

The logo for the University of La Laguna (ULL) consists of the letters 'ULL' in a bold, purple, sans-serif font. A vertical line is positioned to the right of the letters, separating them from the university's name.

Universidad  
de La Laguna

## **FENILCETONURIA EN CANARIAS**

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *PAH* EN PACIENTES CON  
FENILCETONURIA E HIPERFENILALANINEMIAS DE LA  
COMUNIDAD CANARIA

Eduardo Valerio Hernández  
La Laguna, 2016





Universidad  
de La Laguna

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, ANATOMÍA  
PATOLÓGICA E HISTOLOGÍA

---

TESIS DOCTORAL

## **FENILCETONURIA EN CANARIAS**

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *PAH* EN PACIENTES  
CON FENILCETONURIA E HIPERFENILALANINEMIAS  
DE LA COMUNIDAD CANARIA

Lcdo. en Medicina D. Eduardo Valerio Hernández

San Cristóbal de La Laguna, 2016



Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

**Prof. Dr. D. EDUARDO SALIDO RUIZ**, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna

**HACE CONSTAR,**

Que **D. EDUARDO VALERIO HERNÁNDEZ** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado "**Fenilcetonuria en canarias. Estudio molecular del gen PAH en pacientes con fenilcetonuria e hiperfenilalaninemias de la comunidad canaria**" con el máximo rigor y aprovechamiento.

Dado que la presente memoria reúne los requisitos necesarios para constituir una tesis doctoral y, una vez revisada, autorizo la presentación de la misma por encontrarla apta para su defensa ante un tribunal.

Y para que conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide la presente autorización en La Laguna, a 16 de diciembre de 2015.

A handwritten signature in black ink, consisting of the letters 'EM' followed by a long, sweeping horizontal stroke.

**Fdo: Prof. Dr. D. Eduardo Salido Ruiz**



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis por darme la oportunidad de realizarla bajo su dirección. Todo un honor.

A mis compañeros del laboratorio y en especial a Fátima, Débora y Bárbara, sin ellas no habría sido posible.

A mis padres y hermano, así como a mi familia política por su cariño y apoyo.

A mi familia, Cristina y David, que me han dado todo y me han hecho lo que soy.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

<b>1. RESUMEN</b>	<b>23</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
2.1. HISTORIA	29
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	32
2.3. GENÉTICA Y FISIOPATOLOGÍA	34
2.3.1. Genética	34
2.3.2. Ruta metabólica y fisiopatología	36
2.4. CLÍNICA	41
2.4.1. Fenilcetonuria “Clásica”	42
2.4.2. Neuropsicológica	42
2.4.3. Metabolismo óseo	45
2.4.4. PKU materna	45
2.4.5. Otros	47
2.4.6. Clasificación	48
2.5. DIAGNÓSTICO	49
2.5.1. Diagnóstico bioquímico y cribado neonatal	49
2.5.2. Diagnóstico genético	50
2.5.3. Correlación genotipo-fenotipo	52
2.6. TRATAMIENTO	53
2.6.1. Tratamiento dietético	53
2.6.2. Diclorhidrato de Sapropterina (Kuvan®)	55
2.6.3. Aminoácidos Largos Neutros (LNAA)	57
2.6.4. Glucomacropéptidos (GMP)	58
2.6.5. Fenilalanina Amonio-Liasa (PAL)	59
2.6.6. Terapia génica	61
2.6.7. Terapias alternativas en desarrollo	61
2.7. ESTUDIOS MUTACIONALES EN REGIONES CERCANAS: PENÍNSULA IBÉRICA Y MARRUECOS	63

2.8. SITUACIÓN PREVIA EN CANARIAS	64
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>73</b>
4.1. PACIENTES Y MATERIAL	73
4.1.1. Pacientes	73
4.1.2. Duración del estudio	73
4.1.3. Criterios diagnósticos y clasificación	74
4.1.4. Muestras	74
4.1.5. Reactivos y productos	75
4.1.6. Soluciones y tampones	76
4.1.7. Equipamiento	77
4.1.8. Fármacos	78
4.1.9. Comité ético y consentimiento informado	78
4.2. MÉTODOS	79
4.2.1. Sobrecarga de BH <sub>4</sub> en pacientes PKU	79
4.2.2. Pruebas complementarias relevantes (Santa Cruz de Tenerife)	79
4.2.2.1. DHPR y pterinas en orina	79
4.2.2.2. Densitometría ósea	80
4.2.2.3. Cociente intelectual (CI)	80
4.2.3. Procesamiento de muestras	81
4.2.3.1. Extracción de DNA de plasma	81
4.2.3.2. Extracción de DNA en sangre en papel	82
4.2.3.3. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	84
4.2.3.4. Polimorfismo conformacional de cadenas simples (SSCP, <i>Single-strand conformation polymorphism</i> )	86
4.2.3.5. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )	88
4.2.3.6. Secuenciación	89
4.2.4. Soporte de Software	91

4.2.4.1. Diseño de Cebadores	91
4.2.4.1.1. Primer3	91
4.2.4.1.2. Cebadores por exones	92
4.2.4.2. Lectura de secuencias	93
4.2.4.2.1. FinchTV	93
4.2.4.3. SNP ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )	93
4.2.4.3.1. Grantham Score	93
4.2.4.3.2. SIFT ( <i>Sorting Intolerant from Tolerant</i> )	94
4.2.4.3.3. Polyphen-2 ( <i>Polymorphism Phenotyping</i> , v.2.0)	95
4.2.4.3.4. Provean ( <i>Protein Variation Effect Analyzer</i> )	95
4.2.4.4. Splicing (HSF, <i>Human Splicing Finder</i> 3.0)	96
4.2.4.5. Estabilización proteica (mCSM)	96
4.2.4.6. Modelado 3D ( <i>Swiss-PDB Viewer</i> , <i>YASARA</i> )	97
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>101</b>
5.1. PACIENTES	101
5.1.1. Resultados de SSCP, RFLP y secuenciación por pacientes	103
5.1.2. Pruebas complementarias relevantes (Santa Cruz de Tenerife)	104
5.1.2.1. DHPR y pterinas en orina	104
5.1.2.2. Densitometría ósea	104
5.1.2.3. Cociente intelectual (CI)	104
5.1.3. Pacientes mujeres en edad de procrear	105
5.2. MUTACIONES	106
5.2.1. Características específicas de mutación	110
5.3. POLIMORFISMOS	112
5.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	113
5.5. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	116
5.5.1. Niveles de Phe al nacimiento	117
5.5.2. Tolerancia de Phe diaria	118
5.5.3. Sobrecarga de BH <sub>4</sub>	119
5.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	120
5.6.1. SNP ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )	122

5.6.2. Splicing (HSF, <i>Human Splicing Finder</i> 3.0)	124
5.6.3. Estabilización proteica (mCSM)	125
5.6.4. Modelado 3D ( <i>Swiss-PDB Viewer, YASARA</i> )	125
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
6.1. FRECUENCIAS MUTACIONALES. COMPARATIVA CON ESTUDIOS NACIONALES	131
6.2. NUEVA MUTACIÓN (p.P409L)	134
6.3. EVENTOS MUTACIONALES SOCIO-DEMOGRÁFICOS	138
6.3.1. p.R408W en homocigotos de La Palma	138
6.3.2. Mutación del norte de Marruecos (G352>Vfs)	140
6.4. NUEVO PROTOCOLO DE ESTUDIO MUTACIONAL DE CANARIAS	141
6.5. RELACIÓN FENOTIPO GENOTIPO	142
6.5.1. Diferencias fenotípicas entre pacientes con mismo genotipo	145
6.5.2. Sobrecarga de BH <sub>4</sub> y pacientes sugestivos de realizar test de sobrecarga	148
6.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	152
6.7. PROBLEMAS ENCONTRADOS	155
6.7.1. SSCP	155
6.7.2. Exón 2	156
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>159</b>
BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXOS	
ANEXO 1	191
ANEXO 2	192

# ABREVIATURAS





## ABREVIATURAS

### A

AA: aminoácido/s

AD: Autosómico dominante

AR: Autosómico recesivo

### B

BH<sub>4</sub>: Tetrahidrobiopterina

BHE: Barrera Hemato-Encefálica

### C

CC.EE: Consultas Externas

cDNA: DNA codificante

CEDEM: Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares

CNA: Cribado Neonatal Ampliado

### D

DCGH: 2'-7'-diclorofluoresceína

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización)

DHPR: Dihidrobiopterina Reductasa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleótidos

DSSP: *Define Secondary Structure of Proteins*

### E

EEG: Electroencefalograma

EMA: Agencia Europea del Medicamento

ESE: *Exonic Splicing Enhancers* (Potenciadores del Splicing Exónico)

ESS: *Exonic Splicing Silencers* (Silenciadores del Splicing Exónico)

## **G**

GC: Gran Canaria

GMP: Glucomacropéptido

## **H**

HPA: Hiperfenilalaninemia

HSF: *Human Splicing Finder*

CHUC: Complejo Hospitalario Universitario de Canarias

CHUIMI: Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil

CHUNSC: Complejo Hospitalario Universitario Nuestra Señora de la Candelaria

## **I**

INE: Instituto Nacional de Estadística

## **K**

KAMPER: *The Kavan Adult Maternal Paediatric Registry*

## **L**

LNAA: Aminoácidos largos neutros (Large Neutral Amino Acid)

## **M**

MDA:

MS/MS: Espectrómetro de masas en tándem

mRNA: RNA mensajero

MLPA: *Multiplex Ligation Probe Amplification*

## **N**

NPAA: Aminoácidos No-Fisiológicos (*Non-Physiological Amino Acid*)

## **O**

OMS: Organización Mundial de la Salud

## **P**

PAH: Fenilalanina Hidroxilasa

PAL: Fenilalanina Amonio Liasa

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PDB: *Protein Data Bank*

PEG: Polietilenglicol

Phe: Fenilalanina

PKU: Fenilcetonuria

PKUDOS: *The Phenylketonuria Demographics, Outcomes and Safety*

Polyphen: *Polymorphism Phenotyping*

## **R**

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RN: Recién nacido/s

RNA: Ácido Ribonucleico

## **S**

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido simple)

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism

## **T**

TBA-rs: Sustancias Activas del Ácido Tiobarbitúrico (*Thiobarbituric acid reactive substances*)

TBE: Tris/Borato/EDTA

TDAH: Trastorno de Déficit de Atención con Hiperactividad

TF: Tenerife

TM: Temperatura de fusión/hibridación del DNA

Tyr: Tirosina

## **U**

UNIPROT: *The Universal Protein Resource*



# RESUMEN



## 1. RESUMEN

Las hiperfenilalaninemias son enfermedades genéticas, de herencia autosómica recesiva, que afectan al gen codificante de la enzima fenilalanina hidroxilasa o a las enzimas responsables de la síntesis y regeneración del cofactor de la PAH, la tetrahidrobiopterina, indispensables para convertir la L-Phe en L-Tyr. Dicha enfermedad incluye desde fenotipos benignos que no requieren de tratamiento (hiperfenilalaninemias benignas) a otros más severos (retraso mental severo, microcefalia, epilepsia, rasgos psicóticos, etc.) englobados en el espectro fenotípico de la denominada fenilcetonuria.

Actualmente, debido a la dificultad de mantener una dieta estricta en cantidades de Phe existe en el mercado, y se está trabajando en nuevos, fármacos que ayudan a disminuir la Phe en plasma sin necesidad de restringir su ingesta, pudiendo así liberalizar la dieta. Para recibir tratamiento con BH<sub>4</sub>, así como para el diagnóstico, categorización y establecimiento de la relación entre genotipo y fenotipo del paciente como parte del pronóstico del mismo y consejo genético, es necesario realizar un estudio molecular de las mutaciones en paciente y familiares directos (portadores sanos).

En nuestra comunidad autónoma, sólo cuatro pacientes disponían del estudio mutacional (realizado en laboratorios nacionales), de un total de 45 casos. Esta carencia y su fuerte repercusión presente y futura en los pacientes PKU ha llevado a realizar el primer estudio de mutaciones en el gen *PAH* en Canarias, con los objetivos de describir la epidemiología en nuestra región y su relación geno-fenotípica, así como valorar el tratamiento con BH<sub>4</sub>. Las frecuencias mutacionales encontradas difieren de las encontradas en trabajos previos de la

península ibérica y área mediterránea, siendo nuestra mutación más prevalente (p.R408W) la más frecuentemente hallada a nivel mundial. Las formas mayoritarias son las formas de fenotipo benigno, y se ha establecido un protocolo diagnóstico molecular para nuestra comunidad, así como hallado una nueva mutación no descrita previamente (p.P409L). Las bases de datos mutacionales y clínicas de PKU ofrecen una buena predicción de los efectos sobre el paciente.

Es fundamental este tipo de estudios en enfermedades genéticas desde el nacimiento y diagnóstico de los pacientes, sobretodo en aquellas cuyo conocimiento puede suponer cambios beneficiosos en el tratamiento de los pacientes.

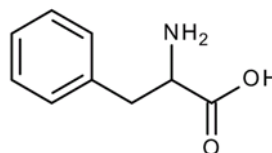


# INTRODUCCIÓN

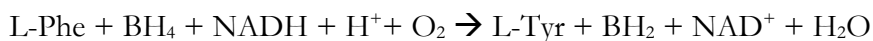


## 2. INTRODUCCIÓN

La fenilalanina (Phe, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>) es un aminoácido aromático y uno de los 10 aminoácidos esenciales del ser humano. Se encuentra tanto como componente de proteínas en su forma L-fenilalanina (L-Phe) (somatostatina, hormona corticotropa (ACTH), angiotensina, etc.), como precursor de la L-Tirosina (L-Tyr), reacción catalizada por la fenilalanina-4-monooxigenasa o fenilalanina hidroxilasa (PheOH, PAH, EC 1.14.16.1). La PAH es una enzima dependiente de cofactor 6(R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) para catalizar dicha reacción, siendo el inicio de la vía metabólica implicada en la síntesis de dopamina, adrenalina y noradrenalina en el Sistema Nervioso Central (SNC).



La fenilcetonuria (Phenylketonuria, PKU, OMIM #261600) es una de las enfermedades genético-metabólicas de pequeña molécula de las que más se ha estudiado y escrito en los últimos 70 años. De herencia autosómica recesiva, afecta a la hidroxilación de la L-Phe hacia L-Tyr, por alteración de la estructura y actividad de la PAH (Blau et al., 2010; Mitchell et al., 2011; Scriver, 2007). El espectro de enfermedades asociadas a la alteración de la actividad de la enzima PAH comprenden la PKU, hiperfenilalaninemias benignas (HPA) y las alteraciones en las enzimas que se encargan de la síntesis y regeneración del cofactor, las cuales no se analizarán en el presente trabajo.



Englobada dentro de las "aminoacidopatías", un cambio en la estructura de la PAH conlleva una alteración de su actividad, en mayor

o menor medida y, como consecuencia, un acúmulo de fenilalanina en el organismo. Este aminoácido aromático e hidrófobo es esencial para el ser humano, obteniéndose en su mayor parte de las proteínas ingeridas en la dieta. El acúmulo de Phe disminuye el transporte de los demás aminoácidos (LNAA, aminoácidos largos neutros) a nivel de los transportadores transmembrana celulares a nivel intestinal y cerebral, lo que se asocia a un déficit de neurotransmisores dependientes de catecolaminas. Así, las manifestaciones clínicas de la PKU derivan de la acumulación de la Phe, aunque su mayor efecto negativo es a nivel del SNC, pudiendo manifestar los pacientes fallo de medro, retraso mental, microcefalia, convulsiones y alteraciones neuropsicológicas varias como TDAH, alucinaciones, etc.

Su frecuencia varía según razas y regiones, siendo la raza más frecuentemente afectada la caucásica (1:10.000) y dentro de las regiones con mayor número de fenilcetonúricos son Inglaterra, Alemania y España (PAHdb, <http://www.PAHdb.mcgill.ca>), aunque estos datos pueden que disten de la realidad, ya que son países con un alto estudio en PKU y de los que más publicaciones realizan sobre el tema. El diagnóstico se realiza fundamentalmente en los países occidentales y del primer mundo en el cribado neonatal desde hace más de 50 años, con estudio estudio molecular posterior mediante DGGE y secuenciación directa. En España, el cribado neonatal para PKU se inició por primera vez como proyecto piloto en Granada como una iniciativa del Prof. Federico Mayor Zaragoza en el año 1968, extendiéndose progresivamente al resto de la geografía nacional gracias al Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad, apoyado por Su Majestad La Reina D<sup>ña</sup> Sofía.

Actualmente, gracias al Cribado Neonatal Ampliado (CNA) podemos cuantificar no sólo la Phe, sino también la Tyr, estableciendo el cociente Phe/Tyr, aumentando la sensibilidad de dicha prueba para el diagnóstico de las HPA/PKU. Este tipo de cribado, ha aumentado su presencia en las Comunidades Autónomas de España, estando disponible en un gran número de ellas.

El pronóstico antes del descubrimiento de la causa de la PKU, y sobretodo, del inicio de la dieta libre en Phe, era devastador para el paciente. Actualmente con dieta libre de Phe, los pacientes son capaces de llegar a la edad adulta con un desarrollo psicomotor cuasi normal, aunque en los últimos años se han descrito muy discretas alteraciones neurológicas en los pacientes PKU.

## 2.1. HISTORIA

La historia de la fenilcetonuria viene marcada principalmente por cuatro grandes nombres: Følling, Jervis, Bickel y Guthrie; y su estudio a comienzos del siglo XX, supuso el primer avance en multitud de pasos hacia el desarrollo diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas. La primera causa reconocible de retraso mental, la primera ruta metabólica y la descripción de su alteración en el contexto de una enfermedad, así como el primer tratamiento que cambió totalmente la evolución y pronóstico de una enfermedad genética fueron los avances realizados gracias al estudio de la PKU.

Ya desde algunas décadas antes de que fuera descrita, Pearl S. Buck, escritora estadounidense y ganadora del Premio Nobel de Literatura en 1938, se convirtió en la primera mujer norteamericana que recibía dicho galardón, habló en su libro *“The Child Who Never Grew”*

(Buck, 1950) de su hija, Caroline Grace, nacida en 1920 y diagnosticada años más tarde de PKU, cuya descripción narra la evolución natural de un paciente afecto de PKU con clínica clásica sin tratamiento.

A finales de los años 20, dos hermanos (Liv y Dag Egeland) nacieron con una cualidad peculiar de la cual su padre, Harry Egeland, se dio cuenta: su orina olía como la de los ratones. Intrigado por este hecho, acudieron él y su mujer, Borgny, al Dr. Asbjørn Følling (1888-1973), un médico noruego que utilizaba métodos bioquímicos para el diagnóstico de algunas enfermedades. En la época se realizaban pruebas como añadir cloruro férrico para acidificar la orina, con el fin de detectar cuerpos cetónicos en ella. Al realizarla sobre la orina de los dos hermanos, la orina se tornaba en verde oscuro de forma transitoria. Esta reacción no estaba descrita hasta la fecha, ya que la coloración debería haber sido azul. Estudios posteriores identificaron el exceso de ácido fenilpirúvico como probable causante de la reacción. En 1934, Følling describía el evento bioquímico que identificaba la fenilcetonuria, y establecía el nombre de “Oligofrenia Fenilpirúvica” o “*Imbecillitas phenylpyruvica*” (Følling, 1934), que más tarde sería reemplazado por el de Fenilcetonuria en 1937 por Penrose y Quastel (Penrose et al., 1937). Era la primera vez que se relaciona un retraso mental a un desorden bioquímico.

En 1953 Jervis demuestra el déficit enzimático de la PAH hepática en pacientes PKU (Jervis, 1953), y sólo un año más tarde Bickel establece la restricción de Phe en la dieta como tratamiento de los fenilcetonúricos (Bickel, 1954). En 1963, Kaufmann describe la acción como cofactor de la BH<sub>4</sub> sobre la PAH para ejercer su acción catalítica sobre la fenilalanina (Kaufman, 1963) y Guthrie y Susi establecen un método de medición mediante inhibición microbiana por la cual realizar

un cribado neonatal masivo de PKU (Guthrie and Susi, 1963). En 1978, Danks describe pacientes con una extraña condición denominada “HPA maligna”, asociada al déficit del cofactor BH<sub>4</sub> (Danks et al., 1978). En 1985, Kwok y su equipo mapean y clonan el gen y cDNA asociado a la PKU (Kwok et al., 1985) y en el año 1999, Erlandsen y Stevens cristalizan y describen a 2Å de resolución la estructura de la PAH (Erlandsen and Stevens, 1999).

Otras fechas a destacar son:

- 1967: Dick Koch crea el Estudio Nacional sobre PKU.
- 1980: Lenke y Levy reconocen el síndrome de fenilcetonuria materna o embriopatía por PKU (Lenke and Levy, 1980), aunque ya había sido descrito por Dent en 1957 (Dent, 1957).
- 1993: Se recomienda dieta libre de Phe de por vida. Shedlovsky y McDonald crea el ratón PKU (PAH<sup>enu1</sup>) (Shedlovsky et al., 1993).
- 1998: El laboratorio de Stevens determina la estructura tridimensional de la PAH (Fusetti et al., 1998).
- 1999: Kure (Kure et al., 1999) propone la BH<sub>4</sub> como tratamiento.
- 2007: Es aprobada en EE.UU en diciembre por la FDA para su comercialización en el mercado la Sapropterina diclorhidrato (Kuvan<sup>®</sup>).
- 2009: rAvPAL-PEG entra en ensayo clínico Fase I (*ClinicalTrials.gov* Identificador: NCT00925054).

La cantidad de artículos científicos sobre la PKU han sufrido de altibajos a lo largo de su historia, manteniéndose en la actualidad en una media de 100-120 artículos/año, enfocados la mayor parte de ellos en el manejo clínico de los pacientes, determinaciones de otros parámetros analítico-bioquímico-somatométricos de estudio y nuevos tratamientos enzimáticos, como el realizado con  $BH_4$  y otras moléculas con capacidad de infundir en la PAH una mejoría en su función de base alterada (chaperonas). Las nuevas mutaciones descritas a lo largo de todo el mundo, otro de los campos actuales de estudio, y cuyo interés radica en la respuesta o no del paciente con determinadas mutaciones al tratamiento con  $BH_4$ , son la base de la comprensión de la relación genotipo-fenotipo de la PKU. Además, los esfuerzos a nivel gubernamental y de cribado neonatal se están centrando en crear bases de datos globales para aumentar el conocimiento de la verdadera epidemiología de la PKU.

## 2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La fenilcetonuria tiene una mayor incidencia entre personas de raza caucásica que entre otras razas, siendo ésta de aproximadamente 1:10.000 (Scriver et al., 1995). Entre los países con una alta frecuencia de PKU se encuentran Turquía, probablemente de las incidencias más altas del mundo con aprox. 1:4.000 RN (Ozalp et al., 2001), en gran parte debido a la alta tasa de matrimonios con individuos de una misma familia (consanguinidad). Junto con Turquía, Europa presenta dos regiones más con alta incidencia de fenilcetonuria, como son Sicilia con una incidencia de 1:2.500 RN (Trunzo et al., 2013) y el norte de Irlanda con una incidencia de aprox. 1:4.500 RN (Zschocke et al., 1997, 1995).



El resto de países presentan unas incidencias variables (Tabla 1) (Zschocke, 2003).

Región	Incidencia	Región	Incidencia
España	1:10.000	Turquía	1:4.000
Portugal	1:15.000	EE.UU	1:15.000
Sicilia	1:2.500	América latina	1:25.000 – 1:50.000
Suecia	1:20.00	África	1:100.000
Irlanda	1:4.500	Tailandia	1:200.000
Finlandia	1:100.000	Japón	1:70.000 – 1:143.000
Alemania	1:8.000	China	1:15.000-1:100.500
Inglaterra	1:12.000	Corea del sur	1:41.000

Tabla 1. Incidencias de PKU en diferentes países del mundo (Blau et al., 2010; Mitchell et al., 2011)

En España, hasta la fecha se han publicado 2 grandes trabajos con pacientes de todas las regiones en el centro inicial de referencia nacional de los pacientes analizados hasta el momento (L. Desviat et al., 1999; Pérez et al., 1997) y 3 más por regiones: Cataluña (Mallolas et al., 1999), Galicia (Couce et al., 2013) y Andalucía (Bueno et al., 2013). El común denominador entre todas ellas es la mutación IVS10-11G>A, mutación más frecuentemente encontrada en todos los trabajos del área mediterránea con frecuencias entre el 10,9% y el 13,8%. Para la segunda mutación más frecuente, existe concordancia en el norte de España (p.R261Q), no así en el sur, que pasa a ser la p.S349P. También difieren en las incidencias, ya que en Cataluña se encontró una incidencia de 1:6.600 RN, mientras que en Andalucía es la mitad (1:12.000).

## 2.3. GENÉTICA Y FISIOPATOLOGÍA

### 2.3.1. Genética

El gen *PAH* contiene 96 kb (101835511-101756234 pb), localizado en el cromosoma 12 (12q22-q24.1) y un tamaño de 2,4 kb para cDNA que codifica, formado por 13 exones (Erlandsen and Stevens, 1999), sin que haya evidencia de splicing alternativo que genere variantes. Dicho gen se encuentra flanqueado en el cromosoma 12 por el gen *IGF1*, que codifica el factor de crecimiento insulin-like IGF-1 (somatomedina C) y cuya enfermedad viene definida por su déficit y por el gen *ASCL1* (Achaete-Scute Complex Homolog 1), cuya expresión da como resultado un factor de transcripción de la familia de las hélice-bucle-hélice básicas, y la mutación origina un déficit congénito del control autónomo, también denominado síndrome de hipoventilación central congénita, Síndrome Ondine-Hirschsprung.

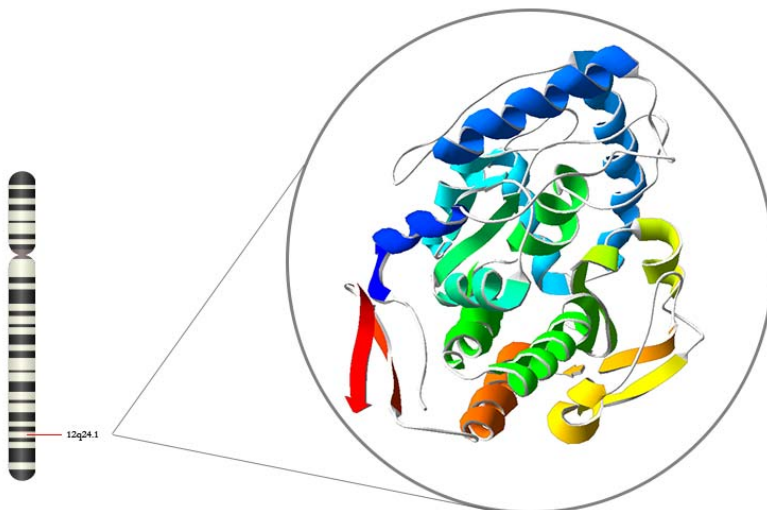


Figura 1. Cromosoma 12 (esquema) con localización del gen *PAH* e imagen tridimensional del monómero de la proteína PAH.

La herencia es autosómica recesiva, es decir, ambos padres han de ser portadores de una mutación en uno de sus alelos y transmitirla conjuntamente a los descendientes para manifestar la enfermedad. La probabilidad de obtener un paciente PKU de 2 portadores sanos es del 25% en cada embarazo, así como un 50% de obtener portadores sanos y un 25% de tener un hijo sano no portador (Figura 2).

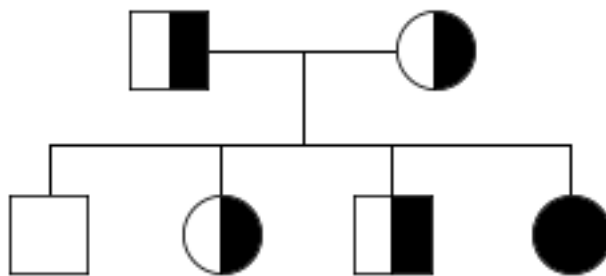


Figura 2. Árbol genealógico con las posibles opciones de descendencia de dos progenitores portadores de una mutación para el gen *PAH*.

Más de 900 mutaciones diferentes han sido descritas en las bases de datos actuales en el gen *PAH* (BIOPKUdb, PAHdb y HGMD), reconociendo nuevas mutaciones con cada nuevo trabajo que se realiza en poblaciones y regiones no estudiadas previamente (Tabla 2).

Mutación	PAHdb	BIOPKU	HGMD
<i>Missense</i>	341	-	519
<i>Splicing</i>	62	-	104
Reguladoras		-	2
Pequeñas deleciones	76	-	88
Pequeñas inserciones	10	-	17
Pequeñas INDELS		-	6

Grandes deleciones	-	-	46
Grandes inserciones	-	-	3
Complejas		-	2
Repeticiones		-	0
Silenciosas	32	-	
TOTAL	489	908	787

Tabla 2. Número de mutaciones descritas en las distintas bases de datos actuales por tipo, salvo BIOPKUDB, que no dispone de desglose (5 de septiembre de 2015). INDELS= inserciones/deleciones.

En su mayoría, las mutaciones descritas corresponden a cambios *missense* o de nucleótido en el DNA codificante que conllevan un cambio en el aminoácido correspondiente, y que comprenden aproximadamente el 60% de las mutaciones encontradas hasta el momento. El resto, mucho más infrecuentes, se reparten por orden de frecuencia entre pequeñas y grandes deleciones y pequeñas inserciones y mutaciones que afectan a zonas de splicing en DNA intrónico, siendo el resto de tipos de alteraciones en el DNA prácticamente anecdóticas.

### 2.3.2. Ruta metabólica y fisiopatología

La L-Phe sigue tres rutas principales en su metabolismo, aparte de incorporarse a las cadenas polipeptídicas formando estructuras proteicas: es hidroxilada hacia tirosina mediante la PAH, hacia feniletilamina por decarboxilación o hacia fenilpiruvato por transaminación (Scriver and Kaufman, 2001) (Figura 3). El primer paso es esencial en la síntesis de catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), y secundario en la síntesis de otras hormonas (melanina) y

moléculas primordiales dentro de las rutas metabólicas básicas como fumarato y acetoacetato. El resto son vías metabólicas alternativas que producen metabolitos inactivos como fenilpiruvato, fenilactato e hidroxifenilacetato, que son eliminados por la orina (Williams et al., 2008), pero que en grandes cantidades al activarse y acumularse en el SNC, producen neurotoxicidad, como se verá a continuación.

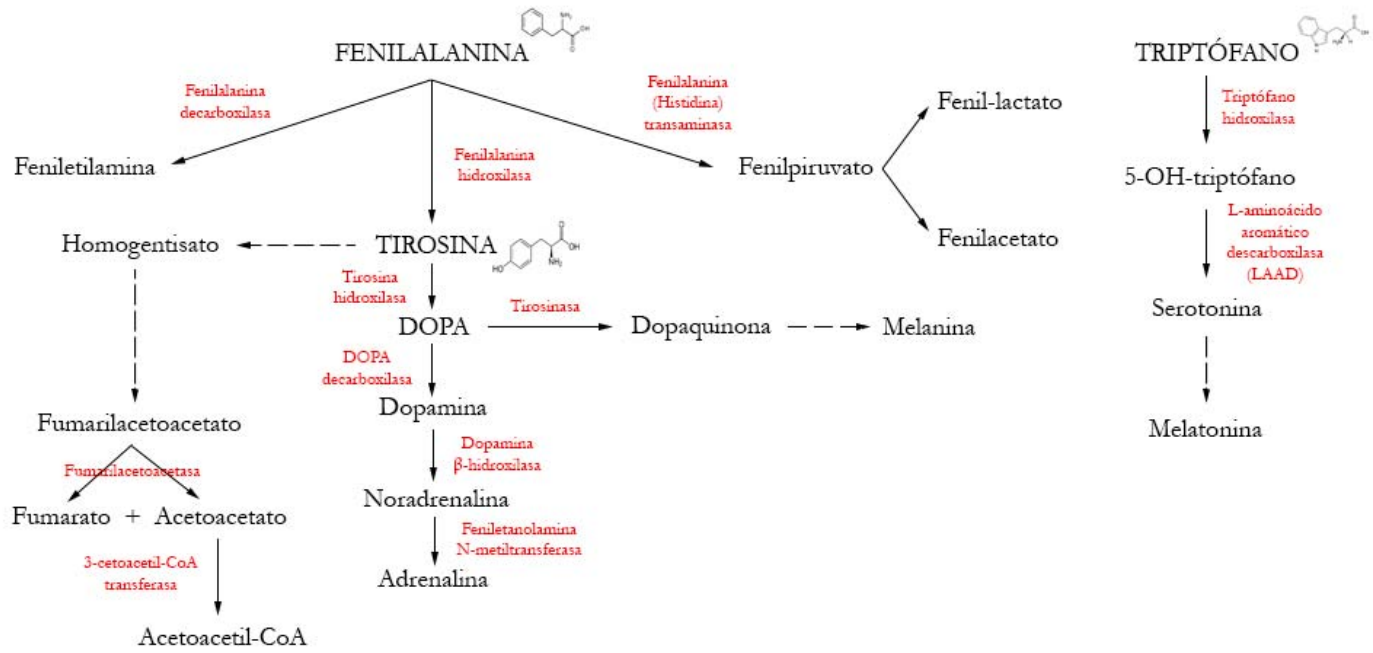


Figura 3. Ruta metabólica de la fenilalanina, triptófano y sus derivados.

El bloqueo en el paso de L-Phe a L-Tyr por alteración en la estructura y función de la PAH produce un acúmulo de la fenilalanina en el organismo. La PAH, una monooxigenasa que utiliza oxígeno y NADH como catalizadores además de un cofactor, la BH<sub>4</sub>, es un tetramero en su forma activa y se localiza principalmente en hígado y riñones. Cada monómero consta de 3 dominios: regulador (1-142), catalítico (143-410) y tetramerización/C-terminal (411-452); con una longitud de 452 AA codificados como se ha visto previamente por el gen *PAH*. Su expresión se localiza principalmente en el hígado y, en menor medida, en el riñón (Lichter-Konecki et al., 1999; Scriver, 2007).

En el SNC, el acúmulo de Phe y derivados de las vías alternativas de decarboxilación y transaminación, es una de las causas que se postulan como causantes de los síntomas presentados ya que, aunque es la manifestación principal el aumento de Phe en sangre, no es la única que se produce a consecuencia de este bloqueo, ni parece ser la única condición necesaria para que los pacientes manifiesten las alteraciones neurológicas clásicas (Scriver and Waters, 1999).

En una revisión de este año 2015, se engloban todas las teorías fisiopatológicas descritas hasta el momento sobre cual o cuales son las causas principales del daño causado en el SNC de los pacientes PKU. De forma resumida y debido en la gran mayoría de las opciones a las altas concentraciones de Phe en plasma y sus derivados, se ve afectado el entorno REDOX (óxido-reducción) a nivel cerebral en sus componentes enzimáticos y no enzimáticos, encargados de evitar un estrés oxidativo, produciendo un daño a todos los niveles (DNA, proteínas y lípidos). El metabolismo de los neurotransmisores por 1) tener mayor afinidad la Phe por el transportador de LNAA localizado en la BHE, disminuye las concentraciones de Trp y Tyr, con los cuales

compite; y 2) ser la Phe un inhibidor directo de la tirosina hidroxilasa y de la triptófano hidroxilasa, esenciales para la continuación de las rutas metabólicas hacia la síntesis de catecolaminas, serotonina, melatonina y melanina (Figura 3). El transportador de aminoácidos tipo-L con expresión a nivel cerebral y localizado en la BHE, LAT1-2 (el tipo 2 es una isoforma del 1), es el encargado de facilitar el paso a los LNAA a dicho nivel y mantener la homeostasis aminoacídica cerebral (Fukasawa et al., 2000; Kanai et al., 1998; Segawa et al., 1999).

La síntesis proteica y lipídica sufren de manera importante con las altas concentraciones de Phe, siendo un hecho observado en diversos trabajos, tanto a nivel cerebral como en plasma de determinados modelos animales HPA y pacientes PKU. Se han observado alteraciones de las enzimas responsables de la síntesis de proteínas cerebrales, así como de los derivados del colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Las repercusiones de estas alteraciones se ha manifestado y recogido en diversas publicaciones en la plasticidad sináptica, inmunoglobulinas plasmáticas y daños en la neurotransmisión y bioenergética, aunque no está claro si estos eventos son debidos al efecto tóxico de la Phe y sus derivados o al pobre estado nutricional de los pacientes PKU.

La energética celular, especialmente importante para el tejido cerebral, sufre alteraciones a todos los niveles, observándose efectos en el metabolismo de la glucosa (oxidación), cadena respiratoria mitocondrial, ciclo de Krebs y creatina kinasa (Schuck et al., 2015).

En 2012 en la revista Nature, Adler-Abramovich describió por primera vez un nuevo origen de la etiopatogenia neurológica en la PKU. Previamente, en 2011, un trabajo de Leandro y colaboradores expusieron el hallazgo de una determinada mutación en el dominio



regulador, p.G46S, y la tendencia de la proteína resultante a formar estructuras fibrilares de sí misma (Leandro et al., 2011). Posteriormente, se observaron estructuras similares a depósitos amiloideos en hipocampo del modelo de ratón PKU (PAH<sup>enu2</sup>) y en la corteza parietal de pacientes PKU (Adler-Abramovich et al., 2012), corroborando las observaciones previas. Esto abrió una nueva línea de investigación sobre las repercusiones que estos depósitos pudieran acarrear al SNC, así como nuevos tratamiento a investigar en modelos animales PKU (Shaham-Niv et al., 2015; Singh et al., 2014). Dichas terapias se abordarán más adelante en la sección de tratamiento.

Este conjunto de eventos adversos metabólicos en cada tipo celular del tejido cerebral y, probablemente otros aún desconocidos, generan las manifestaciones clínicas neuro-psicológicas que presentan los pacientes PKU, en mayor o menor medida, y siempre con un desencadenante común a todos: las altas concentraciones de Phe plasmáticas y cerebrales.

## 2.4. CLÍNICA

La clínica o fenotipo clínico que presentan los pacientes con PKU viene determinada por distintas causas a distintos niveles, considerándose una enfermedad “multifactorial”. El genotipo y mutaciones heredadas, sus repercusiones sobre la actividad enzimática y su efecto sobre su acción metabólica, y el transporte de la Phe a nivel digestivo y cerebral son causantes, entre otros, de establecer un fenotipo diferente para cada individuo (Scriver and Waters, 1999).

#### 2.4.1.Fenilcetonuria “Clásica”

La clínica presentada de forma “clásica” en los pacientes fenilcetonúricos antes de los programas de cribado neonatal y de las dietas con restricción de Phe, es aquella descrita por Følling en 1934 como pacientes con manifestaciones físicas en los primeros meses de la vida como piel y anejos claros y rubios, ojos azules, eczemas cutáneos, microcefalia con prominencia maxilar, diástasis dentaria con hipoplasia del esmalte, retraso pondo-estatural y olor a orina de ratón en piel y orina. Posteriormente, conforme el niño crece, los síntomas neurológicos destacan sobre el resto, mostrando actitud autista, agitación psicomotora errática, coreoatetosis, temblores, convulsiones, alteraciones en la estática, marcha y sedestación y el retraso mental es grave.

Es de suponer que dichos pacientes serían portadores de mutaciones severas o “*null*” (IVS10-11G>A, p.R408W, etc.) ya que otros con mutaciones leves con fenotipo HPA benigna pasarían totalmente desapercibidos, mostrando síntomas muy sutiles, como los mostrados actualmente por los pacientes PKU con buen control de la enfermedad.

Prácticamente este fenotipo ha quedado relegado a los libros de texto tradicionales en el mundo occidental, mientras que en el tercer mundo, donde no hay cribado neonatal, es la clínica con la que se diagnostica a estos pacientes (Dahri et al., 2010).

#### 2.4.2.Neuropsicológica

Si bien las manifestaciones clásicas en los pacientes PKU diagnosticados mediante cribado neonatal ya no se encuentran en nuestra población, se siguen encontrando hallazgos clínicos a nivel

neurológico y manifestaciones estructurales y funcionales del SNC. Son hallazgos que pueden ser muy sutiles, incluso en pacientes con un buen control de su enfermedad o en pacientes en los que los niveles de Phe han aumentado por diversos motivos, ya sea por una liberación de la dieta sin control de Phe, un tratamiento farmacológico inadecuado o procesos intercurrentes que aumenten la proteólisis.

Dentro de los hallazgos clínicos neuropsicológicos en estudio se encuentran el Cociente Intelectual (CI), temblores, alteraciones en las funciones de alto nivel y ejecutivas, TDAH, convulsiones, fobias, etc.

El adecuado control de los niveles de Phe en sangre es el modo de prevención más efectivo de cara a minimizar los déficits asociados a la PKU en el SNC (Blau et al., 2011b). Dos meta-análisis relacionan el CI de PKU con controles, llegando incluso a estimar una disminución de 1,9-4,1 puntos de CI por cada 100  $\mu\text{mol/L}$  de más (Smith et al., 1990; Waisbren and White, 2010).

Las funciones ejecutivas, funciones de alto nivel como planear, resolución de problemas, procesamiento de información y mantenimiento de la atención, se ven afectadas con una disminución en pacientes con mal control o sin control afectos de PKU y niveles de más de 400  $\mu\text{mol/L}$  (Leuzzi et al., 2004; VanZutphen et al., 2007), aunque de por sí, estas funciones ya se encuentran deficitarias en pacientes PKU, independientemente del control metabólico con respecto a hermanos sanos y población sana (Diamond et al., 1997).

En niños, los trastornos del comportamiento y disfunciones motoras (Arnold et al., 1998), así como de alteraciones de la memoria (White et al., 2010), estando esto último en discusión (Moyle et al., 2007), así como autismo y TDAH (Baieli et al., 2003) son relativamente frecuentes.

Las convulsiones han sido descritas en pacientes PKU prácticamente desde sus inicios. De etiología no aclarada hasta el momento, y con una frecuencia estimada en torno al 25% de los pacientes, incluso con tratamiento, se manifiestan como convulsiones de tipo tónico-clónicas generalizadas y mioclonías (Brenton and Pietz, 2000). Sin embargo, los trazados anómalos en los EEG se observan con frecuencia en pacientes PKU, incluidos los asintomáticos, con restricción de Phe, pudiendo suponer un daño previo permanente cerebral (Gross et al., 1981). Los hallazgos electroencefalográficos encontrados (descargas generalizadas punta-onda de 3-4 Hz) se han correlacionado con pruebas de imagen cerebral (RMN funcional, activación talámica mediante técnica de BOLD-fMRI o *Blood Oxygenation Level-Dependent Functional Magnetic Resonance Imaging*) en pacientes PKU con epilepsia, aunque los resultados no son concluyentes y se necesitan de más publicaciones e información de este tipo para establecer una correlación adecuada entre los niveles de Phe y epilepsia (Guida et al., 2014).

Han sido descritos en adultos agorafobia, reducción del bienestar emocional, sentimientos de alienación, depresión, aislamiento social, deterioro de la capacidad para comunicarse, baja autoestima y pobre funcionamiento en situaciones sociales (Antshel and Waisbren, 2003; Baieli et al., 2003; Pietz et al., 1997; Waisbren and Levy, 1991; Waisbren and Zaff, 1994; Weglage et al., 1992).

Otros aspectos neuropsicológicos alterados son la rapidez de respuesta a determinados test (Albrecht et al., 2009), procesamiento de información, aumento de la susceptibilidad a interferencias inducidas en tareas, rendimiento menos mantenido e inconsistente, sobretodo en la realización de un determinado test (Huijbregts et al., 2002).

### 2.4.3. Metabolismo óseo

Las alteraciones del metabolismo óseo en la PKU son frecuentes y no están bien establecidas las bases fisiopatológicas de la osteopenia y fracturas patológicas que un buen número de pacientes padece, a pesar de una buena adherencia al tratamiento. No se conoce si dicha afectación es primaria, y por lo tanto, consecuencia de la enfermedad, o bien es debida al tratamiento con restricción de proteínas de alto valor biológico, sobretodo en la etapa infantil (Moreno Villares and Oliveros Leal, 2006). Hay múltiples hipótesis, como factores genéticos no conocidos, alteraciones bioquímicas, carencias nutricionales o acúmulo de Phe y su interferencia en la mineralización ósea.

Se han estudiado a este nivel tanto la densidad mineral ósea en densitometría, como posibles marcadores analíticos de osteopenia como deoxipiridinolina en orina y fosfatasa alcalina ósea en sangre (Millet et al., 2005) e inclusión de nuevas terapias en los pacientes PKU para disminuir la osteopenia, tales como el calcitriol y oligoelementos (Pérez-Dueñas et al., 2002).

Una reciente revisión sistemática de 16 estudios sobre la densidad ósea en pacientes PKU con respecto a controles sanos, concluía que la densidad mineral ósea en columna lumbar medida mediante densitometría ósea en estos pacientes es menor que los controles, con una frecuencia aproximada de fracturas en pacientes PKU en torno al 20% y sin que haya una relación entre los niveles de Phe y los parámetros estudiados (Hansen and Ney, 2014).

### 2.4.4. PKU materna

La situación de embarazo en una paciente PKU es un hecho en profundo estudio por las graves repercusiones que tiene para el feto. La

Phe, al ser un aminoácido esencial es transmitido por la madre al feto que, en este caso, lo es en altas concentraciones, las cuales son teratogénicas para el feto. Por debajo de niveles de Phe < 360  $\mu\text{mol/L}$  previos a la gestación o durante la misma el riesgo de dichos efectos son prácticamente nulos en el feto, mientras que a mayor concentración, mayores serán las repercusiones que presente, sobretodo a nivel del SNC (Campistol Plana et al., 1999)

Esta entidad se establece por varias razones fisiopatológicas: 1) gradiente de aminoácidos aumentado durante el primer trimestre (Schoonheydt et al., 1994), 2) inmadurez del sistema hepático de hidroxilación y, 3) fetos heterocigotos obligados para una mutación del gen *PAH*, lo que conlleva una copia alterada y menor cantidad de proteína funcional. Todo ello conlleva las alteraciones observadas en dichos pacientes:

- Microcefalia.
- SNC: alteraciones en la mielinización, síntesis proteica cerebral, producción de neurotransmisores, y otras alteraciones bioquímicas detectadas en experimentación animal (Okano et al., 1986).
- Retraso del crecimiento intrauterino (CIR).
- Fenotipo dismórfico: hipertelorismo, fisuras palpebrales cortas, epicanto, paladar ojival, micrognatia, filtrum largo, labio superior fino, pabellones auriculares grandes o pequeños.
- Alteraciones cardíacas.
- Retraso mental.
- Otros menos frecuentes (fisura palatina, atresia de esófago, malrotación intestinal, extrofia vesical, defectos oculares).

- Abortos espontáneos (aumenta la frecuencia).

Así como la clínica clásica de los pacientes PKU es actualmente una rareza verla en el mundo occidental, este síndrome no lo es y evitar su aparición con un seguimiento y tratamientos adecuados son esenciales en pacientes PKU que desean ser madres. Desde el inicio en que una paciente PKU desea quedar embarazada, debe acudir a su médico responsable para realizar una consulta pre-concepcional y planificar el embarazo para, desde ese momento, comenzar con el control metabólico mediante una ingesta controlada de Phe y mantener unos niveles de seguridad en torno a 100-240  $\mu\text{mol/L}$  (Maillot et al., 2007), así como un control general exquisito del embarazo y suplementación de micronutrientes y ácidos grasos esenciales.

Como ya se está llegando al punto de que las madres PKU actuales, la gran mayoría de ellas han sido diagnosticadas mediante cribado neonatal y, algunas están actualmente en tratamiento con  $\text{BH}_4$ , se están comenzando a ver los efectos de ésta durante la gestación, mostrando hasta el momento seguridad sobre el feto, aunque con restricciones de dosificación y, todavía, con pocos casos comunicados (Aldámiz-Echevarría et al., 2014; Koch, 2008; Koch et al., 2005).

#### 2.4.5. Otros

Otras alteraciones menos importantes y casi anecdóticas en su aparición en los pacientes PKU actuales son las cutáneas, con hipopigmentación de cabello, piel y ojos, la cual se cree que está causada por la inhibición de la tirosinasa debida a los altos niveles de Phe (Hassel and Brunsting, 1959). Actualmente, salvo en pacientes adultos de  $> 40$

años, no se observa esta característica que una vez fue signo guía en el diagnóstico clínico de los pacientes PKU.

#### 2.4.6. Clasificación

La clasificación inicial para diferenciar entre pacientes los grados de severidad de la PKU fue realizada por Kayaalp, de la escuela canadiense en el año 1997 (Kayaalp et al., 1997), y aunque sólo diferenciaba entre PKU y HPA (no-PKU), estaba definida por los valores que posteriormente serían la base de los esquemas actuales, como son los niveles de Phe al nacimiento y la tolerancia de Phe a lo largo de la vida (Tabla 3) (Blau et al., 2010; Mitchell et al., 2011). Un año después, Guldberg dividió dicha clasificación en 4, según los mismos parámetros modificados (Guldberg et al., 1998), ajustándose más a las utilizadas actualmente, siendo la que sigue este trabajo.

La clasificación por niveles de Phe al nacimiento, tiene el inconveniente de que con el cribado neonatal, algunos pacientes no llegan a los niveles máximos que podrían llegar. Por ello, la segunda clasificación se ajusta mejor al fenotipo ya que el ajuste de tolerancia se realiza según los niveles que vaya alcanzando el paciente en los controles.

	Phe al nacimiento ( $\mu\text{mol/L}$ )	mg/dL	Tolerancia Phe (mg/día)
HPA Benigna	120-360	2-6	Dieta libre
PKU Leve	360-600	6-10	400-600
PKU Moderada	600-1200	10-20	350-400
PKU Clásica	> 1200	> 20	< 350

Tabla 3. Clasificación de la PKU según niveles al nacimiento y por tolerancia de Phe (Pérez-Dueñas et al., 2004).



Lo cierto es que no hay una estandarización entre centros ni entre países o regiones. En una revisión del grupo europeo con Nenad Blau al frente proponen incluso una clasificación eliminando la categoría creada por Guldberg entre mild-PKU y PKU clásica, la PKU moderada, con niveles entre 900-1200  $\mu\text{mol/L}$  y una tolerancia de entre 350-400 (Blau et al., 2010). La escuela norteamericana, en la reunión del National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference Statement sobre la PKU del año 2000 estableció clasificar a todos los pacientes con  $> 1200 \mu\text{mol/L}$  como PKU clásica y aquellos con  $< 1200 \mu\text{mol/L}$  como HPA. En revisiones posteriores, incluida la Guía de Práctica Clínica de la *American College of Medical Genetics and Genomics* del año 2014 (Vockley et al., 2014) y una revisión del 2011 de John Mitchell (Mitchell et al., 2011) recomiendan llegar a un consenso y estandarización en la clasificación de la PKU, proponiendo algunas muy similares a la utilizada en Europa.

## 2.5. DIAGNÓSTICO

### 2.5.1. Diagnóstico bioquímico y cribado neonatal

Desde el año 1982 en la Comunidad Canaria se viene realizando el cribado neonatal con determinaciones de Phe y TSH en sangre obtenida mediante punción con lanceta del talón y conservada en papel secante. Los avances en el tratamiento dietético de la PKU sólo han sido efectivos gracias al diagnóstico rápido de la enfermedad mediante cribado neonatal, el cual permite instaurar el tratamiento a tiempo de prevenir los daños neurológicos que conlleva dicha enfermedad.

Las técnicas de cribado neonatal para determinación de Phe han variado a lo largo de los años, comenzando con Guthrie en el año 1963

con la técnica de inhibición microbiana del *Bacillus subtilis* por Phe en sangre y que inició el sistema de cribado neonatal para millones de niños en todo el mundo (Guthrie and Susi, 1963). Posteriormente se utilizaron métodos bioquímicos no microbiológicos llegando en la última década al uso de la fluorimetría y espectrometría de masas.

El diagnóstico mediante fluorimetría se estableció en el cribado neonatal de Canarias en  $> 2$  mg/dL ( $120 \mu\text{mol/L}$ ), mientras que para espectrometría de masas en tándem (MS/MS), además de la determinación de Phe es posible realizar el cociente Phe/Tyr, el cual, si es  $> 2,5$  establece el diagnóstico de HPA/PKU, incluso en aquellos casos con Phe  $< 2$  mg/dL y recién nacidos con muestra de talón en las primeras 24 h de vida (Chace et al., 1998).

Actualmente disponemos de cribado neonatal ampliado (CNA) en Canarias desde julio de 2015, realizándose determinación de Phe y cociente Phe/Tyr, éste último de forma no oficial al no realizarse, de momento, aminoacidopatías, salvo la PKU.

### 2.5.2. Diagnóstico genético

El diagnóstico mutacional del gen *PAH* es posible desde su clonación (Kwok et al., 1985) mediante las técnicas habituales, tales como búsqueda de polimorfismos de migración en geles y secuenciación. Los cebadores más utilizados para la secuenciación de cada exón y secuencias intrónicas flanqueantes son los descritos por Guldberg en el año 1993 (Guldberg et al., 1993b).

Previamente a la secuenciación se suelen realizar técnicas de búsqueda de polimorfismos por exones o “escaneo de mutaciones” para maximizar la eficiencia de la secuenciación directa, que nos indiquen si hay alguna alteración presente. La técnica que ha

demostrado más rentabilidad para el gen *PAH* es el DGGE o Electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización en sus siglas en inglés (Collins and Myers, 1987; Myers et al., 1987), mostrando hasta un 95-99% de detecciones en algunas poblaciones, incluida la española, y es la recomendada actualmente como método de escaneo de mutaciones en el gen *PAH* (Guldberg et al., 1993a; Pérez et al., 1997; Romano et al., 1996). El SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism* en sus siglas en inglés) (Orita et al., 1989), a pesar de ser una técnica más novedosa, ha mostrado una frecuencia de detecciones de polimorfismos en el gen *PAH* en torno al 60% (Pérez et al., 1997, 1994), por lo que las recomendaciones en el uso de esta técnica varían considerablemente., aunque se sigue utilizando en multitud de estudios.

La secuenciación de la zona promotora o región 5' del gen *PAH*, en donde se han localizado un escaso número de mutaciones, es el siguiente paso en el estudio mutacional de los pacientes PKU que presentan una sola mutación tras la secuenciación de los 13 exones. Esta región fue caracterizada en el año 1992, consta de la caperuza 5' (CAP), localizada a 154 pb del codón de inicio y su región flanqueante de unos 300 pb (Konecki et al., 1992) y en ella se han descrito varios polimorfismos reguladores, tanto patológicos como neutros (Svensson et al., 1993; Yu et al., 2014). Dicha zona junto con los sitios de poliadenilación en el extremo 3' y regiones internas intrónicas son las otras posibilidades donde encontrar cambios patológicos que pudieran explicar el encontrar una sola mutación en pacientes PKU.

Para la detección de grandes deleciones e inserciones se desarrolló en la última década una técnica denominada *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA, en sus siglas en inglés) (Sellner and Taylor, 2004), la cual se ha utilizado en diversos estudios con pacientes PKU

en los que se ha encontrado un solo alelo mutado (Desviat et al., 2006; Groselj et al., 2012; Guldborg et al., 1997). En la actualidad existe un kit comercial SALSA MLPA P055 PAH probemix (CE-IVD) de MRC Holland optimizado para el gen *PAH*, estando indicada en aquellos casos en los que un solo alelo sea identificado con las técnicas de escaneo de mutaciones y secuenciación directa de los 13 exones con sus secuencias intrónicas flanqueantes.

### 2.5.3. Correlación genotipo-fenotipo

La correlación que existe entre las mutaciones presentes en los pacientes PKU y las manifestaciones clínicas que presentan se relaciona actualmente con 3 parámetros: Phe al nacimiento, tolerancia de Phe y respuesta a BH<sub>4</sub>. En pacientes heterocigotos compuestos con homocigosis funcional (*null/missense*) la mutación menos severa tiende a determinar la severidad de la enfermedad, mientras que si son de similar severidad, el fenotipo encontrado puede ser más leve que el esperado para cada mutación por separado (Guldborg et al., 1998; Kayaalp et al., 1997; Waters et al., 1998).

Aunque el genotipo puede ayudar a la predicción de respuesta a BH<sub>4</sub> y los niveles de Phe que puede alcanzar el paciente (fenotipo bioquímico), las mutaciones localizadas en el dominio regulador son más inconsistentes en este sentido (Trefz et al., 2009), no se ha encontrado una relación estricta con el fenotipo clínico y las manifestaciones neurológicas mostradas por el paciente, habiendo sido descritas distintas manifestaciones clínicas incluso entre hermanos con idéntico genotipo (DiSilvestre et al., 1991).

Varios autores han subrayado la “multifactoriedad” de la enfermedad a todos los niveles (Blau et al., 2010; Kayaalp et al., 1997;

Mitchell et al., 2011; Scriver and Waters, 1999; Scriver, 2007) y se ha demostrado la complejidad de la misma. Cuanto más se sabe de fenilcetonuria, más compleja se está convirtiendo en su comprensión.

## 2.6. TRATAMIENTO

### 2.6.1. Tratamiento dietético

Desde el año 1954 en el que Bickel estableció los beneficios de una dieta exenta de Phe (Bickel, 1954), el tratamiento dietético ha sido el pilar básico del gran cambio en el pronóstico de los pacientes PKU, aunque no es fácil ni previene todas las complicaciones. En los casos severos con clínica clásica y una tolerancia de Phe < 350 mg/día, la dieta es prácticamente vegetariana con restricción de proteínas de alto valor biológico (carnes, pescado, huevos, etc.) y cuya fuente principal de aminoácidos son fórmulas con contenido reducido de Phe, cuya palatabilidad no es de las mejores. Por todo ello, la adherencia a la dieta y el control de los niveles de Phe en sangre varían con cada etapa de la vida. Si bien en lactantes y primera infancia, la adherencia al tratamiento dietético no es algo que preocupe, en recientes estudios, se ha relacionado la pérdida de dicha adherencia con la edad, tanto a la dieta en sí, exenta de Phe, como a las fórmulas sustitutivas utilizadas (Cotugno et al., 2011; MacDonald et al., 2012). La adherencia empeora en la etapa de la adolescencia (Sharman et al., 2013) y se asocia a estatus social, familiar e intelectual (Alaei et al., 2011). Se ha buscado la mejor forma de mantener el tratamiento “de por vida” que necesitan los pacientes PKU (Rollins, 2001), influyendo en el automanejo de su enfermedad con llamadas por su dietista, correos electrónicos y, como nuevas herramientas, páginas web con seguimiento de los parámetros

de control por el propio paciente (Ten Hoedt et al., 2011), así como fórmulas o preparados de pequeña cantidad pensados para mejorar el aporte de aminoácidos en la mínima cantidad posible diaria (MacDonald et al., 2004), así como otras suplementaciones que serán descritas más adelante (GMP, LNAA).

Además de no ser una dieta fácil, contiene en sí misma restricciones nutritivas no sólo de Phe, sino a todos los niveles. Desde la instauración de una dieta con restricción de Phe, se han estudiado en los pacientes PKU todo tipo de parámetros bioquímicos con el fin de optimizar el estado nutricional de los pacientes, destacando en las últimas investigaciones entre las carencias más notables la proteica, ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, y oligoelementos (Se y Zn). Como ya se vio anteriormente, un mal control dietético conlleva un deterioro neuropsicológico, posibles anomalías congénitas en RN de madres PKU, además de problemas de fragilidad ósea con riesgo de fracturas patológicas y deterioro de la función renal (Hennermann et al., 2013; Ney, 2013).

Paradójicamente, se está comenzando a investigar sobre una posible tendencia a la obesidad entre los pacientes PKU, sobretodo entre mujeres y en determinadas poblaciones (Burrage et al., 2012), aunque no se ha demostrado totalmente, si se ha observado una cierta tendencia a niveles más altos de TG y HDL-c en pacientes PKU obesos que no-PKU con obesidad (Rocha et al., 2013, 2012). Algunos autores sí hablan de una predisposición de los pacientes PKU obesos al síndrome metabólico (Kanufre et al., 2015), aunque de nuevo, se refleja la necesidad de más trabajos y guías sobre el manejo de la obesidad y síndrome metabólico en el paciente PKU.

A pesar de haber sido el mayor avance en el tratamiento de la fenilcetonuria, con el desarrollo de la medicina moderna y la capacidad de optimización de la nutrición actual, el tratamiento dietético está en continuo cambio y perfeccionamiento hacia un paciente PKU que necesita una optimización en su estado nutricional.

#### 2.6.2. Diclorhidrato de sapropterina (Kuvan®)

A finales de los '90, un grupo del departamento de genética médica de la Universidad de Tohoku (Japón) observaron un nuevo evento no observado previamente en pacientes PKU. En pacientes con elevación de la Phe en plasma en los cuales se realizaba la sobrecarga con Phe y BH<sub>4</sub> para realizar el diagnóstico diferencial entre las hiperfenilalaninemias debidas a déficit de cofactor o alteración de la enzima, algunos de los debidos a la alteración de la PAH, con un estudio de pterinas y DHPR normales, respondían con una disminución de la Phe en plasma, hechos que en aquellos tiempos, no estaban relacionados (Kure et al., 1999). En los años siguientes, multitud de publicaciones establecían la misma relación, estableciéndose un nuevo subgrupo de pacientes PKU con respuesta a BH<sub>4</sub> (Spaapen and Rubio-Gozalbo, 2003).

De este modo, la investigación en el tratamiento con BH<sub>4</sub> de pacientes PKU aumentó considerablemente hasta su punto culmen cuando, en 2007, la formulación de la BH<sub>4</sub> ((6R)-2-amino-6-[(1R,2S)-1,2-dihydroxypropyl]-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinone dihydrochloride, figura 4) desarrollada y distribuida por los laboratorios Merck Serono (Darmstadt, Alemania) en Europa y BioMarin (Novato, California, USA) en Estados Unidos alcanza el status de “*Orphan Drug*” (droga huérfana), siendo aprobada como medicación en pacientes PKU

por la FDA en el mismo año (Burnett, 2007) y un año después por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, en sus siglas en inglés) (Harding, 2010), aunque previamente ya había sido utilizada como medicación compasiva con otra formulación de los laboratorios Schircks (Jona, Suiza).

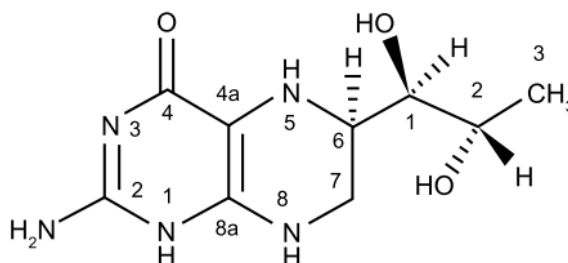


Figura 4. Dihidrocloruro de sapropterina

El mayor inconveniente de la terapia con BH<sub>4</sub> es que es genotipo dependiente, es decir, dependiendo de las mutaciones que presente el paciente habrá una respuesta adecuada o no, considerada como tal una disminución de > 30% a las 8 horas de la administración de BH<sub>4</sub>. Por lo tanto, no todos los pacientes se benefician de dicho tratamiento (Blau et al., 2011a) y es necesario saber el genotipo del paciente.

A pesar de ello, la BH<sub>4</sub> es el tratamiento de elección en aquellos pacientes respondedores y con fenotipo PKU leve-moderado (las formas clásicas no suelen ser respondedoras) junto con el tratamiento dietético, utilizándose en los protocolos actuales a una dosis máxima de 20 mg/Kg/día para test de sobrecarga y en tratamientos continuados de mantenimiento entre 10-20 mg/Kg/día, vía oral (Blau et al., 2011a, 2009).



En el 2015 se han publicado los primeros datos de los dos grandes grupos, europeo (KAMPER) y americano (PKUDOS), que se encargan del seguimiento en eficacia y seguridad, así como del registro de pacientes en tratamiento con BH<sub>4</sub> (Longo et al., 2015; Trefz et al., 2015).

### 2.6.3. Aminoácidos largos neutros (LNAA)

La suplementación con aminoácidos largos neutros (LNAA), dígase tirosina (Tyr, Y), triptófano (Trp, W), treonina (Thr, T), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), valina (Val, V), metionina (Met, M) e histidina (His, H), es utilizada sobretudo en pacientes adultos con mala adherencia a dietas exentas o bajas en Phe, y en países como EE.UU y Dinamarca. Este tipo de tratamiento se basa en la competitividad de los LNAA con los transportadores LAT1-4 cerebrales e intestinales y, en sus inicios, se teorizó con los posibles efectos que ayudaría a conseguir, entre los que se incluían una disminución de la Phe a nivel cerebral y plasmático y un aumento en la síntesis de neurotransmisores secundario al aumento de LNAA a nivel cerebral (van Spronsen et al., 2010). A pesar de dicha suplementación, los resultados obtenidos han sido parcialmente positivos ya que no se ha demostrado una correlación positiva entre los LNAA y el metabolismo de la serotonina y dopamina, al menos sólo con la suplementación con Tyr y Trp. Sí se ha observado un aumento de la melatonina (Yano et al., 2013) y tanto a nivel cerebral como en sangre sí se ha constatado una disminución de la Phe (Koch et al., 2003; Matalon et al., 2007, 2006, 2003; Pietz et al., 1999; Sanjurjo et al., 2003), lo cual supone un beneficio añadido para los pacientes PKU.

Además del tratamiento descrito con LNAA, en los últimos años se está investigando con nuevos aminoácidos “no fisiológicos” (NPAA), tales como la DL-norleucina, 2-aminonorbonano y 2-aminoisobutirato, entre otros, con los mismos objetivos que el aporte de LNAA (Vogel et al., 2013).

#### 2.6.4. Glucomacropéptidos (GMP)

Los glucomacropéptidos (GMP), son glucofosfopéptidos de 64 AA derivados del suero de leche bovina, aunque también de la cabra, durante la producción de queso cuando la caseína en su forma kappa ( $\kappa$ ), al ser degradada mediante quimosina en para- $\kappa$ -caseína queda en la cuajada y los GMP en el suero. Es el único alimento proteico conocido con un contenido mínimo de Phe de sólo 2 mg/g de alimento y eso debido a la contaminación por otras proteínas del suero que sí contienen Phe, ya que en su forma purificada no contiene absolutamente nada de Phe (Ney et al., 2009). El problema es que no sólo no tiene prácticamente Phe, sino todos los denominados AA aromáticos, Tyr y Trp además de Phe y, por ello, antes de su introducción como alimento para pacientes PKU ha de ser suplementado con dichos aminoácidos, convirtiéndose así en una fuente de LNAA, ya que sí es una fuente rica de Ile y Thr y demás aminoácidos ramificados (van Calcar et al., 2009).

Este tipo de alimento proteico ofrece algunas ventajas sobre los LNAA o fórmulas *Phe-free*, siendo la principal de ellas tener una mejor preparación culinaria (mejor sabor y mayor variedad de preparación de platos), lo cual aumenta la adherencia al tipo de dieta PKU. Estudios en ratones han demostrado un mayor aumento de los LNAA en plasma con GMP comparados con fórmulas de AA (Ney et al., 2008) y en

recientes trabajos, se han visto efectos biológicos no esperados y beneficiosos como una menor tasa de infecciones tanto virales como bacterianas (Brody, 2000) y supresión del apetito (Keogh and Clifton, 2008).

#### 2.6.5. Fenilalanina Amonio-Liasa (PAL)

En la naturaleza, no sólo hay una enzima capaz de metabolizar la Phe. En plantas y hongos, esta función la realiza la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL, en sus siglas en inglés, EC 4.1.3.24), la cual metaboliza la L-Phe a ácido transcinámico + amonio ( $\text{NH}_3$ ) mediante una reacción de deaminación no oxidativa, siendo excretado del cuerpo en forma de hipurato, con cantidades mínimas de amonio.

En la obtención de una molécula de PAL mediante ingeniería genética (rPAL) y la construcción de una forma de tratamiento viable en modelos animales y humanos, se han formado dos grupos de investigación en el desarrollo de la PAL como tratamiento, el grupo estadounidense, que obtuvo la PAL del organismo *Anabaena variabilis* (rAV-PAL) y que está actualmente en fase II (*Clinicaltrials.gov* identificadores: NCT01560286, NCT01212744, NCT00925054) en humanos mediante inyección subcutánea (Longo et al., 2014); y el grupo canadiense, que si bien iniciaron sus investigaciones con la PAL obtenida del organismo *Rhodospiridium toruloides* (rRt-PAL) (Gámez et al., 2007, 2005; Wang et al., 2005), posteriormente en una revisión de las condiciones bioquímicas y estructurales de la PAL entre ambos organismos, llegaron a la conclusión de que la PAL obtenida de *Anabaena variabilis* con dos mutaciones puntuales C503S/C565S es más estable térmicamente y más resistente a las proteasas, a pesar de tener una menor afinidad por la Phe que la de *R. toruloides* (Wang et al., 2008),

continuando sus investigaciones con dicha forma (Av-p.C503S/p.C565S/p.F18A PAL) (Gámez et al., 2007; Kang et al., 2010; Sarkissian et al., 2011).

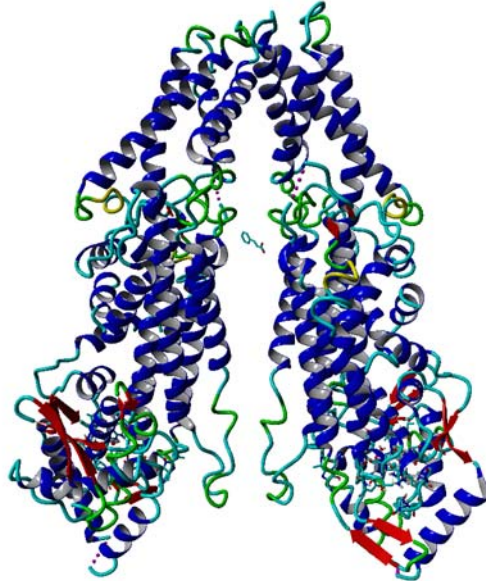


Imagen 1. Estructura tridimensional cristalizada de la PAL de la levadura *Rhodosporidium toruloides* expresada en *E. coli*. Imagen obtenida con *YASARA*<sup>®</sup> (PDB ID: 1T6J).

Ambos grupos utilizan la “pegilación”, es decir, adición de polietilenglicol (rAvPAL-PEG), tanto para disminuir la respuesta inmune contra la proteína del organismo huésped como, en el grupo canadiense, obtener una forma oral que sea resistente a la tripsina intestinal y que está actualmente en fase de experimentación animal (Kang et al., 2010).

El objetivo del desarrollo de esta enzima como tratamiento es obtener una terapia enzimática sustitutiva que elimine la necesidad de cofactores y la dependencia de las mutaciones que presente el paciente.

Actualmente, es el tratamiento de mayor proyección y desarrollo y, probablemente, el tratamiento de los pacientes PKU en un futuro a medio plazo (Blau and Longo, 2015).

#### 2.6.6. Terapia génica

La terapia génica está actualmente, como en muchas otras enfermedades, en fase de experimentación con animales, aunque ya alguna de ellas ha dado el paso hacia ensayos clínicos en fase II como el déficit de alfa-1-antitripsina (ClinicalTrials.gov: NCT01054339) o la enfermedad de Canavan (Leone et al., 2012). Las últimas publicaciones al respecto en ratones han mostrado que el vector utilizado, un derivado de adenovirus, no se integra en los hepatocitos tras inyección directa hepática, se pierde con el tiempo, debido a la regeneración celular del órgano, y no es posible su reinyección por eliminación inmunitaria. En cambio, la inyección en tejido muscular parece beneficiosa, simulando la acción hepática en el metabolismo de la Phe (Ding et al., 2006; Rebuffat et al., 2010).

Se siguen optimizando los vectores y nuevas investigaciones son necesarias para llegar a obtener un producto seguro y fiable que incluya el gen *PAH* de nuevo en el DNA de las células de un tejido, siendo de momento el más prometedor el muscular, que permita realizar ensayos en humanos (Strisciuglio and Concolino, 2014).

#### 2.6.7. Terapias alternativas en desarrollo

En fenilcetonuria, otras terapias a parte de las resumidas previamente han sido objeto de estudio con mejor o peor resultado. A pesar de que el fallo celular más importante se encuentra en el hígado, el trasplante hepático no es una opción que se contemple actualmente

en los pacientes PKU debido a que los riesgos superan en creces a los beneficios (Di Campli et al.), salvo en aquellos casos de enfermedad hepática concomitante (Vajro et al., 1993). La infusión de células sanas obtenidas mediante cultivos celulares, por el contrario, ha mostrado beneficios en otras enfermedades (Raper and Wilson, 1993), tales como alteraciones del ciclo de la urea (Puppi et al., 2008) y glucogenosis tipo Ib (Boers et al., 2014). En fenilcetonuria, se ha probado en modelos animales (Hamman et al., 2005, 2011) y en ensayos preclínicos en pacientes con muy mal control de la enfermedad (Stéphenne et al., 2012), aunque parece no mantener la actividad de forma definitiva debido en parte a la no proliferación de la líneas celulares implantadas. La terapia celular con células madre o células progenitoras obtenidas del adulto (Baruteau et al., 2014) parece ser la respuesta a los problemas de realizar un trasplante celular con células diferenciadas, siendo actualmente otro de los campos terapéuticos sobre los que se está explorando (Harding, 2008; Harding and Gibson, 2010).

Es conocido el mecanismo por el que los aminoglucósidos, un tipo de antibiótico bactericida, es capaz de hacer que en mutaciones *null*, aquellas que producen un codón de parada prematuro en la secuencia proteica, la pauta de lectura salte dicho codón de parada y se continúe con la lectura del resto de la secuencia, produciendo anulación de la mutación y una proteína no truncada. Esto ya se está comprobando en algunas enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne (Howard et al., 2004; Malik et al., 2010) o en la epidermólisis distrófica bullosa (Cogan et al., 2014), pero que, al igual que en la PKU, está en fase de experimentación animal.

Al igual que los aminoglucósidos, otro antibiótico, la doxiciclina, se está investigando su utilidad en el tratamiento de una de las causas

más novedosas de la etiopatogenia de la PKU. Se ha demostrado que la doxiciclina, y las tetraciclinas en general, es capaz de obstaculizar el paso de péptidos amiloidogénicos y la agregación de proteínas, desestabilizar a los agregados proteicos y promover su degradación por proteasas (Cardoso and Saraiva, 2006; Cardoso et al., 2003; Forloni et al., 2001; Giorgetti et al., 2011). Por ello, ha sido probado en cultivos celulares, obteniendo buenos resultados (De Luigi et al., 2015). Además, se ha comprobado que esta acción depende de la localización neuronal, ya que aquellas localizadas en el hipocampo responden más favorablemente que aquellas localizadas en tejido de corteza o cerebelo.

## 2.7. ESTUDIOS MUTACIONALES EN REGIONES CERCANAS: PENÍNSULA IBÉRICA Y MARRUECOS

Desde el año 1992 en el que se realizó la primera aproximación de las mutaciones en población española (Pérez et al., 1992), se han realizado 2 estudios más aproximativos (Desviat et al., 1997; Pérez et al., 1994) y 4 estudios más completos a nivel general (L. R. Desviat et al., 1999) y por regiones en la zona de la península ibérica (Bueno et al., 2013; Couce et al., 2013; Mallolas et al., 1999). En la zona del norte de África cercana a nuestro archipiélago, Marruecos, se realizó un estudio con la colaboración del CEDEM español (Dahri et al., 2010).

En los últimos estudios realizado en las zonas de Galicia y Andalucía se ha comprobado la relación entre el genotipo y el fenotipo con la respuesta a BH<sub>4</sub> de los pacientes candidatos ya que, si bien el conocimiento de las frecuencias mutacionales ofrece información valiosa, más lo es aumentar el número de genotipos respondedores a BH<sub>4</sub> como tratamiento principal en la actualidad junto con el dietético.

En ambos trabajos se encontraron nuevas mutaciones (1 en Galicia y 4 en Andalucía), además del marroquí (una nueva mutación), lo que ofrece, a pesar de la gran cantidad de estudios que se realizan cada año en PKU, siguen apareciendo nuevas mutaciones en distintas regiones del globo.

En Portugal, la única publicación sobre las mutaciones hace referencia a la zona sur del país, con unos resultados muy similares a los obtenidos en territorio español, aunque con una mutación localizada sólo en población portuguesa y extranjera con origen portugués (p.R270K), incluidos estadounidenses y españoles (Rivera et al., 2011), sin encontrar mutaciones no descritas.

## 2.8. SITUACIÓN PREVIA EN CANARIAS

La situación anterior del diagnóstico molecular en los pacientes PKU al inicio del estudio en la Comunidad Canaria era de 5 pacientes de 45 seguidos en algún momento en los principales hospitales de las islas (CHUC, CHUNSC y CHUIMI). Debido en algunos casos a cuestiones económicas (recursos limitados), a otros emplazamiento del diagnóstico a otro momento y, en la mayoría, a no condicionar cambios en el tratamiento actual (la mayoría a restricción dietética o no) dicho estudio no se ha realizado en la amplia mayoría de pacientes seguidos en las islas.

Los pacientes con diagnóstico mutacional han sido parte de estudios realizados por otras instituciones, CEDEM principalmente, con el principal objetivo de establecer relaciones entre genotipo y fenotipo en los pacientes españoles.



La necesidad de realizar en todos los pacientes diagnosticados de PKU el estudio mutacional parte del Instituto Nacional de Salud americano, como parte del manejo, seguimiento, pronóstico y consejo genético de cada individuo (“National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000.,” 2001). Como se verá en los resultados y discusión del presente trabajo, el estudio molecular es actualmente esencial en estos pacientes por la cantidad de información que ofrece y de la que disponemos actualmente en los trabajos, publicaciones y bases de datos internacionales para correlacionarlo con muchos parámetros tanto diagnósticos, como pronósticos y de seguimiento. De entre los motivos a realizar el diagnóstico mutacional, los 3 principales se resumen a continuación:

- 1°. Relación genotipo-fenotipo: hay una buena correlación entre genotipo-fenotipo en la PKU, estableciendo un pronóstico sobre el que comenzar a trabajar si se realiza y conoce desde el nacimiento. Ofrece información que no se conocería de otra manera, pudiendo informar a los progenitores sobre los objetivos tanto clínicos como terapéuticos en su hijo.
- 2°. Respuesta a BH<sub>4</sub>: el conocimiento del genotipo del paciente PKU es indispensable para valorar realizar una test de sobrecarga y un tratamiento con BH<sub>4</sub>. Sin él, los pacientes que podrían beneficiarse de una liberación dietética o un mejor control de niveles de Phe se quedarían sin esta opción terapéutica, lo que equivale a una desigualdad entre comunidades que sí realizan

dicho estudio e inexistencia del principio de equidad entre ciudadanos de un mismo país o territorio.

- 3°. Consejo genético: herramienta básica del clínico especialista en enfermedades genéticas e indispensable para una buena información a progenitores portadores de alelos mutados. Esta información es de obligada notificación a los padres, tanto las mutaciones en cada uno para nuevos descendientes, como las posibles repercusiones en familiares de primer grado que pudieran verse afectados por el estado de portador de una determinada mutación.

Gracias a estudios como este se llegan a establecer protocolos diagnósticos en cada zona dependiendo de las frecuencias mutacionales, las cuales en algunas ocasiones, difieren o no de otros territorios y poblaciones cercanas. Podríamos tener las mismas frecuencias que nuestro territorio de referencia, la España peninsular o, por el contrario, compararnos con zonas más cercanas como el norte de África o tener una epidemiología propia y “local” debido a nuestra condición de archipiélago, con sus mutaciones características y presentar alguna mutación no publicada hasta el momento.

Todas estas cuestiones sólo obtienen respuesta al realizar el estudio molecular del gen *PAH*, origen de la fenilcetonuria, y objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

# OBJETIVOS



### 3. OBJETIVOS

Dada la importancia para la correlación genotipo-fenotipo y su relación con el pronóstico de la enfermedad, así como el conocimiento de la misma, el estudio molecular mutacional en pacientes PKU es una necesidad a día de hoy. La situación previa a la realización de esta tesis en la comunidad canaria era de un total de 41 familias, 4 pacientes estudiados. Por este motivo, bajo la supervisión y dirección del Dr. Eduardo Salido Ruiz (Director del Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario de Canarias durante los años 1997-2013, y en colaboración con los pediatras responsables de las unidades de enfermedades metabólicas de ambas islas, la unidad de genética del Hospital Universitario Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria, así como el Programa de Cribado Neonatal de Canarias, ha sido posible realizar esta tesis, que viene a cubrir una necesidad básica de nuestros pacientes PKU en el archipiélago canario.

Los objetivos del presente estudio han sido los siguientes:

- 1º. Definir las mutaciones en el gen *PAH* de cada paciente PKU seguido en consultas externas de las unidades de enfermedades metabólicas de los 3 hospitales de referencia de la Comunidad Canaria y así establecer el espectro mutacional de las islas.
- 2º. Comparar las mutaciones encontradas y sus frecuencias con las halladas en el resto del territorio nacional, según los estudios previos realizados.
- 3º. Establecer la correlación geno-fenotípica de los pacientes.

- 4°. Analizar las posibles nuevas mutaciones encontradas mediante análisis “*in silico*” o herramientas bioinformáticas.
- 5°. Realizar en aquellos pacientes con mutaciones descritas o en las que, por análisis bibliográfico, no se dispongan de datos, con respuesta a Sapropterina diclorhidrato (BH<sub>4</sub>, Kuvan<sup>®</sup>) test de sobrecarga.

Inclusión de los pacientes que no lo hayan sido en la base de datos internacional BIOPKUdb una vez realizada la tesis.

# MATERIAL Y MÉTODOS





## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. PACIENTES Y MATERIALES

#### 4.1.1. Pacientes

Los pacientes PKU/HPA benigna sin diagnóstico molecular en otros laboratorios externos ni hiperfenilalaninemia debida a alteración de la síntesis o regeneración de BH<sub>4</sub>, y en seguimiento en los centros de referencia de Canarias (Hospital Universitario de Canarias, Hospital Universitario de Nuestra Señora de la Candelaria y Hospital Universitario Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria) fueron seleccionados para su inclusión en el estudio, así como los familiares de primer grado (padres y hermanos) que quisieran participar. Aquellos con traslado a la península previo al inicio del estudio fueron excluidos del mismo.

El lugar de extracción de sangre dependió de la disponibilidad de las CC.EE en sus centros de referencia, citas programadas previamente en las mismas o citados exclusivamente para este fin, para lo cual se dispuso, a parte de las CC.EE, del departamento de Anatomía Patológica y sus enfermeras cualificadas para realizar dichas extracciones, todo ello con el fin de minimizar las molestias y traslados de los pacientes y familiares.

#### 4.1.2. Duración del estudio

La extracción y recogida de la mayor parte de las muestras en la provincia de Santa Cruz de Tenerife tuvo lugar entre marzo del año 2010 y abril de 2011, mientras que en la provincia de Las Palmas de

Gran Canaria fue de marzo a mayo de 2013. Los pacientes nacidos posteriormente no han sido incluidos en presente estudio.

#### 4.1.3. Criterios diagnósticos y clasificación

El diagnóstico bioquímico de los pacientes PKU fue en su mayoría a través del cribado neonatal (Phe > 2 mg/dL ó 120  $\mu$ mol/L) establecido en la Comunidad Autónoma de Canarias desde el año 1983 (tras una fase de prueba de dos años), siendo sólo 3 pacientes de la provincia de Tenerife anteriores a dicha fecha y, por lo tanto, diagnosticados posteriormente por diagnóstico clínico.

Para su clasificación, se siguió la propuesta por Guldberg y modificada por Pérez-Dueñas en 2004 según niveles de Phe en sangre en el momento del diagnóstico y tolerancia de Phe diaria (Guldberg et al., 1998; Pérez-Dueñas et al., 2004) (Tabla 4):

	Phe al nacimiento ( $\mu$ mol/L)	mg/dL	Tolerancia Phe (mg/día)
HPA Benigna	120-360	2-6	Dieta libre
PKU Leve	360-600	6-10	400-600
PKU Moderada	600-1200	10-20	350-400
PKU Clásica	> 1200	> 20	< 350

Tabla 4. Clasificación de la PKU según niveles al nacimiento y por tolerancia de Phe (Pérez-Dueñas et al., 2004).

#### 4.1.4. Muestras

Las muestras tomadas de los pacientes y familiares fueron de sangre total periférica mediante punción de vena cubital interna, en posición sentada, y con aplicación de compresión braquial evitando el éxtasis prolongado a través de métodos rutinarios de extracción

sanguínea. La cantidad osciló entre 2-3 mL en cada paciente (mayores de 6 años con extracción exclusiva para esta prueba), así como a sus familiares de primer grado (padres en el caso de que fuera posible y hermanos) para la extracción de DNA de linfocitos. En aquellos casos en los que hubiese dudas con el resultado encontrado y sospecha de “error humano”, ya fuese en la extracción sanguínea, etiquetado y/o numeración libretas, tubos de DNA, etc., se procedió a la extracción de DNA en sangre en papel (obtenida previamente mediante punción en la yema de uno de los dedos de la mano y puesta sobre papel estándar para cribado neonatal Schleicher & Schüell (S&S#903) con el objetivo de minimizar las molestias a paciente/familiares y obtener una muestra de forma rápida y válida.

#### 4.1.5.Reactivos y productos

- SDS 10%
- Proteinasa K (10 mg/mL)
- Fenol cloroformo saturado (pH 8)
- Acetato sódico 3M
- Etanol absoluto PRS (Panreac)
- Etanol hidratado 70%
- Tris HCl 1 M (pH 8)
- EDTA 0,5 M
- NaCl 100 mmol/L
- Acetato potásico
- Isopropanolol
- TEcresol
- Polymejor (Sucrosa 0,35 M, Cresol 80 µg/ml)

- dNTP's (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)
- Taq DNA Polimerasa (1 UI/ $\mu$ L, Promega)
- Cebadores (in vitro gen, pedido 127831, 13 exones F+R, 100  $\mu$ M)
- Gel de agarosa 2% (TBE 0,5X, agarosa estándar calidad biológica molecular, Merck)
- Bromuro de Etidio
- pUC-HaeIII (Sigma)
- Poliacrilamida 10% (Acrilamida:Bisacrilamida 99:1)
- APS 25%
- Tetrametiletilendiamina (TEMED)
- HNO<sub>3</sub> 65%
- Ácido acético 10%
- BSA 10 mg/mL
- DTT 100 mM
- Enzima de restricción *XbaI* (10 U/ $\mu$ L, Promega)
- ExoI (20 U/ $\mu$ L fermentas, #M0293S, 20.000 U/mL. New England BioLabs)
- rAPid Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/ $\mu$ L, Roche)
- Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v.1.1 (Applied Biosystems)
- Formamida desionizada (Applied Biosystems)
- Papel secante Schleicher & Schüell (S&S#903)

#### 4.1.6.Soluciones y tampones

- Tampón de lisis hemática

- Tampón TEN (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 100 mM)
- Tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM)
- TES (Solución de digestión): Tris HCl 1 M (pH 8) 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 10%, NaCl 100 mmol/L/H<sub>2</sub>O
- Tampón TBE 0,5X
- Tampón 10X (Tris, KCl, MgCl)
- Solución de Formamida-EDTA: Formamida 95% 9,5 mL + EDTA 0,5 M 200 µL + Bromofenol 0,05% 10 mg + Xilencianol 0,05%+ H<sub>2</sub>O destilada a -20°C.
- Solución SDS-EDTA: SDS (10%) 50 µL + EDTA 0,5 M 100 µL + H<sub>2</sub>O destilada 4,85 mL.
- Solución de Nitrato de plata: Nitrato de Plata 0,1 gr. + 100 mL H<sub>2</sub>O milliQ.
- Solución revelante (SSCP): Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 5,9 gr. + 200 mL de agua milliQ + Formaldehído (37%) 250 µL
- Tampón Ó (Promega, para enzimas de restricción)

#### 4.1.7. Equipamiento

- Tubos de EDTA
- Pipetas P20, P200 Pipetman (Gilson)
- Centrifugadora (Spectrafuge 24D, Labnet International, Inc.)
- Agitador Vortex (Vortex mixer SA3, Stuart Scientific)
- Estufa 37°C (Heraeus)
- Cámara fría
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler PTC-100, BIO-RAD)

- Batería de electroforesis Model 200/2.0 (Bio-Rad)
- Cámara ultravioleta
- Termobloque Multi-Blok Heater (Lab-Line)
- Electroforesis vertical (BlueVertical 160/C, Serva)
- Secuenciador ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

#### 4.1.8. Fármacos

- Kuvan<sup>®</sup> (Merck, Alemania) comprimidos de 100 mg (Burnett, 2007).



#### 4.1.9. Comité ético y consentimiento informado

Se diseñaron las técnicas a realizar y la metodología del estudio para su presentación y aprobación por parte del comité de Ética Médica del Hospital Universitario de Canarias, siendo aprobado con fecha de 3 de noviembre de 2010 (Anexo 1).

De forma directa por sus médicos responsables, o por mi persona, en el Servicio de Anatomía Patológica del HUC, se entregaron los consentimientos informados para toma de muestra mediante extracción de sangre periférica y estudio genético tanto de los pacientes como de ambos padres, así como de aquellos hermanos que quisieran conocer su estado de portador. La realización de las pruebas fueron totalmente voluntarias para los pacientes y sus familias, sin coste algunos para los mismos.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Sobrecarga de BH<sub>4</sub> en pacientes PKU

Pacientes en seguimiento en el HUNSC y HUC (S/C de Tenerife) que por su genotipo-fenotipo (Alelos respondedores / Tolerancia de Phe actual) fueran susceptibles de responder al tratamiento con BH<sub>4</sub>, y no estuviesen en ese momento en tratamiento con dicho fármaco, fueron incluidos para la realización de la prueba de sobrecarga.

Se realizó el diseño de la prueba, basada en los protocolos europeos para el test de sobrecarga de 24 horas y de 7 días para los respondedores parciales (Blau et al., 2009).

### 4.2.2. Pruebas complementarias relevantes (Santa Cruz de Tenerife)

Las pruebas más relevantes para pacientes con PKU son aquellas destinadas a realizar un diagnóstico diferencial con otras entidades (déficit de BH<sub>4</sub>, principalmente) y a poner de manifiesto aquellas complicaciones que se dan actualmente en estos pacientes, tales como la densidad ósea y el desarrollo cognitivo-intelectual de la persona.

#### 4.2.2.1. DHPR y pterinas en orina

Para la determinación de actividad de DHPR en eritrocitos y pterinas en orina se recogieron muestras de sangre en papel y orina, siendo ésta congelada a -20°C para su envío al centro de referencia del HUNSC y HUC, el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), de la Universidad Autónoma de Madrid. La determinación de actividad de DHPR se realiza mediante técnica

espectrofotométrica basada en la descrita por Arai en 1982 en muestra de sangre en papel secante (Arai et al., 1982). Los valores normales para DHPR se encuentran en 0,9 y 3,7 nmoles Ferri C red/min/disco.

La cuantificación de pterinas en orina se basa en el método que Fukushima estableció en 1980 para su análisis en tejidos corporales (Fukushima and Nixon, 1980). Los resultados obtenidos se expresan según aclaramiento de creatinina (mmol/mol), siendo éstos de mmol/mol creatinina. Los valores normales en nmol/L son:

- Neopterinina                    5-22
- Biopterina                        4-10
- Primapterina                    1-6
- % Biopterina                    20-70

#### 4.2.2.2. Densitometría ósea

El equipo utilizado para las densitometrías óseas en el HUNSC es el Hologic QDR 4500SL, mediante la técnica de medición en columna lumbar y cadera izquierda, con visualización de los resultados de imagen digital con el programa de la misma marca (QDR) para Windows XP.

#### 4.2.2.3. Cociente intelectual (CI)

Para realizar una valoración y estimación del Cociente Intelectual (CI) se realizaron Test de Weschler adaptados a edad, WPPSI para niños en edad pre-escolar, WISC para niños y WAIS para adultos (en sus versiones III y IV, según año realizado), así como Brunet-Lezine para valoración del desarrollo psicomotor en niños menores de 30 meses.



### 4.2.3. Procesamiento de muestras

#### 4.2.3.1. Extracción de DNA de sangre

La sangre periférica contenida en tubo con EDTA estéril (2-3 mL) fue vertida en tubo Falcon de 50 mL, llenando hasta 20 mL con tampón de lisis hemática y guardado a 4°C durante 15 min. Se procedió a su centrifugación durante 10 min. a 2800 rpm., desechando el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de células blancas pegado en el fondo.

Se añadió nuevamente tampón de lisis hemática hasta 10 mL, con vortex posterior hasta observar una buena dispersión celular. Centrifugado durante 5 min. a 2800 rpm., con decantación posterior del sobrenadante, colocando el tubo sobre papel y cuidando de que no se desprendiera el pellet celular al fondo.

Se procedió posteriormente a la adición de 2,5 mL de tampón TEN, vortex para separación de las células del fondo, y 140 µL de SDS 10 % y 40 µL de proteinasa K (10 mg/mL), dejando en incubación mediante estufa a 37°C toda la noche.

Se añadieron 2.5 mL de Fenol cloroformo (pH 8), mezclando y pasando a tubo de polipropileno de 15 mL, sin realizar vortex, y centrifugado durante 15 min. a 2800 rpm.

Se extrajo la fase acuosa y paso a tubo limpio de 15 mL, añadiendo 100 µL de Acetato sódico 3M y 5 mL de etanol absoluto, mezclando hasta que precipitó totalmente el DNA, pasando el pellet de DNA a tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 500 µL de Etanol hidratado al 70%, centrifugando durante 1 min. para precipitar el pellet al fondo, decantando en bote limpio y secando con el bote abierto durante unos 10 minutos.

Una vez seco, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de TE (pH 8), resuspendiendo en menos cantidad el pellet de DNA, siendo almacenado posteriormente entre 4°C y 8° C para su posterior análisis.

#### 4.2.3.2. Extracción de DNA en sangre en papel

Cada bloque de sangre estándar (1.2-1.4) contiene unos 50  $\mu\text{L}$  de sangre que rinden aproximadamente alrededor de 1  $\mu\text{g}$  de DNA. La extracción de DNA en sangre en papel consta de 4 fases que se resumen en:

- PREPARACIÓN DE TES (Solución de digestión)

	CF	VF (50 mL)
Tris HCl 1 M (pH 8)	10 mM	500 $\mu\text{L}$
EDTA	1 mM	100 $\mu\text{L}$
SDS 10%	0,1%	500 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O / NaCl 100 mmol/L	Rellenar hasta 50 mL	

Tabla 5. Contenido de la solución TES

- 1°. Se picó cada bloque con un sacabocados en el tubo de Eppendorf previamente etiquetado, depositando las muestras en él.
- 2°. Se mezcló la solución TES con Proteinasa K (sol. 10 mg/mL, 15  $\mu\text{L}$  por cada mL de TES), añadiendo 600  $\mu\text{L}$  por tubo con la muestra.
- 3°. Se incubó con agitación durante 12-18 horas a 55°C (50-65°C) en estufa.

- EXTRACCIÓN

- 1°. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de Acetato potásico, realizando un vortex a máxima potencia durante 20 seg.

- 2°. Se centrifugó a 13.300 rpm (max.) durante 10 min., preparando en ese intervalo alícuotas de 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol en tubos Eppendorf nuevos.

- 3°. Pipetear sobrenadante de cada centrifugado, evitando tocar los detritus y el papel del fondo, al tubo con isopropanol frío.

- INSOLUBILIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN

Se realizó vortex con centrifugación posterior a 13.300 rpm durante 10 min., realizado todo ello en refrigeración a 10°C en cámara fría.

- LAVADO, SECADO Y DISOLUCIÓN

- 1°. Se desechó el sobrenadante, lavando el pelet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, realizando nuevo vortex y centrifugación a 13.300 rpm durante 10 min., refrigerado a 10°C en cámara fría.

- 2°. Se desechó de nuevo el sobrenadante, drenando en papel, secando y resuspendiendo en 20  $\mu\text{L}$  de TEcresol.

- 3°. Para conservación, se guardaron las muestras en congelador a -20°C.

#### 4.2.3.3. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*)

La amplificación mediante PCR de los exones se realizó, inicialmente, realizando un MIX con los siguientes componentes en un tubo Eppendorf:

13,5 µL	H <sub>2</sub> O
5 µL	Polymejor
2,5 µL	Tampón 10X (Tris HCl 10mM, KCl 50 mM, MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM)
1 µL	dNTP's (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)
1 µL	Taq DNA Polimerasa (1 UI/µL)
1 µL	Cebador (Según exón)
1 µL	DNA

Siendo posteriormente optimizado a:

6,25 µL	Master Mix* (MM)
5,25 µL	H <sub>2</sub> O
0,5 µL	Cebador (Según exón)
0,5 µL	DNA

\* Contenido del Master Mix (2X)

En todas las reacciones de amplificación se usó Polymejor (Sucrosa 0,35 M, Cresol 80 µg/ml) por su capacidad de incrementar la eficacia de la PCR. Una vez mezclado, se inició el programa del termociclador, con la siguiente configuración:

- 1°. 95°C durante 3'
- 2°. 94°C durante 45''
- 3°. T<sub>m</sub>\* durante 30''
- 4°. 72°C durante 30''

(Repetir ciclo volviendo al paso 3, 34 veces más)

5°. 72°C durante 10' (Período de elongación)

6°. 15°C (FIN)

\*T<sub>m</sub> (temperatura de fusión o hibridación, según exón)

Las temperaturas de fusión o hibridación (T<sub>m</sub>) para cada cebador, según el exón fueron las siguientes (Tabla 6):

<i>T<sub>m</sub></i>	<i>Exones</i>
60°C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13
58°C	8
55°C	12

Tabla 6. Temperaturas de fusión por exones.

- GEL DE AGAROSA (2%):

Gel de agarosa (2%) realizado con TBE 0,5X y agarosa estándar calidad biológica molecular, calentando en microondas durante **1-2'**, hasta disolver la agarosa en el TBE. Se añadieron 20 µL de Bromuro de Etidio a la solución de Agarosa y se colocó en el molde, adaptando un peine de 15 muestras al portageles y esperando a solidificación (aprox. 15 min.). En el carril inicial se añadieron 3 µL de muestra control (pUC19-HaeIII) 3 µL de cada muestra en cada pocillo y entre 1,5 y 2 µL de DNA, iniciando electroforesis en soporte con TBE 0,5X.

Para la lectura de resultados se colocó el gel sobre la cámara ultravioleta y visionado de resultados.

#### 4.2.3.4. Polimorfismo conformacional de cadenas simples (SSCP, *Single-strand conformation polymorphism*)

Para el rastreo de mutaciones en la zona codificante del gen *PAH* se usó la técnica de SSCP. Se siguió una variante del método original (Orita et al., 1989) basada en los protocolos descritos por Myers (Myers R et al., 1997).

Para la realización de los geles de SSCP y su carga de las muestras se siguieron 3 pasos esenciales: preparación del gel, preparación de las muestras y electroforesis en gel y la tinción mediante plata para obtener los resultados.

- PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA

Previo limpieza y colocación del sistema de soporte y prensado de los 2 cristales se procedió a la elaboración de la acrilamida para su introducción en dicho soporte.

Se añadió en un recipiente Acrilamida 10% (22,5 mL, para 1 gel) y se calentó en microondas. Posteriormente se añadió APS 25% (60 µL) y luego TEMED (10 µL), introduciendo dicha mezcla entre los cristales del soporte SSCP y dejando polimerizar durante al menos 30 min., retirando posteriormente el filtro de la parte inferior. Una vez completado el montaje, se procedió a realizar la electroforesis (Tampón TBE 0,5X), añadiendo previamente 6 µL de muestra desnaturalizada en cada pocillo. La electroforesis se realizó en cámara fría a -4°C aprox. 8 h (75-100 V).

- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se mezclaron en un Eppendorf rotulado de producto de PCR (2  $\mu\text{L}$ ) con Solución Formamida-EDTA (4  $\mu\text{L}$ ) y Solución SDS-EDTA (500  $\mu\text{L}$ ) (Tampón de carga de la muestra), realizando una posterior desnaturalización a 90°C durante 5 minutos en termobloque, para luego introducir en hielo o agua helada. Posteriormente, se procedió a realizar la electroforesis vertical (BlueVertical 160/C, Serva) en geles de acrilamida:bisacrilamida (99:1) 10% a 15°C, en tanque refrigerado con 0,5X TBE, previamente enfriado a 4°C, con un volumen final de gel de 30 mL (50  $\mu\text{L}$  APS 25% + 10  $\mu\text{L}$  TEMED), corriendo a 60 V durante 16 h ó 200 V durante 4 h.

- TINCIÓN DE PLATA

Se procedió a la retirada del gel, depositándolo en una batea limpia con agua destilada, fijando con etanol al 10% hasta cubrir el gel y agitando suavemente durante 10 minutos. Se decanta evitando doblar el gel.

Se añadió  $\text{HNO}_3$  al 1% ( $\text{HNO}_3$  65% 15 mL +  $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar 1 L) agitando manualmente primero durante 3 minutos y posteriormente en el agitador, lavando acto seguido con agua milliQ agitando manualmente durante 3 minutos 2 veces y decantación posterior.

El siguiente paso fue añadir la solución de Nitrato de Plata fresca ( $\text{AgNO}_3$  0,1%: 0,1 gr. en 100 mL de agua milliQ) agitando suavemente durante 20 minutos, preferiblemente en oscuridad, con decantación posterior, tapando la batea con papel de plata.

El revelado se realizó con solución Revelante ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5,9 gr. + 200 mL de agua milliQ + Formaldehído 35-37% 250  $\mu\text{L}$ ), añadiendo 100 mL de la solución, agitando durante aprox. 1 minuto y desechando todo el contenido tras la agitación. Se lavó durante 1 minuto en agitación con agua milliQ. Este procedimiento se repitió otra vez más con 100 mL de solución revelante, sin lavado posterior, parando la reacción con 100 mL de ácido acético al 10% sobre la solución Revelante. Una vez completado este proceso se lava el gel 2 ó 3 veces con agua milliQ y el gel está listo para ser escaneado.

#### 4.2.3.5. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Para la realización del RFLP sobre el exón 3, y en concreto la mutación R68S (AGA>AGT) se procedió con la enzima *XbaI*, descrita en las bases de datos como enzima de restricción para dicha mutación. Si la mutación está presente se obtiene una banda única de 288 pb en el gel resultante. Si es *wild-type* (no hay mutación) se obtienen dos bandas, una de 92 pb y otra de 196 pb, utilizando como cebadores para la amplificación los ya utilizados para la PCR-SSCP-secuenciación del exón 3 (Figura 5).



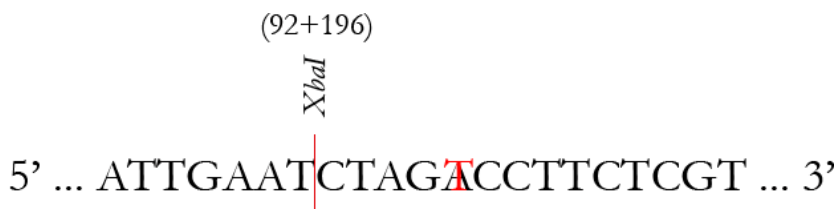


Figura 5. Secuencia del ex3n 3 vecina a la mutaci3n (nucle3tido en rojo especifica el cambio) y zona de corte de la enzima *XbaI*.

La digesti3n del fragmento amplificado se realiz3 sometiendolo 10  $\mu$ L del producto con la mezcla de la reacci3n que se resume en la siguiente tabla (Tabla 7).

5,5 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O
2 $\mu$ L	Tamp3n O (Tamp3n enzima 5X)
1,6 $\mu$ L	Spermidina 50 mM
0,2 $\mu$ L	BSA 10 mg/mL
0,2 $\mu$ L	DTT 10 mM
0,5 $\mu$ L	Enzima 10 U/ $\mu$ L ( <i>XbaI</i> )

Tabla 7. Composici3n de la mezcla de reacci3n de digesti3n para RFLP.

Las condiciones de temperatura de incubaci3n para la digesti3n de la enzima *XbaI* fueron de 37°C.

#### 4.2.3.6. Secuenciaci3n

Una vez realizada la amplificaci3n PCR del ex3n a estudiar, obteniendo una banda 3nica y robusta y comprobado en un gel de agarosa que existe una 3nica banda, se inici3 el protocolo de secuenciaci3n para dicha muestra.

- Purificación enzimática del producto de PCR (EXO1-SAP)

Para un volumen final de reacción de 4,5  $\mu\text{L}$ , se añadió en un tubo Eppendorf  $\text{H}_2\text{O}$  2,5  $\mu\text{L}$ , ExoI 0,25  $\mu\text{L}$ , SAP 1  $\mu\text{L}$  y producto de PCR 0,74  $\mu\text{L}$ , para trasladarlo a un termobloque para la reacción de purificación enzimática: 37°C durante 30', 80°C durante 15', inactivando de esta manera los enzimas presentes en el producto de PCR.

- Reacción de secuenciación (ABI 3130XL)

Para un volumen final de reacción de 6,5  $\mu\text{L}$ , se añadió DNA purificado 4,5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  0,863  $\mu\text{L}$ , Primer F ó R 5 mM 0,637  $\mu\text{L}$  y Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v.1.1 (Applied Biosystems -20°C) 0,5  $\mu\text{L}$ , con las siguientes condiciones para la reacción de secuenciación (termociclador): 96°C durante 2 min., 94°C durante 3 seg., 50°C durante seg. y 60°C durante 2 min. (25 ciclos) 72°C durante 4 min. y 4°C para finalizar la reacción y mantener el producto.

- Purificación de la reacción de secuenciación

La purificación de la reacción se realiza mediante precipitación con Etanol/EDTA/ $\text{H}_2\text{O}$ , el cual se resume en la siguiente secuencia:

1°. Volumen final de secuenciación: 36  $\mu\text{L}$  (a añadir al tubo) + pasos previos.

- a.  $\text{H}_2\text{O}$  3,5  $\mu\text{L}$ .
- b. EDTA 125 mM 2,5  $\mu\text{L}$ .
- c. EtOH 100% 30  $\mu\text{L}$ .

2°. Vortex y 15 min. de reposo a temperatura ambiente.

- 3°. Centrifugación 30' a 4°C (3000 g que equivalen a aprox. 5.700 rpm)
- 4°. Decantación
- 5°. Lavado con EtOH 70% 30 µL. Centrifugación 15' x 3000 g a 4°C.
- 6°. Decantación y secado 10 min. en estufa a 37°C o en termobloque.
- 7°. Adición de Formamida 10 µL.
- 8°. Placa de secuenciador.

Si las muestras fueron procesadas en el día, se resuspendieron en 10 µL de Formamida desionizada (Applied Biosystems, -20°C) y transferir a la placa del ABI 3130XL Si fueron almacenadas, se cubrieron con papel de aluminio y guardadas a -20°C.

#### 4.2.4. Soporte de Software

##### 4.2.4.1. Diseño de Cebadores

###### 4.2.4.1.1. Primer3

Para el diseño de los cebadores o “primers” a emplear en la amplificación y secuenciación de los exones del gen *PAH* se recurrió al programa bioinformático Primer3<sup>®</sup> (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>).

A pesar de contar con cebadores ya probados y contrastados en la bibliografía actual, específicos para cada exón (Guldberg et al., 1993b), optimizados con para la realización de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) se decidió diseñar a partir de la secuencia descrita para el gen *PAH* unos cebadores nuevos. Los motivos por los cuales se tomó esta decisión son ampliar la base de datos actual de cebadores y corroborar su eficacia.

#### 4.2.4.1.2. Cebadores por exones

A continuación se muestran en la siguiente tabla (Tabla 8) los cebadores utilizados, así como el producto resultante y la temperatura de hibridación ( $T_m$ ).

EXÓN	Secuencia 5' → 3'	Producto (pb)	$T_m$ (°C)
1	TCTTCTCCTCCCTAGTGCGA	272	60
	ATGAAACCAGGAAGCACCAG		
2	GGAATGAATTGCTAAACTGTGGA	218	60
	AACATGGAAGTTTGCTACGACA		
3	CATCTTTGGCCTGCGTTAGT	288	60
	CAGTGTGGAGTACTTATGTTGCA		
4	GGGATCCCCACTTCTGATCT	223	60
	AGTGGAGGAGAGGCACTGAA		
5	CCCCATTCAAAGCATTTCATAA	201	60
	AGCAGGCTAGGGGTGTGTTT		
6	CTAACCTGCGTTCTGCTGTG	339	60
	CTTGTCTTCCCCTTCCCTCT		
7	CCTATGTCCCTGGGCAGTTA	297	60
	AAAAGATGGCGCTCATTGTG		
8	TCCATTCTTTCTGCCCATTC	279	58
	TGTACCTGGTTTCCGCTCTT		
9	GGTIGGTTCTGTGGTTCCAA	181	60
	TCAAAGACCTGAGGGCCATA		
10	TCCCTTCATCCAGTCAAGGT	227	60
	TGGTTTCTGTACCCACCACT		
11	GATGAGAGAAGGGGCACAAA	302	60
	CCAACCACCCACAGATGAGT		
12	GGAGGTGTCCGTGTTCCCTAA	298	62
	TATGGCGATGGTAGGGAAAG		
13	CACCCAGCTCATCCAAGAAG	205	60
	TCTCCATCAACAGATTCACAGC		

Tabla 8. Cebadores por exones con producto resultante (pb) y  $T_m$  (°C)

En el Anexo 2 se amplía la información con cada exón y su secuencia correspondiente, así como los cebadores diseñados en rojo y subrayado en gris los publicados por Guldberg (Guldberg et al., 1993b).

#### 4.2.4.2. Lectura de secuencias

##### 4.2.4.2.1. FinchTV

Los resultados obtenidos mediante el secuenciador ABI 3130XL fueron procesados mediante el software del fabricante. Para su lectura, se utilizó el programa FinchTV<sup>®</sup>, un visualizador de secuencias DNA multiplataforma para extensiones conocidas (.abi).

##### 4.2.4.3. SNP

Las alteraciones en las secuencias genómicas, denominadas polimorfismos nucleicos simples (SNP) pueden tener significado patológico (mutaciones) y producir un cambio en la estructura y/o función de la proteína afectada. Las herramientas bioinformáticas, ya sea en forma de programas específicos, multiplataforma o no, basadas en Web la mayoría, están creadas para realizar una predicción del impacto sobre la estructura o función proteica según los posibles cambios aminoacídicos que suceden como consecuencia de dichas alteraciones. Gracias a esta predicción, muchas de ellas permiten realizar una correlación fenotipo-genotipo y poder establecer dentro del contexto clínico y enfermedad, un posible pronóstico.

##### 4.2.4.3.1. Grantham Score

Creado en 1974 por R. Grantham, realiza una comparación entre todos los posibles cambios aminoacídicos (60 en total) de una proteína, desde el punto de vista de su composición, polaridad y volumen molecular, dotando dicho cambio de una puntuación (entre 0 y 215) y, a su vez, categorización según dicha puntuación en cambios conservativos (5–60), no conservativos (60–100) y radicales (>100)

(Grantham, 1974). Mutaciones patógenas dan una puntuación más alta ( $> 100$ ), mientras que mutaciones neutras resultan en más bajas. Actualmente existe una variante bioinformática basada en web que toma como base las puntuaciones del score de Grantham denominada Align GVGD (A-GVGD) de la OMS (Mathe et al., 2006; Tavtigian et al., 2006). Dicha extensión fue creada para determinados genes conocidos de alto interés epidemiológico (ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53) con el propósito de servir para alineamientos de múltiples secuencias entre especies en mutaciones missense y valorar dichos cambios en la posición que ocupan.

#### 4.2.4.3.2. SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant*)

SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) es una herramienta creada por el grupo de Pauline Ng en el *Fred Hutchinson Cancer Researcher Center* desde los años 2001 a 2008, y posteriormente en el *J. Craig Venter Institute* hasta el 2010. Basada en la homología de secuencia que ordena sustituciones de aminoácidos en tolerantes e intolerantes y predice si una sustitución de aminoácido en una proteína tendrá un efecto en el fenotípico final de la proteína. SIFT se basa en la premisa de que la evolución de las proteínas se correlaciona con la función de la proteína y, por lo tanto, su composición aminoacídica varía o permanece según la importancia de su localización, así posiciones importantes para la función de la proteína deben ser conservados a lo largo de la escala evolutiva en la familia de la proteína, mientras que las posiciones menos importantes pueden variar. Por rango numérico de 0 a 1, SIFT califica los cambios aminoacídicos en dañinos (*damaging*) o “deletéreos” (*deleterious*) si la puntuación es  $\leq 0,05$  y tolerables (*tolerated*) si es  $> 0,05$  (Kumar et al., 2009; Ng and Henikoff, 2003).

#### 4.2.4.3.3. Polyphen-2 (*Polymorphism Phenotyping* v.2.0)

Herramienta bioinformática de predicción del impacto de una sustitución de aminoácido no sinónimo por otro sobre la estructura y función de proteínas en el ser humano. Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) usa determinadas bases de datos (UniProtKB, Swiss-Prot DB) para obtener información genómica y proteica según el indentificador SNP (UNIPROT) aportado, con los cambios aminoacídicos y posición del aminoácido, así como en la estructura de la proteína (PDB/DSSP). Los resultados se ofrecen de forma gráfica y numérica, con una puntuación entre 0 y 1, siendo 0 cambios benignos (*benign*) y 1 “probablemente dañinas” (*probably damaging*) para la estructura y función de la proteína en cuestión (Adzhubei et al., 2013, 2010).

#### 4.2.4.3.4. Provean (*Protein Variation Effect Analyzer*)

Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>) es un nuevo proyecto fundado por el *National Institutes of Health* (referencia 5R01HG004701-03) y en desarrollo por Yongwook Choi y Agnes Chan en el *J. Craig Venter Institute*, utilizado para la predicción de cambios en la secuencia proteica y su repercusión en la función de la misma. La diferencia con las demás herramientas descritas hasta el momento es que es capaz de trabajar con múltiples cambios, ya sean cambios simples, inserciones o deleciones. El umbral predeterminado para predecir entre cambios “neutros” (*neutral*) y “deletéreos” (*deleterious*) es de -2,5, pudiendo aumentar en sensibilidad para rangos positivos (-1,3)

y especificidad (-4,1) para rangos menores de -2,5, dependiendo de si queremos localizar más o menos cambios deletéreos (Choi and P. Chan, 2015; Choi, 2012; Choi et al., 2012).

#### 4.2.4.4. Splicing (HSF, *Human Splicing Finder* 3.0)

HSF (<http://www.umd.be/HSF3/>) en su versión 3.0 es una herramienta bioinformática diseñada por Ghadi Raï que combina 12 algoritmos diferentes para identificar los efectos sobre los motivos de splicing, ya sean donantes o aceptores, o aquellas secuencias auxiliares denominadas *Exonic Splicing Enhancers* (ESE, Potenciadores) o *Exonic Splicing Silencers* (ESS, Silenciadores). Mediante la selección de nuestro análisis, ya sea una secuencia o una mutación, y que datos vamos a aportar (nombre del gen, transcrito *Ensembl*, CDS, etc.) nos ofrece una serie de datos numéricos aplicando dichos algoritmos y según los resultados, unos comentarios sobre las posibles alteraciones en los sitios de splicing descritos (Desmet et al., 2009).

#### 4.2.4.5. Estabilización proteica (mCSM)

Para la predicción de estabilización proteica mediante aproximaciones basadas en estructuras (*Structure-Based Approaches*) se utilizó la herramienta basada en web mCSM (<http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/mcsm/>) del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge (Pires et al., 2014). Dicha herramienta tiene como objetivo analizar las distancias atómicas y los patrones que acontecen en la vecindad del aminoácido mutado y, para ello, utiliza la colección ProTherm (Kumar et al., 2006) de parámetros termodinámicos experimentales sobre proteínas *wild-type* y mutadas. Entre los parámetros utilizados se encuentran los cambios en la energía



libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ), para mutaciones puntuales. Con éste y otros métodos y experimentos de regresión y comparativos, se consigue predecir el valor numérico y el cambio de dirección para la  $\Delta\Delta G$ , respectivamente.

La herramienta web necesita para el análisis la estructura cristalizada, obtenida de la RCSB Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Berman, 2000), utilizando para nuestro análisis el PDB ID: 1PAH, fenilalanina hidroxilasa en su forma dimérica (residuos 117 a 424, DOI: [10.2210/pdb1pah/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1pah/pdb)) (Erlandsen et al., 1997) y la mutación en su nombre común (P409L).

#### 4.2.4.6. Modelado 3D (*Swiss-PDB Viewer*, *YASARA*)

Para la visualización 3D se utilizaron las aplicaciones multiplataforma *Swiss-PDB Viewer* (Guex and Peitsch, 1997) y *YASARA* (Krieger and Vriend, 2014), la primera una de las aplicaciones más utilizadas en este campo con la que realizar la mutación p.P409L y la otra de reciente creación para una visualización y etiquetado de las localizaciones de las mutaciones encontradas



# RESULTADOS



## 5. RESULTADOS

### 5.1. PACIENTES

De un total 44 pacientes seguidos en los hospitales de referencia, 23 pacientes de la provincia de Tenerife y 21 de la provincia de Las Palmas, 41 familias y 3 parejas de hermanos; 40 fueron analizados en el presente estudio. La distribución por sexos fue de 20 varones (11 TF, 9 GC) por 24 mujeres (12 TF, 12 GC), contando en el inicio del estudio (año 2010) con 7 pacientes mayores de edad (> 18 años) y 37 menores, siendo la edad media actualmente de 13 años y la mediana de 14 años. En todos ellos se requirió de consentimiento informado, firmado por los padres/tutores en el caso de los menores.

Los pacientes F001.1, F032.1, F033.1, F034.1 y F0XX.1 fueron analizados molecularmente en laboratorios externos. Hubo un traslado a la península durante el estudio (F020.1) y en 4 pacientes (F005.1, F018.1, F022.1 y F028.1) no se han podido analizar a los familiares por diversos motivos. En la provincia de Tenerife, 4 pacientes PKU se trasladaron a la península antes del inicio del estudio. Una de ellos (F0XX.1) tenía diagnóstico molecular realizado en laboratorio externo, mostrando el genotipo p.R176L (padre) / p.R408W (madre). Por motivos de diseño del estudio, no teniendo en cuenta a los pacientes no seguidos en las unidades a partir del inicio del mismo, no se incluirá en el análisis de los resultados de correlación fenotipo-genotipo, pero sí en el cómputo de alelos mutados. Así mismo, en otra paciente trasladada se realizó prueba de sobrecarga de BH<sub>4</sub>, aunque con sobrecarga de 100 mg de Phe previos, actuación que no se recomienda en los protocolos actuales, y sin estudio genético previo. Por iguales motivos que los del

paciente con estudio mutacional previo, no se tendrá en cuenta para el análisis de los resultados. Una paciente (F016.1) es un traslado de otra comunidad (no constan datos del diagnóstico inicial).

Se conoce de la existencia de dos mujeres, hermanas del paciente F018.1, el cual si se puede citar para consulta en el CHUNSC, que viven en la isla de La Palma, con diagnóstico de retraso mental que no han sido estudiadas y que, con alta probabilidad son pacientes PKU.

Los menores de 6 años en la provincia de Tenerife, a no ser que se realizara analítica por otros motivos, no les fue extraída muestra de sangre, analizándose los padres en su lugar. En todos los casos se descubrieron las dos mutaciones patológicas (F009.4, F010.1, F013.1, F015.1, F017.1, F019.1). En el caso de los pacientes F011.1 y F014.1 sólo se analizó a un familiar por motivos personales (familia uniparental). En la provincia de las Palmas de Gran Canaria se realizó extracción a todos los pacientes y familiares que así lo desearon.

Se dio un caso en el que el padre del paciente estudiado no se correspondía con el padre biológico (F040.3), con estudio de paternidad realizado. En los otros casos en los que la mutación paterna no se detectó (F007.1, F027.3 y F041.3), no se han realizado pruebas de paternidad por el momento. Los padres que accedieron a realizarse el estudio genético mostraron, a excepción de los cuatro padres mencionados, las mutaciones encontradas en sus hijos.

En cuanto al origen de los progenitores, el paciente F004.1 tiene padre marroquí, el paciente F013.1 su madre es de origen brasileño y el paciente F017.1 tiene un padre de origen vasco y a una madre de origen belga. En el paciente F004.1 se encontró en homocigosis una delección (G352>Vfs) descrita en altos porcentajes en el norte de Marruecos

(Dahri et al., 2010), mientras que en el paciente F017.1 se encontró la misma mutación en ambos padres (p.A403V), a pesar de ser de diferentes zonas. En el paciente F013.1, el alelo materno encontrado no se corresponde con los mayormente descritos en las zonas estudiadas de Brasil a día de hoy (Santana da Silva et al., 2003; Santos et al., 2006). Para una población total de 2.104.815 en Canarias en el año 2014 (INE), la prevalencia de PKU es de 2,1 casos/100.000 habitantes o, lo que es lo mismo, un 0,0021%. Desde el período comprendido entre el inicio del estudio (año 2010) y la finalización de inclusión de nuevos pacientes (2013) nacieron 7 nuevos casos, obteniéndose una incidencia de 1:9.827 RN para dicho periodo, siendo el número de RN en la Comunidad Canaria en esos años de 68.788 RN. Esta frecuencia disminuye a 1:10.222 si ampliamos los años hasta 1999 (INE), con 28 pacientes nacidos hasta 2013 y 286.209 RN en total en ese periodo.

#### 5.1.1. Resultados de SSCP, RFLP y secuenciación por pacientes

En el Anexo 3 (sólo versión digital) se detallan los resultados por pacientes y provincias con los geles y secuencias obtenidos en el estudio molecular. En un inicio y a modo de cribado, se realizó SSCP para los pacientes iniciales. Durante el estudio se encontró que, como ya ha sido descrito previamente en la literatura, la técnica de rastreo de mutaciones mediante SSCP y secuenciación directa para el gen *PAH* tiene un porcentaje de detección en torno al 62% (Pérez et al., 1997). En nuestro estudio, las siguientes mutaciones fueron detectables por SSCP: p.I65T/p.S87R, p.I164V, p.D129G, p.R158Q, p.R176L, p.R261Q, G352>Vfs, p.A403V, p.R408W. Esto se corresponde con un total de 48 alelos mutados encontrados (57,8%), por lo que se confirma

los porcentajes descritos hasta el momento. Debido a los bajos porcentajes se decidió continuar realizando sólo secuenciación directa siguiendo las frecuencias mutacionales encontradas hasta el momento.

Con la técnica RFLP se realizó la búsqueda de la mutación p.R68S en algunos casos (F005.1) y en familiares de pacientes (F009.2, F009.3, F013.2) para dicha mutación con la enzima *XbaI*.

### 5.1.2. Pruebas complementarias relevantes (Santa Cruz de Tenerife)

#### 5.1.2.1. DHPR y pterinas en orina

Un total de 17 pacientes (17/20) les fue realizado estudio bioquímico de despistaje de déficit de BH<sub>4</sub> en el laboratorio de referencia tras diagnóstico bioquímico mediante prueba de cribado neonatal, obteniéndose valores dentro de la normalidad para los parámetros estudiados y, por lo tanto, descartado un déficit de BH<sub>4</sub>. Hasta el momento en la Comunidad Canaria no se ha descrito ningún caso de déficit de BH<sub>4</sub>.

#### 5.1.2.2. Densitometría ósea

La prueba de densitometría ósea se ha practicado hasta el momento a 6 pacientes, mostrando 3 de ellos (F004.1, F006.1 y F010.1) valores de osteopenia. De ellos, 2 muestran en su fenotipo PKU clásica, mientras que uno tiene una HPA benigna.

#### 5.1.2.3. Cociente intelectual (CI)

Se realizaron los test especificados en la sección de material y métodos, los cuales se resumen, junto con los resultados obtenidos en los pacientes a los que se les han realizado en la tabla 9.



Paciente	Edad	Brunet-Lezine	Wechsler WISC	Wechsler WAIS	Wechsler WPPSI	No especificado
F001.1	4		CI 96 (Normal-Medio)			
F002.1	3	Favorable				
F002.4	12		CI 113 (Normal-Alto)			
F003.1	4					CI 98 (Normal-Medio)
F004.1	6		CI 116 (Normal-Alto)			
F006.1	20			CI 71 (Límite)		
F006.4	19			CI 61 (RM leve)		
F008.1	9		CI 102 (Normal)			
F009.1	7		CI 98 (Normal-Medio)			
F015.1	5				CI 84 (Normal-Bajo)	
F016.1	-					CI 100 (Normal)

Tabla 9. Pacientes y test realizados a cada edad con CI de cada uno en el momento de su realización.

De los 11 pacientes a los que se les ha realizado, 2 contaban ya con la mayoría de edad y 8 se encontraban en el periodo entre la niñez y pre-adolescencia. Nueve mostraban puntuaciones dentro de la normalidad o en los límites alto o bajo. Los pacientes adultos, en cambio, mostraban CI en el límite o retraso mental leve.

### 5.1.3. Pacientes PKU en edad de procrear

Al término del estudio, habían 11 pacientes mujeres (TF 6, 5 GC) en edad de procrear (> 18 años, < 40 años). Hasta el momento no se tiene constancia de ninguna paciente PKU con embarazo activo y ninguna de ellas se encuentra en tratamiento con BH<sub>4</sub>.

## 5.2. MUTACIONES

Cuarenta pacientes fueron analizados en nuestro estudio (84 alelos mutados en total contando con los estudios de laboratorios externos), encontrándose 83 alelos mutados (98,8%). De las mutaciones encontradas, 23 están descritas en las bases de datos consultadas, encontrándose una mutación no descrita en la posición c.1226C>T del cDNA (CCC>CTC), prolina por leucina en la posición del aminoácido 409 (p.P409L), presente en el paciente F040.1 (alelo materno). Dicha mutación no aparece los registros y bases de datos publicados (Tabla 10), si bien un cambio C>A en el mismo nucleótido (con cambio proteico p.P409H) ha sido encontrado por azar en un carcinoma de mama (COSMIC database).

Paciente	Fenotipo	Alelo materno	Alelo paterno	Phe al diagnóstico (μmol/L)	Tolerancia Phe (mg/día)
F001.1	PKU leve	p.R158Q	p.R68S	584,2	250
F002.1	PKU clásica	p.R408W	p.R261Q	1628,5	250
F002.4	PKU moderada	p.R408W	p.R261Q	659,9	250
F003.1	PKU clásica	p.R408W	p.V388M	1949,9	
F004.1	PKU clásica	G352>Vfs	G352>Vfs	2009,9	
F005.1	HPA benigna	p.R68S	p.R68S	314,8	NR
F006.1	PKU clásica	p.R408W	p.R408W		
F006.4	PKU clásica	p.R408W	p.R408W		
F007.1	HPA benigna	p.R297C	IVS10-11G>A	278,5	NR
F008.1	HPA benigna	p.R261Q	p.R176L	254,3	NR
F009.1	PKU moderada	p.R68S	p.R68S	672	60
F009.4	PKU moderada	p.R68S	p.R68S	657,5	97-113
F010.1	HPA benigna	p.M276K	p.R68S	357,2	NR
F011.1	HPA benigna	p.A403V	IVS10-11G>A	151,4	NR
F012.1	HPA benigna	p.R261Q	p.A403V	248,2	NR
F013.1	HPA benigna	R68S	p.A403V	84,8	NR
F014.1	HPA benigna	p.I164V	IVS10-11G>A	254,3	NR
F015.1	PKU moderada	p.R68S	p.R68S	721,4	
F016.1	HPA benigna	p.R297C	p.R297C		NR
F017.1	HPA benigna	p.A403V	p.A403V	207	NR
F018.1	PKU clásica	p.R408W	p.R408W		NR
F019.1	HPA benigna	R252W	p.A403V	320,9	NR
F020.1	HPA benigna	IVS10-11G>A	p.R297C	302,7	NR
F021.1	HPA benigna	p.R176L	p.R261Q	211,9	NR
F022.1	HPA benigna	p.R68S	p.R176L	326,9	NR

F023.1	PKU leve	p.R408W	p.D129G	411,7	
F024.1	PKU clásica	p.R408W	p.R408W	1610,4	
F025.1	HPA benigna	p.I65T	p.S87R	157,4	NR
F026.1	HPA benigna	p.N167I	p.A403V	211,9	NR
F027.1	HPA benigna	p.A403V	IVS4+5G>T	242,2	NR
F028.1	PKU clásica	p.A300S	p.R408W	1331,9	
F029.1	PKU leve	p.R408W	p.R158Q	363,2	
F030.1	HPA benigna	p.A403V	IVS10-11G>A	211,9	NR
F031.1	PKU clásica	p.R048W	p.R408W	1640,6	
F032.1	HPA benigna	p.R176L	p.R408W	121,1	NR
F033.1	HPA benigna	p.A300S	p.R243Q	169,5	NR
F034.1	PKU leve	IVS10-11G>A	IVS10-11G>A	423,8	
F035.1	HPA benigna	p.R176L	p.V388M	272,4	NR
F036.1	HPA benigna	p.D129G	p.R158Q	333	NR
F037.1	HPA benigna	p.A300S	p.R408W	248	NR
F038.1	HPA benigna	p.P281L		127,1	NR
F039.1	HPA benigna	p.R176L	p.R176L	133,2	NR
F040.1	PKU leve	p.P409L	p.Y414C	569,1	
F041.1	PKU clásica	R158Q	IVS2-13T>G	1477	
F0XX.1		p.R408W	p.R176L		

Tabla 10. Número de casos con codificación interna, fenotipo mostrado (Phe al nacimiento) y mutaciones encontradas. La codificación empleada es F (Familia), XXX (Número de familia por entrada en el registro interno del estudio) y .X para familiar, siendo .1 (paciente), .2 (madre), .3 (padre) y siguientes números para hermanos, tanto afectos como sanos que se han estudiado. En color azul, pacientes de la provincia de Santa Cruz de Tenerife, en naranja, Las Palmas de Gran Canaria. NR = No restrictiva; NC=No consta. F0XX.1 hace referencia a el paciente con traslado a la península antes del inicio del estudio pero con diagnóstico molecular realizado (TF).

La frecuencia de homocigotos para una determinada mutación es del 31,1% (14 pacientes), de los cuales el 71,4% (10 pacientes) corresponden a la provincia de Tenerife. El 66,6% (30 pacientes) son heterocigotos compuestos y sólo el 2,2% (1 paciente, F038.1) mostró un solo alelo mutado; asumimos que no hemos sido capaces de detectar la mutación en el otro alelo (Tabla 11).

Paciente	Mutación	Familiar	RESULTADO
F007.1	IVS10-11G>A	F007.3	No muestra mutaciones (i10)
F027.1	IVS4+5G>T	F027.3	No muestra mutaciones (i4)
F038.1	No tiene 2ª mutación	F038.3	No muestra mutaciones
F040.1	p.Y414C	F040.3	No muestra mutaciones (e12)
F041.1	IVS2-13T>G	F041.3	No muestra mutaciones (i2)

Tabla 11. Relación de pacientes con mutaciones no encontradas en alguno de los padres.

Las mutaciones predominantes y sus frecuencias, tomando como referencia los 84 alelos posibles mutados, fueron: p.R408W (19%), p.R68S (11,9%), p.A403V (10,7%), p.R176L (9,5%), IVS10-11G>A (8,3%), p.R297C (4,8%), p.R261Q (4,8%), p.R158Q (4,8%). El resto de mutaciones encontradas tienen frecuencias por debajo de ese porcentaje (1,2-3,6%) (Tabla 12). Las cuatro primeras mutaciones en frecuencia suman el 51,1% de los alelos mutados encontrados, mientras que esas mismas 4 mutaciones se encuentran en al menos un alelo de cada paciente en el 73,3% (33/45 pacientes), es decir, casi 3 de cada 4 pacientes muestran una de esas mutaciones.

Mutación	E/I	cDNA	DOMINIO	Tipo	AAMM	TF	GC	% Alelo
p.R408W	12	c.1222C>T	Catalítico	Missense	16	7	9	19,0
p.R68S	3	c.204A>T	Regulatorio	Missense	10	9	1	11,9
p.A403V	12	c.1208C>T	Catalítico	Missense	9	6	3	10,7
p.R176L	6	c.527G>T	Catalítico	Missense	8	2	6	9,5
IVS10-11G>A	i10	c.1066-11G>A	Intrónico	Splice	7	4	3	8,3
p.R297C	8	c.889C>T	Catalítico	Missense	4	4	0	4,8
p.R261Q	7	c.782G>A	Catalítico	Missense	4	3	1	4,8
p.R158Q	5	c.473G>A	Catalítico	Missense	4	1	3	4,8
p.A300S	8	c.898G>T	Catalítico	Missense	3	0	3	3,6
p.D129G	4	c.386A>G	Regulatorio	Missense	2	0	2	2,4
G352>Vfs	10	c.1055delG	Catalítico	Delección	2	2	0	2,4
p.V388M	11	c.1162G>A	Catalítico	Missense	2	1	1	2,4
p.I65T	3	c.194T>C	Regulatorio	Missense	1	0	1	1,2
p.S87R	3	c.261C>A	Regulatorio	Missense	1	0	1	1,2
p.I164V	5	c.490A>G	Catalítico	Missense	1	1	0	1,2
p.R252W	7	c.754C>T	Catalítico	Missense	1	1	0	1,2
p.M276K	7	c.827T>A	Catalítico	Missense	1	1	0	1,2
p.R243Q	7	c.728G>A	Catalítico	Missense	1	0	1	1,2
p.P281L	7	c.842C>T	Catalítico	Missense	1	0	1	1,2
p.Y414C	12	c.1241A>G	Tetramerización	Missense	1	0	1	1,2
p.N167I	5	c.500A>T	Catalítico	Missense	1	0	1	1,2
p.P409L	12	c.1226C>T	Catalítico	Missense	1	0	1	1,2
IVS4+5G>T	i4	c.441+5G>T	Intrónico	Splice	1	0	1	1,2
IVS2-13T>G	i2	c.169-13T>G	Intrónico	Splice	1	0	1	1,2
					<b>83/84</b>	<b>42</b>	<b>41/42</b>	<b>98,8</b>

Tabla 12. Mutaciones encontradas en número de alelos y porcentajes. E/I = Exón / Intrón; AAMM = Alelos Mutados.

Por frecuencias exónicas, incluyendo las intrónicas como los exones a los que afectan, los exones 12, 3, 11 contienen el 58,3% de las mutaciones totales encontradas en nuestra población con unas frecuencias del 32,1%, 15,5% y 10,7%, respectivamente. Este porcentaje aumenta hasta el 85,7% si son añadidos los exones 6 (9,5%), 7 (9,5%) y 8 (8,3%). Los exones 1, 2, 9 y 13 no mostraron ninguna mutación en los pacientes estudiados.

Por dominios dentro de la proteína PAH, el regulatorio (N-terminal) presenta, con respecto a los 81 alelos mutados encontrados, 14 alelos (17,28%), el dominio catalítico 57 (70,37%), y en el encargado de la tetramerización proteica (C-terminal) 1 (1,23%), siendo el resto intrónicas, 9 en total (11,1%). La tabla 13 resume de las mutaciones intrónicas a qué dominio afectan.

Mutación	Exón afectado	DOMINIO AFECTADO
IVS10-11G>A	11	Catalítico
IVS4+5G>T	4	Regulador-Catalítico
IVS2-13T>G	3	Regulador

Tabla 13. Mutaciones intrónicas, frecuencia con respecto a y su relación con los dominios afectados.

Por tipo de mutación fueron encontradas 24 mutaciones diferentes en total, distribuyéndose en 20 *missense* (83,33%), 3 con alteración del *splicing* (12,5%) y 1 deleción (4,16%). La tabla 14 muestra

los porcentajes por tipo de mutaciones, tanto por número absoluto (n° de mutaciones encontradas), como en relación a los alelos encontrados.

Tipo de mutación	N° total	%	N° alelos	%
Missense	20	83,33	70	86,42
Splice	3	12,5	9	11,1
Delección	1	4,16	2	2,46

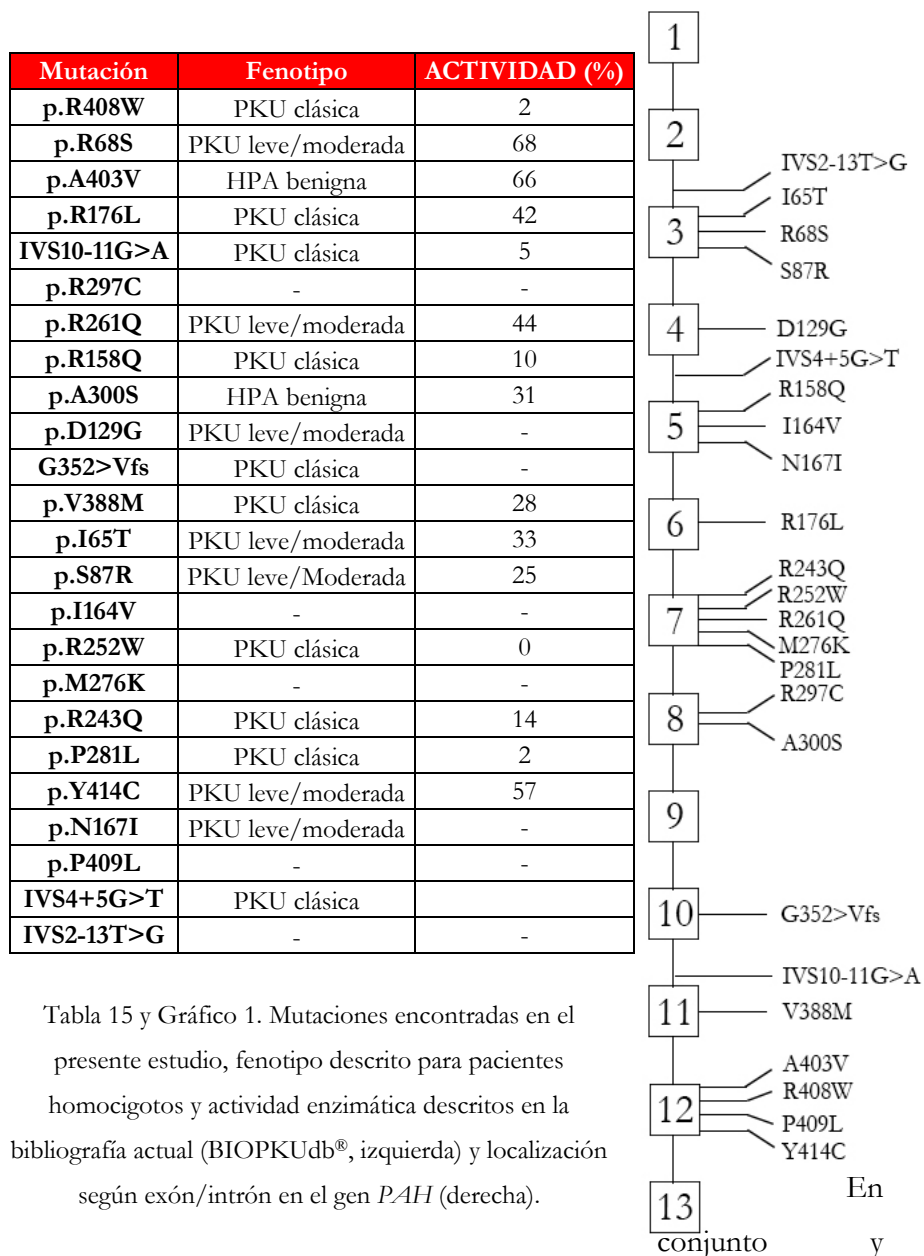
Tabla 14. Frecuencias mutacionales por tipo de mutación.

### 5.2.1. Características específicas de mutación

Para cada mutación, ha sido descrito en pacientes homocigotos un fenotipo, además de una actividad *in vitro* mediante ensayos en líneas celulares. Para las mutaciones encontradas en nuestro trabajo, la siguiente tabla resume dichas características (Tabla 15), además de su localización en el gen *PAH* (Gráfico 1).

En el año 1999 se describieron las características estructurales de la proteína PAH, así como las alteraciones acontecidas para determinadas mutaciones. En nuestro trabajo hemos encontrado 24 mutaciones diferentes. Salvando las intrónicas, en el artículo se definen todas las demás, salvo la mutación p.P409L no descrita, con las predicciones de los cambios en cada una. A destacar la cercanía del residuo P281 al ión férrico del sitio activo de la proteína. El resto alteran de alguna forma la estructura proteica a diferentes niveles, ya sean por alteraciones en los puentes de hidrógeno (p.R408W, p.R68S, p.R297C, p.R261Q, p.R158Q, p.D129G, p.Y414C, p.N167I), puentes salinos (p.R176L, p.R158Q, p.R243Q) o por estar localizados en sitios estratégicos importantes para la formación de bucles, alfa-hélices y láminas-beta, así como alteraciones en los residuos hidrofóbicos vecinos. Para algunas mutaciones (p.V388M, p.I164V) no han sido

predichos cambios en la estructura proteica (Erlandsen and Stevens, 1999).



resumido por fenotipo, se pueden agrupar las mutaciones encontradas según el fenotipo descrito:

HPA benigna	PKU leve/moderada (Mild-PKU)	PKU clásica	No descrita
A300S A403V	I65T R68S S87R D129G N167I R261Q Y414C	<i>IVS4+5G&gt;T</i> R176L R252W R243Q P281L G352>Vfs V388M <i>IVS10-11G&gt;A</i> R408W	<i>IVS2-13T&gt;G</i> I164V R261Q M276K R297C P409L

### 5.3. POLIMORFISMOS

Los polimorfismos o mutaciones silentes encontrados fueron aquellos que se localizaron durante la búsqueda de las mutaciones patológicas (Tabla 16), no realizándose una búsqueda sistemática en todos los exones de todos los pacientes. Todos los polimorfismos no patológicos encontrados se encuentran descritos en las bases de datos actuales.

Paciente (TF)	Polimorfismos	Paciente (GC)	Polimorfismos
F001.1	Q232Q/V245V	F021.1	Q232Q/V245V
F002.1		F022.1	
F002.4		F023.1	
F003.1	L385L	F024.1	
F004.1		F025.1	L385L (H) / Q232Q (H) / IVS9+43G>T (H)
F005.1		F026.1	L385L (H)
F006.1	L385L (H)	F027.1	IVS9+43G>T (i9,H)
F006.4	L385L (H)	F028.1	
F007.1		F029.1	
F008.1	Q232Q/V245V	F030.1	L385L (H) / IVS2-7C>G (i2) / IVS9+43G>T
F009.1	L385L (H)	F031.1	
F009.4		F032.1	
F010.1		F033.1	



<b>F011.1</b>	IVS9+43G>T / L385L (H)	<b>F034.1</b>	
<b>F012.1</b>	Q232Q	<b>F035.1</b>	Q232Q / V245V / IVS9+43G>T / L385L (H)
<b>F013.1</b>		<b>F036.1</b>	IVS3-22C>T / V245V / L385L (H)
<b>F014.1</b>	L385L (H)	<b>F037.1</b>	L385L (H)
<b>F015.1</b>		<b>F038.1</b>	IVS1+62C>T / Q232Q (H) / IVS9+43G>T / L385L (H)
<b>F016.1</b>	Q232Q/V399V/L385L (H)	<b>F039.1</b>	V245V (H) / L385L (H)
<b>F017.1</b>		<b>F040.1</b>	L385L (H) / N426N
<b>F018.1</b>	Q232Q/L385L (H)	<b>F041.1</b>	V254V / L385L (H)
<b>F019.1</b>			
<b>F020.1</b>	L385L		

Tabla 16. Polimorfismos encontrados en los pacientes de ambas provincias. H = Homocigosis.

#### 5.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

En la distribución por provincias, de los 83 alelos mutados encontrados, la provincia de Santa Cruz de Tenerife cuenta con 42 (50,6%, 23 pacientes), y 41 (49,4%, 21 pacientes) en las Palmas de Gran Canaria (Gráfico 4). Las mutaciones más frecuentes en la provincia de Santa Cruz de Tenerife fueron por orden de frecuencia: p.R68S (9, 21,4%), p.R408W (7, 16,7%) y A403V (6, 14,3%) (Gráfico 2), mostrando un total de 13 mutaciones diferentes de las 24 encontradas (54,2%).

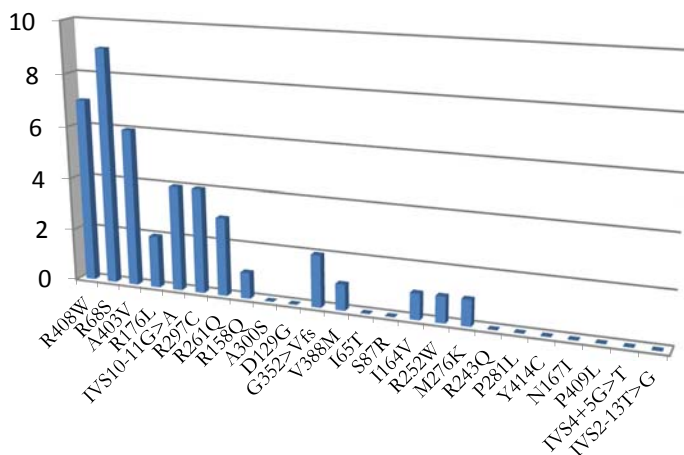


Gráfico 2. Provincia de Santa Cruz de Tenerife

En la provincia de Las Palmas de Gran Canaria, las frecuencias mutacionales son diferentes a las encontradas en Tenerife, siendo las más frecuentes p.R408W (9, 22%) y p.R176L (6, 14,6%) (Gráfico 3). En esta provincia hay una mayor variedad de mutaciones encontradas, localizándose un total de 19 mutaciones diferentes de las 24 encontradas (79,2%). En la siguiente (Tabla 17) se resumen las mutaciones encontradas en cada comunidad y su proporción en cada una de ellas.

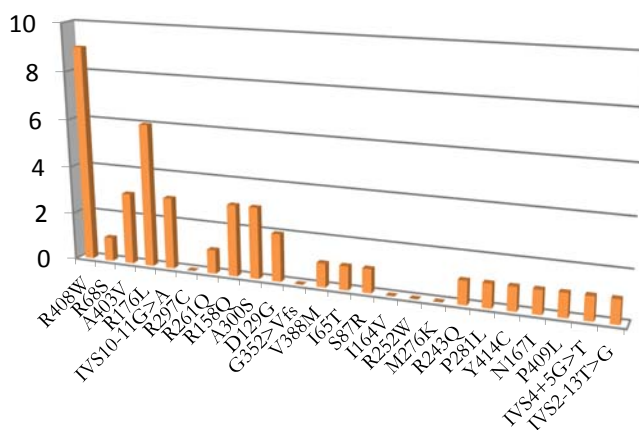


Gráfico 3. Provincia de Las Palmas de Gran Canaria

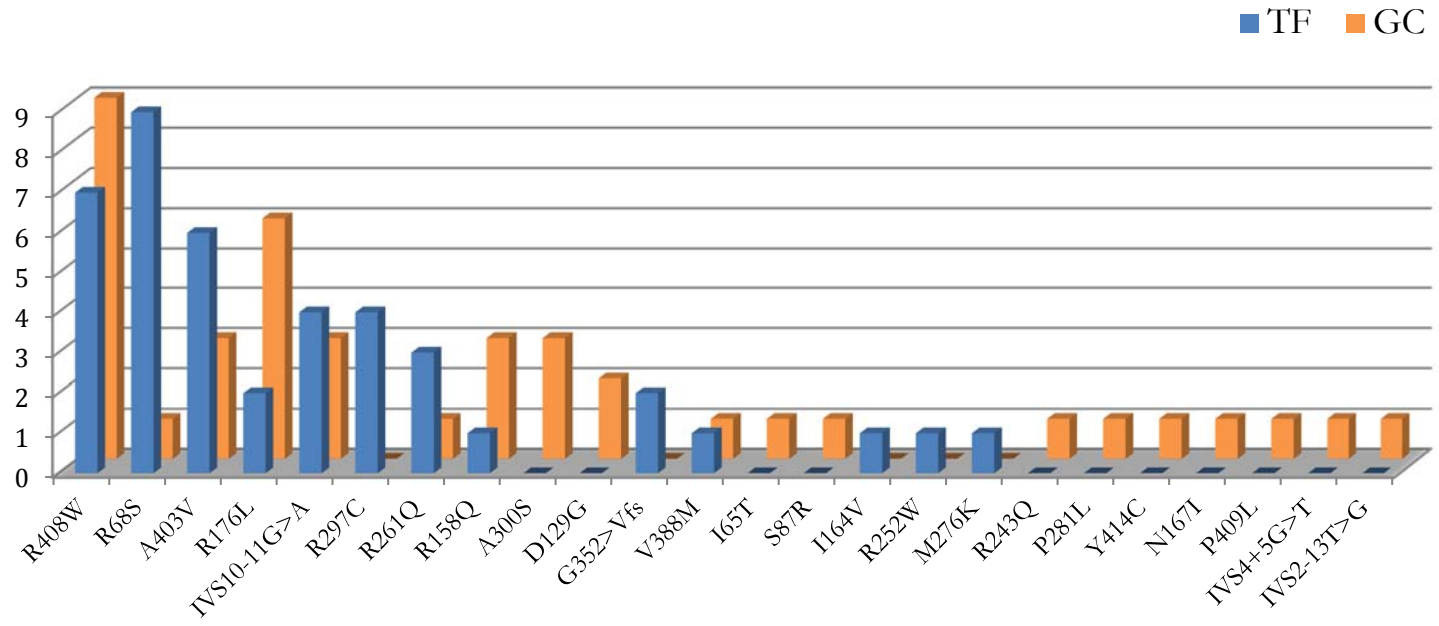


Gráfico 4. Número de mutaciones por provincias. Distribución de alelos encontrados por provincias (números absolutos).

Mutación	Alelos	% Alelo	TF	%	GC	%
p.R408W	16	19,0	7	16,7	9	21,4
p.R68S	10	11,9	9	21,4	1	2,4
p.A403V	9	10,7	6	14,3	3	7,1
p.R176L	8	9,5	2	4,8	6	14,3
IVS10-11G>A	7	8,3	4	9,5	3	7,1
p.R297C	4	4,8	4	9,5	0	0,0
p.R261Q	4	4,8	3	7,1	1	2,4
p.R158Q	4	4,8	1	2,4	3	7,1
p.A300S	3	3,6	0	0,0	3	7,1
p.D129G	2	2,4	0	0,0	2	4,8
G352>Vfs	2	2,4	2	4,8	0	0,0
p.V388M	2	2,4	1	2,4	1	2,4
p.I65T	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.S87R	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.I164V	1	1,2	1	2,4	0	0,0
p.R252W	1	1,2	1	2,4	0	0,0
p.M276K	1	1,2	1	2,4	0	0,0
p.R243Q	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.P281L	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.Y414C	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.N167I	1	1,2	0	0,0	1	2,4
p.P409L	1	1,2	0	0,0	1	2,4
IVS4+5G>T	1	1,2	0	0,0	1	2,4
IVS2-13T>G	1	1,2	0	0,0	1	2,4
<b>TOTAL</b>	<b>84</b>	<b>98,8</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>	<b>41</b>	<b>97,6</b>

Tabla 17. Mutaciones y número total de alelos encontrados con porcentajes relativos a un total de 84 alelos posibles. Mutaciones por provincias y porcentajes de cada una de ellas con respecto al número de alelos posibles (42 en cada provincia).

## 5.5. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Para la correlación del genotipo encontrado en los pacientes PKU y el fenotipo mostrado se compararon los niveles de Phe mostrados al nacimiento, la tolerancia oral de Phe (mg/día) y en aquellos pacientes con mutaciones con respuesta positiva a BH<sub>4</sub> descrita

o en aquellos no descrita para ninguna respuesta, a la prueba de sobrecarga a BH<sub>4</sub>, su respuesta a ella.

#### 5.5.1. Niveles de Phe al nacimiento

Según los niveles de Phe al nacimiento en prueba de cribado neonatal, como se observa en la tabla 10, 3 pacientes de la provincia de Tenerife fueron diagnosticados posteriormente de forma clínica (antes de la instauración del cribado neonatal), por lo que no hay registros iniciales, y 1 traslado de la península de la que no tenemos datos de Phe en el cribado neonatal. Según la clasificación seguida en nuestro estudio (Pérez-Dueñas et al., 2004), 25 pacientes (56,8%) muestran un fenotipo benigno de HPA, con niveles de Phe en sangre < 6 mg/dL (< 360 μmol/L) y sin restricción de Phe en su dieta. Cinco pacientes en total (11,4%) presentan un fenotipo PKU leve, con niveles entre 6 y 10 mg/dL (360-600 μmol/L), 4 un fenotipo moderado de PKU (9,1%, niveles entre 10 y 20 mg/dL ó 600-1.200 μmol/L) y 10 pacientes han sido catalogados como PKU clásica, con niveles > 20 mg/dL (> 1.200 μmol/L). En el siguiente gráfico se muestran el número de pacientes por fenotipo mostrado y provincias. (Gráfico 5).

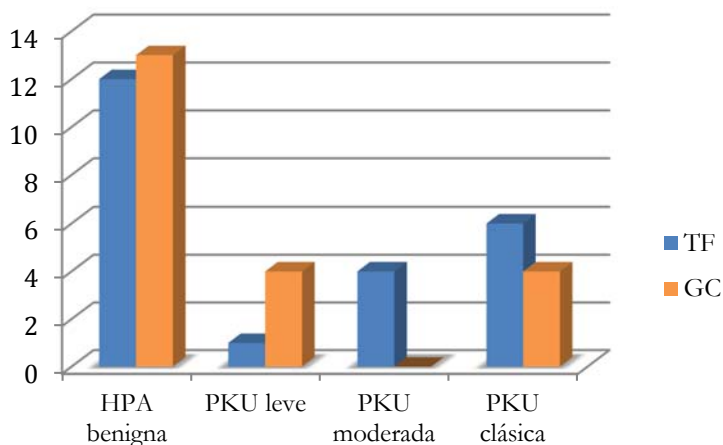


Gráfico 5. Número de pacientes de ambas provincias por fenotipo mostrado según niveles de Phe al nacimiento.

### 5.5.2. Tolerancia de Phe diaria

Con el cribado neonatal, el fenotipo en cada paciente viene marcado por los niveles de Phe durante la prueba del talón, es decir, aquel encontrado antes de iniciar el tratamiento alguno. Sin embargo, en algunos casos, el recién nacido tiene una escasa ingesta en los primeros días, la cantidad proteica de la leche materna puede variar entre personas y el catabolismo proteico neonatal puede aumentar las concentraciones iniciales (Ponzzone et al., 2008).

La tolerancia de Phe diaria supone el fenotipo “real” del paciente PKU en un contexto cronológico amplio ya que, según existan transgresiones o aumentos de la ingesta proteica, la Phe máxima alcanzada dependerá de su verdadera función enzimática y, por lo tanto, su verdadero fenotipo.

En nuestro estudio, los pacientes de la provincia de Santa Cruz de Tenerife con restricción en Phe se pueden ver en la tabla 10. Como

se puede observar, según tolerancia de Phe, algunos pacientes cambian de fenotipo en la clasificación utilizada.

El paciente F005.1 está catalogado como HPA benigna por no tener restricción dietética alguna, ya que por la edad y por haber sido seguido previamente por otros profesionales no tenemos constancia de si tuvo restricción dietética o no. Por genotipo mostrado y comparativamente con otros pacientes debería mostrar un fenotipo moderado.

#### 5.5.3. Sobrecarga de BH<sub>4</sub>

De los 44 pacientes PKU de Canarias incluidos en el estudio, cuatro están actualmente con Dihidrocloruro de Sapropterina (Kuvan<sup>®</sup>) tras prueba de sobrecarga con BH<sub>4</sub> (F001.1, F009.1, F009.4 y F015.1), todos pertenecientes a la provincia de Tenerife. En la provincia de Las Palmas de Gran Canaria no hay ningún paciente actualmente en tratamiento con Kuvan<sup>®</sup>. En colaboración con la Dra. Mónica Ruíz Pons del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, en dos de ellos se realizó el test de sobrecarga tras conocer el genotipo en este estudio (F009.4 y F015.1), ambos con genotipo homocigoto para la mutación p.R68S. Debido a que el paciente F009.4 tiene un hermano PKU (F009.1) con genotipo conocido y en tratamiento con Kuvan<sup>®</sup> por ser paciente respondedor, se realizó el test de sobrecarga con BH<sub>4</sub> en el período neonatal (6 días), con resultado positivo (Tabla 18).

En los pacientes F001.1 y F009.1 se realizó la prueba de sobrecarga antes del inicio del presente estudio, con una formulación propia de los Laboratorios Shircks (Suiza), que no llegó a comercializarse y de uso sólo en ensayos clínicos y a criterio de cada centro.

Codificación	GENOTIPO	FENOTIPO	FECHA	0	4 h	8 h	12 h	24 h	%
<b>F001.1</b>	p.R68S / p.R158Q	PKU leve	19/08/03	743	567	357	485	467	<b>52,0</b>
<b>F009.1</b>	p.R68S / p.R68S	PKU moderada	21/12/07	672			315	375	<b>53,1</b>
<b>F009.4</b>	p.R68S / p.R68S	PKU moderada	16/06/11	636	539	357	266	369	<b>58,2</b>
<b>F015.1</b>	p.R68S / p.R68S	PKU moderada	31/12/11	490		430	285	315	<b>41,8</b>

Tabla 18. Test de sobrecarga con BH<sub>4</sub> en los pacientes de la Provincia de Tenerife.

Resultados en µmol/L. El porcentaje hace referencia a la mayor disminución obtenida a partir de las 8 h.

La cuantificación de Phe resultante en la prueba de sobrecarga de BH<sub>4</sub> del paciente F001.1 fue obtenida en laboratorio externo (CEDEM, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid). En su caso se obtuvieron resultados tanto de Phe como de Tyr, así como de excreción de pterinas en orina para las horas señaladas (no se adjuntan resultados). Para todos los demás pacientes la cuantificación se llevó a cabo en el laboratorio de Cribado Neonatal de Canarias.

En todos los pacientes se observó una disminución de más del 30% a partir de las 8 h de administrada la BH<sub>4</sub>, por lo que se dio como respondedores según los protocolos actuales, y siguen actualmente en tratamiento con Kuvan<sup>®</sup> y mejor tolerancia de Phe.

## 5.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se analizaron las mutaciones encontradas (24 en total) *in silico* con las herramientas bioinformáticas disponibles para análisis de SNP y mutaciones en áreas de *splicing*. Para los SNP se hizo una comparativa con 3 herramientas bioinformáticas (SIFT, Polyphen-2 y PROVEAN),



ya descritas previamente en el apartado de Material y Métodos y el *Grantham Score*, también descrito en el mismo apartado con el objetivo de relacionar los resultados obtenidos con el fenotipo asociado a cada mutación (tabla 19).

Mutación	Grantham Score	SIFT®	Polyphen-2®	PROVEAN®
p.R408W	101	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	- 6,834 / Deletérea
p.R68S	110	0,05 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-5,472 / Deletérea
p.A403V	64	0,05 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-3,218 / Deletérea
p.R176L	102	0,03 / Dañina	0,003 / Benigna	-5,037 / Deletérea
p.R297C	180	0,00 / Dañina	0,979 / Probablemente Dañina	-1,439 / Neutra
p.R261Q	43	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-3,745 / Deletérea
p.R158Q	43	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-3,871 / Deletérea
p.A300S	99	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-2,915 / Deletérea
p.D129G	94	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-6,748 / Deletérea
G352>Vfs		-	-	-14,923 / Deletérea
p.V388M	21	0,01 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-1,913 / Neutra
p.I65T	89	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-4,497 / Deletérea
p.S87R	110	0,56 / Tolerable	0,091 / Benigna	-1,395 / Neutra
p.I164V	29	0,21 / Tolerable	0,270 / Benigna	-0,827 / Neutra
p.R252W	101	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-7,664 / Deletérea
p.M276K	95	0,09 / Tolerable	0,013 / Benigna	-3,730 / Deletérea
p.R243Q	43	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-3,829 / Deletérea
p.P281L	98	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-9,593 / Deletérea
p.Y414C	194	0,00 / Dañina	1,000 / Probablemente Dañina	-8,117 / Deletérea
p.N167I	149	0,00 / Dañina	0,095 / Benigna	-6,233 / Deletérea
p.P409L	98	0,00 / Dañina	0,981 / Probablemente Dañina	-7,307 / Deletérea

Tabla 19. Correlación de los resultados obtenidos mediante las diferentes herramientas bioinformáticas SIFT, Polyphen-2 y PROVEAN, además del

Grantham Score para cada mutación missense (SNP) y deleciones (sólo PROVEAN).

#### 5.6.1.SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

En el caso de SIFT<sup>®</sup>, de las 21 mutaciones *missense* encontradas (20 analizables son SIFT), sólo 3 mostraron la categorización de tolerables p.S87R, p.I164V y p.M276K (puntuaciones > 0,05). Las mutaciones p.R68S y p.A403V, con una puntuación de 0,05 se sitúan en el límite de la tolerabilidad. Polyphen-2<sup>®</sup> coincidió con SIFT<sup>®</sup> en las 3 mutaciones, catalogándolas de benignas (puntuaciones cercanas a 0), además de añadir las mutaciones R176L y N167I. En la tabla 15 donde se muestran las actividades *in vitro* de cada mutación, observamos que sólo las mutaciones p.S87R y p.N167I tienen actividad enzimática descrita, no siendo ambos casos > 50% (25% y 42%, respectivamente). En relación con el fenotipo mostrado, pacientes homocigotos descritos en las bases de datos actuales (BIOPKUdb), sólo la p.S87R, p.R176L y p.N167I tienen fenotipos asociados, todos ellos catalogados como PKU leve/moderada (p.S87R y p.N167I) o PKU clásica (p.R176L). La mutación p.A403V, con fenotipo descrito de HPA benigna y 66% de actividad *in vitro* demostrada, muestra en todos los resultados puntuaciones de mutación dañina. Aquellas mutaciones con actividad *in vitro* > 50%, además de la p.A403V, son la p.R68S y p.Y414C, ambas con fenotipo descrito en pacientes de PKU leve/moderada, también presentan puntuaciones de predicción dañinos con las herramientas descritas.

PROVEAN ofrece una puntuación numérica más específica, estableciendo cambios neutros para las mutaciones p.R297C, p.V388M, p.S87R y p.I164V, coincidiendo en éstas dos últimas con las

herramientas antes descritas. Para la mutación p.R297C no hay fenotipos ni actividad *in vitro* descritos, mientras que para la mutación p.V388M el fenotipo mostrado es PKU clásica y su actividad *in vitro* es del 28%.

Para la nueva mutación encontrada p.P409L, todos los resultados obtenidos predicen un comportamiento deletéreo/dañino, que pueden verse resumidos en la tabla 19.

Desde el punto de vista práctico, si consideramos un valor Grantham > 50 como probablemente patológico y deducimos una "predicción de consenso" (acuerdo en al menos 3 de las 4 predicciones) dicotómica (patológica vs. tolerable), los resultados se pueden simplificar así:

- La predicción informática coincide con lo admitido en las bases de datos mutacionales, que tienen en cuenta datos experimentales sobre dichas mutaciones cuando estos existen, en 18 de 21 mutaciones (85.7%) encontradas en nuestra cohorte (en la tabla se marcan sin relleno las de consenso unánime y en gris las de consenso 3/4).
- El cambio p.V388M (marcado en azul en la tabla) es interpretado como tolerable por la escala Grantham (al ser dos aminoácidos hidrófobos no-polares) y PROVEAN (donde pesa más la conservación de residuos en secuencias alineadas), mientras que SIFT y Polyphen-2 (que tiene más en cuenta las connotaciones estructurales) la clasifican como patológica. Como hemos mencionado previamente, el fenotipo asociado a esta mutación en bases de datos es PKU clásica y su actividad *in vitro* es del 28%.

- El cambio p.S87R (marcado en naranja en la tabla) es interpretado como tolerable por consenso, salvo la escala Grantham, que asigna un valor alto por tratarse de un cambio de aminoácidos de estructura química muy diferente. Como también se ha mencionado previamente, el fenotipo asociado a esta mutación en bases de datos es PKU leve/moderada y su actividad *in vitro* es del 25%.
- El cambio p.I164V (marcado en rojo en la tabla) es interpretado como tolerable por consenso unánime y en las bases de datos el fenotipo asociado a esta mutación es de HPA benigna.

#### 5.6.2. Splicing (HSF, *Human Splicing Finder* 3.0)

Se analizaron las 3 mutaciones encontradas localizadas en zonas intrónicas con la herramienta *Human Splicing Finder*<sup>®</sup>, resultando en las diferentes probabilidades obtenidas para cada mutación en el splicing del RNA (Tabla 20).

Mutación	Human Splicing Finder <sup>®</sup>
IVS10-11G>A	Activación de un aceptor críptico intrónico. Hay una alteración potencial de splicing. Alteración del aceptor natural, con más que probable afectación del splicing. +9
IVS4+5G>T	Alteración del sitio de donación natural, con una más que probable afectación del splicing.
IVS2-13T>G	Activación de un aceptor críptico intrónico. Hay una alteración potencial de splicing. Alteración del aceptor natural, con más que probable afectación del splicing. +12

Tabla 20. Resultados obtenidos con la herramienta *Human Splicing Finder*<sup>®</sup> para mutaciones localizadas en áreas de splicing (intrónicas).

En 2 de ellas, hubo una alteración del aceptor natural con afectación del splicing en las mutaciones IVS10-11G>A y IVS2-13T>G, añadiendo 9 y 12 aminoácidos a la secuencia resultante,

respectivamente. Para la mutación IVS4+5G>T hace referencia a una alteración del sitio de donación natural con afectación probable del splicing.

### 5.6.3. Estabilización proteica (mCSM)

Para la mutación p.P409L se realizó el análisis de estabilización proteica mediante la herramienta informática basada en web mCSM, así como el modelado 3D mediante el programa *Swiss-PDB Viewer* (ver punto 5.6.4 de este mismo capítulo), como ampliación de los datos a obtener de esta nueva mutación no descrita.

Para dicha mutación, la predicción del cambio en la estabilidad proteica se muestra desestabilizante, con un  $\Delta\Delta G = -0,403$  Kcal/mol.

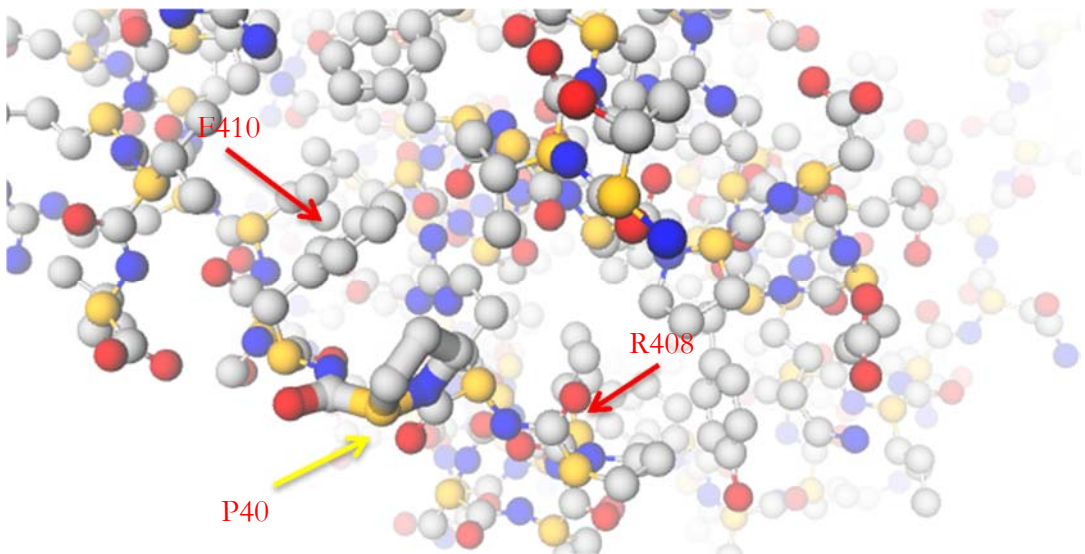


Imagen 2. Imagen obtenida con mCSM para la predicción gráfica del cambio a leucina de la prolina en la posición 409. PDB ID: 1PAH.

### 5.6.4. Modelado 3D (*Swiss-PDB Viewer*, *YASARA*)

Para el modelado, localización de mutaciones y descripción de dominios se utilizó la imagen *Protein Data Bank* ID: 1PAH (residuos 117-424), la cual muestra una de las dos partes de la estructura dimérica de la proteína PAH (Erlandsen et al., 1997). La estructura funcional de la proteína en su forma tetramérica tiene una imagen propia en la base de datos PDB (2PAH), la cual contiene los residuos desde el 118 al 452 (Fusetti et al., 1998).

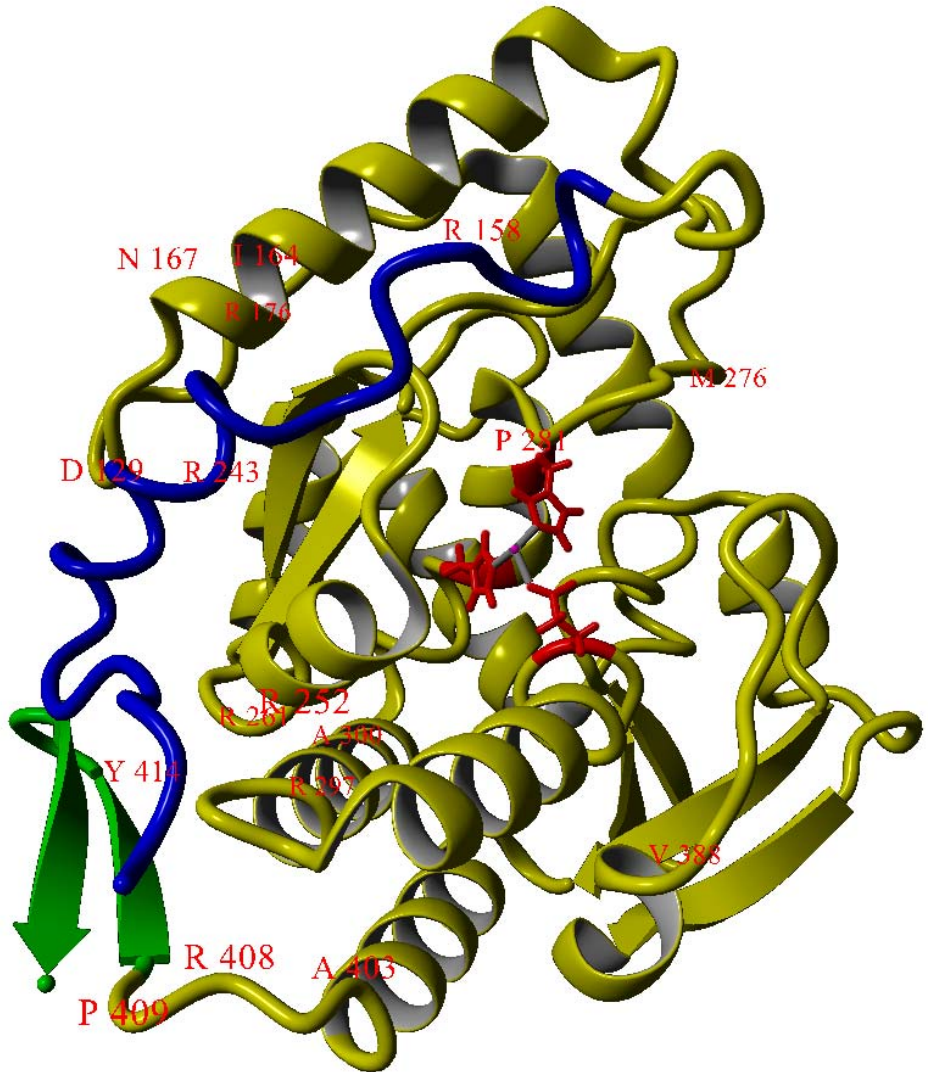


Imagen 3. Estructura tridimensional basada en la imagen PDB ID: 1PAH, con dominios en diferentes colores (azul = regulador, amarillo = catalítico, verde = tetramerización), situación de mutaciones encontradas y centro activo. Imagen obtenida mediante YASARA.

En la imagen 3 está representada la estructura tridimensional basada en dicha imagen con dominios en diferentes colores y situación de las mutaciones encontradas en la población PKU Canaria. No se observan las mutaciones que se encuentran por detrás del residuo 117:

p.I65T, p.R68S, p.S87R. En el centro, en rojo, los residuos His285, His290 y Glu330, enlazando con el ión férrico formando el centro activo de la proteína.

Para establecer y predecir el cambio de la mutación encontrada p.P409L en la estructura tridimensional se utilizó el programa *Swiss-PDB Viewer*, con el que se cambió el aminoácido en la posición 409 (Pro) por Leu (Imagen 4). En la imagen se observan como el nuevo aminoácido es mucho mayor que el anterior, cambiando la conformación de la estructura tridimensional de la proteína.



# DISCUSIÓN



## 6. DISCUSIÓN

El análisis mutacional de los pacientes fenilcetonúricos de Canarias suponía una necesidad de primer orden en el estudio de la enfermedad, así como resultar clave para poder ofrecer un consejo genético adecuado, valorar otras terapias alternativas (BH<sub>4</sub>, Kuvan<sup>®</sup>) y predecir un pronóstico en la evolución de cada paciente (correlación genotipo-fenotipo).

### 6.1. FRECUENCIAS MUTACIONALES. COMPARATIVA CON ESTUDIOS NACIONALES

Conocido el espectro mutacional de la Comunidad Canaria de los pacientes PKU, se confirmaron las sospechas iniciales con las diferencias en las frecuencias mutacionales encontradas a nivel nacional en los distintos trabajos publicados hasta la fecha (Bueno et al., 2013; Couce et al., 2013; L. R. Desviat et al., 1999; Mallolas et al., 1999; Pérez et al., 1997). Se han realizado 5 grandes trabajos en mutaciones del gen *PAH* a nivel nacional, 6 si incluimos uno realizado en Marruecos (Dahri et al., 2010), en colaboración con el CEDEM de Madrid, y que, por cercanía, es de gran interés comparar (Tabla 21). En todos ellos se realiza un análisis de frecuencias de las mutaciones encontradas y en la mayoría, se diferencian bastante de las encontradas en el presente estudio.

Mutación	Alelos	% Alelo	Pérez et al. (1997)	Desviat et al. (1999)	Mallolas et al. (1999)	Dahri et al. (2009)	Couce et al. (2013)	Bueno et al. (2013)
R408W	16	19,0			2,87		1	2,4
R68S	10	11,9	2,3				1	3
A403V	9	10,7	3,1	8 (1,3-14,6)	5,1		2,4	3,4
R176L	8	9,5	1,5				6,2	0,3
IVS10-11G>A	7	8,3	14,7	10 (8,3-125)	12,6	8,3	13,8	10,9
R297C	4	4,8						
R261Q	4	4,8	3,9	0-10,3	5,6		10,5	4,4
R158Q	4	4,8			2,2		1,4	1,7
A300S	3	3,6	1,5	0-6,4	2,87			1,3
D129G	2	2,4	1,5					
G352>Vfs	2	2,4			2,87	62,5		0,6
V388M	2	2,4	6,2	2,5-10,4	4,6		6,2	7,4
I65T	1	1,2	8,5	6,7	5,6		2,4	4,4
S87R	1	1,2					1	
I164V	1	1,2			0,5			
R252W	1	1,2	0,8		0,5		1,4	
M276K	1	1,2						
R243Q	1	1,2			3,4	4,17		1,7
P281L	1	1,2	2,3					1
Y414C	1	1,2	2,3		1,15		1,4	2,7
N167I	1	1,2		< 1,5	0,5			
P409L	1	1,2						
IVS4+5G>T	1	1,2			4			
IVS2-13T>G	1	1,2						

Tabla 21. Comparativa entre las frecuencias alélicas de los diferentes estudios realizados en España hasta la fecha (Bueno et al., 2013; Couce et al., 2013; L. R. Desviat et al., 1999; Mallolas et al., 1999; Pérez et al., 1997).

Comparativamente, y por mutaciones referencia, la mutación con mayor frecuencia encontrada en el presente estudio (p.R408W) es la más frecuentemente encontrada a nivel mundial, de origen y altas frecuencias del norte y centro de Europa (Guldberg et al., 1994; Sterl et al., 2013), con una frecuencia elevada (19%) y distribución uniforme en

las dos provincias, siendo mayor en Las Palmas de Gran Canaria. Esto a pesar de contar en la provincia de Tenerife con un probable “efecto fundador” en la isla de La Palma, del cual se hablará más adelante. Esta mutación en los estudios previos realizados en España, se encuentra en los pacientes PKU prácticamente de manera anecdótica, con frecuencias que no superan el 3%, incluso en zonas tan distantes como el norte y sur de la península ibérica.

Lo mismo sucede con las dos mutaciones siguientes en frecuencia (p.R68S y p.A403V), que en nuestra población encontramos en porcentajes superiores al 10% y en los trabajos nacionales, en menos del 5%.

La mutación que con mayor frecuencia se ha encontrado en la península ibérica, es la 4ª en frecuencia para nuestro estudio, con porcentajes muy similares a los encontrados en Cataluña (Mallolas et al., 1999) y, en menor medida que otras áreas. A pesar de ello, las frecuencias oscilan entre 8-14% según región y con frecuencias similares a otros trabajos publicados de la zona mediterránea, de la cual es la mutación mayormente encontrada (Giannattasio et al., 2001; Guldberg et al., 1994, 1993b; Ozgüç et al., 1993; Rivera et al., 2011; Traeger-Synodinos et al., 1994).

La mutación Gly352Valfs\*48, característica de Marruecos (Dahri et al., 2010), con un cambio en la pauta de lectura y un codón de STOP a 48 AA, ha sido encontrada en nuestra comunidad casualmente en una familia cuyo padre es de origen marroquí, pero que la madre es originaria de Tenerife. El paciente presentó la delección de forma homocigota la guanina en la posición 1055 en el cDNA del gen *PAH*, siendo caracterizada tanto en secuenciación como en SSCP.

Aparte de las mutaciones p.V388M, frecuentemente encontrada en trabajos previos españoles con frecuencias superiores al 5% y que, en nuestra cohorte supone el 2,8%; y la mutación p.R261Q, de altos porcentajes en la zona de Galicia (> 10%) y que se ha encontrado en Canarias en torno a la mitad (4,8%), muy similar a la zona sur de España; el resto de mutaciones muestran unos porcentajes bajos (<4,8%), similares a los encontrados previamente. Es de señalar que las mutaciones p.R297C (4,8%), p.M276K (1,2%) e IVS2-13T>G (1,2%) no se han encontrado en los trabajos españoles previos, aunque en el caso de las dos últimas, nuestra frecuencia sea el equivalente a 1 alelo para cada una.

En cuanto a frecuencias por fenotipos, sí se han encontrado resultados similares a los obtenidos en estudios previos con un 56,8% de formas HPA benignas frente al 54% mostrado a nivel nacional (L. Desviat et al., 1999).

## 6.2. NUEVA MUTACIÓN (p.P409L)

La mutación p.409L (c.1226C>T, CCC>CTC) no se ha encontrado en las bases de datos consultadas (PAHdb, BIOPKUdb, HGMD<sup>®</sup>) ni en los artículos revisados. Localizada en la madre del paciente F040.1, se encontró en el exón 12 junto a la mutación Y414C, a sólo 14 nucleótidos de ella, y el polimorfismo N426N, todos ellos de forma heterocigota. Se encuentra en el dominio catalítico junto a la mutación p.R408W, la más frecuentemente encontrada en nuestra comunidad, y cuyo codón no ha mostrado hasta el momento cambios en su secuencia original (CCC) que hayan sido descritos (a excepción del cambio c.1226C>A, con traducción proteica p.P409H, que ha sido

encontrado en un carcinoma de mama, COSMIC database), mientras que en los aminoácidos colindantes sí y con diferentes variantes (p.R408W, p.Arg408Glyfs\*44, p.R408Q, p.F410S, p.F410C , p.F410I).

El paciente, nacido en Fuerteventura, heterocigoto compuesto, mostró una Phe al nacimiento de 569,1  $\mu\text{mol/L}$  (9,4 mg/dL), límite entre PKU leve y moderada. Aunque la mutación p.Y414C ha sido descrita, es de destacar que ésta se encuentra en el dominio N-terminal o de tetramerización, mientras que la mutación en cuestión lo está en el dominio catalítico.

No se ha realizado hasta el momento sobrecarga de  $\text{BH}_4$ , aunque la mutación que la acompaña (p.Y414C) se ha descrito como respondedora en pacientes homocigotos (BIOPKUdb) en el 90% de los 11 pacientes en los que se ha realizado y se ha descrito una actividad enzimática del 57% en cultivos celulares eucariotas. El resto de datos no han sido posible rescatar para su descripción en el presente estudio por razones logísticas.

Comparativamente con lo que se conoce en los aminoácidos colindantes, sólo podemos realizar una comparación con la mutación p.R408W, ya que de la p.F410S no se han descrito sus características principales (BIOPKUdb). La p.R408W presenta un fenotipo clásico en aquellos pacientes homocigotos, con una actividad enzimática in vitro en células eucariotas del 2% y sin respuesta a test de sobrecarga con  $\text{BH}_4$  en el 100% de los casos publicados. Con ella podemos hacernos una leve idea de las posibles repercusiones de esta nueva mutación.

Como se observa en la siguiente imagen, la secuencia encontrada en el paciente muestra las 2 mutaciones y el polimorfismo encontrados en el exón 12 (Imagen 4).

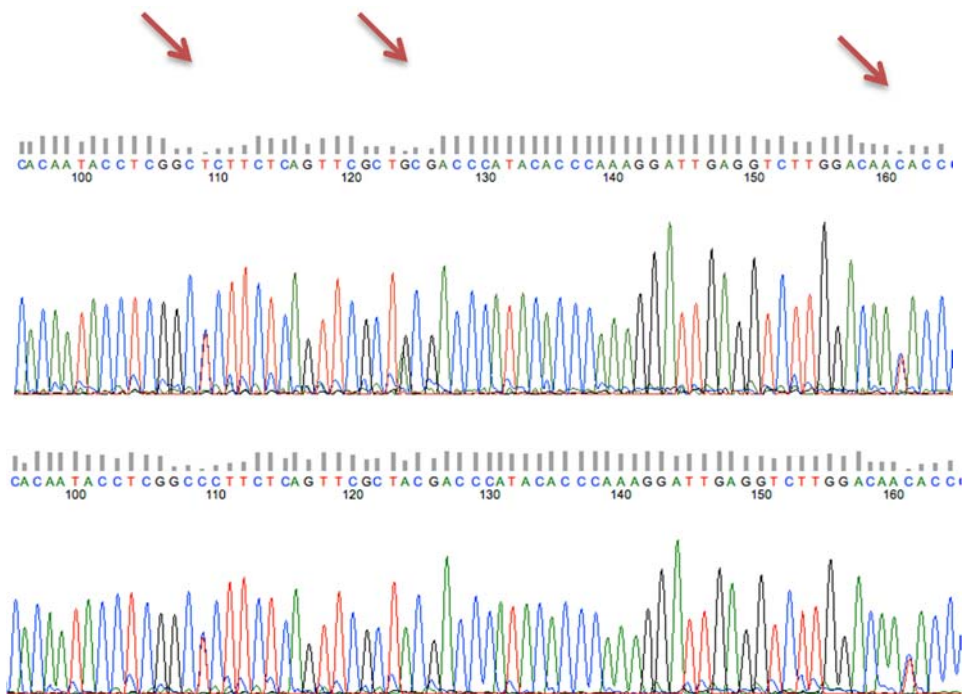


Imagen 4. Arriba, secuencia DNA paciente F040.1 con cambios en heterocigosis por orden de izquierda a derecha: c.1226C>T (p.P409L), c.1241A>G (p.Y414C) y N426N. Abajo, secuencia DNA materno, conteniendo la mutación p.P409L y el polimorfismo N426N.

Por sí solo, el análisis por SSCP del exón 12 no sería valorable en principio en nuestro paciente al encontrarse conjuntamente con otra mutación en el mismo exón, pudiendo deberse la mostrada a una u otra variante. Por el contrario, sí lo es comparativamente con la madre, que sólo muestra la mutación problema.

Para realizar una análisis mediante RFLP localizando de una manera efectiva y rápida la presencia de la mutación, las enzimas de restricción que podríamos utilizar serían *HaeIII* (133+165), *HpyAV* (145+153) y *Sau96I* (132+166), todas cortando en secuencia WT, mientras que la secuencia mutada daría un fragmento de 298 pb, utilizando los cebadores ya utilizados para PCR del exón 12 (Figura 6),



u otros más cercanos a la mutación y que produjeran un fragmento más corto que se diferenciara más claramente del restante.

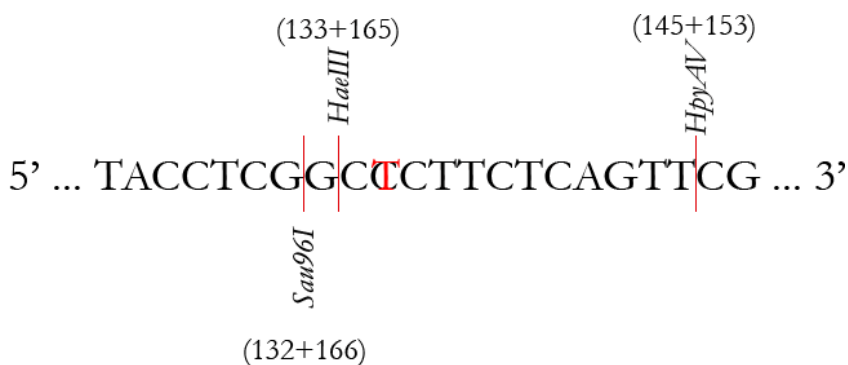


Figura 6. Secuencia del exón 12 vecina a la mutación (nucleótido en rojo especifica el cambio) y zona de corte para las enzimas *Sau96I*, *HaeIII* y *HpyAV*.

El análisis bioinformático realizado sobre la mutación p.P409L revela datos de cierta consideración. El *Grantham Score* arroja una puntuación para un cambio no conservativo (98), en el límite de ser radical. Tanto SIFT como Polyphen-2 la catalogan como dañina y PROVEAN como deletérea, por lo que en un inicio podríamos estar ante una mutación importante con cambios estructurales y funcionales sobre la proteína resultante, corroborado igualmente mediante la herramienta mCSM, cuyo resultado ofrece una predicción de mutación desestabilizante para el enzima (Tabla 22).

Grantham Score	SIFT®	Polyphen-2®	PROVEAN®	mCSM
98	0,00 / Dañina	0,981 / Probablemente Dañina	-7,307 / Deletérea	-0,403 Kcal/mol

Tabla 22. Resumen de resultados obtenidos mediante las herramientas bioinformáticas utilizadas para la mutación p.P409L.

El polimorfismo adyacente (p.N426N, mutación silente) localizado tanto en el genoma materno como en el paciente, acompañando a la mutación p.P409L es un polimorfismo ya descrito en 1999 por Christa Aulehla-Scholz (Alemania) como comunicación para la página web PAHdb y referida en la base de datos BIOPKUdb, con número de referencia dbSNP rs59326968 (c.1278T>C), variante sinónima benigna. Dicha alteración no se ha encontrado en el resto de análisis del exón 12 realizados durante el estudio.

Esto supone el hallazgo de una nueva mutación en una localización sin alteraciones previas por lo que su afectación en un paciente está siendo descrita por primera vez, aunque su presencia en heterocigosis compuesta enmascara su verdadero fenotipo. Esta nueva mutación abre nuevas vías de investigación en la caracterización estructural de la proteína resultante, así como de su actividad y otras características moleculares.

### 6.3. EVENTOS MUTACIONALES SOCIO- DEMOGRÁFICOS

#### 6.3.1.p.R408W en homocigotos de La Palma

Los pacientes procedentes de la isla de La Palma (F006.1, F006.2 y F018.1) son todos originarios de un pueblo de la isla llamado El Pueblo, situado en el municipio de Tijarafe, al oeste de la isla. El último censo poblacional de la zona (Tijarafe) es de 2013, contando con 2776 habitantes, lo que supone una alta prevalencia dentro de la zona. De los 3 pacientes, dos son hermanos y un tercero, de otra familia, tiene a su vez dos hermanas de las cuales se conoce su existencia por dicho

paciente. Ambas presentan retraso mental y su descripción se correspondería con la de un paciente PKU con fenotipo clásico.

Dos familias con individuos afectados de PKU en una pequeña zona de una isla con igual genotipo (p.R408W en homocigosis) tendría varias explicaciones, y todas ellas en conjunto supondrían el mantenimiento de la mutación dentro de la genética local. La primera un “efecto fundador” por un individuo de generaciones anteriores portador de la mutación y que ha pasado de generación en generación a uno o varios individuos, llegando tiempo más tarde a coincidir en dos personas que tuvieran un hijo en común.

La segunda, la endogamia y consanguinidad. Ya sea por residir en zonas de difícil acceso o aisladas por su localización, véase Islandia, o por mantener a la familia o grupo étnico o religioso homogéneo e identificable, judíos Askenazis, se produce el hecho de la endogamia. La unión y reproducción de dos individuos con relación familiar-genética incrementa el riesgo de contraer enfermedades recesivas de forma homocigota para un alelo recesivo infrecuente. Este hecho puede haber sido el potenciador del posible “efecto fundador” y permitir que la mutación se mantuviera en las siguientes generaciones.

El hecho de que la mutación sea la más frecuentemente encontrada a nivel mundial y sea característica del norte de Europa podría indicar que fue la llegada de un individuo de dicha región a la Palma y que se estableciera en la zona el origen de dicha mutación local. Algo menos probable aunque no imposible, es que este evento en una zona de La Palma fuese el origen del resto de individuos con dicha mutación en el resto de las islas, ya que supone la mutación más frecuente del estudio realizado. Para poder refutar o confirmar dicha hipótesis, se necesitaría de un estudio genealógico extenso buscando un

ancestro común y otros estudios moleculares como los haplotipos asociados a dicha mutación.

En nuestro caso, en las dos familias estudiadas, no se daba cosanguinidad en ninguna de ellas, pero ambas son originarias de Tijarafe desde generaciones pasadas.

### 6.3.2. Mutación del norte de Marruecos (G352>Vfs)

Los componentes de la familia F004 comparten una mutación característica del norte de Marruecos, la delección de una guanina en el codón 352 (c.1055delG) del exón 10 (Dahri et al., 2010). Esta delección cambia la pauta de lectura del mRNA codificando una secuencia proteica diferente desde ese aminoácido, que pasaría de Gly a Val y originaría un codón de parada a 48 aminoácidos de su posición. Es una mutación muy característica de Marruecos, encontrándose en el trabajo realizado en colaboración con el CEDEM de Madrid en hasta el 62,5% de los alelos mutados, teniendo una frecuencia de consanguinidad del 84% (21/25).

Por la cercanía de Canarias con Marruecos, sería esperable que compartiésemos una mayor frecuencia de esta mutación, pero no se da el caso. La familia de nuestro estudio esta compuesta por un padre de origen marroquí y una madre canaria. Ella es la única persona del estudio en donde se ha encontrado dicha mutación, siendo de origen canario y no hay otros pacientes de origen marroquí en seguimiento en los principales hospitales de Canarias.

Este hecho destaca que si bien a pesar de tener una alta inmigración de la zona y que tenemos una filogenética común en los antepasados aborígenes de las islas con poblaciones del África negra subsahariana, bereber y norte de África (Fregel et al., 2009; Maca-Meyer

et al., 2004; Rando et al., 1999), por lo menos, en el caso de mutaciones causantes de PKU en el gen que codifica la fenilalanina hidroxilasa, no compartimos una epidemiología común.

#### 6.4. NUEVO PROTOCOLO DE ESTUDIO MUTACIONAL DE CANARIAS

Una vez obtenidos los resultados del estudio mutacional de los pacientes con PKU /HPA de la Comunidad Canaria con las frecuencias de los alelos mutados, se dan las condiciones para establecer un protocolo diagnóstico-molecular en población canaria de pacientes PKU (Figura 7). Aproximadamente el 60% de los alelos mutados se han encontrado en 3 exones: 3, 11 y 12, por lo que el rastreo inicial en ellos es una manera eficiente de comenzar el estudio. Cabe destacar que 10 de las 24 mutaciones encontradas se encuentran en estos 3 genes y que en casi 3 de cada 4 pacientes se han encontrado alguna mutación localizada en uno de estos 3 exones, por lo que las probabilidades de encontrar una mutación en una primera secuenciación son muy altas. Señalar que de forma eficiente, tendríamos que realizar 2 PCR por separado, ya que la temperatura de hibridación para el exón 12 (62°C) difiere de la de los otros 2 exones (60°C); esta circunstancia se puede optimizar técnicamente si fuese preciso.

Posteriormente se añaden los exones 6, 7 y 8, con lo que aumentaríamos hasta en un 85% las probabilidades de encontrar los dos alelos mutados, y hasta un 98% completando con los exones 4, 5 y 10.

En caso de no encontrar uno o dos alelos en el paciente, completariamos el estudio con los exones 1, 2, 9 y 13, de los que no se

han obtenido alelos mutados en el presente estudio y, de no encontrar algún alelo una vez completado el estudio de exones, según marcan los protocolos actuales, deberían realizarse una secuenciación de la zona promotora del gen *PAH* y determinación de grandes deleciones o duplicaciones de largas regiones genómicas mediante la técnica MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) las cuales suponen una minoría respecto al tipo de mutaciones encontradas en el gen *PAH*.

## 6.5. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

A modo introductorio de esta sección, cabe destacar que uno de los parámetros que condiciona mayoritariamente la relación entre el genotipo y el fenotipo mostrado, tanto bioquímicamente como clínicamente son las mutaciones y la alteración estructural de la proteína que resulta. En PKU, estas alteraciones ya fueron descritas para determinadas mutaciones por (Erlandsen and Stevens, 1999). En la siguiente tabla, se muestran por orden de frecuencia las mutaciones encontradas en el presente estudio, así como las alteraciones descritas para cada una de ellas (Tabla 23). En ella no se incluyen mutaciones en zonas intrónicas, ni mutación p.P409L ni G352>Vfs. Las predicciones informáticas favorecen una gran tolerabilidad para el cambio de aminoácido p.I164V, que se trata de una mutación probablemente asociada a HFA benigna.

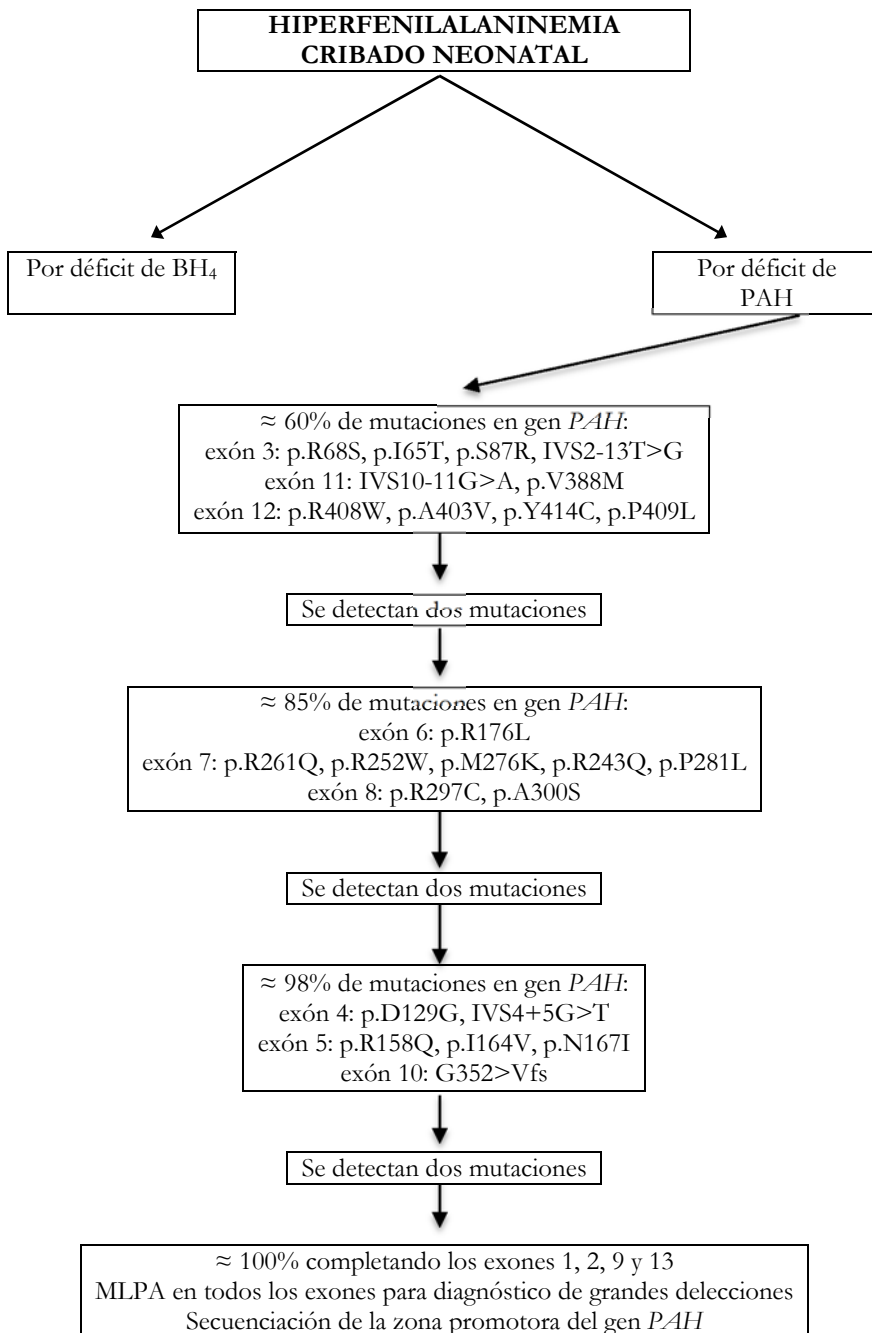


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico molecular para la Comunidad Canaria. Basado en el realizado por Stojiljković-Petrović para su población de referencia (Stojiljković-Petrović et al., 2014)

Esto es coherente con los datos de nuestro paciente F014.1, heterocigoto compuesto con una mutación severa (IVS10-11G>A). En efecto, F014.1 es, a nivel proteico, funcionalmente similar a un homocigótico para p.I164V y presenta HFA benigna.

Mutación	Contactos y comentarios de la estructura
p.R408W	Localizado en el bucle bisagra que une el brazo del dominio de tetramerización con el dominio catalítico. Puentes de hidrógeno hacia los oxígenos del grupo carbonilo de Leu311 y Leu308. Cualquier sustitución supone la rotura de los puentes de hidrógeno.
p.R68S	Realiza un puente de hidrógeno con Ser67, estabilizando la estructura secundaria de Rβ2. Esta sustitución puede romper este puente.
p.A403V	Al final de la hélice Cα12, podría ser necesario para el inicio del bucle antes de Tβ1.
p.R176L	Cualquier sustitución debería romper el puente salino a Asp229 en Cα5.
p.R297C	Puentes de hidrógeno hacia Arg71 y Glu422 en otra subunidad dimérica. La sustitución por Cys podría romper los puentes.
p.R261Q	En el bucle entre Cα6 y Cβ2, cualquier sustitución podría romper los puentes de hidrógeno con Glu304 y Thr238, los cuales estabilizan la estructura secundaria del sitio activo.
p.R158Q	Una sustitución por Gln podría romper un importante puente salino hacia Glu280 y un puente de hidrógeno a Tyr268, lo cual es importante para definir la forma del sitio activo.
p.A300S	Cercano a la Thr238, no hay suficiente espacio para las largas cadenas laterales de Val y Ser.
p.D129G	Localizada al final de la Cα1, Asp129 realiza puentes de hidrógeno con His170 y Gln127. Esta sustitución puede romper estos puentes y desestabilizar la estructura secundaria.
p.V388M	En la superficie de la proteína. No hay predicciones para los efectos de la mutación.
p.I65T	En el núcleo hidrofóbico del dominio regulador. La sustitución por Thr podría distorsionar el paquete hidrofóbico en el núcleo del dominio regulador.
p.S87R	Cercana a numerosos residuos hidrofóbicos. La sustitución por Arg podría desestabilizar la estructura.
p.I164V	(=I164T). No hay predicciones para sustituciones en este aminoácido.
p.R252W	Cualquier sustitución debería desestabilizar la estructura de la PAH.
p.M276K	(=M276I, M276V). En la superficie del dominio catalítico. Expone los residuos hidrofóbicos a la superficie de la proteína.
p.R243Q	La sustitución por Gln rompe el puente salino hacia Asp129, desestabilizando Cβ1 y su interacción con Cα1.
p.P281L	Ayuda a definir el la forma del sitio activo en la inmediata vecindad con el ión férrico. Su sustitución debería cambiar la estructura de la zona.
p.Y414C	Puentes de hidrógeno a través de 2 moléculas de agua hacia los oxígenos de los grupos carbonilos de Phe260 y Gly239, importantes para mantener el domino de tetramerización cerca del dominio catalítico.
p.N167I	Último residuo en Cα2b en la superficie de CD. Puentes de hidrógeno a Asp163 son destruidos con una mutación tipo Ile.



Tabla 23. Alteraciones estructurales de determinadas mutaciones en la proteína PAH (Erlandsen and Stevens, 1999).

Dependiendo de las alteraciones ultra-estructurales intrínsecas acontecidas sobre la proteína PAH debidas a la mutación que las genere, ésta puede verse afectada a diferentes niveles, con una mayor o menor alteración en su función. Sin duda, al igual que en otras enfermedades metabólicas, este es uno de los aspectos esenciales que condiciona el fenotipo de un paciente.

#### 6.5.1. Diferencias fenotípicas entre pacientes con mismo genotipo

La relación existente entre el genotipo-fenotipo existente entre los pacientes PKU en Canarias es constante, comparativamente entre los pacientes homocigotos y los heterocigotos compuestos con mismo genotipo, así como con los fenotipos descritos para los genotipos dados en las bases de datos actuales (Tabla 24).

	Diagnóstico	Fenotipo	BIOPKUdb	Fenotipo BIOPKUdb
F001.1	R68S (3) / R158Q (5)	PKU leve	0 registros	-
F002.1	R261Q (7) / R408W (12)	PKU clásica	114 registros	Mild-PKU (52,63%; 60); Classic PKU (47,37%; 54)
F002.4	R261Q (7) / R408W (12)	PKU moderada	114 registros	Mild-PKU (52,63%; 60); Classic PKU (47,37%; 54)
F003.1	V388M (11) / R408W (12)	PKU clásica	15 registros	Mild-PKU (80%; 12), Classic PKU (20%; 3)
F004.1	G352>Vfs (10) / G352>Vfs (10)	PKU clásica	21 registros	Classic PKU (100%; 21)
F005.1	R68S (3) / R68S (3)	HPA benigna	2 registros	Mild-PKU (100%; 2)
F006.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	821 registros	Mild-PKU (0,37%; 3), Classic PKU (99,63%; 818)
F006.4	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	822 registros	Mild-PKU (0,37%; 3), Classic PKU (99,63%; 818)
F007.1	R297C (8) / IVS10-11G>A (10)	HPA benigna	No R297C	-
F008.1	R176L (6) / R261Q (7)	HPA benigna	0 registros	-
F009.1	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	2 registros	Mild-PKU (100%; 2)
F009.4	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	2 registros	Mild-PKU (100%; 2)

F010.1	R68S (3) / M276K (7)	HPA benigna	No M276K	-
F011.1	IVS10-11G>A (10) / A403V (12)	HPA benigna	30 registros	Mild-PKU (36,67%; 11), Mild-HPA (63,33%; 19)
F012.1	R261Q (7) / A403V (12)	HPA benigna	14 registros	Mild-HPA (100%; 14)
F013.1	R68S (3) / A403V (12)	HPA benigna	3 registros	Mild-HPA (100%; 3)
F014.1	I164V (5) / IVS10-11G>A (10)	HPA benigna	0 registros	-
F015.1	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	2 registros	Mild-PKU (100%; 2)
F016.1	R297C (8) / R297C (8)	HPA benigna	No R297C	-
F017.1	A403V (12) / A403V (12)	HPA benigna	13 registros	Mild-PKU (15,38%; 2), Mild-HPA (84,62%; 11)
F018.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	821 registros	Mild-PKU (0,37%; 3), Classic PKU (99,63%; 818)
F019.1	R252W (7) / A403V (12)	HPA benigna	5 registros	Mild-PKU (80%; 4), Mild-HPA (20%; 1)
F020.1	R297C (8) / IVS10-11G>A (10)	HPA benigna	No R297C	-
F0XX.1	R176L (6) / R408W (12)	-	1 record	Mild-HPA (100%; 1)
F021.1	R176L (6) / R261Q (7)	HPA benigna	0 registros	-
F022.1	R68S (3) / R176L (6)	HPA benigna	0 registros	-
F023.1	D129G (4) / R408W (12)	PKU leve	6 registros	Mild-PKU (100%; 6)
F024.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	821 registros	Mild-PKU (0,37%; 3), Classic PKU (99,63%; 818)
F025.1	I65T (3) / S87R (3)	HPA benigna	2 registros	Mild-HPA (100%; 2)
F026.1	N167I (5) / A403V (12)	HPA benigna	0 registros	-
F027.1	IVS4+5G>T (4) / A403V (12)	HPA benigna	7 registros	Mild-PKU (14,29%; 1), Mild-HPA (85,71%; 6)
F028.1	A300S (8) / R408W (12)	PKU clásica	59 registros	Mild-PKU (11,86%; 7), Mild-HPA (88,4%; 52)
F029.1	R158Q (5) / R408W (12)	PKU leve	125 registros	Mild-PKU (8%; 10), Classic PKU (92%; 115)
F030.1	IVS10-11G>A (10) / A403V (12)	HPA benigna	30 registros	Mild-PKU (36,67%; 11), Mild-HPA (63,33%; 9)
F031.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	821 registros	Mild-PKU (0,37%; 3), Classic PKU (99,63%; 818)
F032.1	R176L (6) / R408W (12)	HPA benigna	1 record	Mild-HPA (100%; 1)
F033.1	R243Q (7) / A300S (8)	HPA benigna	1 record	Mild-HPA (100%; 1)
F034.1	IVS10-11G>A / IVS10-11G>A	PKU leve	200 registros	Mild-PKU (5,5%; 11), Classic PKU (94,5%; 189)
F035.1	R176L (6) / V388M (11)	HPA benigna	0 registros	-
F036.1	D129G (4) / R158Q (5)	HPA benigna	0 registros	-
F037.1	A300S (8) / R408W (12)	HPA benigna	59 registros	Mild-PKU (11,86%; 7), Mild-HPA (88,4%; 52)
F038.1	P281L (7)	HPA benigna	0 registros	-
F039.1	R176L (6) / R176L (6)	HPA benigna	0 registros	-
F040.1	P409L (12) / Y414C (12)	PKU leve	No P409L	-
F041.1	IVS2-13T>G (12) / R158Q (5)	PKU clásica	0 registros	-

Tabla 24. Número de casos con codificación interna, genotipo encontrado y fenotipo mostrado (Phe al nacimiento), así como fenotipos comparativos con la base de datos más extensa de PKU realizada hasta el momento (BIOPKUdb).

Los pacientes homocigotos cuyo genotipo lo presentan más de 2 personas no relacionadas por el parentesco son aquellos portadores de las mutaciones p.R68S (F005.1, F009.1, F009.4, F015.1) y p.R408W (F006.1, F006.4, F018.1, F024.1, F031.1). En el primer caso, sólo el paciente F005.1 presenta un fenotipo benigno sólo por estar actualmente sin restricción dietética. Al ser un paciente diagnosticado en los inicios del cribado neonatal y no seguido posteriormente por los actuales responsables de las unidades de metabopatías de los hospitales de Tenerife, no disponemos de la información, estando actualmente pendiente de visita y control de Phe por la unidad del Hospital Universitario de Canarias. El resto de pacientes muestran un fenotipo moderado.

Los pacientes homocigotos para la mutación p.R408W muestran todos un fenotipo clásico, lo cual se corresponde con los hallazgos descritos en la bibliografía actual.

De entre los pacientes con mutaciones en heterocigosis compuesta, los pacientes F007.1 - F020.1 (p.R297C / IVS10-11G>A) y F008.1 – F021.1 (p.R176L / p.R261Q) comparten mismo genotipo y, a su vez, mismo fenotipo en los 4 (HPA benigna).

En todos los casos, comparativamente con la base de datos más extensa de la que se disponen registros de los trabajos publicados hasta la fecha, BIOPKUdb, se correlacionan los fenotipos del presente trabajo con los realizados anteriormente, salvo los casos de los pacientes

F028.1, diagnosticado de PKU clásica y con fenotipos descritos de PKU leve-moderada y HPA benigna, y el paciente F034.1, que si bien tiene un diagnóstico con Phe al nacimiento de PKU leve, su genotipo ha sido descrito de PKU clásica en la gran mayoría de casos publicados (94,5%).

Con los datos obtenidos en las bases de datos consultadas, la predicción de un determinado fenotipo a partir del genotipo encontrado parece la herramienta más útil actualmente con la que predecir tanto el pronóstico y evolución del paciente, así como la posible respuesta a BH<sub>4</sub> en el test de sobrecarga.

#### 6.5.2. Sobrecarga de BH<sub>4</sub> y pacientes sugestivos de realizar test de sobrecarga

Como ya se vio en el apartado de resultados, durante la realización del estudio y conociendo el genotipo de los pacientes, se realizó test de sobrecarga con BH<sub>4</sub> en dos pacientes (F009.4 y F015.1) ambos con genotipo p.R68S homocigoto, mutación descrita como respondedora al test en las bases de datos y bibliografía actuales. Uno de ellos (F009.4) fue una sobrecarga neonatal por conocer previamente el genotipo de la hermana (también p.R68S homocigota). Si bien Kuvan<sup>®</sup> no está autorizado su uso en menores de 4 años, los estudios actuales demuestran su seguridad en pacientes más jóvenes e incluso se han hecho test de sobrecargas en el periodo neonatal (Couce et al., 2012). Esto conlleva múltiples ventajas desde el inicio de la alimentación del paciente, siendo la más importante mantener LM exclusiva, con un mejor aporte proteico y menores niveles de Phe en sangre, así como una alimentación posterior más liberalizada y una mejor tolerancia del fármaco en edades posteriores.

Hasta ahora, las mutaciones respondedoras al test de sobrecarga con BH<sub>4</sub> son aquellas que muestran un fenotipo leve-moderado, con una actividad enzimática que permite al cofactor actuar en dosis farmacológicas como chaperona y potenciar su efecto. En los casos graves de PKU clásica con Phe > 20 mg/dL (1200 μmol/L) no suelen responder por lo que el test de sobrecarga ya suelen estar asociadas a genotipos que conllevan actividades enzimáticas casi inexistentes. No tendría sentido realizar pruebas de sobrecarga en estos pacientes, pero hay excepciones que se verán más adelante.

En nuestro estudio, de las 24 mutaciones localizadas, 8 se han descrito en la bibliografía como respondedoras o potencialmente respondedoras por tener una actividad enzimática residual suficiente para potenciar mediante BH<sub>4</sub>: p.I65T (33%), p.R68S (68%), p.D129G (-%), p.R261Q (44%), p.A300S (31%), p.V388M (28%), p.A403V (66%), p.Y414C (57%) (Zurflüh et al., 2008), todas ellas, salvo la p.D129G, con actividades superiores o cercanas al 30%.

A pesar de que la mutación p.R176L tiene una actividad residual del 42%, no está descrita como respondedora en las bases de datos consultadas. A pesar de ello, es probable que sea así por que en todos los casos en los que se ha encontrado dicha mutación en el presente estudio, los pacientes presentan un fenotipo benigno sin necesidad de restricción de Phe, requisito indispensable para administrar Diclorhidrato de Sapropterina. Este hecho es probable que se de en el resto de trabajos y, por lo tanto, no ha sido necesario comprobar su respuesta al fármaco en cuestión.

Para determinar qué pacientes serían subsidiarios de realizar test de sobrecarga se han de responder 2 preguntas en el siguiente orden: ¿Tiene una PKU leve o moderada con restricción de Phe en la dieta?

¿Tiene un genotipo compatible?. Eliminando los pacientes con HPA benigna sin restricción dietética obtenemos los pacientes PKU (Tabla 25) susceptibles de sobrecarga. Sin embargo, por genotipo mostrado y comprobando dicho genotipo en la base de datos BIOPKUdb se observa que sólo dos pacientes de la provincia de Las Palmas de Gran Canaria serían susceptibles de realizar sobrecarga ya que el resto muestra un genotipo no respondedor o mutaciones con una actividad enzimática muy baja (F041.1, p.R158Q muestra 10% de actividad enzimática residual, no descrita para IVS2-13T>G).

El paciente F040.1 muestra en su genotipo una mutación respondedora por lo que también sería susceptible de realizar test de sobrecarga. En el trabajo publicado en 2008 de (Zurflüh et al., 2008)

Paciente	Diagnóstico	Fenotipo	Respuesta BH <sub>4</sub>	Respuesta BH <sub>4</sub> (BIOPKUdb)
F001.1	R68S (3) / R158Q (5)	PKU leve	+	-
F002.1	R261Q (7) / R408W (12)	PKU clásica	NR	Sí (6,25%; 2), No (84,38%; 27), Lento (9,38%; 3)
F002.4	R261Q (7) / R408W (12)	PKU moderada	NR	Sí (6,25%; 2), No (84,38%; 27), Lento (9,38%; 3)
F003.1	V388M (11) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 2)
F004.1	G352>Vfs (10) / G352>Vfs (10)	PKU clásica	NR	No (100%; 10)
F006.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 73)
F006.4	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 73)
F009.1	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	+	Sí (100%; 2)
F009.4	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	+	Sí (100%; 2)
F015.1	R68S (3) / R68S (3)	PKU moderada	+	Sí (100%; 2)
F018.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 73)
F023.1	D129G (4) / R408W (12)	PKU leve	SR	Sí (100%; 5)
F024.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 73)
F028.1	A300S (8) / R408W (12)	PKU clásica	SR	Sí (85,71%; 6), No (14,29%; 1)
F029.1	R158Q (5) / R408W (12)	PKU leve	NR	Sí (8,7%; 2), No (82,61%; 19), Lento (8,7%; 2)
F031.1	R408W (12) / R408W (12)	PKU clásica	NR	No (100%; 73)
F034.1	IVS10-11G>A / IVS10-11G>A	PKU leve	NR	Sí (5,68%; 5), No (87,5%; 77), Lento (6,82%; 6)
F040.1	P409L (12) / Y414C (12)	PKU leve	SR	-
F041.1	IVS2-13T>G (i2) / R158Q (5)	PKU clásica	NR	-

Tabla 25. Relación de pacientes con su genotipo y fenotipo así como respuesta a BH<sub>4</sub> y su equivalente en la base de datos BIOPKUdb con fenotipos encontrados y su respuesta a BH<sub>4</sub>. Marcados en verde, pacientes sugestivos de realizar sobrecarga de BH<sub>4</sub>. NR = No realizada, SR = Susceptible de realizar.

en el que se basa la base de datos BIOPKUdb, el alelo mutado p.A403V fue el mayormente estudiado con 56 alelos (8,9%) dentro de las mutaciones respondedoras en al menos 4 pacientes homocigotos (8 alelos), siendo el resto heterocigotos compuestos. No se especifica en el artículo el porcentaje de disminución en cada paciente.

Con dicha sobrecarga se beneficiarían un total de 7 pacientes de ambas provincias, suponiendo un 15,9% (7/44) del total de pacientes seguidos en las consultas externas de los 3 hospitales, representado un 36,8% del total de pacientes que presentan fenotipo PKU (ya sea leve, moderada o clásica) con restricción dietética de Phe y un 70% de los que presentan formas leves-moderadas. Estos porcentajes se asemejan a los presentados en trabajos previos (Blau and Erlandsen, 2004; Zurflüh et al., 2008) en los que se hace referencia a que hasta un 40% de los pacientes totales PKU pueden verse beneficiados de la terapia con cofactor.

## 6.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La bioinformática de predicción de consecuencias a nivel molecular y clínico de mutaciones está actualmente en expansión y desarrollo. Con las herramientas más utilizadas y alguna de reciente creación, se han determinado las predicciones de cada mutación por separado. Se buscó una relación entre los resultados encontrados y el fenotipo hallado en los pacientes, sobretodo con la nueva herramienta PROVEAN®, la cual emite un valor numérico que ofrece la posibilidad de realizar un ajuste estadístico entre dichos parámetros. A continuación se realiza una comparativa entre el fenotipo presente en los pacientes, y



el grado de actividad in vitro con la herramienta PROVEAN<sup>®</sup>, que se resume en la tabla 26.

Paciente	Fenotipo	Alelo materno	PROVEAN <sup>®</sup>	Act. (%)	Alelo paterno	PROVEAN <sup>®</sup>	Act. (%)
F001.1	PKU leve	p.R158Q	-3,871 / Deletérea	10	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F002.1	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R261Q	-3,745 / Deletérea	44
F002.4	PKU moderada	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R261Q	-3,745 / Deletérea	44
F003.1	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.V388M	-1,913 / Neutra	28
F004.1	PKU clásica	G352>Vfs	-14,923 / Deletérea	-	G352>Vfs	-14,923 / Deletérea	-
F005.1	HPA benigna	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F006.1	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F006.4	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F007.1	HPA benigna	p.R297C	-1,439 / Neutra	-	IVS10-11G>A	-	5
F008.1	HPA benigna	p.R261Q	-3,745 / Deletérea	44	p.R176L	5,037 / Deletérea	42
F009.1	PKU moderada	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F009.4	PKU moderada	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F010.1	HPA benigna	p.M276K	-3,730 / Deletérea	-	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F011.1	HPA benigna	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66	IVS10-11G>A	-	5
F012.1	HPA benigna	p.R261Q	-3,745 / Deletérea	44	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66
F013.1	HPA benigna	R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66
F014.1	HPA benigna	p.I164V	-0,827 / Neutra	-	IVS10-11G>A	-	5
F015.1	PKU moderada	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68
F016.1	HPA benigna	p.R297C	-1,439 / Neutra	-	p.R297C	-1,439 / Neutra	-
F017.1	HPA benigna	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66
F018.1	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F019.1	HPA benigna	R252W	-7,664 / Deletérea	0	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66
F020.1	HPA benigna	IVS10-11G>A	-	5	p.R297C	-1,439 / Neutra	-

F021.1	HPA benigna	p.R176L	5,037 / Deletérea	42	p.R261Q	-3,745 / Deletérea	44
F022.1	HPA benigna	p.R68S	-5,472 / Deletérea	68	p.R176L	5,037 / Deletérea	42
F023.1	PKU leve	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.D129G	-6,748 / Deletérea	-
F024.1	PKU clásica	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F025.1	HPA benigna	p.I65T	-4,497 / Deletérea	33	p.S87R	-1,395 / Neutra	25
F026.1	HPA benigna	p.N167I	-6,233 / Deletérea	-	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66
F027.1	HPA benigna	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66	IVS4+5G> T	-	-
F028.1	PKU clásica	p.A300S	-2,915 / Deletérea	31	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F029.1	PKU leve	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R158Q	-3,871 / Deletérea	10
F030.1	HPA benigna	p.A403V	-3,218 / Deletérea	66	IVS10- 11G>A	-	5
F031.1	PKU clásica	p.R048W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F032.1	HPA benigna	p.R176L	5,037 / Deletérea	42	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F033.1	HPA benigna	p.A300S	-2,915 / Deletérea	31	p.R243Q	-3,829 / Deletérea	14
F034.1	PKU leve	IVS10- 11G>A	-	5	IVS10- 11G>A	-	5
F035.1	HPA benigna	p.R176L	5,037 / Deletérea	42	p.V388M	-1,913 / Neutra	28
F036.1	HPA benigna	p.D129G	-6,748 / Deletérea	-	p.R158Q	-3,871 / Deletérea	10
F037.1	HPA benigna	p.A300S	-2,915 / Deletérea	31	p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2
F038.1	HPA benigna	p.P281L	-9,593 / Deletérea	2	-	-	
F039.1	HPA benigna	p.R176L	5,037 / Deletérea	42	p.R176L	5,037 / Deletérea	42
F040.1	PKU leve	p.P409L	-7,307 / Deletérea	-	p.Y414C	-8,117 / Deletérea	57
F041.1	PKU clásica	R158Q	-3,871 / Deletérea	10	IVS2- 13T>G	-	-
F0XX.1		p.R408W	- 6,834 / Deletérea	2	p.R176L	5,037 / Deletérea	42

Tabla 26. Comparativa entre mutaciones con predicción de PROVEAN, actividad enzimática y fenotipo encontrado.

Si bien las herramientas utilizadas para el análisis bioinformático ofrecen una predicción fenotípica a nivel molecular de cada mutación, en conjunto, la predicción de un fenotipo clínico es bastante inconsistente y limitado en el caso de mutaciones en el gen *PAH* y

pacientes fenilcetonúricos. Este hecho ya ha sido reflejado en últimos trabajos donde se han encontrado mutaciones no descritas y que han utilizado las herramientas bioinformáticas más actuales (Bayat et al., 2015), aunque si bien es cierto que el uso de sólo dos herramientas que analizan determinados parámetros limita la información obtenida y puede llevar a confusión, por lo que al realizar un análisis “*in silico*” se deberían tener en cuenta más opciones que aumenten la información a obtener.

Por el contrario, el acúmulo de datos obtenidos de pacientes en la bibliografía actual en las bases de datos más utilizadas y su consulta en nuevos pacientes con genotipos conocidos, parecen ofrecer una información fiable en lo que al fenotipo y predicción de respuesta a test de sobrecarga de BH<sub>4</sub> se refiere, por lo que su uso debería ser la primera aproximación a predecir el posible fenotipo en un paciente una vez conocido su genotipo.

## 6.7. PROBLEMAS ENCONTRADOS

### 6.7.1.SSCP

En el presente estudio se han realizado las técnicas de laboratorio disponibles para el análisis molecular del gen *PAH*. Si bien las recomendaciones actuales para su análisis son realización de DGGE y posterior secuenciación, se optó por SSCP como técnica de rastreo, por ser más económica que la secuenciación de todos los exones, aun sabiendo que estaba descrito un elevado porcentaje de mutaciones no detectables por SSCP en otras poblaciones. A priori, era posible que las mutaciones más frecuentes en nuestra población fuesen detectables por SSCP. No obstante, una vez conocidas las frecuencias mutacionales tras

el análisis inicial de los pacientes de la provincia de Tenerife, sólo se realizaron SSCP en el inicio del estudio de los primeros pacientes de la provincia de Las Palmas, continuando posteriormente de manera exclusiva con secuenciación por exones.

#### 6.7.2.Exón 2

El exón 2 requirió de varias pruebas con cambios en la  $T_m$  hasta su completa optimización y amplificación en PCR.

# CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

- 1) Presentamos un estudio mutacional amplio del gen *PAH* en los pacientes canarios afectados de fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia benigna.
- 2) La mutación más prevalente encontrada en población canaria es la más frecuentemente encontrada a nivel mundial (p.R408W).
- 3) Las frecuencias mutacionales de Canarias difieren de las encontradas en trabajos previos de la península ibérica, siendo las mutaciones más prevalentes p.R408W (19%), p.R68S (11,9%), p.A403V (10,7%), p.R176L (9,5%), IVS10-11G>A (8,3%). El resto de mutaciones encontradas tienen frecuencias por debajo de ese porcentaje (1,2 - 4,8%).
- 4) Canarias presenta una alta frecuencia de formas benignas, tal como se ha descrito para la zona mediterránea – sur-europea.
- 5) En la isla de La Palma viven 2 familias en el mismo pueblo con al menos 5 miembros con mismo genotipo homocigoto para la mutación p.R408W, con un posible efecto fundador en la zona.
- 6) La nueva mutación encontrada (p.P409L) abre un nuevo campo de estudio *in vitro* en su repercusión sobre la estructura y función de la PAH.
- 7) Se establece un protocolo diagnóstico molecular eficiente para nuestra comunidad mediante secuenciación directa con los exones que engloban las mutaciones más frecuentes.
- 8) Las herramientas bioinformáticas actuales para la predicción de consecuencias sobre el fenotipo molecular-clínico individual no parecen ser la opción más adecuada si se analizan sólo determinados parámetros o se utilizan pocas herramientas bioinformáticas en el

gen *PAH*.

- 9) Las bases de datos geno-fenotípicas para determinadas enfermedades genéticas ofrecen mejores predicciones en enfermedades con relación genotipo-fenotipo constantes, por lo que su mantenimiento y expansión son actualmente la mejor herramienta de predicción. Evidentemente, su fiabilidad depende de la calidad de datos depositados y la robustez de los mismos es proporcional a la frecuencia con que dichas mutaciones se encuentran.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Abramovich, L., Vaks, L., Carny, O., Trudler, D., Magno, A., Caflich, A., Frenkel, D., Gazit, E., 2012. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat. Chem. Biol.* 8, 701–6. doi:10.1038/nchembio.1002
- Adzhubei, I., Jordan, D.M., Sunyaev, S.R., 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 7, Unit7.20. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–9. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Alaei, M., Asadzadeh-Totonchi, G., Gachkar, L., Farivar, S., 2011. Family social status and dietary adherence of patients with phenylketonuria. *Iran. J. Pediatr.* 21, 379–84.
- Albrecht, J., Garbade, S.F., Burgard, P., 2009. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 414–21. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.11.001
- Aldámiz-Echevarría, L., Couce, M.L., Llarena, M., Andrade, F., 2014. A new case of maternal phenylketonuria treated with sapropterin dihydrochloride (6R-BH4). *Gynecol. Endocrinol.* 30, 691–3. doi:10.3109/09513590.2014.928688
- Antshel, K.M., Waisbren, S.E., 2003. Developmental timing of exposure to elevated levels of phenylalanine is associated with ADHD symptom expression. *J. Abnorm. Child Psychol.* 31, 565–74.
- Arai, N., Narisawa, K., Hayakawa, H., Tada, K., 1982. Hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency: diagnosis by enzyme assays on dried blood spots.

- Pediatrics 70, 426–30.
- Arnold, G.L., Kramer, B.M., Kirby, R.S., Plumeau, P.B., Blakely, E.M., Sanger Cregan, L.S., Davidson, P.W., 1998. Factors affecting cognitive, motor, behavioral and executive functioning in children with phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 87, 565–70.
- Baieli, S., Pavone, L., Meli, C., Fiumara, A., Coleman, M., 2003. Autism and phenylketonuria. *J. Autism Dev. Disord.* 33, 201–4.
- Baruteau, J., Nyabi, O., Najimi, M., Fauvart, M., Sokal, E., 2014. Adult human liver mesenchymal progenitor cells express phenylalanine hydroxylase. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 27, 863–8. doi:10.1515/jpem-2013-0425
- Bayat, A., Yasmeen, S., Lund, A., Nielsen, J.B., Møller, L.B., 2015. Mutational and phenotypical spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Denmark. *Clin. Genet.* doi:10.1111/cge.12692
- Berman, H.M., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242. doi:10.1093/nar/28.1.235
- Bickel, H., 1954. The effects of a phenylalanine-free and phenylalanine-poor diet in phenylpyruvic oligophrenia. *Exp. Med. Surg.* 12, 114–7.
- Blau, N., Bélanger-Quintana, A., Demirkol, M., Feillet, F., Giovannini, M., MacDonald, A., Trefz, F.K., Spronsen, F.J. Van, van Spronsen, F.J., 2009. Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 96, 158–63. doi:10.1016/j.ymgme.2009.01.002
- Blau, N., Erlandsen, H., 2004. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 82, 101–11. doi:10.1016/j.ymgme.2004.03.006
- Blau, N., Hennermann, J.B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U., 2011a. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria

- and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* 104, 2–9. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.017
- Blau, N., Longo, N., 2015. Alternative therapies to address the unmet medical needs of patients with phenylketonuria. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 791–800. doi:10.1517/14656566.2015.1013030
- Blau, N., MacDonald, A., van Spronsen, F., 2011b. There is no doubt that the early identification of PKU and prompt and continuous intervention prevents mental retardation in most patients. *Mol. Genet. Metab.* 104 Suppl, S1. doi:10.1016/j.ymgme.2011.10.007
- Blau, N., van Spronsen, F.J., Levy, H.L., 2010. Phenylketonuria. *Lancet* 376, 1417–27. doi:10.1016/S0140-6736(10)60961-0
- Boers, S.J.B., Visser, G., Smit, P.G.P.A., Fuchs, S.A., 2014. Liver transplantation in glycogen storage disease type I. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 47. doi:10.1186/1750-1172-9-47
- Brenton, D.P., Pietz, J., 2000. Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur. J. Pediatr.* 159 Suppl , S114–20.
- Brody, E.P., 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1, S39–46.
- Buck, P.S., 1950. *The Child Who Never Grew*, 0002 ed. Ladies Home J.
- Bueno, M.A., González-Lamuño, D., Delgado-Pecellín, C., Aldámiz-Echevarría, L., Pérez, B., Desviat, L.R., Couce, M.L., 2013. Molecular epidemiology and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria patients from South Spain. *J. Hum. Genet.* 58, 279–84. doi:10.1038/jhg.2013.16
- Burnett, J.R., 2007. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs* 10, 805–13.

- Burrage, L.C., McConnell, J., Haesler, R., O’Riordan, M.A., Sutton, V.R., Kerr, D.S., McCandless, S.E., 2012. High prevalence of overweight and obesity in females with phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 107, 43–8. doi:10.1016/j.ymgme.2012.07.006
- Campistol Plana, J., Arellano Pedrola, M., Poo Argüelles, P., Escofet Sotera, C., Pérez Olarte, P., Vilaseca Buscà, M.A., 1999. Embriopatía por fenilcetonuria materna. Una causa de retardo mental poco diagnosticada. Revisión de ocho observaciones 51, 139–142.
- Cardoso, I., Merlini, G., Saraiva, M.J., 2003. 4<sup>2</sup>-iodo-4'-deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB J.* 17, 803–9. doi:10.1096/fj.02-0764com
- Cardoso, I., Saraiva, M.J., 2006. Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. *FASEB J.* 20, 234–9. doi:10.1096/fj.05-4509com
- Chace, D.H., Sherwin, J.E., Hillman, S.L., Lorey, F., Cunningham, G.C., 1998. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin. Chem.* 44, 2405–9.
- Choi, Y., 2012. A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein, in: *Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine - BCB '12*. ACM Press, New York, New York, USA, pp. 414–417. doi:10.1145/2382936.2382989
- Choi, Y., P. Chan, A., 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31, 2745–7. doi:10.1093/bioinformatics/btv195
- Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., Chan, A.P., 2012.

- Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 7, e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688
- Cogan, J., Weinstein, J., Wang, X., Hou, Y., Martin, S., South, A.P., Woodley, D.T., Chen, M., 2014. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Ther.* 22, 1741–52. doi:10.1038/mt.2014.140
- Collins, M., Myers, R.M., 1987. Alterations in DNA helix stability due to base modifications can be evaluated using denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 198, 737–44.
- Cotugno, G., Nicolò, R., Cappelletti, S., Goffredo, B.M., Dionisi Vici, C., Di Ciommo, V., 2011. Adherence to diet and quality of life in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 100, 1144–9. doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02227.x
- Couce, M.L., Bóveda, M.D., Fernández-Marmiesse, A., Mirás, A., Pérez, B., Desviat, L.R., Fraga, J.M., 2013. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene* 521, 100–4. doi:10.1016/j.gene.2013.03.004
- Couce, M.L., Bóveda, M.D., Valerio, E., Pérez-Muñuzuri, A., Fraga, J.M., 2012. Long-term pharmacological management of phenylketonuria, including patients below the age of 4 years. *JIMD Rep.* 2, 91–6. doi:10.1007/8904\_2011\_53
- Dahri, S., Desviat, L.R., Pérez, B., Leal, F., Ugarte, M., Chabraoui, L., 2010. Mutation analysis of phenylketonuria patients from Morocco: high prevalence of mutation G352fsdelG and detection of a novel mutation p.K85X. *Clin. Biochem.* 43, 76–81. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.09.018
- Danks, D.M., Bartholomé, K., Clayton, B.E., Curtius, H., Gröbe, H., Kaufman, S., Leeming, R., Pfliederer, W., Rembold, H., Rey, F., 1978. Malignant hyperphenylalaninaemia--current status (June 1977). *J. Inherit. Metab. Dis.* 1, 49–53.

- De Luigi, A., Mariani, A., De Paola, M., Re Depaolini, A., Colombo, L., Russo, L., Rondelli, V., Brocca, P., Adler-Abramovich, L., Gazit, E., Del Favero, E., Cantù, L., Salmona, M., 2015. Doxycycline hinders phenylalanine fibril assemblies revealing a potential novel therapeutic approach in phenylketonuria. *Sci. Rep.* 5, 15902. doi:10.1038/srep15902
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C., 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67. doi:10.1093/nar/gkp215
- Desviat, L., Perez, B., Gamez, A., 1999. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur. J. ...* 386–392.
- Desviat, L.R., Pérez, B., Gámez, A., Sánchez, A., García, M.J., Martínez-Pardo, M., Marchante, C., Bóveda, D., Baldellou, A., Arena, J., Sanjurjo, P., Fernández, A., Cabello, M.L., Ugarte, M., 1999. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 386–92. doi:10.1038/sj.ejhg.5200312
- Desviat, L.R., Pérez, B., García, M.J., Martínez-Pardo, M., Baldellou, A., Arena, J., Sanjurjo, P., Campistol, J., Couce, M.L., 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.
- Desviat, L.R., Pérez, B., Ugarte, M., 2006. Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin. Chim. Acta.* 373, 164–7. doi:10.1016/j.cca.2006.05.003
- Di Campli, C., Nestola, M., Piscaglia, A.C., Santoliquido, A., Gasbarrini, G., Pola, P., Gasbarrini, A., Cell-based therapy for liver diseases. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 7, 41–4.
- Diamond, A., Prevor, M.B., Callender, G., Druin, D.P., 1997.



- Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monogr. Soc. Res. Child Dev.* 62, i–v, 1–208.
- Ding, Z., Georgiev, P., Thöny, B., 2006. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 13, 587–93. doi:10.1038/sj.gt.3302684
- DiSilvestre, D., Koch, R., Groffen, J., 1991. Different clinical manifestations of hyperphenylalaninemia in three siblings with identical phenylalanine hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 1014–6.
- Erlandsen, H., Fusetti, F., Martinez, A., Hough, E., Flatmark, T., Stevens, R.C., 1997. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat. Struct. Biol.* 4, 995–1000.
- Erlandsen, H., Stevens, R.C., 1999. The structural basis of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 68, 103–25. doi:10.1006/mgme.1999.2922
- Følling, A., 1934. Über ausscheidung von phenylbrenztraubensäure in den harn als stoffwechselanomalie in verbindung mit imbezillitat. *Physiol Chem* 169–176.
- Forloni, G., Colombo, L., Girola, L., Tagliavini, F., Salmona, M., 2001. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* 487, 404–7.
- Fregel, R., Pestano, J., Arnay, M., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., González, A.M., 2009. The maternal aborigine colonization of La Palma (Canary Islands). *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 1314–24. doi:10.1038/ejhg.2009.46
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Cha, S.H., Endou, H., Kanai, Y., 2000. Identification

and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.* 275, 9690–8.

- Fukushima, T., Nixon, J.C., 1980. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem.* 102, 176–88.
- Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., Stevens, R.C., 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* 273, 16962–7.
- Gámez, A., Sarkissian, C.N., Wang, L., Kim, W., Straub, M., Patch, M.G., Chen, L., Striepeke, S., Fitzpatrick, P., Lemontt, J.F., O'Neill, C., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2005. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol. Ther.* 11, 986–9.  
doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.013
- Gámez, A., Wang, L., Sarkissian, C.N., Wendt, D., Fitzpatrick, P., Lemontt, J.F., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2007. Structure-based epitope and PEGylation sites mapping of phenylalanine ammonia-lyase for enzyme substitution treatment of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 91, 325–34.  
doi:10.1016/j.ymgme.2007.04.015
- Giannattasio, S., Dianzani, I., Lattanzio, P., Spada, M., Romano, V., Calì, F., Andria, G., Ponzzone, a, Marra, E., Piazza, a, 2001. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. *Hum. Hered.* 52, 154–9.  
doi:53371
- Giorgetti, S., Raimondi, S., Pagano, K., Relini, A., Bucciantini, M., Corazza, A., Fogolari, F., Codutti, L., Salmona, M., Mangione, P., Colombo, L., De Luigi, A., Porcari, R., Gliozzi, A., Stefani, M., Esposito, G., Bellotti, V., Stoppini, M., 2011. Effect of

- tetracyclines on the dynamics of formation and destructureation of beta2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* 286, 2121–31. doi:10.1074/jbc.M110.178376
- Grantham, R., 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862–4.
- Groselj, U., Tansek, M.Z., Kovac, J., Hovnik, T., Podkrajsek, K.T., Battelino, T., 2012. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Genet. Metab.* 106, 142–8. doi:10.1016/j.ymgme.2012.03.015
- Gross, P.T., Berlow, S., Schuett, V.E., Fariello, R.G., 1981. EEG in phenylketonuria. Attempt to establish clinical importance of EEG changes. *Arch. Neurol.* 38, 122–6.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–23. doi:10.1002/elps.1150181505
- Guida, M., Pesaresi, I., Fabbri, S., Sartucci, F., Cosottini, M., Giorgi, F.S., 2014. Epilepsy and phenylketonuria: a case description and EEG-fMRI findings. *Funct. Neurol.* 29, 75–9.
- Guldberg, P., Henriksen, K.F., Güttler, F., 1993a. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 17, 141–6. doi:10.1006/geno.1993.1295
- Guldberg, P., Henriksen, K.F., Mammen, K.C., Levy, H.L., Güttler, F., 1997. Large deletions in the phenylalanine hydroxylase gene as a cause of phenylketonuria in India. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 845–6.
- Guldberg, P., Levy, H.L., Koch, R., Berlin, C.M., Francois, B., Henriksen, K.F., Güttler, F., 1994. Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency. Inheritance and expression of the

- hyperphenylalaninaemias. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17, 645–51.
- Guldberg, P., Romano, V., Ceratto, N., Bosco, P., Ciuna, M., Indelicato, A., Mollica, F., Meli, C., Giovannini, M., Riva, E., 1993b. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1703–7.
- Guldberg, P., Zschocke, J., Romano, V., Franc, B., Michiels, L., Ullrich, K., Hoffmann, G.F., Burgard, P., Schmidt, H., Meli, C., Riva, E., Dianzani, I., Ponzzone, A., Rey, J., Gu, F., 1998. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 71–79.
- Guthrie, R., Susi, A., 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32, 338–43.
- Hamman, K., Clark, H., Montini, E., Al-Dhalimy, M., Grompe, M., Finegold, M., Harding, C.O., 2005. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol. Ther.* 12, 337–44. doi:10.1016/j.ymthe.2005.03.025
- Hamman, K.J., Winn, S.R., Harding, C.O., 2011. Hepatocytes from wild-type or heterozygous donors are equally effective in achieving successful therapeutic liver repopulation in murine phenylketonuria (PKU). *Mol. Genet. Metab.* 104, 235–240. doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.027
- Hansen, K.E., Ney, D., 2014. A systematic review of bone mineral density and fractures in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 875–80. doi:10.1007/s10545-014-9735-2
- Harding, C., 2008. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clin. Genet.* 74, 97–104. doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01027.x

- Harding, C.O., 2010. New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride. *Biologics* 4, 231–6.
- Harding, C.O., Gibson, K.M., 2010. Therapeutic liver repopulation for phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 681–7. doi:10.1007/s10545-010-9099-1
- Hassel, C., Brunsting, L., 1959. Phenylpyruvic oligophrenia; an evaluation of the light-sensitive and pigmentary characteristics of seventeen patients. *AMA. Arch. Derm.* 79, 458–65.
- Hennermann, J.B., Roloff, S., Gellermann, J., Vollmer, I., Windt, E., Vetter, B., Plöckinger, U., Mönch, E., Querfeld, U., 2013. Chronic kidney disease in adolescent and adult patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 747–56. doi:10.1007/s10545-012-9548-0
- Howard, M.T., Anderson, C.B., Fass, U., Khatri, S., Gesteland, R.F., Atkins, J.F., Flanigan, K.M., 2004. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann. Neurol.* 55, 422–6. doi:10.1002/ana.20052
- Huijbregts, S.C.J., de Sonnevile, L.M.J., Licht, R., van Spronsen, F.J., Verkerk, P.H., Sergeant, J.A., 2002. Sustained attention and inhibition of cognitive interference in treated phenylketonuria: associations with concurrent and lifetime phenylalanine concentrations. *Neuropsychologia* 40, 7–15.
- Jervis, G., 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82, 514–5.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K. i, Uchino, H., Takeda, E., Endou, H., 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629–32.
- Kang, T.S., Wang, L., Sarkissian, C.N., Gámez, A., Scriver, C.R.,

- Stevens, R.C., 2010. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: Phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 99, 4–9.  
doi:10.1016/j.ymgme.2009.09.002
- Kanufre, V.C., Soares, R.D.L., Alves, M.R.A., Aguiar, M.J.B., Starling, A.L.P., Norton, R.C., 2015. Metabolic syndrome in children and adolescents with phenylketonuria. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. 91, 98–103.  
doi:10.1016/j.jpmed.2014.06.006
- Kaufman, S., 1963. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50, 1085–93.
- Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P.J., Byck, S., Nowacki, P., Scriver, C.R., 1997. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1309–17.  
doi:10.1086/301638
- Keogh, J.B., Clifton, P., 2008. The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1602–5.
- Koch, R., 2008. Maternal phenylketonuria and tetrahydrobiopterin. *Pediatrics* 122, 1367–8. doi:10.1542/peds.2008-2783
- Koch, R., Moseley, K., Guttler, F., 2005. Tetrahydrobiopterin and maternal PKU. *Mol. Genet. Metab.* 86 Suppl 1, S139–41.  
doi:10.1016/j.ymgme.2005.09.004
- Koch, R., Moseley, K.D., Yano, S., Nelson, M., Moats, R.A., 2003. Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol. Genet. Metab.* 79, 110–3.
- Konecki, D.S., Wang, Y., Trefz, F.K., Lichter-Konecki, U., Woo, S.L., 1992. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 31, 8363–8.
- Krieger, E., Vriend, G., 2014. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics*

- 30, 2981–2. doi:10.1093/bioinformatics/btu426
- Kumar, M.D.S., Bava, K.A., Gromiha, M.M., Prabakaran, P., Kitajima, K., Uedaira, H., Sarai, A., 2006. ProTherm and ProNIT: thermodynamic databases for proteins and protein-nucleic acid interactions. *Nucleic Acids Res.* 34, D204–6.  
doi:10.1093/nar/gkj103
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–81.  
doi:10.1038/nprot.2009.86
- Kure, S., Hou, D.C., 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, 375–8.
- Kwok, S.C., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Robson, K.J., Woo, S.L., 1985. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24, 556–61.
- Leandro, J., Simonsen, N., Saraste, J., Leandro, P., Flatmark, T., 2011. Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 106–20.  
doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.015
- Lenke, R.R., Levy, H.L., 1980. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 303, 1202–8. doi:10.1056/NEJM198011203032104
- Leone, P., Shera, D., McPhee, S.W.J., Francis, J.S., Kolodny, E.H., Bilaniuk, L.T., Wang, D.-J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H.W., Freese, A., Young, D., During, M.J., Samulski, R.J., Janson, C.G., 2012. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci. Transl. Med.* 4, 165ra163.

doi:10.1126/scitranslmed.3003454

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, 115–25. doi:10.1023/B:BOLI.0000028781.94251.1f

Lichter-Konecki, U., Hipke, C.M., Konecki, D.S., 1999. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol. Genet. Metab.* 67, 308–16. doi:10.1006/mgme.1999.2880

Longo, N., Arnold, G.L., Pridjian, G., Enns, G.M., Ficicioglu, C., Parker, S., Cohen-Pfeffer, J.L., 2015. Long-term safety and efficacy of sapropterin: The PKUDOS registry experience. *Mol. Genet. Metab.* 114, 557–563. doi:10.1016/j.ymgme.2015.02.003

Longo, N., Harding, C.O., Burton, B.K., Grange, D.K., Vockley, J., Wasserstein, M., Rice, G.M., Dorenbaum, A., Neuenburg, J.K., Musson, D.G., Gu, Z., Sile, S., 2014. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 384, 37–44. doi:10.1016/S0140-6736(13)61841-3

Maca-Meyer, N., Arnay, M., Rando, J.C., Flores, C., González, A.M., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., 2004. Ancient mtDNA analysis and the origin of the Guanches. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 155–62. doi:10.1038/sj.ejhg.5201075

MacDonald, A., Lilburn, M., Cochrane, B., Davies, P., Daly, A., Asplin, D., Hall, S.K., 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, 127–35. doi:10.1023/B:BOLI.0000028784.11080.9b

MacDonald, A., van Rijn, M., Feillet, F., Lund, A.M., Bernstein, L., Bosch, A.M., Gizewska, M., van Spronsen, F.J., 2012. Adherence



- issues in inherited metabolic disorders treated by low natural protein diets. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 289–95.  
doi:10.1159/000342256
- Maillot, F., Cook, P., Lilburn, M., Lee, P.J., 2007. A practical approach to maternal phenylketonuria management. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 198–201. doi:10.1007/s10545-007-0436-y
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Mendell, J.R., 2010. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 3, 379–89.  
doi:10.1177/1756285610388693
- Mallolas, J., Vilaseca, M.A., Campistol, J., Lambruschini, N., Cambra, F.J., Estivill, X., Milà, M., 1999. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. *Hum. Genet.* 105, 468–73.
- Matalon, R., Michals-Matalon, K., Bhatia, G., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Braga, C., Fiori, L., Giovannini, M., Grechanina, E., Novikov, P., Grady, J., Tyring, S.K., Guttler, F., 2007. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 153–8. doi:10.1007/s10545-007-0556-4
- Matalon, R., Michals-Matalon, K., Bhatia, G., Grechanina, E., Novikov, P., McDonald, J.D., Grady, J., Tyring, S.K., Guttler, F., 2006. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 732–8.  
doi:10.1007/s10545-006-0395-8
- Matalon, R., Surendran, S., Matalon, K.M., Tyring, S., Quast, M., Jinga, W., Ezell, E., Szucs, S., 2003. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. *Pediatrics* 112, 1570–4.
- Mathe, E., Olivier, M., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., Tavtigian, S.

- V, 2006. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res.* 34, 1317–25. doi:10.1093/nar/gkj518
- Millet, P., Vilaseca, M.A., Valls, C., Pérez-Dueñas, B., Artuch, R., Gómez, L., Lambruschini, N., Campistol, J., 2005. Is deoxyypyridinoline a good resorption marker to detect osteopenia in phenylketonuria? *Clin. Biochem.* 38, 1127–32. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.09.002
- Mitchell, J.J., Trakadis, Y.J., Scriver, C.R., 2011. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet. Med.* 13, 697–707. doi:10.1097/GIM.0b013e3182141b48
- Moreno Villares, J.M., Oliveros Leal, L., 2006. Recambio mineral óseo y densitometría ósea en pacientes sometidos a dieta de riesgo: hiperfenilalaninemia y galactosemia. *An. Pediatría* 64, 284. doi:10.1157/13085520
- Moyle, J.J., Fox, A.M., Arthur, M., Bynevelt, M., Burnett, J.R., 2007. Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol. Rev.* 17, 91–101. doi:10.1007/s11065-007-9021-2
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155, 501–27.
- National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000., 2001. . *Pediatrics* 108, 972–82.
- Ney, D.M., 2013. Does the PKU diet contribute to impaired renal function? *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 903–4. doi:10.1007/s10545-013-9615-1
- Ney, D.M., Gleason, S.T., van Calcar, S.C., MacLeod, E.L., Nelson, K.L., Etzel, M.R., Rice, G.M., Wolff, J.A., 2009. Nutritional

- management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 32–9. doi:10.1007/s10545-008-0952-4
- Ney, D.M., Hull, A.K., van Calcar, S.C., Liu, X., Etzel, M.R., 2008. Dietary glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria. *J. Nutr.* 138, 316–22.
- Ng, P.C., Henikoff, S., 2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31, 3812–4.
- Okano, Y., Chow, I.Z., Isshiki, G., Inoue, A., Oura, T., 1986. Effects of phenylalanine loading on protein synthesis in the fetal heart and brain of rat: an experimental approach to maternal phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 9, 15–24.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2766–70.
- Ozalp, I., Coşkun, T., Tokatlı, A., Kalkanoğlu, H.S., Dursun, A., Tokol, S., Köksal, G., Özgüç, M., Köse, R., 2001. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk. J. Pediatr.* 43, 97–101.
- Özgüç, M., Özalp, I., Coşkun, T., Yılmaz, E., Erdem, H., Ayter, S., 1993. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J. Med. Genet.* 30, 129–30.
- Penrose, B.Y.L., Quastel, J.H., Lionel, P., Hirsch, Q.J., 1937. Metabolic studies in phenylketonuria 266–274.
- Pérez, B., Desviat, L.R., De Lucca, M., Ugarte, M., 1994. Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. *Acta Paediatr. Suppl.* 407, 34–6.
- Pérez, B., Desviat, L.R., Die, M., Ugarte, M., 1992. Mutation analysis of phenylketonuria in Spain: prevalence of two Mediterranean mutations. *Hum. Genet.* 89, 341–2.

- Pérez, B., Desviat, L.R., 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, 95–102.
- Pérez-Dueñas, B., Cambra, F.J., Vilaseca, M.A., Lambruschini, N., Campistol, J., Camacho, J.A., 2002. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr.* 91, 899–904.
- Pérez-Dueñas, B., Vilaseca, M.A., Mas, A., Lambruschini, N., Artuch, R., Gómez, L., Pineda, J., Gutiérrez, A., Mila, M., Campistol, J., 2004. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 37, 1083–90.  
doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.09.005
- Pietz, J., Fätkenheuer, B., Burgard, P., Armbruster, M., Esser, G., Schmidt, H., 1997. Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Pediatrics* 99, 345–50.
- Pietz, J., Kreis, R., Rupp, A., Mayatepek, E., Rating, D., Boesch, C., Bremer, H.J., 1999. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* 103, 1169–78.  
doi:10.1172/JCI5017
- Pires, D.E. V, Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2014. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* 30, 335–42. doi:10.1093/bioinformatics/btt691
- Ponzone, 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, 561–9. doi:10.1097/MPG.0b013e31815eead6
- Puppi, J., Tan, N., Mitry, R.R., Hughes, R.D., Lehec, S., Mieli-Vergani, G., Karani, J., Champion, M.P., Heaton, N., Mohamed, R., Dhawan, A., 2008. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am. J. Transplant* 8, 452–7.

doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02058.x

- Rando, J.C., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., Hernández, M., González, A.M., Pinto, F., Bandelt, H.J., 1999. Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann. Hum. Genet.* 63, 413–28.
- Raper, S.E., Wilson, J.M., 1993. Cell transplantation in liver-directed gene therapy. *Cell Transplant.* 2, 381–400; discussion 407–10.
- Rebuffat, A., Harding, C.O., Ding, Z., Thöny, B., 2010. Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Hum. Gene Ther.* 21, 463–77.  
doi:10.1089/hum.2009.127
- Rivera, I., Mendes, D., Afonso, Â., Barroso, M., Ramos, R., Janeiro, P., Oliveira, A., Gaspar, A., Tavares de Almeida, I., 2011. Phenylalanine hydroxylase deficiency: Molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol. Genet. Metab.* 104, S86–S92.  
doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.026
- Rocha, J.C., MacDonald, A., Trefz, F., 2013. Is overweight an issue in phenylketonuria? *Mol. Genet. Metab.* 110 Suppl, S18–24.  
doi:10.1016/j.ymgme.2013.08.012
- Rocha, J.C., van Spronsen, F.J., Almeida, M.F., Soares, G., Quelhas, D., Ramos, E., Guimarães, J.T., Borges, N., 2012. Dietary treatment in phenylketonuria does not lead to increased risk of obesity or metabolic syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 107, 659–63.  
doi:10.1016/j.ymgme.2012.10.006
- Rollins, G., 2001. Life-long adherence to diet recommended for PKU patients. *Rep. Med. Guidel. Outcomes Res.* 12, 9–10, 12.
- Romano, V., Guldberg, P., Güttler, F., Meli, C., Mollica, F., Pavone, L., Giovannini, M., Riva, E., Biasucci, G., Luotti, D., Palillo, L., Calí, F., Ceratto, N., Anello, G., Bosco, P., 1996. PAH deficiency

- in Italy: correlation of genotype with phenotype in the Sicilian population. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19, 15–24.
- Sanjurjo, P., Aldamiz, L., Georgi, G., Jelinek, J., Ruiz, J.I., Boehm, G., 2003. Dietary threonine reduces plasma phenylalanine levels in patients with hyperphenylalaninemia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 36, 23–6.
- Santana da Silva, L.C., Carvalho, T.S., da Silva, F.B., Morari, L., Fachel, A.A., Pires, R., Refosco, L.F., Desnick, R.J., Giugliani, R., Saraiva Pereira, M.L., 2003. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol. Genet. Metab.* 79, 17–24.
- Santos, L.L. dos, Magalhães, M. de C., Reis, A. de O., Starling, A.L.P., Januário, J.N., Fonseca, C.G. da, Aguiar, M.J.B. de, Carvalho, M.R.S., 2006. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 5, 16–23.
- Sarkissian, C.N., Kang, T.S., Gámez, A., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2011. Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 104, 249–54.  
doi:10.1016/j.ymgme.2011.06.016
- Schoonheydt, W.E., Clarke, J.T., Hanley, W.B., Johnson, J.M., Lehotay, D.C., 1994. Feto-maternal plasma phenylalanine concentration gradient from 19 weeks gestation to term. *Clin. Chim. Acta.* 225, 165–9.
- Schuck, P.F., Malgarin, F., Cararo, J.H., Cardoso, F., Streck, E.L., Ferreira, G.C., 2015. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging Dis.* 6, 390–9.  
doi:10.14336/AD.2015.0827
- Scriver, C., 2007. The PAH Gene , Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Hum. Mutat.* 28. doi:10.1002/humu

- Scriver, C., Kaufman, S., 2001. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. *Metab. Mol. Bases Inherit. Dis.* 1667–1724. doi:10.1036/ommbid.97
- Scriver, C., Waters, P., 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* 15.
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y., 1999. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274, 19745–51.
- Sellner, L.N., Taylor, G.R., 2004. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum. Mutat.* 23, 413–9. doi:10.1002/humu.20035
- Shaham-Niv, S., Adler-Abramovich, L., Schnaider, L., Gazit, E., 2015. Extension of the generic amyloid hypothesis to nonproteinaceous metabolite assemblies. *Sci. Adv.* 1, e1500137–e1500137. doi:10.1126/sciadv.1500137
- Sharman, R., Mulgrew, K., Katsikitis, M., 2013. Qualitative analysis of factors affecting adherence to the phenylketonuria diet in adolescents. *Clin. Nurse Spec.* 27, 205–10. doi:10.1097/NUR.0b013e31829555d5
- Shedlovsky, A., McDonald, J.D., Symula, D., Dove, W.F., 1993. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics* 134, 1205–10.
- Singh, V., Rai, R.K., Arora, A., Sinha, N., Thakur, A.K., 2014. Therapeutic implication of L-phenylalanine aggregation mechanism and its modulation by D-phenylalanine in phenylketonuria. *Sci. Rep.* 4, 3875. doi:10.1038/srep03875
- Smith, I., Beasley, M.G., Ades, A.E., 1990. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* 65, 472–8.
- Spaapen, L.J.M., Rubio-Gozalbo, M.E., 2003. Tetrahydrobiopterin-

- responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol. Genet. Metab.* 78, 93–9.
- Stéphenne, X., Debray, F.G., Smets, F., Jazouli, N., Sana, G., Tondreau, T., Menten, R., Goffette, P., Boemer, F., Schoos, R., Gersting, S.W., Najimi, M., Muntau, A.C., Goyens, P., Sokal, E.M., 2012. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrabiopterin nonresponsive phenylketonuria. *Cell Transplant.* 21, 2765–70. doi:10.3727/096368912X653255
- Sterl, E., Paul, K., Paschke, E., Zschocke, J., Brunner-Krainz, M., Windisch, E., Konstantopoulou, V., Möslinger, D., Karall, D., Scholl-Bürgi, S., Sperl, W., Lagler, F., Plecko, B., 2013. Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 7–13. doi:10.1007/s10545-012-9485-y
- Stojiljković-Petrović, M., Klaassen, K., Pavlović, S., 2014. Molecular Characteristics, Phenotypic Diversity and Genotype-Estimated Therapeutic Responsiveness of Serbian Patients with Phenylketonuria / MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE, FENOTIPSKA RAZNOLIKOST I PROCENA ODGOVORA NA TERAPIJU ZASNOVANA NA GENOTIPU KOD SRPSKI. *J. Med. Biochem.* 33, 97–107. doi:10.2478/jomb-2013-0031
- Strisciuglio, P., Concolino, D., 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites* 4, 1007–17. doi:10.3390/metabo4041007
- Svensson, E., Wang, Y., Eisensmith, R.C., Hagenfeldt, L., Woo, S.L., 1993. Three polymorphisms but no disease-causing mutations in the proximal part of the promoter of the phenylalanine hydroxylase gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 306–13.
- Tavtigian, S. V, Deffenbaugh, A.M., Yin, L., Judkins, T., Scholl, T.,



- Samollow, P.B., de Silva, D., Zharkikh, A., Thomas, A., 2006. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J. Med. Genet.* 43, 295–305. doi:10.1136/jmg.2005.033878
- Ten Hoedt, A.E., Hollak, C.E., Boelen, C.C., van der Herberg-van de Wetering, N.A.P., Ter Horst, N.M., Jonkers, C.F., Wijburg, F.A., Bosch, A.M., 2011. “MY PKU”: increasing self-management in patients with phenylketonuria. A randomized controlled trial. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 48. doi:10.1186/1750-1172-6-48
- Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Kalogerakou, M., Soulpi, K., Missiou-Tsangaraki, S., Kattamis, C., 1994. Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Hum. Genet.* 94, 573–5.
- Trefz, F.K., Muntau, A.C., Lagler, F.B., Moreau, F., Alm, J., Burlina, A., Rutsch, F., Bélanger-Quintana, A., Feillet, F., 2015. The Kuvan(®) Adult Maternal Paediatric European Registry (KAMPER) Multinational Observational Study: Baseline and 1-Year Data in Phenylketonuria Patients Responsive to Sapropterin. *JIMD Rep.* 23, 35–43. doi:10.1007/8904\_2015\_425
- Trefz, F.K., Scheible, D., Götz, H., Frauendienst-Egger, G., 2009. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 22–6. doi:10.1007/s10545-008-0940-8
- Trunzo, R., Santacroce, R., D’Andrea, G., Longo, V., De Girolamo, G., Dimatteo, C., Leccese, A., Lillo, V., Papadia, F., Margaglione, M., 2013. Mutation analysis in hyperphenylalaninemia patients from South Italy. *Clin. Biochem.* 46, 1896–8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.06.009
- Vajro, P., Strisciuglio, P., Houssin, D., Huault, G., Laurent, J., Alvarez, F., Bernard, O., 1993. Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 329,

363. doi:10.1056/NEJM199307293290517

- van Calcar, S.C., MacLeod, E.L., Gleason, S.T., Etzel, M.R., Clayton, M.K., Wolff, J.A., Ney, D.M., 2009. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1068–77. doi:10.3945/ajcn.2008.27280
- van Spronsen, F.J., de Groot, M.J., Hoeksma, M., Reijngoud, D.-J., van Rijn, M., 2010. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 671–6. doi:10.1007/s10545-010-9216-1
- VanZutphen, K.H., Packman, W., Sporri, L., Needham, M.C., Morgan, C., Weisiger, K., Packman, S., 2007. Executive functioning in children and adolescents with phenylketonuria. *Clin. Genet.* 72, 13–8. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00816.x
- Vockley, J., Andersson, H.C., Antshel, K.M., Braverman, N.E., Burton, B.K., Frazier, D.M., Mitchell, J., Smith, W.E., Thompson, B.H., Berry, S.A., 2014. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet. Med.* 16, 188–200. doi:10.1038/gim.2013.157
- Vogel, K.R., Arning, E., Wasek, B.L., Bottiglieri, T., Gibson, K.M., 2013. Non-physiological amino acid (NPAA) therapy targeting brain phenylalanine reduction: pilot studies in PAHENU2 mice. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 513–23. doi:10.1007/s10545-012-9524-8
- Waisbren, S., White, D. a, 2010. Screening for cognitive and social-emotional problems in individuals with PKU: tools for use in the metabolic clinic. *Mol. Genet. Metab.* 99 Suppl 1, S96–9. doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.006
- Waisbren, S.E., Levy, H.L., 1991. Agoraphobia in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 14, 755–64.
- Waisbren, S.E., Zaff, J., 1994. Personality disorder in young women

- with treated phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17, 584–92.
- Wang, L., Gamez, A., Archer, H., Abola, E.E., Sarkissian, C.N., Fitzpatrick, P., Wendt, D., Zhang, Y., Vellard, M., Bliesath, J., Bell, S.M., Lemontt, J.F., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2008. Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase. *J. Mol. Biol.* 380, 623–35. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.025
- Wang, L., Gamez, A., Sarkissian, C.N., Straub, M., Patch, M.G., Han, G.W., Striepeke, S., Fitzpatrick, P., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2005. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 86, 134–40. doi:10.1016/j.ymgme.2005.05.012
- Waters, P.J., Parniak, M.A., Nowacki, P., Scriver, C.R., 1998. In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum. Mutat.* 11, 4–17. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:1<4::AID-HUMU2>3.0.CO;2-L
- Weglage, J., Fünders, B., Wilken, B., Schubert, D., Schmidt, E., Burgard, P., Ullrich, K., 1992. Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 151, 522–5.
- White, D. a, Connor, L.T., Nardos, B., Shimony, J.S., Archer, R., Snyder, A.Z., Moinuddin, A., Grange, D.K., Steiner, R.D., McKinstry, R.C., 2010. Age-related decline in the microstructural integrity of white matter in children with early- and continuously-treated PKU: a DTI study of the corpus callosum. *Mol. Genet. Metab.* 99 Suppl 1, S41–6. doi:10.1016/j.ymgme.2009.09.016
- Williams, R.A., Mamotte, C.D.S., Burnett, J.R., 2008. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin. Biochem. Rev.* 29, 31–41.
- Yano, S., Moseley, K., Azen, C., 2013. Large neutral amino acid supplementation increases melatonin synthesis in phenylketonuria: a new biomarker. *J. Pediatr.* 162, 999–1003.

doi:10.1016/j.jpeds.2012.10.015

- Yu, W., He, J., Yang, X., Zou, H., Gui, J., Wang, R., Yang, L., Wang, Z., Lei, Q., 2014. Characterization of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria in Xinjiang of China. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 4406–12.
- Zschocke, J., 2003. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum. Mutat.* 21, 345–56. doi:10.1002/humu.10192
- Zschocke, J., Graham, C. a, Carson, D.J., Nevin, N.C., 1995. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1311–7.
- Zschocke, J., Mallory, J.P., Eiken, H.G., Nevin, N.C., 1997. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum. Genet.* 100, 189–94.
- Zurflüh, M., Zschocke, J., Lindner, M., 2008. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum. ...* 29, 167–175. doi:10.1002/humu

# ANEXOS



# ANEXO 1



El estudio de investigación titulado: "**Hiperfenilalaninemias en Canarias**" del que es Investigador Principal el Dr. Eduardo Salido Ruiz , ha sido evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Canarias en su sesión del 28 de Octubre de 2010 y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Protocolo con los objetivos del estudio.

La capacidad del Investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por todo ello, el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Canarias autoriza la realización de éste estudio.

La Laguna, 03 de Noviembre de 2010

Firmado:

Dra. Consuelo María Rodríguez Jiménez  
Secretaria del Comité de Ética e Investigación  
Clínica del HUC















