas positivas tras la administración de la BH<sub>4</sub>, aunque en dos de los pacientes la respuesta sea lenta. La combinación V388M/F39L también da lugar a una respuesta positiva en el paciente 16271, y los dos pacientes con la combinación V388M/R408W también tienen un descenso en sus niveles de fenilalanina. Sin embargo, la mutación V388M en homocigosis (paciente 9501) o con otras mutaciones acompañantes (pacientes 12431, 12562) no da lugar a una reducción suficiente de los niveles de fenilalanina. Lo mismo ocurre con las mutaciones I65T y F39L, que junto con otras mutaciones no da lugar a una respuesta positiva a BH<sub>4</sub> (ver tabla 4.20). Obtenemos similares resultados con las mutaciones P275R y L348V, que en el paciente 12895 dan lugar a sensibilidad al medicamento, pero que por separado no dan lugar a la misma respuesta.

3) **Mutaciones no sensibles a BH<sub>4</sub>:** Son aquellas que no dan lugar a respuestas positivas en la sobrecarga de BH<sub>4</sub> ni en homocigosis ni en ninguna de sus combinaciones en heterocigosis.

4) **Mutaciones con sensibilidad indeterminada:** Finalmente, existen una serie de mutaciones presentes en heterocigosis en los pacientes que tuvieron una respuesta positiva a BH<sub>4</sub>, y que no se hallan en el genotipo de otros casos estudiados. En estas situaciones no es posible determinar por el comportamiento *in vivo* si la respuesta al medicamento se debe exclusivamente a una mutación determinada o, como en los casos referidos anteriormente, requiere la combinación con unas mutaciones concretas para dar lugar a la sensibilidad a BH<sub>4</sub>. Es el caso de las mutaciones: E76G, S87R, P122Q, R176L, D222G, P244L, P281L, S349P y R408Q.

Como ya hemos dicho con anterioridad, parece necesario que la enzima PAH del paciente tenga una cantidad y calidad suficiente como para interactuar con el medicamento administrado. Por lo tanto, es lógico que aquellas mutaciones que den lugar a proteínas con mayor actividad residual sean aquellas en las que la respuesta *in vivo* a BH<sub>4</sub> es más factible. Al igual que ocurría con el fenotipo del paciente (ver Tabla 4.4), aquellas mutaciones con mayor actividad residual *in vitro* (y que se relacionan con fenotipos benignos) son las que también confieren mejor respuesta a la tetrahidrobiopterina. Las mutaciones con una actividad intermedia (V388M, I65T, F39L), son las que confieren un fenotipo y una respuesta a BH<sub>4</sub> según la mutación acompañante. Aquellas mutaciones con poca o nula actividad residual, como son las mutaciones en intrones, confieren un fenotipo severo e imposibilitan el tratamiento medicamentoso. Estas mutaciones producen enzimas muy defectuosos o inexistentes, y por lo tanto es fácil imaginar que el cofactor, a pesar de ser administrado a altas dosis, no encuentre un lugar sobre el que ejercer su acción.

De esta forma, aunque clínicamente una mutación tenga una sensibilidad indeterminada a BH<sub>4</sub>, podemos suponer que la mutación R176L sea responsable de una buena respuesta, mientras que por ejemplo sea la mutación S87R y no la mutación S349P la que propicia el descenso en los niveles de fenilalanina en el paciente 18811.

Es importante señalar que las mutaciones sensibles a BH<sub>4</sub> no se encuentran necesariamente en la región del genoma que codifica la zona de unión con el cofactor, sino que se encuentran diseminadas por todo el gen, como se aprecia en la figura 4.25.

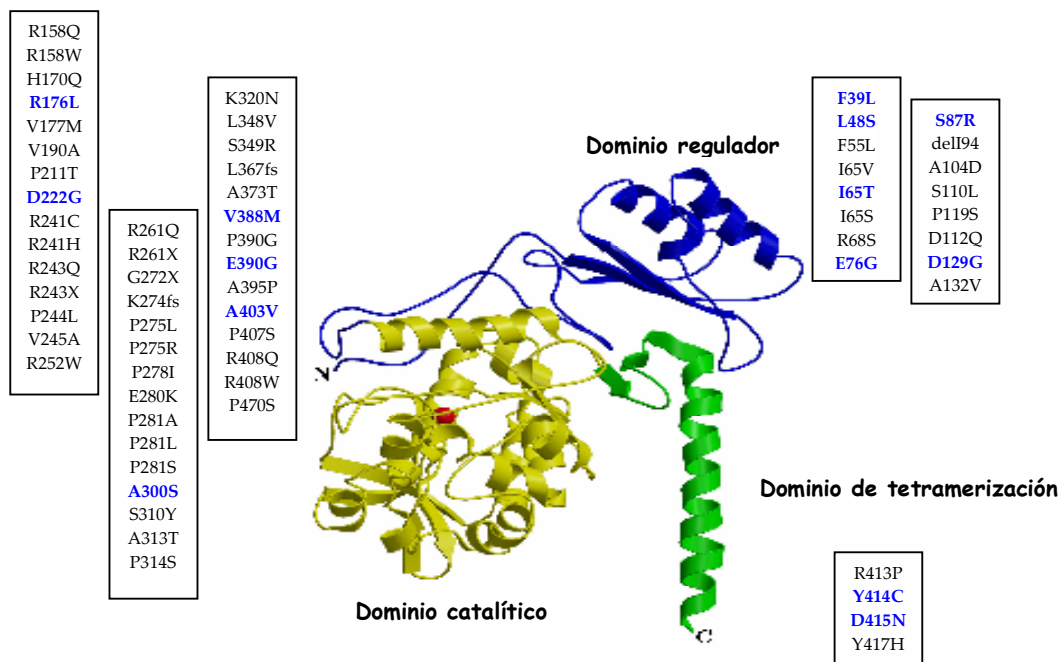


Figura 4.25.- Mutaciones descritas como respondedoras a BH<sub>4</sub> en la literatura según el dominio de la PAH que codifican (tomado de [www.bh4.org](http://www.bh4.org)). Se muestran en azul las mutaciones halladas en nuestros pacientes.

#### 4.3.1.2.- Relación de la respuesta a BH<sub>4</sub> con la edad del paciente

No hemos encontrado diferencias en cuanto al tipo de respuesta en pacientes en edad neonatal o edades más tardías. El tipo de respuesta y el grado de descenso de los niveles de fenilalanina en nuestros pacientes parece estar más en relación con el fenotipo que con la edad a la que se realiza la prueba de sobrecarga. Para ello será necesario repetir la prueba en edades posteriores a los pacientes en los que se realizó coincidiendo con el diagnóstico de su fenilcetonuria, y comparar la respuesta a BH<sub>4</sub> al diagnóstico y en el futuro en los mismos pacientes.



#### 4.3.1.2.- Absorción de la BH<sub>4</sub> durante una sobrecarga puntual

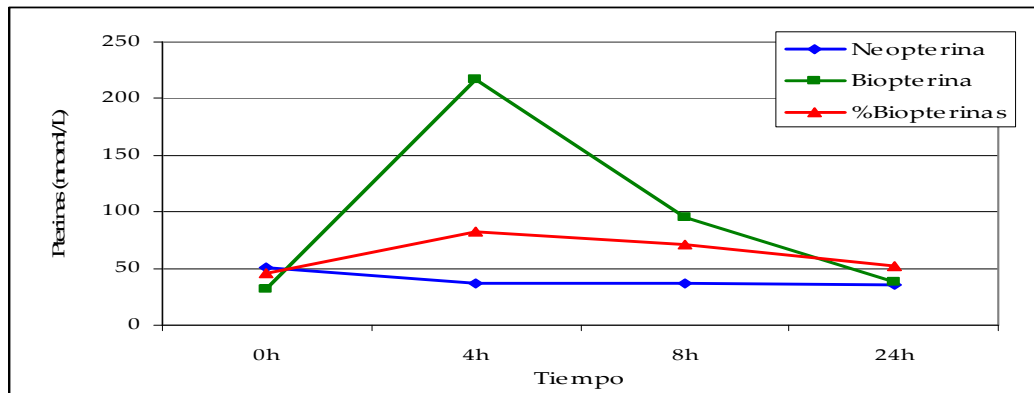
Aunque no existen muchos trabajos al respecto, la absorción de la BH<sub>4</sub> está descrito que puede ser muy variable dependiendo de la dosis, vía de administración o de factores individuales (Fiege et al, 2003). Para observar el grado de absorción de la BH<sub>4</sub> administrada vía oral y de forma puntual a 20 mg/Kg, durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron los niveles de biopterinas en sangre como marcador indirecto de la absorción de la BH<sub>4</sub> administrada.

Con la dosis indicada, todos nuestros pacientes tuvieron una buena absorción del medicamento, con un incremento máximo de los niveles de biopterina a las 4h post-ingesta de BH<sub>4</sub>. El incremento medio en ese tiempo fue del 586%. Sufren posteriormente un rápido descenso, con niveles a las 8h tras la ingesta un 43% más bajos, siendo normales a las 24h post-administración. (Ver Tabla 4.27 y Figura 4.26).

	<b>Neopterina</b> ( $\mu$ mol/L)	<b>Biopterina</b> ( $\mu$ mol/L)	<b>% Biopterinas</b>
Basal BH <sub>4</sub>	50,7 $\pm$ 58,8	31,3 $\pm$ 10,5	45,7 $\pm$ 13,7
4h postBH <sub>4</sub>	36,9 $\pm$ 22,5	217,1 $\pm$ 138,1	82,5 $\pm$ 14,3
8h postBH <sub>4</sub>	37,0 $\pm$ 24,0	95,4 $\pm$ 83,0	70,8 $\pm$ 12,0
24h postBH <sub>4</sub>	36,1 $\pm$ 19,9	37,5 $\pm$ 14,2	52,1 $\pm$ 10,7

**Tabla 4.27.- Media y desviación estandar de los niveles de neopterina, biopterina y % de biopterinas obtenidos tras una sobrecarga oral en dosis única a 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> en pacientes PKU.**

En nuestra serie no hemos encontrado diferencias en el grado de absorción de la BH<sub>4</sub> entre neonatos y pacientes de mayor edad. Tampoco hemos observado que el grado de ayuno o la ingesta conjunta de otros alimentos hiciera variar notablemente la curva de absorción.



**Figura 4.26.- Evolución de los niveles de pterinas en sangre (valores medios) durante una sobrecarga puntual con BH4 en pacientes con deficiencia de PAH.**

Hemos observado que la curva de absorción y eliminación de la BH<sub>4</sub> durante una sobrecarga puntual es muy similar de unos pacientes a otros, mientras que la forma de respuesta a la medicación es variable, con respuestas rápidas y mantenidas en algunos casos, respuestas precoces con aumento posterior de los niveles de fenilalanina en otros, respuestas tardías o pacientes en los que no se observa modificación en los niveles de fenilalanina. Esto indica que la respuesta a BH<sub>4</sub> no está influenciada por el grado o forma de absorción a nivel intestinal del medicamento, sino que el tipo de respuesta debe venir determinado por las modificaciones a nivel nuclear o molecular que produce una vez ha alcanzado los tejidos.

#### **4.3.2.- RESULTADOS DEL PROTOCOLO PARA LA VALORACION DE LA RESPUESTA IN VIVO A UNA SOBRECARGA PROLONGADA DE TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Este estudio se engloba dentro del estudio multicéntrico PKU-006, patrocinado por laboratorios BioMarin.

En los 15 pacientes que no tomaban ya tratamiento con BH<sub>4</sub> y que por edad podían ser susceptibles de entrar en el estudio se hizo una determinación de fenilalanina como screening. Algunos de estos pacientes ya habían recibido BH<sub>4</sub> en dosis única y uno había sido lentos respondedores mientras que los demás no habían sido respondedores. Finalmente fueron rechazados 5 por tener los niveles de fenilalanina por encima del rango determinado para el estudio. A los 10 pacientes restantes se les administró BH<sub>4</sub> con dosis de 20 mg/Kg/día en una única dosis diaria durante una semana, al cabo de la cual se midió de nuevo la fenilalanina. La Tabla 4.28 incluye los datos de todos los pacientes que participaron en esta prueba. No se observaron reacciones adversas durante la realización de la prueba ni en las semanas posteriores.

Ref.	Sexo	Edad	Phe (µM) al Dx	Fenotipo	Alelo 1	Alelo 2	% descenso de Phe
14902 6067	V	6 años 8 años	672	PKU suave	L48S	I65T	30 (16h) 72
14788 6066	M	Neonato 8 años	840	PKU suave	I65T	I65T	- 10 66
17045 6078	V	Neonato 5 años	1338	PKU moderada	R261X	R243Q	- 9 - 6
16714 6092	V	Neonato	1476	PKU moderada	R243Q	nd	- 4 4
14116 6076	V	6 años 8 años	1944	PKU severa	IVS10	nd	23 16
16060 6093	M	4 años 6 años	2094	PKU severa	IVS4nt5	I65T	14 39
6065	M	11 años	2112	PKU severa	V388M	IVS4nt5	68
6091	M	12 años	2190	PKU severa	P122Q	S349P	12
15618 6068	M	Neonato 6 años	2532	PKU severa	delF39	IVS10	- 30 39
6090	M	6 años	1068	PKU severa	IVS10nt11	IVS1nt5	- 49

**Tabla 4.28.- Datos de los pacientes con deficiencia de PAH en los que se realizó una sobrecarga prolongada con BH<sub>4</sub>.** En siete de los pacientes se habían realizado previamente sobrecargas puntuales, puestas en primer lugar.

Cinco pacientes tuvieron un descenso en los niveles de fenilalanina superior al 30%. Cuatro de estos pacientes fueron admitidos para el estudio a largo plazo. La paciente 6068 tuvo un descenso en los niveles de un 39%, a pesar de lo cual no fue incluida en el estudio PKU-006 a largo plazo dado que sus niveles no bajaron por debajo de 300 µmol/L, otro de los requisitos imprescindibles para participar en dicho estudio.

Aunque el número de pacientes es pequeño, se puede observar que los pacientes con respuesta a BH<sub>4</sub> continúan siendo aquellos con mutaciones que determinan cierta actividad residual en el enzima PAH, como son I65T y V388M. Algunos de estos pacientes no tuvieron un descenso en los niveles de fenilalanina significativo durante la sobrecarga puntual, pero sí lo tuvieron durante la sobrecarga más prolongada. Hay que aclarar, sin embargo, que la sobrecarga puntual de la paciente 6066 no se hizo según el protocolo actual, sino que sólo se cogieron muestras a las 4 y 8 horas postBH<sub>4</sub>. Es posible, por lo tanto, que esta paciente tuviera una respuesta tardía que pasó desapercibida.

Aquellos con mutaciones más graves tuvieron una respuesta similar, negativa, en ambas pruebas. Excepción a esta afirmación es la paciente 6068. Aunque no había sido admitida en el estudio PKU-006, en ella probamos tratamiento con BH<sub>4</sub> en los meses siguientes. No fue posible ni aumentar la tolerancia a fenilalanina ni disminuir la dosis de proteínas sin fenilalanina y finalmente se suspendió el tratamiento. Esta evolución está más acorde con el resultado negativo de la sobrecarga puntual a la que fue sometida con anterioridad, y que corresponde con su fenotipo y su genotipo.

#### **4.3.3.- EVALUACION DEL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON TETRAHIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>) EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PAH**

Dieciocho de los pacientes que precisaban dieta y que tuvieron una respuesta positiva a BH<sub>4</sub> en la sobrecarga puntual o en la sobrecarga prolongada, aceptaron sustituir su tratamiento habitual por un tratamiento con dosis farmacológicas de tetrahidrobiopterina. Se incluyeron tanto pacientes con una respuesta precoz en la sobrecarga puntual como aquellos en los que la respuesta había sido tardía. Los pacientes en tratamiento con BH<sub>4</sub> son 10 varones y 8 mujeres con edades comprendidas al inicio del tratamiento entre el periodo neonatal y los 29 años.

De los 19 pacientes que respondieron durante la sobrecarga puntual, tres renunciaron a ser tratados con BH<sub>4</sub>: en un caso por tener ya una dieta muy amplia, en otro por tratarse de un neonato y preferir sus padres esperar a que se tuviese más experiencia con el medicamento, en un tercer caso por tratarse de una mujer en edad fértil que prefirió continuar con tratamiento dietético ante la poca información existente sobre posibles efectos teratogénicos de la BH<sub>4</sub>. Una de las pacientes no se trató ya que no sigue habitualmente controles en nuestra Unidad, y el paciente 14902 fue incluido en el estudio PKU-006. De los cuatro pacientes aceptados para este estudio, la paciente 6065, incluida inicialmente, tuvo que ser sacada del estudio dado que los frecuentes procesos alérgicos que sufría dificultaban enormemente su manejo. Finalmente se han seguido a largo plazo un total de 17 pacientes, cuyos datos y evolución se resumen en las Tablas 4.29 y 4.30.

Inicialmente todos los pacientes tratados según el protocolo de nuestra Unidad comenzaron tomando 10 mg/Kg/día de BH<sub>4</sub> repartido en dos dosis diarias y una dieta completamente libre. Según los niveles de fenilalanina obtenidos, teniendo en cuenta los niveles que se consideran adecuados para cada edad, el régimen terapéutico se fue modificando de forma individual, bien modificando la cantidad de BH<sub>4</sub>, bien introduciendo ciertas restricciones a la dieta. El tiempo medio en el que se tardó en adecuar el tratamiento a cada paciente fue de entre quince días y un mes. Durante este tiempo se pudieron llevar a cabo múltiples ensayos terapéuticos gracias a la frecuencia con que los pacientes remitían los controles de fenilalanina. Tras este periodo inicial no ha sido necesario modificar el tratamiento, siendo necesario únicamente adecuar las dosis administradas a la ganancia ponderal de cada niño.

Los pacientes del estudio PKU-006 continuaron con su dieta habitual y recibían al día bien 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> en dosis única matutina o bien un placebo, a doble ciego. Si los controles de fenilalanina lo permitían, cada 15 días se aumentaba la cantidad de fenilalanina en la dieta mediante la adición de una cantidad controlada de leche.

Ref.	Descenso de Phe con BH <sub>4</sub>	Edad al inicio del tratamiento	Tiempo en tratamiento con BH <sub>4</sub> (meses)	Dosis BH <sub>4</sub> (mg/kg/día) y reparto diario	Tolerancia antes BH <sub>4</sub> (g PNAVB al día)	PXPhe antes de BH <sub>4</sub> (g/kg/d)	Tolerancia con BH <sub>4</sub> (g PNAVB al día)	PXPhe con BH <sub>4</sub> (g/kg/d)	Nivel medio Phe antes de BH <sub>4</sub> (µM)	Nivel medio Phe con BH <sub>4</sub> (µM)	
1	21242	93%	Neonato	36	10 1 dosis	-	-	Libre (3g/kg/d)	-	-	120
2	24528	78%	11 meses	3 meses	10 1 dosis	7	3	Libre (3g/kg/d)	-	60	138
3	11332	67%	12 años	40	10 2 dosis	40	2	Libre (120 g/d)	-	300	245
4	19068	62%	12 años	54	5 1 dosis	40	1.5	Libre (100 g/d)	-	420	470
5	23395	52%	5 meses	16	10 1 dosis	18	2	Libre (3g/kg/d)	-	264	222
6	12895	49%	8 años	54	10 2 dosis	12	2	Libre (80 g/d)	-	330	230
7	12528	43%	18 años	54	1g/día 2 dosis	24	1.5	Libre (150 g/d)	-	520	530
8	21964	43% (16h)	11 meses	18	15 2 dosis	10	3	24 (3g/Kg/d)	1	342	348
9	20115	41%	8 meses	40	20 3 dosis	10	3	22 (3g/Kg/d)	1	200	300
10	16271	37%	3 años	45	10 2 dosis	12	2.5	28	1	300	280
11	20136	34%	8 meses	40	15 3 dosis	10	3	22	1	200	145
12	12576	33%	29 años	10	1g/día 1 dosis	20	1,5	34	1	780	420
13	12324	33% (16h)	12 años	19	1g/día 1 dosis	10	2	50	1	510	480
14	23636	32%	13 años	12	1g/día 2 dosis	10	2	25	1	252	540

**Tabla 4.29.- Evolución de los pacientes PKU en tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub>.** Se exponen aquellos en los que se hizo una sobrecarga puntual y siguieron el protocolo de nuestra Unidad.

Los niveles de fenilalanina una vez se consiguió el régimen terapéutico óptimo para cada uno de ellos fueron similares a los que tenían con el tratamiento dietético previo, y en todos los casos fueron adecuados para la edad de cada paciente. Utilizando análisis de varianza univariante no se han encontrado diferencias significativas entre ambas medidas.

	Ref.	Descenso de Phe con BH <sub>4</sub>	Edad al inicio del tratamiento	Tiempo en tratamiento con BH <sub>4</sub> (meses)	Dosis BH <sub>4</sub> (mg/kg/día) y reparto diario	Tolerancia antes BH <sub>4</sub> (g PNAVB al día)	PXPhe antes de BH <sub>4</sub> (g/kg/d)	Tolerancia con BH <sub>4</sub> (g PNAVB al día)	PXPhe con BH <sub>4</sub> (g/kg/d)	Nivel medio Phe antes de BH <sub>4</sub> (μM)	Nivel medio Phe con BH <sub>4</sub> (μM)
15	6067	72%	8 años	20	20 1 dosis	20	2,5	50	0,5	348	408
16	6066	64%	8 años	20	20 1 dosis	16	2,5	40	1	180	282
17	6093	39%	6 años	20	20 1 dosis	8	2,5	9	2	324	474

**Tabla 4.30.- Evolución de los pacientes PKU en tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub>.** Se exponen aquellos en los que se hizo una sobrecarga prolongada y siguieron el protocolo de estudio PKU-006.

En todos los casos se consiguió un aumento en la tolerancia de fenilalanina y se pudo reducir la cantidad de productos especiales sin fenilalanina, aunque el grado en el que se pudieron hacer estos cambios fue variable y se comenta más adelante. El aumento en la cantidad de proteínas naturales de alto valor biológico fue de entre 12 y 126 gramos al día. En la paciente 6093 del estudio PKU-006 no se pudieron hacer cambios dietéticos, y posteriormente se supo que había sido tratada con placebo. En el estudio PKU-008 que se está completando en la actualidad, esta paciente sí se ha podido beneficiar del tratamiento. Este último estudio no ha sido aún publicado y por lo tanto no podemos exponer los datos.

#### **4.3.1.2.- Relación del tratamiento a largo plazo con el grado de respuesta durante la sobrecarga puntual con BH<sub>4</sub>**

Como ya hemos referido anteriormente, el tratamiento de los pacientes seguidos según el protocolo de nuestra Unidad se ajustó de forma individualizada. A pesar de este planteamiento inicial, observamos que el comportamiento a largo plazo de los pacientes podía dividirse en dos grupos:

**1) Grupo 1 o mejor respondedor:**

Estos pacientes son aquellos en los que el tratamiento con BH<sub>4</sub> ha permitido llevar una dieta completamente libre, sin ningún tipo de restricción ni suplementación con productos especiales. Dentro de este grupo estarían los pacientes 1-7. El aumento en la tolerancia de proteínas de alto valor biológico en estos pacientes es muy llamativo, con aumentos entre el 200 y 600%.

La dosis inicial de 10 mg BH<sub>4</sub>/Kg/día repartida en dos dosis es suficiente para controlar los niveles de fenilalanina en estos casos. El paciente 4, y posiblemente los casos 1-3, pueden incluso permitir una reducción de la dosis a 5mg/Kg/día administrada de forma única. Ver Tabla 4.27.

Hemos observado que este grupo incluye a todos los pacientes que durante la sobrecarga puntual con BH<sub>4</sub> tuvieron un descenso en sus niveles de fenilalanina respecto del basal igual o superior al 40%. El paciente 9 corresponde probablemente a este grupo pero se encuentran en la actualidad en una edad en la que sufren frecuentes procesos febriles, motivo por el cual hemos preferido tratar con dosis más altas de BH<sub>4</sub> y no liberalizar completamente la dieta. El paciente 8, en cambio, aunque tiene un descenso del 43% en sus niveles de fenilalanina durante la sobrecarga, lo hace de forma tardía y se comporta de forma similar al de los pacientes del grupo 2.

**2) Grupo 2 o peor respondedor:**

Este grupo incluye a los pacientes que durante la sobrecarga puntual con BH<sub>4</sub> tuvieron un descenso en sus niveles de fenilalanina entre un 30 y un 40%. Para mantener niveles adecuados de fenilalanina en estos pacientes fue necesario no sólo aumentar la dosis diaria de BH<sub>4</sub> incluso hasta 20 mg/Kg y repartirla en 2 ó 3 dosis diarias, sino que fue preciso llevar a cabo cierta restricción proteica. Observamos que la adición de pequeños suplementos de aminoácidos sin fenilalanina a la dieta permitía mantener una mayor tolerancia a alimentos naturales. En el grupo de peor



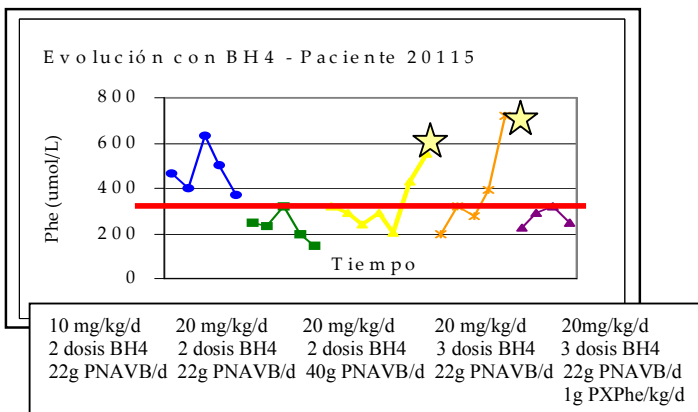
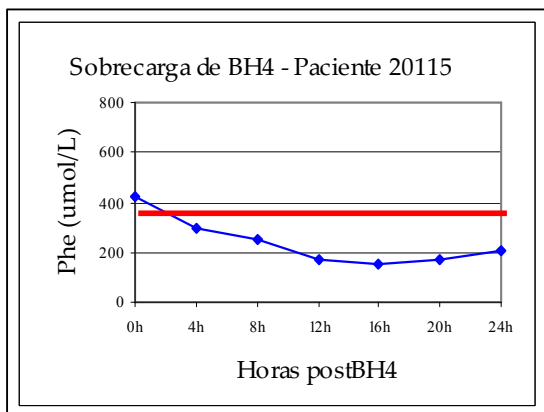
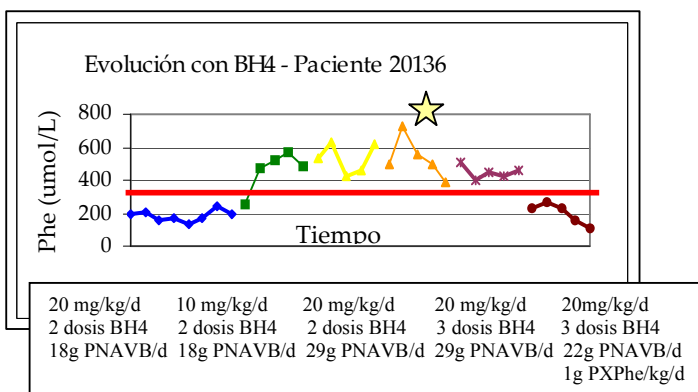
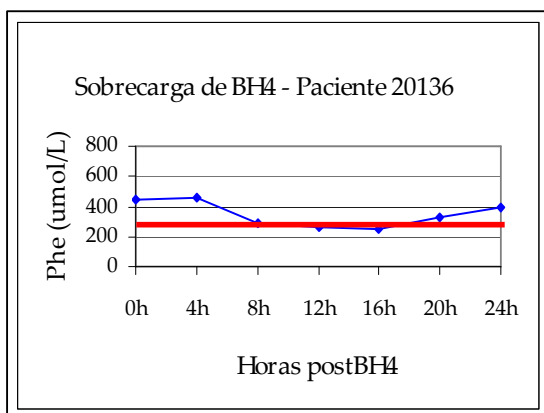
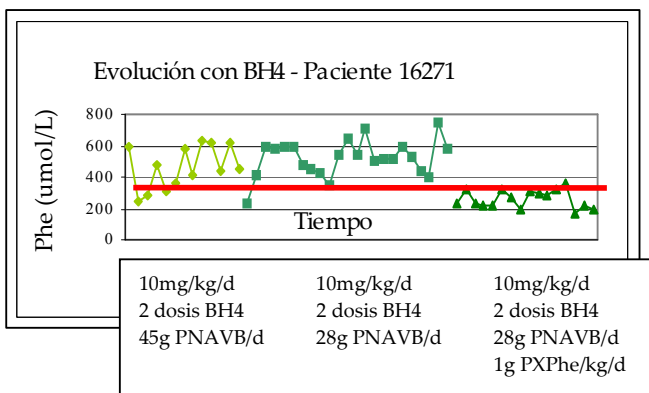
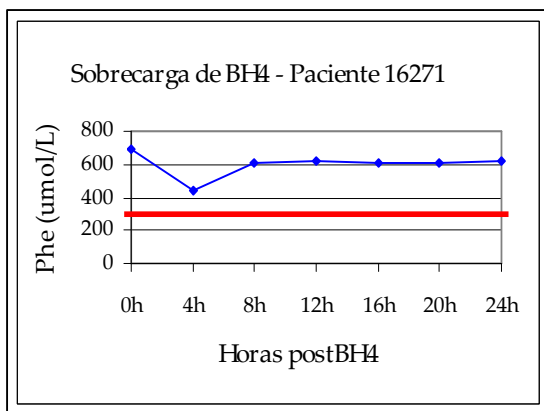
respondedores están los pacientes 10-14. A pesar de no conseguir una dieta normal en estos pacientes con el tratamiento con BH<sub>4</sub>, en todos ellos se dobló o triplicó la tolerancia a proteínas naturales, y la cantidad de productos especiales necesarios para su control disminuyó de 3 a 1g/Kg/día. Ver tabla 4.27 y figura 4.27.

Estos resultados indican que aquellos pacientes con una respuesta más pobre durante la sobrecarga puntual a BH<sub>4</sub> tienen menos posibilidades de conseguir liberalizar completamente su dieta, suelen requerir dosis más altas del medicamento para mantener niveles adecuados de fenilalanina en sangre y es preciso en ellos mantener los suplementos de proteínas sin fenilalanina. Estos pacientes requerirán al iniciar el tratamiento a largo plazo con el medicamento una monitorización clínica y bioquímica más estrecha, mientras que a aquellos pacientes con mejor respuesta durante la sobrecarga puntual se les puede proponer una dieta completamente libre con mayor seguridad de éxito.

El grado de respuesta a BH<sub>4</sub> durante la sobrecarga en nuestra serie no se vio determinado por la edad del paciente. De igual manera, durante el tratamiento a largo plazo la edad del paciente no determinó la cantidad diaria de BH<sub>4</sub> requerida (expresada en mg/Kg de peso del paciente), ni el número de tomas, ni la posibilidad de liberalizar completamente o no la dieta.

En el tratamiento a largo plazo los pacientes con una respuesta lenta durante la sobrecarga puntual tuvieron una evolución tan satisfactoria como aquellos en los que la respuesta había sido precoz. En general, parece tener mayor importancia el grado de respuesta que el tiempo en el que ésta se produce.

El estudio PKU-006 estaba diseñado para observar exclusivamente la eficacia y la seguridad del medicamento. Por este motivo todos los pacientes fueron tratados con dosis máximas (20mg/Kg/día) en dosis única, independientemente de su grado de respuesta o edad, y no se hicieron modificaciones en el tratamiento salvo el aumento en proteínas naturales de alto valor biológico.



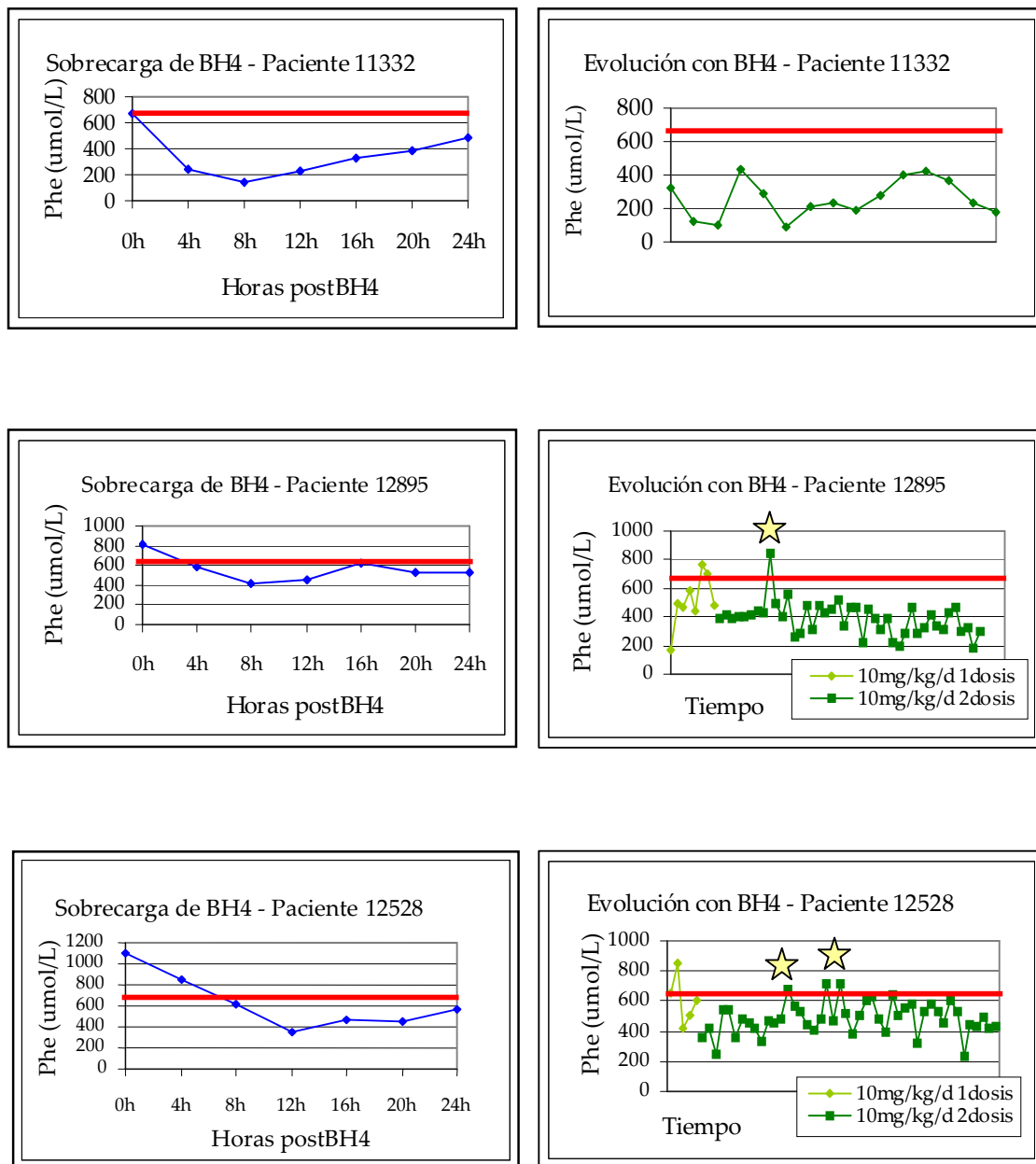
**Figura 4.27.- Curvas de sobrecarga y evolución con BH<sub>4</sub> de los pacientes 16271, 20136 y 20115.** En estos casos se observa que durante las 24h post-ingesta de BH<sub>4</sub> durante la sobrecarga aislada los niveles de fenilalanina tienen un descenso inicial pero posteriormente tienden a aumentar de nuevo en las siguientes horas. Además, durante la sobrecarga los niveles de fenilalanina descienden pero sólo hasta niveles muy próximos al límite máximo permitido para el paciente. Durante el tratamiento a largo plazo los pacientes requirieron múltiples pruebas terapéuticas pero finalmente se observó que añadiendo pequeñas cantidades de PXPhe se obtenía un mejor control. La línea roja indica el rango superior de los niveles de fenilalanina considerado adecuado para la edad del paciente. Las estrellas representan episodios febriles.

#### **4.3.1.3.- Relación de las dosis diarias necesarias durante el tratamiento a largo plazo con el tipo de respuesta durante la sobrecarga puntual con BH<sub>4</sub>**

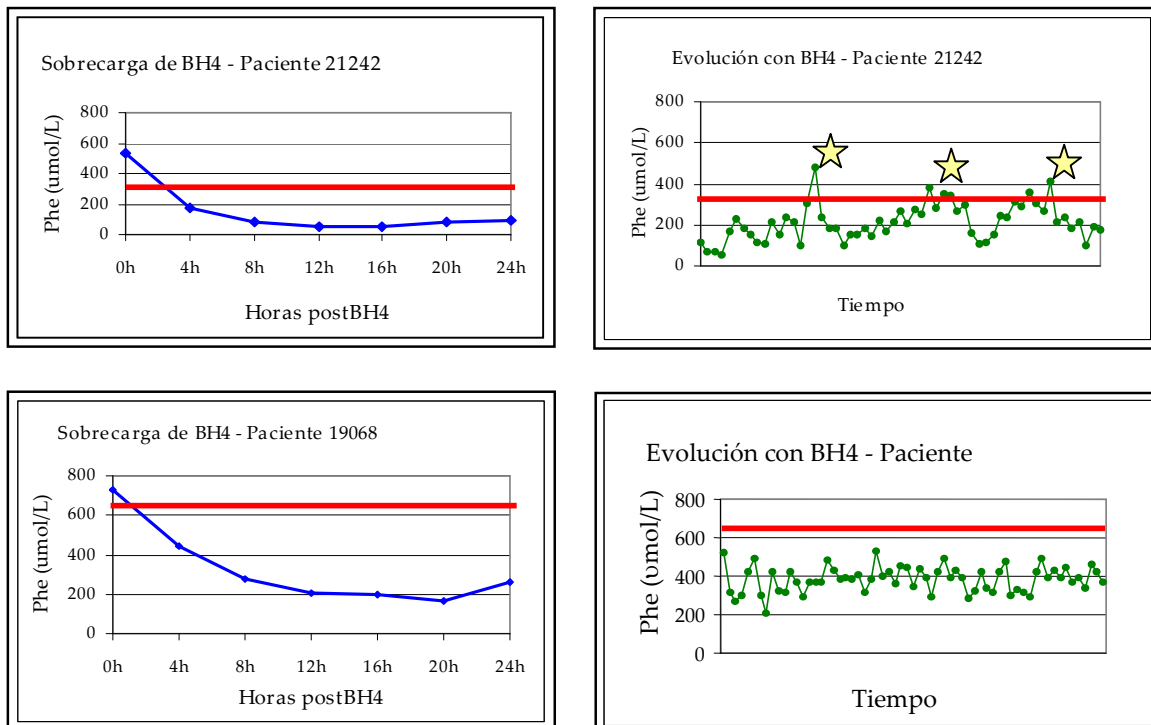
Al igual que en el apartado anterior, estos resultados corresponden únicamente a aquellos pacientes tratados de forma individualizada según el protocolo de nuestra Unidad. A pesar de que todos los pacientes incluidos en el estudio a largo plazo con BH<sub>4</sub> habían tenido respuestas positivas durante la sobrecarga puntual con el medicamento, el grado de respuesta y la forma de la curva resultante no fueron homogéneos en todos ellos. Como ya hemos comentado en el apartado anterior, el grado de respuesta parece determinar la dosis total requerida a largo plazo y las posibilidades de liberalizar completamente o no la dieta. En cambio, la forma de la curva resultó ser el mejor indicador del número de dosis diarias en las que se debe repartir la administración del medicamento. Ver Figuras 4.28 y 4.29.

#### **4.3.1.4.- Relación de la evolución durante el tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub> con el fenotipo / genotipo del paciente.**

Dado el pequeño número de pacientes tratados a largo plazo con BH<sub>4</sub> hasta el momento, no nos es posible relacionar claramente su respuesta a esta terapéutica con su fenotipo / genotipo. Sí existe una tendencia de los pacientes con fenotipos más suaves (que durante la sobrecarga tienen descensos más acusados y mantenidos) a pertenecer al grupo 1 de mejor respondedores, mientras que los pacientes con fenotipos /genotipos más graves en general pertenecen al grupo 2. Entre los pacientes tratados a largo plazo sólo tenemos un genotipo repetido, el V388M/I65T, en tres pacientes sin relación familiar. Estos tres pacientes, a pesar de haber tenido pruebas de sobrecarga ligeramente diferentes (uno con un descenso >40% pero tardío, otro con un descenso <40% precoz y otro con un descenso <40% tardío), se comportan de forma similar a largo plazo, perteneciendo todos al grupo 2 de pacientes.



**Figura 4.28.- Curvas de sobrecarga y evolución con BH<sub>4</sub> de los pacientes 11332, 12895 y 12528.** En estos casos se observa que durante las 24h post-ingesta de BH<sub>4</sub> durante la sobrecarga aislada los niveles de fenilalanina tienen un descenso inicial pero posteriormente tienden a aumentar de nuevo en las siguientes horas. Durante el tratamiento a largo plazo los pacientes tienen controles adecuados haciendo dos tomas diarias de la medicación, mientras que con una sola toma sus niveles eran superiores y con amplias variaciones a lo largo del día. La línea roja indica el rango superior de los niveles de fenilalanina considerado adecuado para la edad del paciente. Las estrellas representan episodios febriles.



**Figura 4.29.- Curvas de sobrecarga y evolución con BH<sub>4</sub> de los pacientes 21242 y 19068.** En ambos casos se observa que durante las 24h post-ingesta de BH<sub>4</sub> durante la sobrecarga aislada los niveles de fenilalanina se mantienen estables y en rangos bajos. Durante el tratamiento a largo plazo ambos pacientes tienen controles adecuados haciendo una única toma diaria de la medicación. La línea roja indica el rango superior de los niveles de fenilalanina considerado adecuado para la edad del paciente. Las estrellas representan episodios febriles.

#### **4.3.1.5.- Efectos adversos e inconvenientes encontrados durante el tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub>.**

La tetrahydrobiopterina administrada de forma oral ha sido bien tolerada por todos los pacientes, ninguno de los cuales ha tenido ningún tipo de efecto secundario hasta el momento ni clínico ni bioquímico. La ganancia estatural y ponderal de los pacientes ha sido normal. El desarrollo psicomotor en los pacientes de menos edad ha seguido los patrones adecuados, y los pacientes adolescentes y adultos no han experimentado cambios en su comportamiento o personalidad. Todos los pacientes y sus familiares, incluso aquellos en los que la dieta no ha podido normalizarse completamente, opinan que su calidad de vida ha mejorado ostensiblemente, aunque sólo disponemos de datos subjetivos para medir estos parámetros.

Las únicas dificultades surgidas con el tratamiento a largo plazo han sido de dos tipos:

1.- Aumento de los niveles de fenilalanina coincidiendo con los picos febriles, similares a los que se producen en pacientes con tratamiento dietético (ver figuras 4.26, 4.27 y 4.28). En estos casos se recomienda igualmente que los pacientes lleven a cabo una restricción proteica en su dieta durante los días que dure el proceso febril.

2.- La obtención de la BH<sub>4</sub> actualmente requiere de su dispensación hospitalaria. Esto ha supuesto en ciertas ocasiones dificultades y retrasos en el inicio del tratamiento y supone un inconveniente para las familias, que deben adaptarse al horario hospitalario y acudir a un centro más alejado de su domicilio que la farmacia para recibir la medicación. Asimismo dificulta la obtención de medicación en caso de pérdida de alguna pastilla o en caso de viajes y periodos vacacionales prolongados.

## **5.- DISCUSSION**

La primera descripción de la fenilcetonuria ha cumplido casi un siglo <sup>(5)</sup>, y la eficacia de su tratamiento mediante una dieta restringida en fenilalanina fue demostrada hace más de 50 años <sup>(11)</sup>. Desde entonces la investigación ha permitido importantes y constantes avances en el conocimiento de la enfermedad a nivel molecular. Se conoce el plegamiento y funcionamiento de la proteína PAH, progresivamente se describen distintas mutaciones, se estudia la actividad residual que cada mutación condiciona, etc. La industria farmacéutica, dentro del restringido campo que supone desarrollar productos para una enfermedad rara, ha venido produciendo suplementos sin fenilalanina y productos sucedáneos con mayor calidad médica y organoléptica.

A nivel clínico, en cambio, la investigación ha sido más irregular. Al tratarse de una enfermedad rara, los pacientes son pocos y por lo tanto cada clínico puede no tener un número suficiente de pacientes para realizar estudios con unos resultados fiables. La dieta de los pacientes, aunque siempre restringida en fenilalanina, suele diferir entre los distintos centros. Los productos sin fenilalanina no son accesibles a los pacientes de forma homogénea ni siquiera dentro de un mismo país, y mucho menos a nivel mundial. Y para complicar más las cosas no existe consenso entre las diferentes comunidades científicas en los niveles de fenilalanina en sangre considerados patológicos. Todo ello hace que sea difícil llevar a cabo estudios multicéntricos, que serían la solución al escaso número de pacientes. En 1998 se propone el tratamiento alternativo con tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), pero incluso en este apartado no hay acuerdo unánime sobre la forma de evaluar la respuesta a esta medicación o cómo realizar el tratamiento a largo plazo.

En esta Tesis Doctoral se recogen los datos y los estudios realizados en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal en pacientes fenilcetonúricos en los últimos 25 años. El ser centro de referencia para el tratamiento de esta enfermedad en la Comunidad de Madrid, y haberlo sido durante años tanto de



las Comunidades de Castilla La Mancha y como de Castilla León, hace que sea el centro con mayor número de pacientes de España. La amplia experiencia tanto numérica como temporal de esta Unidad es lo que permite llevar a cabo estudios clínicos, con el objetivo de evaluar aquellas medidas clínicas que han resultado de mayor utilidad en el diagnóstico o tratamiento de estos pacientes, y que han permitido mejorar su calidad de vida. También se ha intentado aunar la clínica con los conocimientos moleculares de la enfermedad, correlacionando el fenotipo de cada paciente con su genotipo.

### **5.1.- DISCUSION SOBRE LAS MEJORAS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA HIPERFENILALANINEMIA**

Realizar el diagnóstico de la fenilcetonuria en unas condiciones adecuadas nos parece una de las medidas de mayor importancia para poder tratar y seguir en condiciones óptimas a estos pacientes.

La primera conclusión importante a la que se llega tras observar la evolución de los pacientes PKU en los últimos 25 años en nuestra Unidad de Enfermedades Congénitas del Metabolismo es que el factor más determinante para conseguir un desarrollo psicomotor y un cociente intelectual normal es la edad a la que se realiza el diagnóstico. Por este motivo la primera medida es conseguir un diagnóstico precoz. En la Comunidad de Madrid el programa de detección precoz ha sido eficaz y no hemos registrado falsos negativos desde su implantación. Pero existe una tendencia a hacer la toma de muestras cada vez de forma más precoz, lo que puede dar lugar a éstos <sup>(144)</sup>. Además, se debe estar atento ante la gran afluencia de inmigrantes en cuyos países no existen estos programas y que pueden no realizar la toma de la segunda muestra de talón (la que detecta los niveles de fenilalanina) debido a falta de información o situaciones de marginalidad que dificultan el acceso a los Centros de Salud donde se realiza la toma de muestras. En el caso de que los niños hayan nacido en el extranjero, es importante cerciorarse de que se les hayan realizado las pruebas de detección

precoz, ya que aunque en estos casos el diagnóstico será tardío, hemos demostrado que incluso en estos casos el tratamiento es beneficioso.

Solamente una de nuestras pacientes con deficiencia en la síntesis del cofactor tuvo un diagnóstico precoz, pero no se pudo beneficiar de un tratamiento completo hasta casi los dos años de vida. El resto de los pacientes con deficiencia en la síntesis o reciclaje del cofactor fueron diagnosticados tardíamente. Es poco probable que un tratamiento desde el periodo neonatal no suponga grandes cambios en los pacientes con deficiencia de DHPR, dado el escaso resultado del tratamiento en nuestra paciente. En cambio, los pacientes con deficiencia de PTS sí obtuvieron una importante mejoría con el tratamiento de BH<sub>4</sub> y neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos, y cabe la posibilidad de que con un diagnóstico y tratamiento completo precoces estos pacientes alcancen mejor rendimiento intelectual <sup>(145)</sup>.

En ninguna de las series publicadas sobre la incidencia de fenilcetonuria o alteraciones en la síntesis o reciclaje de la BH<sub>4</sub> se hace referencia a patología de este tipo transitoria. En nuestra serie tenemos 3 casos, dos con deficiencia de PAH y uno con deficiencia de PTS. Las alteraciones encontradas en estos pacientes son seguramente secundarias a inmadurez y mejoran espontáneamente hasta desaparecer. La evolución de estos pacientes es la de un niño normal. La detección de estos pacientes en nuestra Unidad se debe al estricto control llevado a cabo por el laboratorio del Centro de Estudio de Enfermedades Moleculares, que permite la determinación de niveles límite de los metabolitos a estudio.

El aspecto físico de los pacientes, sobre todo en el periodo neonatal, es similar a la normalidad en la mayoría de los pacientes. Según Zaffanello et al<sup>(146)</sup> los pacientes PKU tienen un retraso en el crecimiento hasta que inician el tratamiento. En nuestra serie, tanto los pacientes con diagnóstico precoz como aquellos con diagnóstico tardío tuvieron un peso, talla y perímetro cefálico dentro de los límites de la normalidad. En caso de que el paciente con hiperfenilalaninemia haya tenido un crecimiento intrauterino retardado, y sobre todo si tiene hipoglucemias neonatales, hay que pensar

en los trastornos de síntesis del cofactor. En el caso de pacientes con diagnóstico tardío, todos los pacientes con hiperfenilalaninemia en niveles superiores a 600  $\mu\text{mol/L}$  tendrán retraso psicomotor, pero las alteraciones distónicas y trastornos en la regulación de la temperatura son propias sólo de alteraciones en el metabolismo de la BH<sub>4</sub>.

También es importante fomentar el Programa de Detección de la Hiperfenilalaninemia Materna, que administrativamente está implantada al menos en la Comunidad de Madrid pero que actualmente no se realiza de forma universal a todas las mujeres embarazadas. Sería conveniente concienciar a médicos de familia y ginecólogos sobre este problema, ya que mejor que la detección durante el embarazo, en el que ya pueden haberse producido los efectos teratológicos de la hiperfenilalaninemia, sería la detección de estas mujeres antes de la concepción <sup>(59-66,147)</sup>. En nuestra muestra, todas las mujeres seguidas por este motivo tuvieron embarazos a término y niños normales, pero la mitad habían sufrido con anterioridad abortos de repetición.

Una vez detectado cada caso de hiperfenilalaninemia la toma de muestras para un diagnóstico definitivo se debe realizar en unas condiciones estandarizadas para permitir comparaciones entre los distintos pacientes. Hay que asegurar una ingesta de fenilalanina suficiente, que nosotros hemos establecido en 500-700mg de Phe /Kg al día durante los tres días previos en neonatos. Aunque en condiciones normales un neonato de 15-20 días de vida ingiere estas cantidades, hay que descartar situaciones de agalactia, fórmulas especiales, prematuridad, o diagnóstico demasiado precoz en los que no se realice una ingesta suficiente de fenilalanina. En estos casos el nivel de fenilalanina en sangre puede ser menor al que le corresponde realmente y las conclusiones obtenidas de tales hallazgos pueden inducir a error <sup>(148)</sup>. El fenotipo determinado será más suave del real, y no sólo se verá alterada la relación fenotipo/genotipo, sino que se puede poner inicialmente al paciente una dieta con mayor aporte de proteínas de las que realmente puede tolerar.

En nuestra muestra las infecciones no han demostrado influir en los niveles de fenilalanina en sangre al diagnóstico, a pesar de lo cual seguimos pensando que es importante descartar la presencia de procesos infecciosos. La fiebre induce elevaciones en los niveles de fenilalanina a edades posteriores y por lo tanto es probable que este fenómeno también pueda producirse en neonatos. Es posible que nuestros resultados se vean afectados por el hecho de tratarse de infecciones leves y, en la mayoría de los casos, asintomáticas. Habría que tener las mismas consideraciones en caso de hepatopatía grave.

La toma de muestras debe realizarse correctamente, teniendo en cuenta que los niveles de las pterinas se ven afectados por su desnaturalización con la luz. Aunque la causa principal de hiperfenilalaninemia es la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa, los niveles de fenilalanina exclusivamente no discriminan entre ésta y el resto de deficiencias en el sistema de hidroxilación, y por lo tanto es necesaria la toma de muestras para pterinas en el diagnóstico. La muestra en orina para pterinas y la actividad DHPR en sangre en papel son indispensables para el diagnóstico diferencial. Los niveles de pterinas en sangre y LCR pueden retrasarse y tomarse sólo en caso de sospecha de deficiencia en la síntesis o reciclaje de BH<sub>4</sub>.

Está descrito un descenso en los niveles de neurotransmisores dopa y serotoninérgicos en los pacientes con fenilalaninemias altas <sup>(149)</sup>. En nuestra muestra fueron similares a los de la población normal <sup>(150,151)</sup>. Esto induce dos conclusiones: 1) es poco probable que la deficiencia en neurotransmisores sea la causa de las alteraciones neurológicas en los pacientes PKU; 2) la toma de muestras para los niveles de neurotransmisores pueden retrasarse hasta la sospecha de deficiencia en la síntesis o reciclaje de BH<sub>4</sub>, en cuyo caso sí hemos encontrado niveles patológicos.

De esta forma proponemos hacer el diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia siguiendo el siguiente protocolo:

- Historia clínica y medidas antropométricas.
- Comprobación de una ingesta mínima de proteínas de 2,5g/Kg/día.
- Toma de muestras:
  - Sangre en papel para Phe, Tyr y actividad DHPR.
  - Hemograma y bioquímica con transaminasas y PCR.
  - Plasma para aminoácidos.
  - Orina para ácidos orgánicos y pterinas.
  - Urocultivo.
  - Sangre total para determinación del genotipo.
  - Sangre en papel de los padres y hermanos para descartar hiperfenilalaninemias no detectadas previamente.

Sólo en caso de sospecha de deficiencia de síntesis o reciclaje del cofactor se tomarían muestras de plasma para pterinas y LCR para pterinas y neurotransmisores dopa y serotoninérgicos.

Con los resultados de estas pruebas se llegaría al diagnóstico siguiendo las pautas de la tabla 5.1.

Diagnóstico	Phe (mg/dl)	Actividad DHPR	Pterinas en orina (nmol/molCr)			Neurotransmisores en LCR (ng/ml)	
			Neopterina	Biopterina	% Biopterina	5 HIAA	HVA
Normal	<2	Normal	Normal	Normal	> 20%	50 ± 23	107 ± 48
Def. PAH	>2,5	Normal	↑↑	↑	↑↑	Normal	Normal
Def. DHPR	>2,5	↓↓↓	Normal	↑↑↑	↑↑↑	↓	↓
Def. PTS	>2,5	Normal	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓
Def. GTPCH	> 2,5	Normal	↓↓↓	↓↓↓	Normal	↓	↓
Deficiencia de. Sepiapterina Reductasa			Sepiapterina en LCR			↓	↓

**Tabla 5.1.- Resumen de los resultados del diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia según los valores analíticos obtenidos.**

La sobrecarga de BH<sub>4</sub> en el momento del diagnóstico es obligatoria en el caso de sospecha de deficiencias en la síntesis o reciclaje del cofactor. En pacientes PKU no es indispensable realizarla de forma tan precoz. El hacerla en el periodo neonatal tiene como ventaja que el paciente está ya con una dieta normal, y no es necesario hacer cambios dietéticos posteriormente en el momento de la sobrecarga. Además, conocer la respuesta a BH<sub>4</sub> de forma precoz permite iniciar este tratamiento y evitar a las familias los inconvenientes de la dieta (aunque la dieta los primeros meses de vida no supone grandes cambios respecto a una dieta normal). Como desventaja tiene la extracción de muestras repetidas en un paciente pequeño, con el consiguiente riesgo de anemia. Este inconveniente puede obviarse si las muestras son de sangre en papel en vez de plasma. En nuestra muestra la respuesta de pacientes pequeños es similar a la observada en pacientes de mayor edad.

Este protocolo diagnóstico, propuesto por nuestro grupo, ha sido el adoptado por la AECOM a partir de 2006 (Martínez-Pardo et al, 2007).

La realización del diagnóstico en unas condiciones estandarizadas nos ha permitido observar la alta correlación que existe entre los niveles de fenilalanina al diagnóstico de los pacientes con deficiencia de PAH y la tolerancia a fenilalanina en la dieta a los 5 años de edad. Este parámetro es el que Güttler propuso en 1980 para definir la gravedad de cada paciente y que clásicamente se denomina fenotipo <sup>(16,83)</sup>. En vista de la alta correlación hallada entre la tolerancia y los niveles de fenilalanina al diagnóstico, proponemos utilizar estos últimos como determinación del fenotipo. Esta nueva aproximación tiene diversas ventajas:

- 1) Es un dato que se obtiene precozmente, de forma que permite instaurar un tratamiento más adecuado a cada paciente desde el momento del diagnóstico, sin tener que realizar múltiples pruebas terapéuticas a lo largo de los primeros años de vida hasta determinar la tolerancia de cada caso. Son estos primeros años en los que el tratamiento tiene mayor importancia para preservar la función intelectual de los pacientes.

- 2) Conocer desde el principio la probable tolerancia de cada niño permite ofrecer a los padres mejores datos sobre la dieta y evolución de su hijo ya en el momento del diagnóstico.
- 3) Como hemos demostrado durante la realización de esta Tesis Doctoral, la tolerancia a fenilalanina a una determinada edad puede verse afectada por diversos factores, como pueden ser procesos febriles (muy frecuentes a la edad de 2-5 años), el que se realicen trasgresiones en la dieta no conocidas por el equipo médico que evalúa la tolerancia, el número de tomas diarias de suplementos sin fenilalanina, etc. Estos factores pueden dar lugar a determinaciones del fenotipo que no se corresponden realmente con la capacidad para metabolizar la fenilalanina de cada paciente. La tolerancia a los 5 años, que es la que se toma como referencia en muchos centros, nos parece por este motivo muy variable, máxime cuando los 5 años es una edad en la que hemos observado que está cercana al pico de peor control debido a procesos febriles. En cambio, hemos observado que los niveles de fenilalanina mientras el paciente toma una dieta normal (2,5 g proteínas por kg y día, condiciones en las que se realiza al diagnóstico) no son susceptibles a infecciones leves, y ni siquiera son dependientes de la edad a la que se realiza el estudio. Si la dieta no cumple los criterios referidos sí puede haber fallos diagnósticos.
- 4) En realidad, y si ambas determinaciones se realizan en condiciones óptimas, son conceptos absolutamente intercambiables, ya que ambos son determinaciones clínicas del verdadero fenotipo, que es la capacidad residual del enzima PAH para metabolizar la fenilalanina. La capacidad residual condiciona la cantidad máxima de fenilalanina que puede tomar un individuo en la dieta antes de sobrepasar niveles perniciosos (fenotipo clásico), así como el nivel máximo de fenilalanina en sangre que se alcanza tomando una dieta normal (fenotipo propuesto en esta tesis). La capacidad residual del enzima PAH viene determinada por los cambios en la proteína

que producen las distintas mutaciones. En nuestra serie, el fenotipo determinado por los niveles de Phe al diagnóstico tiene una buena correlación con el genotipo, y todas las parejas de hermanos tienen fenotipos similares. Está descrito que esto no es así utilizando el método habitual para definir el fenotipo <sup>(5,28,29)</sup>, posiblemente por los errores en su determinación provocados por los factores descritos previamente.

Por todos estos motivos nos parece mejor parámetro para determinar el fenotipo los niveles de fenilalanina al diagnóstico que la tolerancia, y ésta ha sido la forma de clasificación utilizada durante la realización del resto de esta Tesis Doctoral. De esta forma los fenotipos propuestos han sido:

- Fenotipo benigno (MHP): Phe al Dx entre 2,5 y 6 mg/dl (150 y 360  $\mu$ M/L).
- Fenotipo muy suave: niveles entre 6 y 11 mg/dl (360 y 660  $\mu$ M/L).
- Fenotipo suave: niveles entre 11 y 21 mg/dl (600 y 1260  $\mu$ M/L).
- Fenotipo moderado: niveles entre 21 y 28 mg/dl (1260 y 1680  $\mu$ M/L)
- Fenotipo severo: niveles al diagnóstico > 28 mg/dl (>1680  $\mu$ M/L).

Con una tolerancia esperada de:

- Fenotipo benigno (MHP): >40 g PNAVB / día
- Fenotipo muy suave: entre 22-40 g PNAVB / día
- Fenotipo suave: entre 11-21 g PNAVB / día
- Fenotipo moderado: entre 6-11 g PNAVB / día
- Fenotipo severo: tolerancia <6 g PNAVB / día

Respecto a la nomenclatura utilizada por Güttler hemos añadido el fenotipo “muy suave”. Esto se debe a que en algunos países los pacientes con niveles de fenilalanina en sangre inferiores a 10 mg/dl (600 $\mu$ M/L) se consideran benignos y se les permite seguir una dieta normal. Nosotros hemos utilizado el criterio de la AECOM, que rige en España, y que recomienda tratar a los pacientes con niveles mantenidos por



encima de 6 mg/dl (360 $\mu$ M/L). Hemos denominado pacientes con fenotipo muy suave aquellos que tienen niveles entre 6 y 11 mg/dl tomando una dieta normal. Nosotros creemos que, al menos durante los primeros años de vida, requieren una restricción en la ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico, aunque ésta sea muy leve, y administración de preparados especiales exentos de fenilalanina para mantener niveles adecuados de ésta en sangre.

En nuestra muestra, a pesar de lo publicado con anterioridad <sup>(5,28-31)</sup>, el fenotipo de cada paciente tiene una buena correlación con sus mutaciones y con la capacidad residual descrita por métodos de laboratorio. Asimismo, pacientes con el mismo genotipo, sean familiares o no, tienen una evolución similar. Por lo tanto, los estudios genéticos, a pesar de ser caros y laboriosos, deben realizarse lo antes posible, ya que complementan los otros datos a la hora de informar a la familia respecto al pronóstico de su hijo. Además, el resultado de estas pruebas permite descartar procesos transitorios o falsos positivos. Los estudios genéticos son indispensables para ofrecer a los padres un diagnóstico prenatal en caso de pensar en tener más descendencia.

## **5.2.- DISCUSION SOBRE LA INVESTIGACION DE NUEVAS POSIBILIDADES DE TRATAMIENTO DIETETICO**

La dieta de los pacientes fenilcetonúricos consiste en una restricción en la ingesta de proteínas naturales para evitar una ingesta excesiva de fenilalanina. Dado que todos los alimentos contienen proteínas, y el 5% de dichas proteínas es fenilalanina, habitualmente los pacientes deben contar, medir y pesar todos y cada uno de los alimentos, y tomar más o menos de cada uno de ellos según su contenido proteico. Como es de suponer, esto no es sólo laborioso, sino también muy complicado de entender e interpretar para muchos padres. No es de extrañar, pues, que en muchos centros tengan “escuelas para niños y familiares” donde se les enseña la dieta. Supone también un importante impedimento en la vida social de los pacientes, ya que es imposible que en centros educativos y/o de trabajo encuentren alimentos con el peso en

contenido proteico que ellos conocen. Este es uno de los motivos principales que alegan los pacientes adultos para abandonar la dieta <sup>(94,95)</sup>.

Dietas como éstas fueron las que tuvieron los pacientes de nuestra Unidad hasta 1994. Su control metabólico y su desarrollo psicomotor fueron buenos pero se encontraban con las dificultades arriba señaladas. De forma empírica se observó entonces que parecía que los alimentos con proteínas de bajo valor biológico no aumentaban sustancialmente los niveles de fenilalanina, y a partir de ese momento se liberalizaron completamente. En esta Tesis Doctoral se demuestra estadísticamente que esa suposición era cierta. Asimismo, se ha observado la evolución de los pacientes con esta nueva dieta y se objetiva que su desarrollo y su control metabólico siguen siendo adecuados (incluso con rangos en los niveles de fenilalanina más estrictos).

La diferencia puede no parecer importante, ya que al fin y al cabo se siguen teniendo que pesar y contar las proteínas de alto valor biológico, pero sí que supone un cambio sustancial. Hay que contar carnes, pescados, huevos, productos lácteos, cereales, legumbres y frutos secos, pero el resto de los alimentos son totalmente libres, en cualquier cantidad. En España, donde el consumo de frutas y verduras sigue siendo elevado, poder comerlas sin pensar aumenta considerablemente la calidad de vida de los pacientes: permite compartir muchos platos con el resto de la familia; las familias ya conocen multitud de recetas que pueden tomarse con libertad, y otras que son fácilmente adaptables; se pueden encontrar en restaurantes o bares verduras, frutas, setas, pimientos, patatas con diferentes salsas, etc lo que facilita las salidas sociales; se pueden comer en cantidades elevadas, quitando la sensación de hambre de las dietas restrictivas, etc. Además, por los motivos arriba descritos, permiten reducir el consumo de productos de bajo contenido proteico y que no siempre están financiadas en su totalidad, por lo que el liberalizar las PNBVB reduce el gasto económico para las familias. A nivel nutricional, son además una fuente rica en vitaminas y oligoelementos que de otra forma hay que suplementar de forma artificial.

Otra de las conclusiones de esta Tesis Doctoral es que la tolerancia a PNAVB no se modifica sustancialmente con la edad. Al expresar la ingesta proteica en miligramos de fenilalanina por kilo, está publicado que la tolerancia se reduce con la edad. Es lógico que al aumentar los kilos, pero no variar la tolerancia a fenilalanina, parezca que la cantidad se reduce. Es cierto que la cantidad de fenilalanina utilizada para el crecimiento varía a las distintas edades y se reduce sustancialmente una vez alcanzada la edad adulta, pero dado que según aumenta la edad también aumentamos el rango permitido de fenilalanina en sangre, la cantidad de PNAVB que recomendamos no se ve alterada. Esto quiere decir que desde un primer momento, conociendo los niveles de fenilalanina al diagnóstico, podemos estimar el fenotipo y con él la tolerancia a PNAVB con bastante fiabilidad. La estabilidad en la cantidad de PNAVB que se permite en cada caso facilita la comprensión y adaptación de los pacientes y sus familiares a la dieta.

Para poder liberalizar las PNBVB sin repercusión en los niveles de fenilalanina, sin embargo, hemos observado que es preciso tomar los productos proteicos sin fenilalanina (PXPhe) en un número mayor de tomas diarias que lo que recomiendan en otros centros. Recomendamos un mínimo de 4, siendo ideal 5-6 tomas diarias, incluso en la edad adulta. Tanto a corto como a largo plazo hemos observado un peor control metabólico en aquellos pacientes con menor número de tomas. Un mayor número de tomas, además, reduce la variabilidad diaria de la fenilalanina <sup>(152,153)</sup>, con los efectos nocivos que esta variabilidad puede suponer. Es indudable que un mayor número de tomas complica la adhesión al tratamiento, pero el desarrollo de nuevas formulaciones por parte de los laboratorios farmacéuticos facilita este último punto <sup>(91-93)</sup>.

La comodidad, facilidad y variedad de la dieta propuesta hicieron imposible el mantener un grupo control que mantuviera la dieta previa a largo plazo, y que hubiera permitido hacer estudios comparativos.

Siguiendo una dieta con restricción de las PNAVB según fenotipo, PABVB libres y productos con PXPhe en múltiples tomas, nuestros pacientes tuvieron un buen control metabólico, con niveles de fenilalanina medios siempre en el rango adecuado

para cada edad. Hemos demostrado que los factores que más dificultan un buen control metabólico son sobre todo la fiebre y las trasgresiones dietéticas. También hemos identificado la alergia como un factor que puede aumentar los niveles de fenilalanina. Nos parece un dato importante en vista del aumento en la prevalencia de procesos alérgicos que se está produciendo en edades pediátricas en nuestro medio <sup>(155)</sup>.

Podría ser que los pacientes, sabiendo que la fiebre o la alergia aumenta sus niveles de fenilalanina, adujeran este motivo para encubrir trasgresiones dietéticas por su parte. Aunque no podemos negar esta posibilidad en algunos casos, nos parecen una minoría por varias razones. La primera es que los pacientes nos indican la coincidencia con la fiebre al remitir la muestra, antes de saber si ese control está elevado o no. Asimismo suelen añadir los síntomas y el tratamiento prescrito por su médico. Una segunda razón es que los controles con procesos febriles se concentran en las edades en las que éstos son más habituales (primeros años de guardería y escolarización). A esta edad, además, son los padres los encargados de llevar a cabo el tratamiento, y en la mayoría de los casos su implicación para evitar un posible retraso mental en sus hijos está fuera de toda duda. La tercera razón es que nuestros pacientes, al ser interrogados sobre la posibilidad de estar haciendo trasgresiones, suelen admitirlas abiertamente, sin buscar subterfugios. Los pacientes adolescentes y adultos prácticamente no refieren procesos febriles. Por todos estos motivos, y aunque no hemos constatado personalmente los procesos febriles, creemos que los datos aportados por los pacientes y sus familiares son fiables.

El aumento en el catabolismo de proteínas endógenas que se produce durante los periodos de estrés explica este aumento en los niveles de fenilalanina durante los procesos febriles, y porqué la eliminación de la fenilalanina de la dieta a veces no es suficiente para mantener los niveles dentro del rango adecuado para la edad del paciente. Aún así hemos demostrado que, en caso de producirse un proceso febril, la eliminación completa de la fenilalanina de la dieta ayuda a mantener los niveles de fenilalanina en un rango más bajo. Teniendo en cuenta la frecuencia de procesos febriles que puede sufrir un paciente los primeros años de vida, y que éste es un

periodo crítico en su desarrollo cerebral, el control de los niveles de fenilalanina durante estos periodos es de suma importancia.

Los pacientes moderados y severos tienen una dieta más estricta pero no hemos encontrado diferencias ni en su grado de control metabólico ni en la frecuencia con la que cometen trasgresiones. Esto es reflejo de algo que no hemos podido estudiar de forma estadística: que no es tanto la dieta que llevan, como cómo lleva la dieta cada paciente y su familia. Los malos controles debidos a trasgresiones suelen recibirse siempre de los mismos pacientes, mientras que el resto aceptan el tratamiento, hacen la dieta adecuadamente y sus controles están dentro de su rango. El que la media de control para todos los fenotipos a todas las edades esté por debajo de los límites establecidos como perjudiciales indica que los pacientes que siguen nuestras indicaciones son la mayoría.

A pesar del posible coste añadido que suponen los alimentos sin fenilalanina, y gracias a que el Estado cubre el gasto de los productos especiales sin fenilalanina, el nivel socio-económico de las familias no influye en el control de sus hijos. El esfuerzo educativo por parte de los médicos que componemos la Unidad de Enfermedades Metabólicas, ha permitido que los hijos de padres con un nivel intelectual más bajo mantengan un control adecuado de su enfermedad, aunque posiblemente la dieta de estos pacientes sea menos variada. Lógicamente, el interés que ponen los padres en el progreso de sus hijos es el factor familiar más positivo para conseguir un control adecuado. Aunque hay pocas publicaciones sobre la influencia de factores familiares en el control metabólico de los pacientes PKU, se ha descrito que éste es peor cuando hay problemas familiares (separaciones o similar) o cuando los padres no consiguen que sus hijos sigan la dieta <sup>(156,157)</sup>. Son dos ejemplos de un bajo interés de la familia por el tratamiento de sus hijos reflejado en nuestro estudio.

Los controles nutricionales de nuestros pacientes estuvieron en rangos normales. Los resultados analíticos a los 3 años no mostraron alteraciones, incluidos los niveles de zinc y carnitina libre. La ingesta libre de frutas y verduras, y la sugerencia

de una ingesta habitual de tocino de cerdo ibérico (rico en w3 y w6, y rico en sabores) pueden haber producido esta diferencia respecto a otras publicaciones <sup>(86,87)</sup>. No hemos podido medir niveles de selenio ni realizar densitometrías óseas para observar si nuestros pacientes sufrían las alteraciones descritas en estas pruebas <sup>(82,88, 158,159)</sup>, dado que no se encuentran disponibles en nuestro hospital. No hemos constatado dolores óseos ni una mayor frecuencia de fracturas en nuestra población PKU, incluso a pesar de que muchos practican deporte con asiduidad e incluso una de ellas, con fenotipo severo, ha sido campeona juvenil de Madrid de taekwondo.

Tampoco hemos realizado controles analíticos a otras edades de forma sistemática. Es posible que en controles sucesivos se pudieran encontrar alteraciones, pero el buen desarrollo pondero-estatural de los pacientes y la normalidad de los resultados de las analíticas realizadas de forma esporádica hizo que no se realicen controles analíticos de forma sistematizada.

La evolución de talla y peso de nuestros pacientes fue en todo momento adecuada para su edad, independientemente de su fenotipo (y la mayor o menor severidad de su dieta). Aunque en la literatura se describe un retraso sobre todo estatural de los pacientes PKU <sup>(160-164)</sup>, la talla final en nuestra muestra es incluso ligeramente superior a la de sus progenitores. El índice de masa corporal, en contra de la suposición inicial del equipo investigador, también es similar al de la población normal, o ligeramente superior al final de la adolescencia. Nuestra percepción es que los pacientes, sobre todo al alcanzar la adolescencia, tienden a sufrir de sobrepeso, pero dado que esto es una tendencia general en nuestra sociedad <sup>(165)</sup>, al comparar de nuestros pacientes con la media no observamos diferencias. La normalidad en la evolución pondero-estatural de nuestros pacientes indica que su dieta, a pesar de sus restricciones, está bastante equilibrada desde el punto de vista nutricional.

El resultado más gratificante de la evaluación de nuestros resultados en el tratamiento de la fenilcetonuria ha sido constatar que los pacientes tratados desde el periodo neonatal tuvieron un desarrollo psicomotor normal, y aquellos en los que el

diagnóstico fue tardío el tratamiento mejoró sustancialmente su desarrollo psicomotor, su comportamiento y su sociabilidad. La edad de inicio del tratamiento es claramente el factor que más influye en el desarrollo intelectual de los pacientes.

A pesar de alcanzar coeficientes intelectuales normales, se ha publicado que los pacientes fenilcetonúricos alcanzan coeficientes intelectuales más bajos que sus hermanos sanos <sup>(166)</sup>. También se ha publicado que sus logros académicos y laborales son inferiores <sup>(167,168)</sup>. Nosotros no hemos podido cuantificar el coeficiente intelectual de los hermanos, pero los pacientes atendieron los mismos colegios que su fratria con resultados académicos similares y, en los casos que así lo quisieron, siguieron estudios superiores. Dado que la detección neonatal en Madrid comenzó en el año 1979, los pacientes tratados de más edad rondan ahora los 30 años y en el caso de los licenciados están ahora comenzando su carrera profesional, por lo que de momento no nos constan problemas laborales. Entre nuestros pacientes hay ingenieros industriales, economistas, auxiliares de enfermería, etc. Los pacientes que han optado por no seguir estudios universitarios en general han encontrado trabajos de su gusto y no refieren mayores dificultades en mantenerlos que los propios de la actual situación económica.

Un hallazgo llamativo es que los pacientes del periodo pre-1994 (durante el cual se permitían niveles de fenilalanina superiores) y del periodo post-1994 alcanzaron coeficientes intelectuales similares a los 9 años de edad. Estos no son los coeficientes intelectuales finales, pero dado que el CI no sufrió grandes diferencias a las distintas edades, es probable que esta similitud se produzca cuando los pacientes de menor edad alcancen su CI final. Hay estudios que defienden que cuánto más baja es la media de los niveles de fenilalanina mantenidos durante los primeros años de vida, más alto es el CI <sup>(169,170)</sup>, pero estos resultados los contradicen. Habrá que hacer más estudios, pero si la disminución en el CI es mínima, habrá que valorar si merece la pena o no endurecer los niveles de fenilalanina que se consideran adecuados para cada edad. No hay que olvidar que endurecer los niveles supone para la mayoría de los casos endurecer considerablemente una dieta, ya de por sí estricta.

En la decisión sobre los niveles adecuados para cada edad no sólo hay que tener en cuenta el coeficiente intelectual, sino también síntomas neurológicos no cuantificables en los test de inteligencia. Al igual que ha sido descrito en otras series <sup>(171)</sup>, tuvieron síntomas compatibles con el síndrome de hiperactividad y déficit de atención el 8,8% de nuestra población MHP y el 20% de la población PKU. En la población normal se estima la prevalencia de este síndrome en un 7-10% <sup>(172)</sup>. Esto supone que a pesar del tratamiento y de tener parámetros normales tanto en el desarrollo psicomotor como en las pruebas de rendimiento intelectual, los pacientes PKU tienen alteraciones neurológicas menores que se manifiestan en forma de este síndrome. Otra alteración neurológica menor descrita en otras series es la alteración en la capacidad manipulativa de los pacientes <sup>(173)</sup>, pero en este caso no hemos podido corroborar dichos hallazgos. En cuanto a los pacientes adultos, en dos casos retomaron la adhesión a la dieta tras padecer síntomas ansioso-depresivos <sup>(41,42,174,175)</sup>, pero, son una excepción a pesar de que la mayoría de los pacientes adultos cometen trasgresiones de forma habitual.

Las pruebas neurofisiológicas no creemos que estén justificadas en el seguimiento habitual de pacientes PKU. En este punto no hay consenso en la literatura, con autores que sí consideran útil la realización de EEG de forma rutinaria <sup>(176)</sup> y otros que han encontrado resultados similares a los nuestros <sup>(177)</sup>. Las pruebas de imagen sí han resultado demostrativas en el caso de pacientes en los que el control metabólico era especialmente malo de forma prolongada. En estos casos la presencia de la leucodistrofia periventricular ha sido una herramienta útil con la cual demostrar al paciente la importancia de adherirse a la dieta. Pero salvo en estos casos, tampoco recomendamos su realización de forma rutinaria. Es posible que otras pruebas de imagen de desarrollo más reciente muestren su utilidad en el seguimiento o valoración pronóstica de estos pacientes, al mostrar cambios más precoces o sutiles <sup>(178,179)</sup>.



### **5.3.- DISCUSION SOBRE LA INVESTIGACION DE NUEVAS POSIBILIDADES DE TRATAMIENTO FARMACOLOGICO**

La eficacia de la tetrahidrobiopterina para tratar a ciertos pacientes con deficiencia de fenilalanina hidroxilasa ha supuesto un cambio sustancial en la forma de diagnóstico y tratamiento de la fenilcetonuria. En el diagnóstico, porque se ha generalizado la práctica de realizar sobrecargas de BH<sub>4</sub> a todos los pacientes con hiperfenilalaninemia, y no sólo a aquellos con sospecha de deficiencias en el cofactor. También se ha hecho más frecuente la determinación del genotipo, ya que ayuda a determinar en qué pacientes puede ser útil esta medicación. En cuanto al tratamiento, ni que decir tiene que ha cambiado la vida de aquellos pacientes en los que se puede utilizar. En los últimos años, desde las primeras publicaciones que se hicieron sobre esta nueva opción terapéutica, y gracias a la realización de esta Tesis Doctoral, la Unidad de Enfermedades Metabólicas del H. Ramón y Cajal ha sido pionera en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes fenilcetonúricos respondedores a BH<sub>4</sub>, tanto a nivel nacional como internacional. Este ha sido uno de los motivos por los que la Unidad, representada por la doctoranda, forma parte del Comité Europeo Asesor en Fenilcetonuria dirigido por el Dr. Nenad Blau (Zúrich, Suiza).

El fármaco ha demostrado ser lo suficientemente seguro para que la sobrecarga de BH<sub>4</sub> se pueda realizar a cualquier edad, desde neonatos hasta la edad adulta, sin perjuicio para la salud del paciente. Tampoco se ha observado que la edad influya en los resultados de la prueba.

Respecto a cómo se debe realizar la sobrecarga de BH<sub>4</sub>, todavía hoy hay controversia. Ciertos autores abogan por realizar una prueba prolongada, desde una semana hasta varios meses, manteniendo una dieta restringida y observando el paulatino descenso de los niveles de fenilalanina y/o el aumento en la tolerancia de fenilalanina <sup>(98,133,134,180)</sup>. Otros autores prefieren pruebas más cortas, de 24-48 horas de duración, durante las cuales unos eliminan la dieta, y otros prefieren mantenerla pero

aumentan el nivel basal de fenilalanina mediante una sobrecarga de fenilalanina previa <sup>(104-107,181,182)</sup>. Las dosis de BH<sub>4</sub> utilizadas también han sido variadas, aunque la utilizada de forma preferente ha sido 20 mg/Kg en dosis única diaria <sup>(183)</sup>. El porcentaje de descenso en los niveles de fenilalanina respecto al basal considerado como respuesta positiva puede ser desde un 20 hasta un 40%. Finalmente, el momento en el que se debe medir dicha respuesta no ha sido uniforme.

Recientemente, Levy et al han publicado lo que se ha convertido en la directriz utilizada en Estados Unidos para determinar la respuesta a BH<sub>4</sub> en pacientes fenilcetonúricos <sup>(184)</sup>. Consiste en una prueba prolongada, durante la cual se mantiene su dieta restringida habitual y se da 20 mg/Kg de BH<sub>4</sub> en dosis única diaria a los pacientes. El descenso en los niveles de fenilalanina se considera positivo a partir de un 30%, y se mide a la semana de iniciado el tratamiento. En caso de respuesta positiva, se puede iniciar el aumento en la cantidad de fenilalanina diaria permitida. En caso de falta de respuesta, el tratamiento se puede mantener hasta 3 meses (durante los cuales periódicamente se miden los niveles de fenilalanina) antes de dar por negativa la prueba. Una prueba tan prolongada tiene por objetivo evitar tener falsos negativos entre los pacientes con respuestas lentas. Como contrapartida, es una prueba mucho más cara y se puede argumentar que en algunos pacientes, el descenso de fenilalanina puede producirse más por un mejor seguimiento de la dieta durante este periodo (bien por interés del propio paciente o simplemente por el hecho de sentirse más observado), que por efecto de la medicación, es decir, puede dar lugar a falsos positivos.

En Europa todavía no hay un consenso común, aunque las directrices ofrecidas por el Dr. Blau, con quien hemos colaborado activamente, son las más aceptadas <sup>(185)</sup>. La forma de realizar la sobrecarga de BH<sub>4</sub> que él propone es la que ha sido utilizada por nosotros desde el año 2002: una sobrecarga de 24 horas de duración con 20 mg/Kg de tetrahidrobiopterina y con mediciones frecuentes de los niveles de fenilalanina.

Nosotros hemos hecho sobrecargas de fenilalanina en los pacientes MHP, en los que los niveles de fenilalanina con dieta normal eran tan bajos que era imposible

cuantificar el cambio producido por la medicación. En los pacientes PKU hemos preferido eliminar completamente las restricciones, con el objeto de medir exclusivamente el efecto de la medicación (sin que interfiera la mejor adhesión a la dieta en ese momento) y poder de ese modo conocer si en ese paciente se puede o no liberalizar totalmente la dieta a largo plazo. Además, al ser de corta duración permite el que se pueda realizar a nivel hospitalario, lo que asegura una igualdad de condiciones para todos los pacientes.

Hay investigadores que temen que los pacientes, en caso de no ser respondedores, una vez han probado una dieta normal tengan enormes dificultades para adaptarse de nuevo a su dieta limitada. Nosotros no hemos tenido ese problema. Los pacientes eran conscientes de que esta situación era transitoria, se lo tomaban como una fiesta, y de hecho todos ellos volvían a su dieta habitual hasta recibir los resultados de la sobrecarga, que en ocasiones se demoraba varios días. En caso de ser respondedores entonces se iniciaban realmente los cambios dietéticos. En caso de no responder, simplemente continuaban como hasta ese momento.

Hacer la sobrecarga en los neonatos manteniendo una dieta normal también es motivo de temor para algunos clínicos. En estos casos el tratamiento simplemente se retrasa 24 horas, tras las cuales inician tratamiento dietético hasta conocer los resultados de la sobrecarga. No se ha demostrado que el desarrollo psicomotor de los pacientes varíe sustancialmente por retrasos tan cortos, siempre y cuando se controlen los niveles de fenilalanina durante el primer mes de vida.

Una sobrecarga de 24 horas tiene el riesgo de dar por no respondedores a aquellos pacientes cuya respuesta es lenta. El hacer controles de fenilalanina frecuentes durante la prueba evita en la mayoría de los casos este problema, ya que estos pacientes suelen tener descensos a las 12, 16 o 24 horas. Tres de los siete pacientes con sobrecargas cortas y dados por no respondedores, tuvieron respuestas positivas durante la sobrecarga prolongada realizada en el estudio PKU-006. En uno de estos casos la sobrecarga corta se había realizado con 10 mg/Kg de BH<sub>4</sub>, y no los 20 mg/Kg

que actualmente se utilizan, y es probable que éste sea el motivo del error. Otra de las pacientes con respuesta positiva en la sobrecarga prolongada pero no en la puntual, finalmente no tuvo una buena evolución con el tratamiento a largo plazo, es decir, fue un falso positivo. En conjunto, la sobrecarga puntual realizada con 20 mg/Kg y con mediciones frecuentes de los niveles de fenilalanina nos parece suficiente para diagnosticar a la mayoría de los pacientes respondedores, tanto tempranos como lentos. Si a este tipo de sobrecarga se le añade además el estudio del genotipo es poco probable que genere falsos negativos.

El grado de descenso en los niveles de fenilalanina ha sido uno de los parámetros que más relación han tenido con la evolución a largo plazo de los pacientes. En los pacientes con descensos superiores al 40% pudimos liberalizar la dieta completamente, mientras que en aquellos con descensos entre el 30 y el 40%, aunque duplicaron su tolerancia, hubo que mantener ciertas restricciones dietéticas. Hay autores que no consideran a éstos últimos pacientes como verdaderos respondedores y sólo tratan a los pacientes en los que se puede utilizar la tetrahidrobiopterina como tratamiento único pero, en nuestra experiencia, la calidad de vida de los pacientes en los que la dieta no se puede eliminar completamente también cambia drásticamente.

El realizar múltiples mediciones de los niveles de fenilalanina a lo largo de la prueba de sobrecarga no sólo permite diagnosticar a los pacientes con una respuesta lenta, sino que ha sido uno de los indicadores más útiles para conseguir un buen control de los pacientes tratados a largo plazo con BH<sub>4</sub>. Si el descenso en los niveles de fenilalanina era mantenido hemos podido ver los pacientes pueden controlarse con una dosis diaria del medicamento, mientras que en los casos en los que tras un corto espacio de tiempo los niveles vuelven a subir requieren repartir en 2 – 3 dosis diarias la BH<sub>4</sub> para tener en todo momento unos niveles adecuados de fenilalanina.

En todos los pacientes la absorción de la BH<sub>4</sub> fue similar, con un pico en los niveles de pterinas en sangre a las 4 horas post-ingesta del medicamento. Por lo tanto, ni el grado de respuesta ni el tiempo en que ésta se produce puede atribuirse en

diferencias en la absorción intestinal que cada paciente pudiera tener <sup>(117,118)</sup>. Estas diferencias están en relación con el genotipo de cada paciente. Aunque en nuestra muestra no hay muchos genotipos coincidentes, los pacientes con genotipos similares respondieron de forma similar a la sobrecarga y tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub>. En general, ocurre como con la determinación del fenotipo: los pacientes con mutaciones que determinan una alta capacidad residual tienden a responder al medicamento, los pacientes con mutaciones con capacidad residual intermedia responden o no según la combinación que configure el genotipo, y los pacientes con mutaciones con capacidad residual baja o nula no tienen proteína para interactuar con la BH<sub>4</sub> y por lo tanto no responden a ella.

El tratamiento a largo plazo con BH<sub>4</sub> ha sido muy satisfactorio. No se ha producido en ningún caso la aparición de reacciones adversas, y la calidad de vida de todos los pacientes, tanto los que siguen dieta libre como la que aquellos que mantienen alguna restricción, ha mejorado considerablemente. El control metabólico de los pacientes ha sido similar al obtenido con la dieta. La fiebre sigue siendo un factor a tener en cuenta, porque la tetrahidrobiopterina no evita que en estos episodios los niveles aumenten. Por lo tanto en estos periodos seguimos sugiriendo a los pacientes una reducción en su ingesta proteica. En cambio, hemos eliminado el problema de las trasgresiones dietéticas. En ningún caso, salvo la paciente que dio un falso positivo en la sobrecarga prolongada, hemos tenido que retirar el tratamiento a ningún paciente por mal control.

Por desgracia, los pacientes con dietas más restrictivas (fenotipos moderados y severos), son aquellos en los que la tetrahidrobiopterina no ha demostrado utilidad. La investigación de nuevas terapias en fenilcetonuria, por tanto, sigue siendo necesaria.

## **6.- CONCLUSIONES**

1. **Davenport HW.** (1968) "Digestión y Absorción Intestinal de Proteínas". En: *Fisiología de la Digestión*. Ed: Davenport HW. Interamericana: 197-203.
2. **Kaufman S.** (1976) "Phenylketonuria: biochemical mechanisms" *Adv Neurochem* 2:1.
3. **Scriver CR, Gregory DM, Sovetts D, Tissenbaum G.** (1985) "Normal plasma free amino acid values in adults: the influence of some common physiological variables" *Metabolism* 34(9):868-73.
4. **Gregory DM, Sovetts D, Clow CL, Scriver CR.** (1986) "Plasma free amino acid values in normal children and adolescents" *Metabolism* 35(10):967-9.
5. **Scriver CR, Kaufman S.** (2001) "Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency" En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8<sup>a</sup> Edición). Ed: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. McGraw-Hil. Pg 1667-1724.
6. **Ugarte M.** (1982) "Detección precoz de metabolopatías congénitas en España" *Informe al Real Patronato de Educación y Atención al Deficiente*. Pg 1-35.
7. **Fölling A.** (1934) "Über ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechsellanomalie in Verbindung mit Imbezillitat" *Hoppe-Sylers. Z Physiol Chem* 227:169-176.
8. **Penrose LS.** (1939) "Inheritance of phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria)" *Lancet* 2:192.
9. **Jervis GA.** (1947) "Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error" *J Biol Chem* 169:651-657.
10. **Jervis GA.** (1953) "Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system" *Proc Soc Exp Biol Med* 82:514-5.
11. **Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM.** (1953) "Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria" *Lancet* 2:812-813.
12. **Writhe SW.** (1962) "Mass screening for phenylketonuria" *J Pediatr* 61:651-2.
13. **Committee for the PKU register in the U.K.** (1981) "Routine neonatal screening for the PKU in the United Kingdom 1964-78" *British Med J* 282:1680-1684.
14. **Levy HL.** (1974) "Neonatal screening for inborn errors of amino acid metabolism" *Clin Endocrinol Metab* 3(1):153-66.
15. **Frontera-Izquierdo P.** (1980) "Phenylketonuria and neonatal hypothyroidism in Spain. Priority of screening for neonatal hypothyroidism" *Eur J Pediatr* 133(3):297.
16. **Guttler F.** (1980) "Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine deficiency in childhood" *Acta Paediatr Scand* 280:1.

17. **Kaufman S, Fisher DB.** (1970) "Purification and some physical properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver" *J Biol Chem* 245:4745.
18. **Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS.** (1999) "Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues" *Mol Genet Metab* 67(4):308-16.
19. **Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke KR, Rodl W, Swanson NN, Hitzemann K, Ziegler I.** (1994) "Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin" *Science* 263(5152):1444-6.
20. **Erlandsen H, Stevens RC.** (1999) "The structural basis of phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 68(2):103-25.
21. **Konecki D, Lichter-Konecki U.** (2001) GenBank AF4044777.
22. **Pey AL.** (2004) "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.*
23. **Dworniczak B, Kalaydjieva L, Pankoke S, Aulehla-Scholz C, Allen G, Horst J.** (1992) "Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot?" *Hum Mutat* 1(2):138-46.
24. **Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR.** (2000) "Expression analysis of phenylketonuria mutations: effects on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein" *J Biol Chem* 275:29737-29742.
25. **Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR.** (2000) "Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype" *Mol Genet Metab* 69:101-110.
26. **Desviat LR, Pérez B, Ugarte M.** (2003) "Investigation of folding and degradation of in vitro synthesized mutant proteins in the cytosol" *Methods Mol Biol* 232:257-263.
27. **Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR.** (1998) "In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function" *Hum Mutat* 11:4-17.
28. **Tyfield LA, Zschocke J, Stephenson A, Cockburn F, Harvie A, Bidwell JL, Wood NA, Hunt LP.** (1995) "Discordant phenylketonuria phenotypes in one family: the relationship between genotype and clinical outcome is a function of multiple effects" *J Med Genet* 32(11):867-70.
29. **Guldberg P, Levy HL, Koch R, Berlin CM Jr, Francois B, Henriksen KF, Güttler F.** (1994) "Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency: inheritance and expression of the hyperphenylalaninemia" *J Inherit Metab Dis* 17:645.



30. **Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR.** (1997) "Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations" *Am J Hum Genet* 61(6):1309-17.
31. **Desviat LR, Perez B, García MJ, Martínez-Pardo M, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Campistol J, Couce ML, Fernández A, Cardesa J, Ugarte M.** (1997) "Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population" *Eur J Hum Genet* 5:196-202.
32. **Meinster A.** (1958) "Phenylpyruvic oligophrenia" *Pediatrics* 21(6):1021-31.
33. **Poser CM, van Bogaert L.**(1959) "Neuro-pathologic observations in phenylketonuria" *Brain* 82(1):1-9.
34. **MacCready RA.** (1974) "Admissions of phenylketonuric patients to residential institutions before and after screening programs of the newborn infant" *J Pediatr* 85:383.
35. **Estrov Y, Scaglia F, Bodamer OA.** (2000) "Psychiatric symptoms of inherited metabolic disease" *J Inherit Metab Dis* 23(1):2-6.
36. **Huttenlocher PR.** (2000) "The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies" *Eur J Pediatr* 159(2):S102-6.
37. **Ormazábal A, Artuch R, Vilaseca MA, García-Cazorla A, Campistol J.** (2004) "Pathogenetic mechanisms in phenylketonuria: disorders affecting the metabolism of neurotransmitters and the antioxidant system" *Rev Neurol* 39(10):956-61.
38. **Partington MW.** (1961) "The early symptoms of phenylketonuria" *Pediatrics* 27:465-73.
39. **Seashore MR, Friedman EG, Novelly RA, Bapat V.** (1985) "Loss of intellectual function in children with phenylketonuria after relaxation of dietary phenylalanine restriction" *Pediatrics* 75:226-232.
40. **Holtzman NA, Kronmal RA, van Doorninck W, Azen C, Koch R.** (1986) "Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria" *N Engl J Med* 314(10):593-8.
41. **Levy HL, Waisbren SE.** (1994) "PKU in adolescents: rationale and psychosocial factors in diet continuation" *Acta Paediatr Suppl.* 407:92-7.
42. **Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, Scott R, Wolff J, Stern AM, Guttler F, Nelson M, de la Cruz F, Coldwell J, Erbe R, Geraghty MT, Shear C, Thomas J, Azen C.** (2002) "Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study" *J Inherit Metab Dis* 25(5):333-46.
43. **Crome L.** (1962) "The association of phenylketonuria with leucodystrophy" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25:149-53.

44. **Battistini S, De Stefano N, Parlanti S, Federico A.** (1991) "Unexpected white matter changes in an early treated PKU case and improvement after dietary treatment" *Funct Neurol* 6(2):177-80.
45. **Ullrich K, Möller H, Weglage J, Schuierer G, Bick U, Ludolph A, Hahn-Ullrich H, Fünders B, Koch HG.** (1994) "White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements" *Acta Paediatr Suppl.* 407:78-82.
46. **Cleary MA, Walter JH, Wraith JE, White F, Tyler K, Jenkins JP.** (1995) "Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change" *J Pediatr.*127(2):251-5
47. **Weglage J, Wiedermann D, Denecke J, Feldmann R, Koch HG, Ullrich K, Möller HE.** (2002) "Individual blood-brain barrier phenylalanine transport in siblings with classical phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 25(6):431-6.
48. **Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaun A, Levy H.** (2007) "Phenylalanine levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic review and meta-analysis" *Mol Genet Metab* 92:63-70.
49. No authors. (1993) "Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria" *Arch Dis Child* 68(3):426-7.
50. **Martínez-Pardo M, Marchante C, Dalmau J, Pérez M, Bellón C.** (1998) "Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias" *An Esp Pediatr Suppl* 114:3-8.
51. **Burgand P, Bremer HJ, Buhrdel P, Clemens PC, Monch E, Przyrembel H, Trefz FK, Ullrich K.** (1999) "Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997" *Eur J Pediatr* 158:46-54.
52. **Seashore MR, Wappner R, Cho S, de La Cruz F.** (1999) "Development of guidelines for treatment of children with phenylketonuria: report of a meeting at the National Institute of Child Health and Human Development held August 15, 1995, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland" *Pediatrics* 104(6):e67.
53. **National Institutes of Health Consensus Development Panel. Natinal Institutes of Health Consensus Development Conference Statement.** "Phenylketonuria: screening and manegement" Oct 16-18 2000. (2001) *Pediatrics* 108:972-982.
54. **Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, Ogier de Baulny H, de Parscau L et l'Association francaise pour le depistage et la prevention des handicaps de l'enfant (AFDPHE).** (2005) "Manegement of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: the french guidelines" *Arch Pediatr* 12(5):594-601.
55. **Koch R, Moseley K, Ning J, Romstad A, Guldberg P, Guttler F.** (1999) "Long-term beneficial effects of the phenylalanine-restricted diet in late-diagnosed individuals with phenylketonuria" *Mol Genet Metab* 67(2):148-55.

56. **Gassió R, Campistol J, Vilaseca MA, Lambruschini N, Cambra FJ, Fusté E.** (2003) "Do adult patients with phenylketonuria improve their quality of life after introduction/resumption of a phenylalanine-restricted diet?" *Acta Paediatr* 92(12):1474-8.
57. **Fleisher TL, Zeligman I.** (1960) "Cutaneous findings in phenylketonuria" *Arch Dermatol* 81:898-9.
58. **Weglage J, Pietsch M, Feldmann R, Koch HG, Zschocke J, Hoffmann G, Muntau-Heger A, Denecke J, Guldberg P, Güttler F, Möller H, Wendel U, Ullrich K, Harms E.** (2001) "Normal clinical outcome in untreated subjects with mild hyperphenylalaninemia" *Pediatr Res* 49(4):532-6.
59. **Levy HL, Waisbren SE, Lobbregt D, Allred E, Schuler A, Trefz FK, Schweitzer SM, Sardharwalla IB, Walter JH, Barwell BE, et al.** (1994) "Maternal mild hyperphenylalaninaemia: an international survey of offspring outcome" *Lancet* 10;344(8937):1589-94.
60. **Johnston JJ, Lichter-Konecki U, Wilson E, Cobb BR, Evans BM, Schnur RE, Wong LJ.** (2004) "Discordant PKU phenotype in one family due to disparate genotypes and a novel mutation" *J Inherit Metab Dis* 27(2):157-63.
61. **Rouse B, Matalon R, Koch R, Azen C, Levy H, Hanley W, Trefz F, de la Cruz F.** (2000) "Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes" *J Pediatr* 136(1):57-61.
62. **Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon K, Matalon R, Rouse B, Trefz F, Güttler F, Azen C, Platt L, Waisbren S, Widaman K, Ning J, Friedman EG, de la Cruz F.** (2003) "The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002" *Pediatrics* 112(6 Pt 2):1523-9.
63. **Feillet F, Abadie V, Berthlot J, Maurin N, Ogier H, Vidaihet M, Farriaux JP, de Parscau L.** (2004) "Maternal phenylketonuria: the French survey" *Eur J Pediatr* 163(9):540-6.
64. **Rohr F, Munier A, Sullivan D, Bailey I, Gennaccaro M, Levy H, Brereton H, Gleason S, Goss B, Lesperance E, Moseley K, Singh R, Tonyes L, Vespa H, Waisbren S.** (2004) "The Resource Mothers Study of Maternal Phenylketonuria: preliminary findings" *J Inherit Metab Dis* 27(2):145-55.
65. **Lee PJ, Ridout D, Walter JH, Cockburn F.** (2005) "Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97" *Arch Dis Child* 90(2):143-6.
66. **Guthrie R, Susie A.** (1963) "A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants" *Pediatrics* 2:338-343.
67. **Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K.** (2001) "Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines." *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8<sup>a</sup> Edición). Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. McGraw-Hill: 1667-1724.

68. **Smith I.** (1974) "Atypical phenylketonuria accompanied by severe progressive neurologic illness unresponsive to dietary treatment" *Arch Dis Child* 49:245-9.
69. **Smith I, Clayton B, Wolff OH.** (1975) "New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction" *Lancet* 1:1108-1111.
70. **Danks DM, Bartholome K, Clayton B, Curtius H, Grobe H, Kaufman S, Leeming R, Pfleiderer W, Rembold H, Rey F.** (1978) "Malignant hyperphenylalaninemia. Current status" *J Inherit Metab Dis* 1:49-53.
71. **Niederwieser A, Curtius HC, Viscontini M, Schaub J, Schmidt H.** (1979) "Phenylketonuria variants" *Lancet* 10;1(8115):550.
72. **Niederwieser A, Curtius HCh, Wang M, Leupold D** (1982) "Atypical phenylketonuria with defective bipterine metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin, screening and study of biosynthesis in man" *Eur J Pediatr* 138:110-112.
73. **Ponzone A, Guardamagna O, Ferraris S, Biasetti S, Bracco G, Niederwieser A.**(1987) "Neurotransmitter therapy and diet in malignant phenylketonuria" *Eur J Pediatr* 146(1):93-4.
74. **Niederwieser A, Curtius HC, Gitzelmann R, Otten A, Baerlocher K, Blehovà B, Berlow S, Gröbe H, Rey F, Schaub J, Scheibenreiter S, Schmidt H, Viscontini M.** (1980) "Excretion of pterins in phenylketonuria and phenylketonuria variants" *Helv Paediatr Acta* 35(4):335-42.
75. **Matalon R, Michals K, Lee CL, Nixon JC** (1982) "Screening for bipterine defects in newborns with phenylketonuria and other hyperphenylalaninemias" *Ann Clin Lab Sci* 12:411-414.
76. **García MJ.** (1989) "Estudio bioquímico de las hiperfenilalaninemias". *Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.*
77. **Martínez-Pardo M, García MJ.** (2006) "Hiperfenilalaninemias por déficit de cofactor BH4" *En: Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias (2ªEd). Ed: Sanjurjo P, Baldellou A. Ergon. Pg 319-328.*
78. **Ponzone A, Guardamagna O, Spada M, Ferraris S, Ponzone R, Kierat I, Blau N.** (1993) "Differential diagnosis of hyperphenylalaninemia by a combined phenylalanine-tetrahydrobiopterin loading test" *Eur J Pediatr* 152:655-661.
79. **Smith I.** (1995) "Treatment of phenylalanine hydroxylase deficiency" *Acta Pediatr* 407 (suppl):60-5.
80. **Dalmau J, Genovés I.** (1995) "Tratamiento nutricional de la fenilketonuria e hiperfenilalaninemias" *An Esp Pediatr* 49-53.

81. **Baldellou A, Salazar MI, Ruiz-Echarri MP, Campos C, Desviat LR, Ugarte M.** (2006) "Tratamiento de la hiperfenilalaninemia por déficit de fenilalanina hidroxilasa ¿Cuándo y cómo?" *An Pediatr* 64(2):146-52.
82. **Campistol J, Lambruscini N, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Fusté E, Gómez L.** (2006) "Hiperfenilalaninemia" *En: Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias (2ªEd).* Ed: Sanjurjo P, Baldellou A. Ergon. Pg 319-328.
83. **Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzone A, Rey J, Guttler F.** (1998) "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* 63(1):71-9.
84. **Desviat LR, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Merchante C, Bóveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernández A, Cabello ML, Ugarte M.** (1999) "Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain. Molecular survey by regions" *Eur J Hum Genet* 7:386-392.
85. **MacDonald A, Rylance G, Davies P, Asplin D, Hall SK, Booth IW.** (2003) "Free use of fruits and vegetables in phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 26:327-33
86. **Böhles H, Ullrich K, Endres W, Behbehani AW, Wendel U.** (1991) "Inadequate iron availability as a possible cause of low serum carnitine concentrations in patients with phenylketonuria" *Eur J Pediatr.* 150(6):425-8.
87. **Vilaseca MA, Briones P, Ferrer I, Campistol J, Riverola A, Castillo P, Ramon F.** (1993) "Controlled diet in phenylketonuria may cause serum carnitine deficiency" *J Inherit Metab Dis* 16(1):101-4.
88. **Darling G, Mathias P, O'Regan M, Naughten E.** (1992) "Serum selenium levels in individuals on PKU diets" *J Inherit Metab Dis* 15(5):769-73.
89. **Moseley K, Koch R, Moser AB.** (2002) "Lipid status and long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations in adults and adolescents with phenylketonuria on phenylalanine-restricted diet" *J Inherit Metab Dis* 25(1):56-64.
90. **Vlaardingerbroek H, Hornstra G, de Koning TJ, Smeitink JA, Bakker HD, de Klerk HB, Rubio-Gozalbo ME.** (2006) "Essential polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocytes of children with inborn errors of amino acid metabolism" *Mol Genet Metab* 88(2):159-65.
91. **MacDonald A, Lilburn M, Cochrane B, Davies P, Daly A, Asplin D, Hall SK, Cousins A, Chakrapani A, Robinson P, Lee P.** (2004) "A new, low-volume protein substitute for teenagers and adults with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 27(2):127-35.
92. **Macdonald A, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall SK, Rylance G, Chakrapani A.** (2004) "Protein substitutes for PKU: what's new?" *J Inherit Metab Dis* 27(3):363-71.

93. **MacDonald A, Lilburn M, Davies P, Evans S, Daly A, Hall SK, Hendriksz C, Chakrapani A, Lee P.** (2006) "Ready to drink' protein substitute is easier for people with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 29(4):526-31.
94. **MacDonald A.** (2000) "Diet and compliance in phenylketonuria" *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2:S136-41.
95. **Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, Francis DE, Shortland GJ, Schmidt M, Vail A.** (2002) "How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria?" *Lancet* 360:55-7.
96. **Walter JH, White FJ.** (2004) "Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria" *Int J Adolesc Med Health.* 16(1):41-5.
97. **Teigen K, Martínez A.** (2003) "Probing cofactor specificity in phenylalanine hydroxylase by molecular dynamics simulations" *J Biomolecular Structure and Dynamics* 20:1-8.
98. **Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K.** (1999) "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency" *J Pediatr* 135(3):375-8.
99. **Bernegger C, Blau N.** (2002) "High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002." *Mol Genet Metab* 77(4):304-13.
100. **Treft FK, Aulela-Scholz C, Blau N.** (2001) "Successful treatment of phenylketonuria with tetrahydrobiopterin" *Eur J Pediatr* 160:315.
101. **Lindner M, Haas D, Mayatepek E, Zschocke J, Burgard P.** (2001) "Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype" *Mol Genet Metab* 73:104-6.
102. **Spaapen LJ, Bakker JA, Velter C, Loots W, Rubio-Gonzalbo ME, Forget PP, Dorland L, de Koning TJ, Poll-The BT, Ploos van Amstel HK, Bekhof J, Blau N, Duran M.** (2001) "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Dutch neonates" *J Inherit Metab Dis* 24:352-358.
103. **Seashore MR** (2002) "Tetrahydrobiopterin and dietary restriction in mild phenylketonuria" *N Engl J Med* 347(26):2094-5.
104. **Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA.** (2002) "Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria" *N Engl J Med* 347(26):2122-32.
105. **Steinfeld R, Kohlschütter A, Zschocke J, Lindner M, Ullrich K, Lukacs Z.** (2002) "Tetrahydrobiopterin monotherapy for phenylketonuric patients with common mild mutations" *Eur J Pediatr* 161:403-5.

106. **Spaapen LJ, Rubio-Gozalbo ME.** (2003) "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art" *Mol Genet Metab* 78(2):93-9.
107. **Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gómez L, Pineda J, Gutierrez A, Mila M, Campistol J.** (2004) "Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria" *Clin Biochem* 37(12):1083-90.
108. **Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, Moseley K, Surendran S, Tyring S, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Romstad A, Moller LB, Guttler F.** (2004) "Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency" *Genet Med* 6(1):27-32.
109. **Kure S, Sato K, Fujii K, Aoki Y, Suzuki Y, Kato S, Matsubara Y.** (2004) "Wild-type phenylalanine hydroxylase activity is enhanced by tetrahydrobiopterin supplementation in vivo: an implication for therapeutic basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency" *Mol Genet Metab* 83(1-2):150-6.
110. **Treft FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G, Korall H, Blau N.** (2005) "Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin" *Mol Genet Metab* 86(1):75-80.
111. **Hennermann JB, Bühner C, Blau N, Vetter B, Mönch E.** (2005) "Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria" *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1:S86-90.
112. **Erlandsen H, Stevens RC.** (2001) "A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria." *J Inherit Metab Dis* 24:213-230.
113. **Blau N, Erlandsen H.** (2004) "The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency" *Mol Genet Metab* 82(2):101-11.
114. **Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tyring S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martínez A, Stevens RC.** (2004) "Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations." *Proc Natl Acad Sci USA* 30;101(48):16903-8.
115. **Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martínez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M, Martínez A.** (2004) "Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations" *Hum Mutat* 24(5):388-99.
116. **Zurflüf MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B, Blau N.** (2008) "Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalaninemia hydroxylase deficiency" *Hum Mutat* 29(1):167-75.
117. **Fiege B, Ballhausen D, Kierat L, Leimbacher W, Goriounov D, Schircks B, Thony B, Blau N.** (2004) "Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration" *Mol Genet Metab* 81(1):45-51.

118. **Zurflüf MR, Fiori L, Fiege B, Ozen I, Demirkol M, Gärtner KH, Thöny B, Giovannini M, Blau N.** (2006) "Pharmacokinetics of orally administered tetrahydrobiopterin in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency" *J Inherit Metab Dis* 29:725-731.
119. **Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo M, Birk Moller L, Blau N.** (2004) "Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 81(2):137-9.
120. **Steinfeld R, Kohlschütter A, Ullrich K, Lukacs Z.** (2004) "Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 27(4):449-53.
121. **Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N, Sakura N, Yoshida I, Yoshino M, Matsubara Y, Suzuki K, Aoki K, Kitagawa T.** (2004) "Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene" *Pediatr Res* 55(3):425-30.
122. **Lambruschini N, Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Artuch R, Gassió R, Gómez L, Gutierrez A, Campistol J.** (2005) "Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy" *Mol Genet Metab* 86(1):554-60.
123. **Jäggi L, Zurflüh MR, Schuler A, Ponzzone A, Porta F, Fiori L, Giovannini M, Santer R, Hoffmann GF, Ibel H, Wendel U, Ballhausen D, Baumgartner MR, Blau N.** (2008) "Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency" *Mol Genet Metab* 93(3):295-305.
124. **Opladen T, Zurflüh M, Kern I, Kierat L, Thöny B, Blau N.** (2005) "Severe mucitis after sublingual administration of tetrahydrobiopterin in a patient with tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria". *Poster. International Conference on Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin. Miami. 2005.*
125. **Treft FK, Blau N.** (2003) "Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria" *Pediatrics* 112:1566-69.
126. **Koch R, Moseley K, Guttler F.** (2005) "Tetrahydrobiopterin and maternal PKU" *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1:S139-41.
127. **Hotchkiss RS, McConnell KW, Bullok K, Davis CG, Chang KC, Schwulst SJ, Dunne JC, Dietz GP, Bähr M, McDunn JE, Karl IE, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith CM, Piwnica-Worms D.** (2006) "TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo" *J Immunol* 176(9):5471-7.



128. **Antoniades C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunnington C, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Leeson P, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM.** (2007) "Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation" *Circulation* 11;116(24):2851-9.
129. **Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, Ketner EA, Majmudar M, Gabrielson K, Halushka MK, Mitchell JB, Biswal S, Channon KM, Wolin MS, Alp NJ, Paolucci N, Champion HC, Kass DA.** (2008) "Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy" *Circulation* 20;117(20):2626-36.
130. **Pierce GL, Larocca TJ.** (2008) "Reduced vascular tetrahydrobiopterin (BH4) and endothelial function with ageing: is it time for a chronic BH4 supplementation trial in middle-aged and older adults?" *J Physiol.* 586(Pt 11):2673-4.
131. **Foxton RH, Land JM, Heales SJ.** (2007) "Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms" *Neurochem Res* 32(4-5):751-6.
132. **Kondo Y, Ishikawa T, Yamaguchi K, Yada T, Fujisawa M.** (2008) "Oral administration of tetrahydrobiopterin attenuates testicular damage by reducing nitric oxide synthase activity in a cryptorchid mouse model" *J Androl* 29(2):153-63.
133. **Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, Abadie V, Harding CO, Cederbaum S, Dobbelaere D, Smith A, Dorenbaum A.** (2007) "The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study" *J Inherit Metab Dis* 30(5):700-7.
134. **Levy H, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Treft FK, Whitley CB, Feillet F, Feigenbaum AS, Bebachuk JD, Christ-Schmidt H, Dorenbaum A** (2007) "Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study" *Lancet* 370: 504-10.
135. **Scott L, Zeger SL, Liang KY, Albert PS.** (1988) "Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach" *Biometrics* 44:1049-60.
136. **Treft FK, Burton B, Longo N, Levy H, Bebachuk J, Christ-Schmidt H, Martinez-Pardo M, Gruskin D, Dorenbaum A, Hennermann JB** (2007) "PKU-006: The effect of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin or 6R-BH4) treatment on phenylalanine (Phe) tolerance in children with phenylketonuria controlled on a Phe-restricted diet" *J Inherit Metab Dis* 2007, suppl 1, pg 17.
137. **Allen KR, Degg TJ, Rushworth PA, Smith M, Henderson MJ** (1999) "Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids" *Ann Clin Biochem* 36 ( Pt 2):207-11.

138. **Arai N, Narisawa K, Hayakawa H, Tada K.** (1982) "Hyperphenylalaninemia due to dihydropterine reductase deficiency: diagnosis by enzyme assay on dried blood spots." *Pediatrics* 98: 426-30.
139. **Fukushima T, Nixon JC.** (1980) "Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids" *Anal Biochem* 102(1):176-88.
140. **Pérez B, Desviat LR, Ugarte M.** (1997) "Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers" *Am J Hum Genet* 60(1):95-102.
141. **John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR.** (1991) "A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes" *Nucleic Acids Res* 25;19(2):408.
142. **Guldberg P, Güttler F.** (1994) "Broad-range' DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene." *Nucleic Acids Res* 11;22(5):880-1.
143. **Mena MA, Aguado EG, Yébenes JG** (1984) "Monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. HPLC/ED method" *Acta Neurol Scand* 69:218-225.
144. **Hanley WB, Demshar H, Preston MA, Borczyk A, Schoonheydt WE, Clarke JT, Feigenbaum A.** (1997) "Newborn phenylketonuria (PKU) Guthrie (BIA) screening and early hospital discharge" *Early Hum Dev* 3;47(1):87-96.
145. **Jäggi L, Zurflüh MR, Schuler A, Ponzzone A, Porta F, Fiori L, Giovannini M, Santer R, Hoffmann GF, Ibel H, Wendel U, Ballhausen D, Baumgartner MR, Blau N.** (2008) "Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency" *Mol Genet Metab* 93(3):295-305.
146. **Zaffanello M, Zamboni G, Tato L.** (2002) "Growth parameters in newborns with hyperphenylalaninemia" *Paediatr Perinat Epidemiol* 16(3):274-7.
147. **Hanley WB.** (2008) "Finding the fertile woman with phenylketonuria" *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 137(2):131-5.
148. **Ponzzone A, Spada M, Roasio L, Porta F, Mussa A, Ferraris S.** (2008) "Impact of Neonatal Protein Metabolism and Nutrition on Screening for Phenylketonuria" *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46;561-569.
149. **Curtius HC, Niederwieser A, Viscontini M, Leimbacher W, Wegmann H, Blehova B, Rey F, Schaub J, Schmidt H.** (1981) "Serotonin and dopamine synthesis in phenylketonuria" *Adv Exp Med Biol* 133:277-91.
150. **Bélangier-Quintana A, Morais A, Mena MA, Martínez-Pardo M.** (2004) "Niveles de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos en líquido cefalorraquídeo en niños" *An Esp Pediatr* 60 (6):82.

151. **Omarzábal A, Artuch R, García-Cazorla A, Fernández E, Campistol J.** (2004) "Neurotrasmisores, pterinas y 5-metil-tetrahidrofolato en LCR: valores de referencia en una población pediátrica" *An Esp Pediatr* 60(6):81.
152. **MacDonald A, Rylance G, Hall SK, Asplin D, Booth IW.** (1996) "Factors affecting the variation in plasma phenylalanine in patients with phenylketonuria on diet" *Arch Dis Child* 74(5):412-7.
153. **MacDonald A, Rylance G, Davies P, Asplin D, Hall SK, Booth IW.** (2003) "Administration of protein substitute and quality of control in phenylketonuria: a randomized study" *J Inherit Metab Dis* 26:319-326.
154. **Anastasiu V, Kurzius L, Forbes P, Waisbren S.** (2008) "Variability of blood phenylalanine and its relationship to children with PKU" *Abstract*.
155. **Torres-Borrego J, Molina-Terán AB, Montes-Mendoza C.** (2008) "Prevalence and associated factors of allergic rhinitis and atopic dermatitis in children" *Allergol Immunopathol* 36(2):90-100.
156. **Crone MR, van Spronsen FJ, Oudshoorn K, Bekhof J, van Rijn G, Verkerk PH.** (2005) "Behavioural factors related to metabolic control in patients with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 28(5):627-37.
157. **Olsson GM, Montgomery SM, Alm J.** (2007) "Family conditions and dietary control in phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 30(5):708-15.
158. **Pérez-Dueñas B, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho JA.** (2002) "New approach to osteopenia in phenylketonuric patients" *Acta Paediatr* 91(8):899-904.
159. **Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R, Efrati O.** (2007) "Peak bone mass in patients with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 30(2):202-8.
160. **Schaefer F, Burgard P, Batzler U, Rupp A, Schmidt H, Gilli G, Bickel H, Bremer HJ.** (1994) "Growth and skeletal maturation in children with phenylketonuria" *Acta Paediatr* 83(5):534-41.
161. **Acosta PB, Yannicelli S, Marriage B, Mantia C, Gaffield B, Porterfield M, Hunt M, McMaster N, Bernstein L, Parton P, Kuehn M, Lewis V.** (1998) "Nutrient intake and growth of infants with phenylketonuria undergoing therapy" *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27(3):287-91.
162. **Arnold GL, Vladutiu CJ, Kirby RS, Blakely EM, Deluca JM.** (2002) "Protein insufficiency and linear growth restriction in phenylketonuria" *J Pediatr* 141(2):243-6.
163. **Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, Farriaux JP** (2003) "Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 26 (1);1-11.

164. **Huemer M, Huemer C, Möslinger D, Huter D, Stöckler-Ipsiroglu S.** (2007) "Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature" *J Inherit Metab Dis* 30(5):694-9.
165. **Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L.** (2003) "Obesidad en niños y adolescentes en España. Resultados del estudio enKid 1998-2000" *Med Clin* 121(19):725-32.
166. **Kock R, Azen C, Friedman EG, Williamson ML** (1984) "Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement test results at eight years of age" *J Inherit Metab Dis* 7:86-90.
167. **Stemerding BA, Kalverboer AF, van der Meere JJ, van der Molen MW, Huisman J, de Jong LW, Slijper FM, Verkerk PH, van Spronsen FJ.**(2000) "Behaviour and school achievement in patients with early and continuously treated phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 23(6):548-62.
168. **Gassió R, Fusté E, López-Sala A, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J.** (2005) "School performance in early and continuously treated phenylketonuria" *Pediatr Neurol* 33(4):267-71.
169. **Channon S, Goodman G, Zlotowitz S, Mockler C, Lee PJ.** (2007) "Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome" *Arch Dis Child* 92(3):213-8.
170. **Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H.** (2007) "Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis" *Mol Genet Metab* 92(1-2):63-70.
171. **Arnold GL, Vladutiu CJ, Orlowski CC, Blakely EM, DeLuca J.** (2004) "Prevalence of stimulant use for attentional dysfunction in children with phenylketonuria" *J Inherit Metab Dis* 27(2):137-43.
172. **Criado Alvarez JJ, Romo Barrientos C.** (2003) "Variabilidad y tendencias en el consumo de metilfenidato en España. Una estimación de la prevalencia del síndrome de hiperactividad y déficit de atención" *Rev Neurol* 37(9):806-10.
173. **Leuzzi V, Pansini M, Sechi E, Chiarotti F, Carducci C, Levi G, Antonozzi I.** (2004) "Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development" *J Inherit Metab Dis* 27(2):115-25.
174. **Pietz J, Fätkenheuer B, Burgard P, Armbruster M, Esser G, Schmidt H.** (1997) "Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria" *Pediatrics* 99(3):345-50.
175. **Smith I, Knowles J.** (2000) "Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review" *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2:S89-93.

176. **Pietz J, Schmidt E, Matthis P, Kobialka B, Kutscha A, de Sonnevile L.** (1993) "EEGs in phenylketonuria. I: Follow-up to adulthood; II: Short-term diet-related changes in EEGs and cognitive function" *Dev Med Child Neurol*.35(1):54-64.
177. **Leuzzi V, Cardona F, Antonozzi I, Loizzo A.** (1994) "Visual, auditory, and somatosensorial evoked potentials in early and late treated adolescents with phenylketonuria" *J Clin Neurophysiol*.11(6):602-6.
178. **Pérez-Dueñas B, Pujol J, Soriano-Mas C, Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J.** (2006) "Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria" *Neurology*.66(7):1074-8.
179. **Vermathen P, Robert-Tissot L, Pietz J, Lutz T, Boesch C, Kreis R.** (2007) "Characterization of white matter alterations in phenylketonuria by magnetic resonance relaxometry and diffusion tensor imaging" *Magn Reson Med* 58(6):1145-56.
180. **Fiege B, Bonafé L, Ballhausen D, Baumgartner M, Thöny B, Meili D, Fiori L, Giovannini M, Blau N.** (2005) "Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study" *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1:S91-5.
181. **Bóveda MD, Couce ML, Castiñeiras DE, Cocho JA, Pérez B, Ugarte M, Fraga JM.** (2007) "The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment" *J Inherit Metab Dis* 30(5):812.
182. **Fiori L, Fiege B, Riva E, Giovannini M.** (2005) "Incidence of BH4-responsiveness in phenylalanine-hydroxylase-deficient Italian patients" *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1:S67-74.
183. **Michals-Matalon K, Bhatia G, Guttler F, Tyring SK, Matalon R.** (2007) "Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin" *J Nutr* 137(6 Suppl 1):1564S-1567S.
184. **Levy H, Burton B, Cederbaum S, Scriver C.** (2007) "Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in phenylketonuria and its use in treatment" *Molecular Genetics and Metabolism* 92; 287-291.
185. **Blau N.** (2008) "Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU" *J Inherit Metab Dis* 31:2-3.

## **8.- PUBLICACIONES**

Parte de este trabajo se encuentra recogido en las siguientes publicaciones:

1. **Desviat LR, Pérez B, Belanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sanchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Ugarte M.** (2004) "Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype" *Mol Genet Metab* 83(1-2):157-62.
2. **Belanger-Quintana A, García MJ, Castro M, Desviat LR, Pérez B, Mejía B, Ugarte M, Martínez-Pardo M.** (2005) "Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin" *Mol Genet Metab* 86(1):61-66.
3. **Aguado A, Pérez B, García MJ, Bélanger-Quintana A, Martínez-Pardo M, Ugarte M, Desviat LR.** (2007) "BH4 responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor" *Clin Chim Acta* 380(1-2):8-12.
4. **Martínez-Pardo M, Bélanger-Quintana A, García MJ, Desviat LR, Pérez B, Ugarte M** (2007) "Fenilcetonuria. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias" *En: Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los Errores Congénitos del Metabolismo. Ed: Sanjurjo P, Couce ML, Pintos G, Ribes A, Merinero B. Bristoll-Myers. Pg 71-107.*