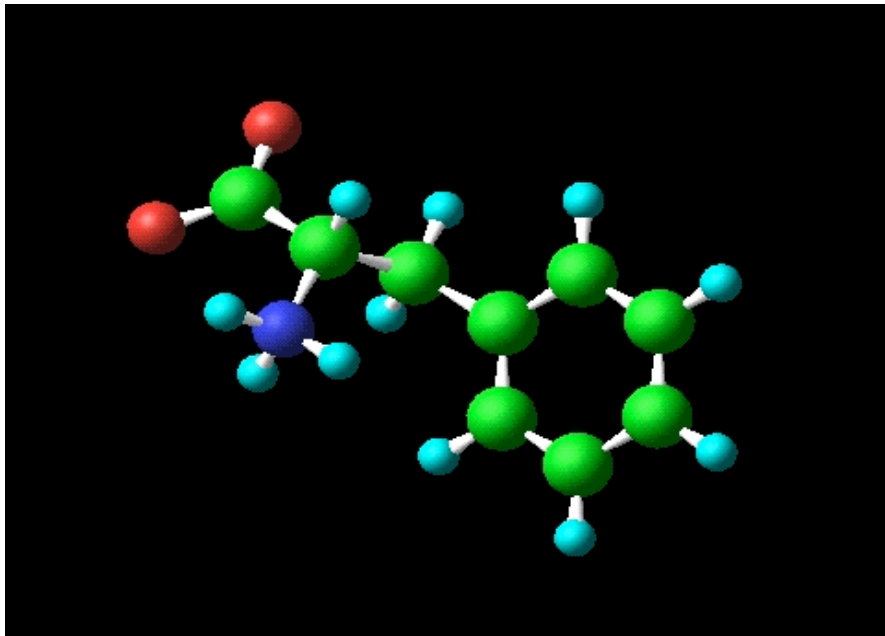


**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO,
MINERALIZACIÓN ÓSEA Y GENÉTICA EN
PACIENTES CON FENILCETONURIA**



Alicia Mirás Veiga

Departamento de Pediatría

Universidad de Santiago de Compostela

2013



Departamento de Pediatría

Universidad de Santiago de Compostela

TESIS DOCTORAL:

**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO, MINERALIZACIÓN ÓSEA Y
GENÉTICA EN PACIENTES CON FENILCETONURIA**

Dña. Alicia Mirás Veiga

DIRECTORES:

Prof. Dr. M^a Luz Couce Pico

Profesor Asociado de Pediatría

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. José María Fraga Bermúdez

Catedrático de Pediatría

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

2013

Departamento de Pediatría

Universidad de Santiago de Compostela



**MARÍA LUZ COUCE PICO Y JOSÉ MARÍA FRAGA BERMÚDEZ,
PROFESOR ASOCIADO Y CATEDRÁTICO DE PEDIATRÍA
RESPECTIVAMENTE DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.**

CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada: "ESTUDIO DEL CRECIMIENTO, MINERALIZACIÓN ÓSEA Y GENÉTICA EN PACIENTES CON FENILCETONURIA", ha sido elaborada por **Dña. ALICIA MIRÁS VEIGA** bajo la dirección de los abajo firmantes. Así mismo, dicha tesis reúne todos los requisitos pertinentes para su presentación y lectura, a fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos el presente en Santiago a siete de noviembre de dos mil trece.

Prof^a María Luz Couce Pico

Prof José María Fraga Bermúdez



Dña. ALICIA MIRÁS VEIGA CON D.N.I. 44816406-D, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela.

DECLARA:

Ser la autora de la presente tesis titulada "ESTUDIO DEL CRECIMIENTO, MINERALIZACIÓN ÓSEA Y GENÉTICA EN PACIENTES CON FENILCETONURIA", dirigida por los Dres. Dña. María Luz Couce Pico y D. José María Fraga Bermúdez y que es presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmo el presente en Santiago a siete de noviembre de dos mil trece.

Alicia Mirás Veiga

AGRADECIMIENTOS

Me vienen a la memoria infinidad de anécdotas y recuerdos al escribir estas líneas. Durante estos últimos años al tiempo que este proyecto iba madurando y tomando forma, lo iba haciendo mi vida, que ha cambiado en muchos aspectos. De las diferentes etapas vividas, desde la revisión bibliográfica, la recogida de datos, el análisis estadístico, la escritura de la tesis, hasta las correcciones finales, he podido aprender infinidad de cosas, por lo que sé que todo el esfuerzo ha valido la pena.

Para empezar quisiera agradecer especialmente a los directores de esta tesis, la Dra Couce y el Dr Fraga, sus sabios consejos y su predisposición permanente a escucharme, ayudarme con las dudas y realizar las correcciones. A Mari Luz nunca le podré estar lo suficientemente agradecida por los buenos consejos, por estar siempre pendiente de mis progresos y sobre todo por los ánimos que constantemente he recibido por su parte, que han sido un refuerzo positivo muy importante para mí.

Al Laboratorio Central (Javier Rodríguez y Antonio Freire) y al Laboratorio de Metabolopatías (M Dolores Bóveda, Daisy Castiñeiras, Jose A. Cocho, Cristóbal Colón, José R Alonso, Javier A Iglesias) por todas las facilidades que me brindaron tanto para el análisis de las muestras, como en la obtención de datos y en la resolución de dudas.

A la Dra Leis y a su equipo, por su amabilidad y ayuda tanto con las densitometrías de los niños, así como con la obtención de muestras para el grupo control. Al Dr Mera por facilitarnos la realización e interpretación de las densitometrías a los pacientes adultos.

Al Servicio de Bioestadística del CHUS, especialmente al Dr Gude y a Ipek Guler, por su aportación en la estadística, así como por su amabilidad y disponibilidad; gracias Ipek por ser tan paciente.

A mis antiguos compañeros de Pediatría del CHUS, de los que guardo un recuerdo entrañable y la esperanza de algún día volver a reencontrarnos trabajando. Y a mis actuales compañeros de Pediatría del HUBU, muy especialmente a Pablo, Esteban, María, Isa, Fer y Sara; por su compañerismo y el buen ambiente que generan en la unidad, lo que me ha permitido ir a trabajar todos los días con ilusión. Al personal de Enfermería de la UCI pediátrica de Burgos, esa gran familia que me ha acompañado en las interminables guardias en las que aprovechaba los momentos muertos para escribir este trabajo. A mi actual jefe, el Dr de la Mata, por la confianza depositada en mí.

Por último, lo más importante, mis padres, que me han dado todas las facilidades para poderme desarrollar personal y profesionalmente; y a mis seres queridos, que con su cariño le dan sentido a mi vida: Sole, Cris, Ángel, Mario, Teo, Elena, Laura, Belén, Nati, Merce, Sara y Sergio.

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca	Calcio
Ca/Cr	Calcio/Creatinina
CEDEM	Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares
CI	Coeficiente intelectual
CMO	Contenido mineral óseo
CTX	Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1
DE	Desviación Estándar
Del	Delección
DEXA	Absorcitometría de doble haz de rayos x o densitometría
DGGE	Gel de gradiente de desnaturalización
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHPR	Dihidropterina reductasa
DMO	Densidad mineral ósea
D-Pir	Deoxipiridinolina
EMO	Enfermedad metabólica ósea
EPA	Ácido eicosahexaenoico
FA	Fosfatasa alcalina
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
GMP	Glicomacropéptido
GPAQ	Cuestionario de actividad física global
GTP-CH	Guanosin-trifosfato-ciclohidrolasa
5HIA	Ácido 5-hidroxiindolacético

His	Histidina
HMV	Ácido homovanílico
HPA	Hiperfenilalaninemia
IMC	Índice de masa corporal
LCPUFA^s	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
LCR	Líquido ceforraquídeo
LNAA	Aminoácidos neutros de cadena larga
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
Met	Metionina
MRO	Marcadores de remodelado óseo
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
NTX	Telopéptido aminoterminal del colágeno tipo 1
OC	Osteocalcina
1-25(OH)2D	1-25 dihidroxivitamina D o calcitriol
25(OH)D	25 hidroxí-vitamina D
OH-P	Hidroxiprolina
P	Fósforo
PAH	Fenilalanina hidroxilasa
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PC	Perímetro de cráneo
PCD	Pterina-4 acarbinolamina dehidratasa
PEG-PAL	Fenilalanina amonio liasa pegilada
Phe	Fenilalanina
Pir	Piridinolina
PKU	Fenilcetonuria
PNP-1	Propéptido N-terminal del colágeno tipo 1
PTH	Hormona paratiroidea

PTPS	6 piruvoil-tetrahidro-biopterina-sintetasa
Q-TC	Tomografía computerizada cuantitativa
QUS	Ultrasonografía cuantitativa
RDA	Cantidad diaria recomendada
RM	Resonancia magnética
SPKUM	Síndrome de fenilcetonuria materna
Thr	Treonina
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VCM	Volumen corpuscular medio

ÍNDICE

INDICE

<u>1. JUSTIFICACIÓN.....</u>	1
<u>2. INTRODUCCIÓN.....</u>	3
2.1. Historia de la Fenilcetonuria.....	5
2.2. Etiopatogenia y Evolución natural de la enfermedad.....	7
2.3. Detección neonatal de la fenilcetonuria.....	8
2.4. Confirmación del diagnóstico de fenilcetonuria y diagnóstico diferencial.....	9
2.4.1. Deficiencia de PAH.....	10
2.4.2. Defectos del Cofactor BH4.....	11
2.4.3. Sobrecarga de BH4.....	13
2.5. Tratamiento	14
2.5.1. Tratamiento dietético	14
2.5.1.1. Requerimientos proteicos.....	16
2.5.1.2. Requerimientos de Phe.....	18
2.5.1.3. Requerimientos de Tyr.....	19
2.5.1.4. Sustitutivos proteicos.....	19
2.5.2. Nuevas estrategias terapéuticas.....	20
2.5.2.1. Tetrahidrobiopterina	20
2.5.2.1.1. Ajuste de la dieta.....	21
2.5.2.2. Glicomacropéptidos.....	22
2.5.2.3. Aminoácidos Neutros de Cadena Larga	23
2.5.2.4. Fenilalanina Amonio Liasa.....	25
2.6 Seguimiento.....	25

2.6.1 Monitorización de los niveles sanguíneos de Phe.....	25
2.6.2. Frecuencia de la monitorización de la Phe sanguínea.....	27
2.6.3. Monitorización de la concentración sanguínea de Tyr.....	27
2.7 Complicaciones de la Fenilcetonuria.....	28
2.7.1. Neurológicas/Neuropsiquiátricas.....	28
2.7.2. Problemas psicológicos.....	29
2.7.3. Déficits vitamínicos.....	29
2.7.4. Deficit de Phe.....	31
2.8. Fenilcetonuria materna.....	31
2.9. Crecimiento.....	34
2.10. Enfermedad mineral ósea (EMO) de la Fenilcetonuria: Osteopenia /Osteoporosis.....	37
2.10.1. Definición y fisiopatología de la EMO.....	37
2.10.2. EMO y Fenilcetonuria.....	38
2.10.3. Diagnóstico de la EMO.....	39
2.10.3.1. Densitometría ósea.....	39
2.10.3.2. Ultrasonografía cuantitativa (QUS).....	41
2.10.3.3. Tomografía computerizada cuantitativa (QT-c).....	42
2.10.3.4. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo.....	42
2.10.3.4.1. Marcadores de formación ósea.....	43
2.10.3.4.2. Marcadores de resorción ósea.....	45
2.10.3.5. Marcadores de remodelado óseo en la infancia.....	47
2.10.4. Manejo terapéutico de la EMO en la fenilcetonuria.....	48
2.11. Genética de la Fenilcetonuria.....	51
2.11.1. Correlación genotipo-fenotipo.....	54
2.11.2. Mutaciones asociadas a respuesta a BH4.....	55

3. OBJETIVOS.....	57
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	58
4.1. Estudio del crecimiento en pacientes fenilcetonúricos en Galicia.....	60
4.1.1. Pacientes.....	60
4.1.2. Metodología Clínica.....	60
4.1.3- Metodología Estadística.....	62
4.2. Estudio de la mineralización ósea en pacientes fenilcetonúricos.....	64
4.2.1. Pacientes.....	64
4.2.2. Metodología Clínica.....	64
4.2.3- Metodología Estadística.....	67
4.3. Estudio de la genética en pacientes fenilcetonúricos en Galicia.....	68
4.3.1. Pacientes.....	68
4.3.2. Metodología Clínica.....	68
5. RESULTADOS.....	71
5.1. Estudio del crecimiento en pacientes fenilcetonúricos en Galicia.....	72
5.1.1. Análisis de la talla.....	72
5.1.2. Análisis del peso	84
5.1.3. Análisis del IMC.....	95
5.1.4. Crecimiento de los pacientes con EMO.....	104
5.2. Resultados del estudio de la mineralización ósea en pacientes fenilcetonúricos.....	105
5.2.1. Enfermedad mineral ósea.....	109
5.2.2. Encuesta nutricional.....	110

5.2.3. Otras variables estudiadas como factor de riesgo de EMO.....	111
5.2.4. Tratamiento con BH4.....	113
5.2.5. Marcadores de remodelado óseo.....	115
5.3. Resultados del estudio de la genética en pacientes fenilcetonúricos en Galicia.....	118
5.3.1. Estudio genético.....	118
5.3.2. Actividad enzimática residual y genotipo.....	120
5.3.3. Test de sobrecarga de BH4 y genotipo.....	121
<u>6. DISCUSIÓN.....</u>	124
6.1. Discusión sobre el estudio del desarrollo físico en los pacientes fenilcetonúricos.....	126
6.2. Discusión sobre los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad mineral ósea en los pacientes fenilcetonúricos.....	130
6.3. Discusión sobre la utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral ósea en los pacientes fenilcetonúricos.....	135
6.4. Discusión del estudio de la genética de los pacientes fenilcetonúricos de Galicia.....	138
6.5. Propuesta de Esquema de seguimiento y manejo nutricional de los pacientes PKU.....	141
<u>7. CONCLUSIONES.....</u>	142
<u>8. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	145
<u>9. PUBLICACIONES.....</u>	170

1.- JUSTIFICACIÓN

El programa de cribado metabólico universal realizado a los recién nacidos posibilita el diagnóstico y tratamiento precoz de la fenilcetonuria. Esto ha permitido a estos pacientes evitar el desarrollo de secuelas neurológicas profundas e irreversibles.

El tratamiento de la fenilcetonuria es fundamentalmente dietético, consistente en restricción de alimentos con alto contenido proteico, esta restricción es variable y dependerá del grado de tolerancia individual a la Phe, que es monitorizada de forma individual tras el diagnóstico.

Por lo tanto, el cribado metabólico neonatal de la fenilcetonuria ha supuesto un avance vital para estos pacientes al evitar la aparición de secuelas neurológicas. Sin embargo, en los últimos años se han hecho más notorios otros aspectos de la enfermedad que condicionan de forma directa la calidad de vida de los pacientes.

Entre estos factores se encuentran las alteraciones de la mineralización ósea, que se saben más frecuentes en esta población, sin estar claro en la actualidad los factores concretos que favorecen su aparición. Seguimos sin saber si la causa que justifica su aparición tiene relación directa con la propia enfermedad, es decir, con las mismas alteraciones genéticas que provocan la fenilcetonuria; si quizá pueda ser debida a una mala adherencia terapéutica, que condicione un mal control metabólico de la enfermedad, con niveles fluctuantes de Phe en sangre o si podría deberse a una carencia nutricional debida, precisamente, al estricto control dietético al que son sometidos estos pacientes. Sin olvidar otros factores que sabemos influyen en la aparición de osteopenia/osteoporosis, como el sedentarismo o la obesidad.

El identificar los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad mineral ósea resultaría en una estrategia preventiva vital para tratar y asesorar a nuestros pacientes fenilcetonúricos, aspecto fundamental que motivó este estudio.

Por otro lado, el conocer las alteraciones concretas en el remodelado óseo de estos pacientes, es decir, objetivar si se trata de una disminución en la formación de

hueso y/o un aumento en la resorción puede ayudar a conocer la fisiopatología de la EMO en estos pacientes. Además, puede permitirnos conocer qué marcadores bioquímicos de remodelado óseo pueden ser útiles para identificar a aquellos pacientes en los que se están produciendo alteraciones en el remodelado óseo que pueden derivar en una disminución de la DMO. Dado que la densitometría es una prueba estática que determina en un momento puntual la DMO; los marcadores bioquímicos pueden ser más ágiles al permitirnos ver estas alteraciones en el remodelado antes de que se produzca el descenso en la DMO.

Otro aspecto fundamental en el desarrollo de los niños con fenilketonuria es el crecimiento. Las restricciones dietéticas pueden alterar la talla, el peso y el perímetro de cráneo de estos pacientes. Los estudios publicados hasta la actualidad reflejan diferentes grados de afectación en el desarrollo físico. El estudiar si el crecimiento de los pacientes fenilketonúricos se apartaba del crecimiento de la población general, así como, si el fenotipo bioquímico y el tipo de tratamiento podían influir en el mismo, pensamos puede ser muy útil con vistas a mejorar el manejo futuro de estos pacientes en lo que al crecimiento se refiere.

Por otro lado, nos parecía un punto fundamental, dada la heterogeneidad de las mutaciones de la PAH, conocer la epidemiología de las mutaciones de la PAH en la población gallega; lo que reflejaría no sólo la historia poblacional, sino que proporciona información sobre la relación genotipo-fenotipo y puede ser de gran utilidad para predecir la respuesta terapéutica a la BH4.

2.- INTRODUCCION

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica congénita, que se transmite por herencia autosómica recesiva (OMIM 261600), con una incidencia de 1 por cada 10.000 individuos caucásicos. Si no se diagnostica y trata precozmente da lugar a secuelas neurológicas profundas e irreversibles.

Se debe a un defecto en la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (PAH, EC 1.14.16.1), que cataliza la hidroxilación de fenilalanina (Phe) a tirosina (Tyr) (Figura 1).

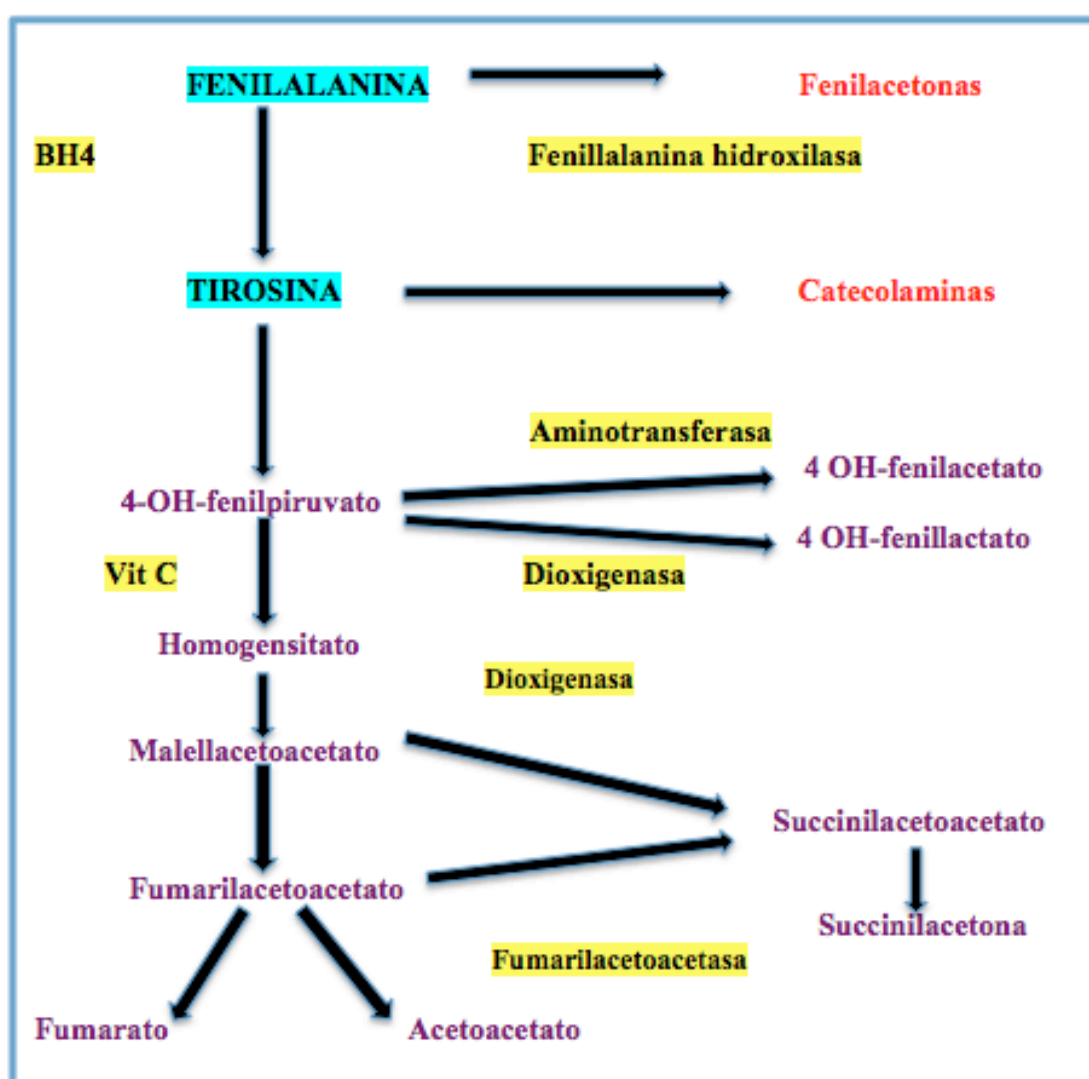


Figura 1. Metabolismo de la Fenilalanina y la Tirosina.

La disfunción de esta enzima, limitante en el metabolismo de la Phe, produce hiperfenilalaninemia (HPA). En un 1-2% de los casos, la hiperfenilalaninemia puede deberse a un déficit del cofactor, L-tetrahidrobiopterina (BH4) (Figura 2).

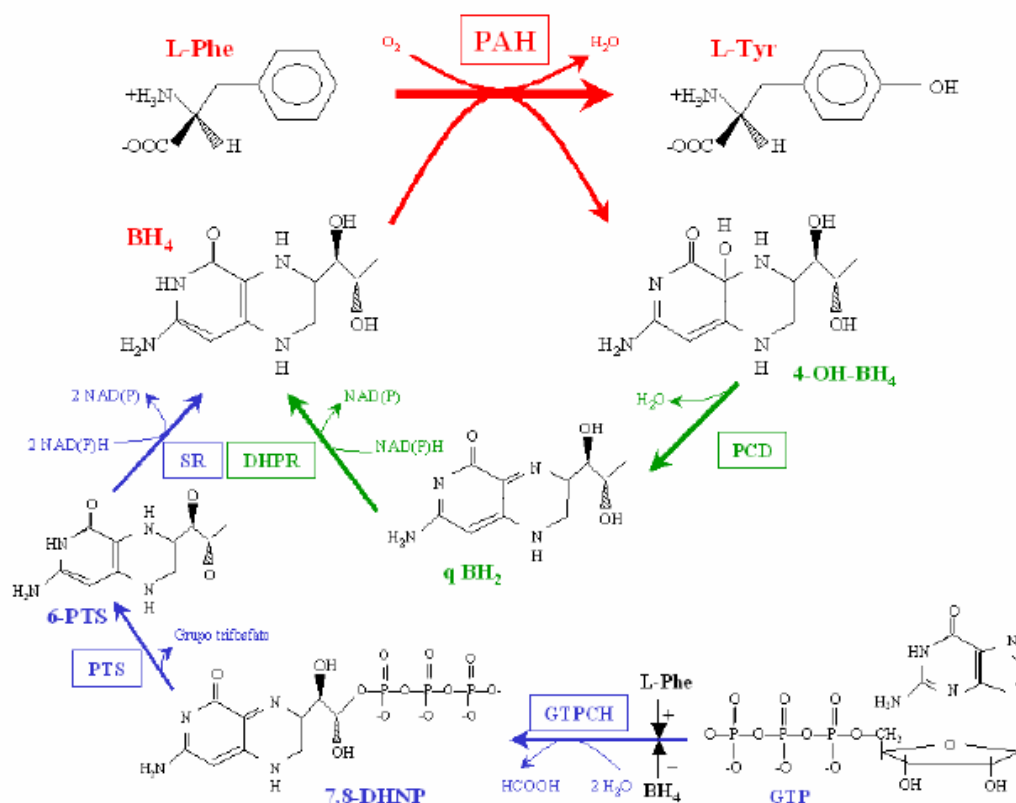


Figura 2. Sistema de hidroxilación de la Phe. El ciclo catalítico de la PAH en presencia de su cofactor natural BH₄ se expresa en rojo, las rutas principales de biosíntesis de BH₄ en azul, y las de reducción del cofactor oxidado en verde. Las enzimas implicadas se muestran en recuadros. Se indica activación (+) ejercida por la L-Phe y la inhibición (-) ejercida por la BH₄ sobre la etapa limitante en la biosíntesis del cofactor

2.1. HISTORIA DE LA FENILCETONURIA

La PKU se describió por primera vez en 1934 al descubrir Fölling en dos niños con retraso mental cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico en su orina: oligofrenia fenilpirúvica⁽¹⁾; un año más tarde Penrose demuestra que esta enfermedad es de transmisión autosómica recesiva⁽²⁾. En el año 1953 se publica que la PKU es debida a un déficit en la actividad de la enzima hepática PAH⁽³⁾, lo que provoca una imposibilidad de la Phe de oxidarse a Tyr. Con este descubrimiento, pronto se demostró una terapia posible consistente en controlar la ingesta de Phe para prevenir la HPA y evitar, si se instauraba en etapas precoces de la vida, el desarrollo de secuelas cognitivas⁽⁴⁻⁶⁾ (Figura 3).

La PKU fue la primera enfermedad genética en la que las consecuencias clínicas de una mutación en homocigosis podrían ser solventadas por un tratamiento médico, una dieta restrictiva en proteínas naturales. El éxito de dicha dieta dependía de un tratamiento lo más precoz posible. Se convertía así la PKU en el prototipo de enfermedad frente a la que realizar una búsqueda masiva en la población general, concretamente en recién nacidos, con fines preventivos. Para ello se diseñó un estudio de laboratorio que permitía la determinación de la concentración de Phe en muestras de sangre impregnada en papel absorbente de recién nacidos (test de inhibición bacteriana de Guthrie)⁽⁷⁾. Esta prueba utiliza el crecimiento de una cepa de bacterias *Bacillus subtilis* (cepa ATCC 60.51) en una placa de agar preparada especialmente para tal fin. A este medio de cultivo se añade el compuesto B-2-tienilalanina, que inhibe el crecimiento de dicha cepa. Sin embargo, si a ese medio se le añaden Phe, fenilpiruvato y/o fenil-lactato, el crecimiento bacteriano se restaura. Dado que en la sangre de los pacientes fenilcetonúricos no tratados, se encuentran niveles elevados de estos compuestos, si se aplica una pequeña cantidad de la misma a la placa de agar, se producirá el crecimiento bacteriano, lo que será un indicador de la presencia de PKU.

Este avance ha permitido la detección precoz de la PKU mediante cribado metabólico a todos los recién nacidos⁽⁸⁾. En España el cribado neonatal de PKU se

inició en Granada en 1968, siendo la cobertura actual superior al 99% de la población de recién nacidos⁽⁹⁾.

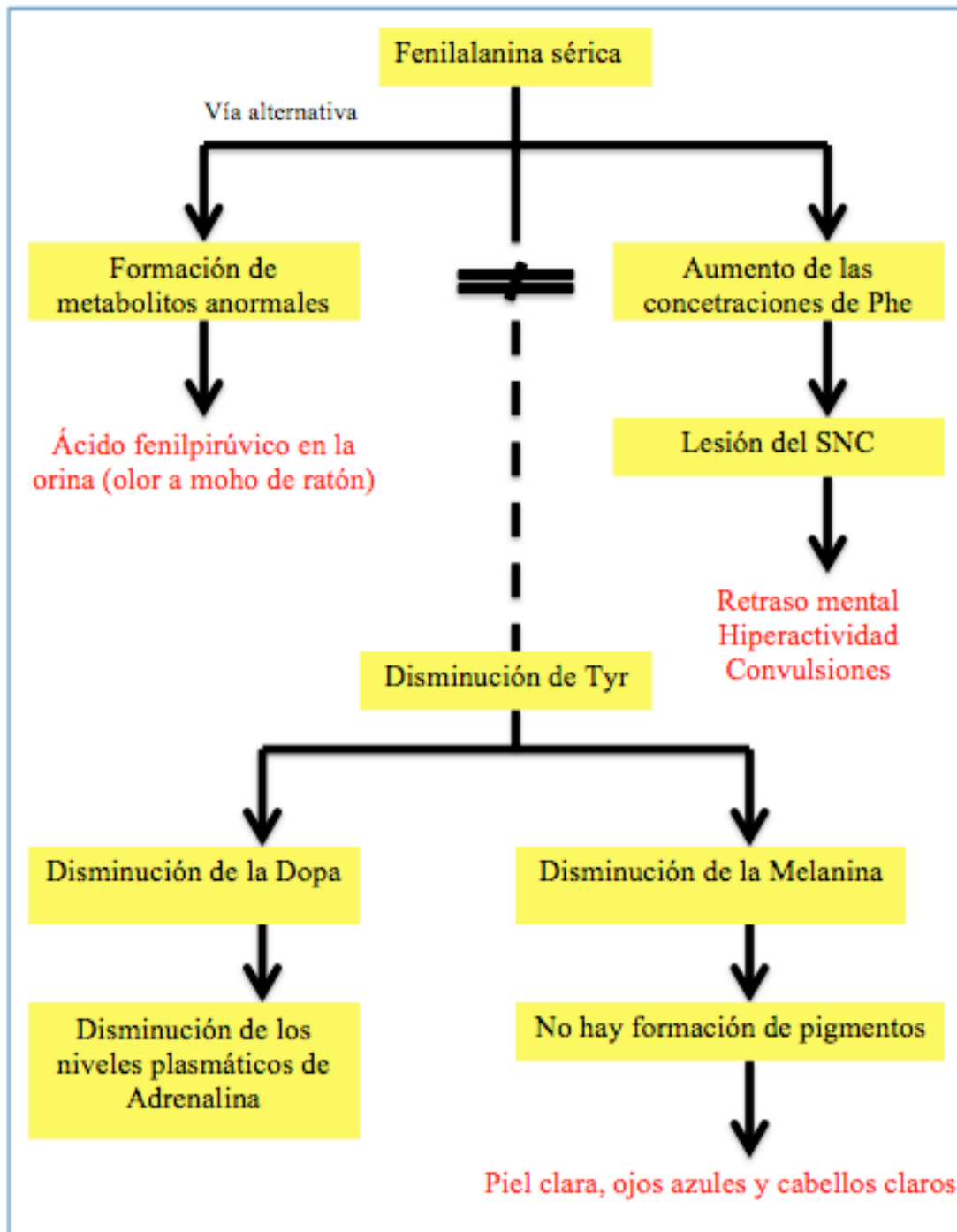


Figura 3. Metabolismo de la Fenilalanina al fallar el sistema enzimático

2.2. ETIOPATOGENIA Y EVOLUCIÓN NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Si no se instaura un tratamiento precoz, la PKU se manifiesta fundamentalmente con una afectación neurológica severa, apareciendo microcefalia, retraso mental, epilepsia y progresión de los trastornos motores en la segunda y tercera década de la vida^(10, 11).

La etiopatogenia del daño neurológico que ocasiona la elevación sanguínea de Phe podría deberse a que se genera una disrupción en el transporte de otros aminoácidos neutros que comparten el mismo sistema de transporte, lo que dificulta el paso de los mismos a través de las membranas celulares y de la barrera hematoencefálica. El transporte de Tyr y triptófano (Trp), aminoácidos aromáticos neutros, se halla interferido y al ser precursores de neurotransmisores, determina que el defecto relativo de estos aminoácidos se traduzca en una reducción de la síntesis de sus respectivos neurotransmisores (fundamentalmente serotonina y dopamina), lo que afecta al metabolismo de las catecolaminas como neurotransmisores en el cerebro^(12,13).

Por otro lado, la Phe elevada en sangre se acaba transformando en los ácidos orgánicos: fenilpiruvato, fenilacetato y fenilactato, siendo el estrés oxidativo derivado un factor cada vez más en boga, que explicaría al menos en parte, el daño neurológico que producen los niveles elevados de Phe en sangre^(14,15). Wagner sostiene que el acúmulo de ácidos orgánicos en varios desórdenes metabólicos induciría la aparición de radicales libres y especies reactivas, así como disminuiría las defensas antioxidantes de los tejidos⁽¹⁴⁾. Estas especies reactivas pueden inhibir varios complejos de la cadena respiratoria y enzimas necesarias para la producción de energía, resultando todo ello en un fracaso metabólico, daño y muerte cerebral^(16,17). Los radicales libres además, provocan daño y muerte celular directa al romper la membrana lipídica de las células, destruir las proteínas y oxidar el ADN⁽¹⁸⁾.

2.3. DETECCIÓN NEONATAL DE LA FENILCETONURIA

El cribado de PKU debe ser realizado a todos los recién nacidos en los primeros días de vida para permitir una intervención terapéutica lo más precoz posible y así prevenir en los niños PKU el desarrollo de secuelas neurológicas. La muestra de sangre se suele obtener al tercer día de vida⁽¹⁹⁾, tras punción del talón (Figura 4). Recientemente se ha publicado la posibilidad de realizar dicha extracción tras punción venosa a nivel del dorso de la mano, ya que ello parece ofrecer como ventaja menos dolor para el niño, así como menos riesgo de efectos secundarios tales como osteocondritis del calcáneo, equimosis, hematomas, etc⁽²⁰⁾.

La sangre se recoge en un papel de filtro absorbente denominado genéricamente tarjeta de Guthrie, que cumpla con las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2014/07 de MUNKTELL).

Existen tres métodos de laboratorio para el cribado de PKU:

- **BIA (bacterial inhibition assay)**, diseñado por Guthrie⁽⁷⁾, semicuantitativo, pues como se ha explicado previamente, únicamente indica si hay niveles elevados de Phe, pero no los cuantifica. Es el método que produce más falsos positivos y no se utiliza actualmente.
- **Análisis fluorométrico:** cuantitativo y automatizable
- **Espectrometría de Masas en Tandem (MS/MS):** cuantitativo y automatizable. Tiene la ventaja frente a las demás técnicas, de que permite obtener simultáneamente los niveles de Tyr. La relación Phe/Tyr es un indicador de esta patología y mejora el valor predictivo positivo.

En España se utilizan diferentes métodos para el cribado neonatal de PKU, en función de la comunidad autónoma (Figura 4).



Figura 4. Método para el screening de PKU en España según la comunidad autónoma. Análisis por MS/MS (Comunidades subrayadas en rojo). Análisis por fluorimetría (Comunidades no subrayadas).

2.4. CONFIRMACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE FENILCETONURIA Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El punto de corte para la Phe se establece en $150\mu\text{mol/L}$ si se determina por métodos fluorométricos y en $120\mu\text{mol/L}$ si es por MS/MS, y se considera normal una relación $\text{Phe/Tyr} < 2$ (Figura 5). En todos los casos de hiperfenilalaninemia, tras asegurarse de que recibe una alimentación con una ingesta proteica equivalente a 3 gramos de proteínas naturales/kg/día (150 mg/kg/día de Phe), se procede a la confirmación y diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia mediante:

- **Cuantificación de aminoácidos en plasma o suero** (permite establecer los niveles de Phe y Tyr)

- **Valoración de la actividad de dihidropterina reductasa (DHPR) en eritrocitos⁽²¹⁾** en sangre total en papel de filtro
- **Cuantificación e identificación de aminoácidos, ácidos orgánicos y pterinas (neopterina y biopterina)⁽²²⁾** en orina de al menos 6-12 horas recogida en oscuridad y congelada posteriormente.

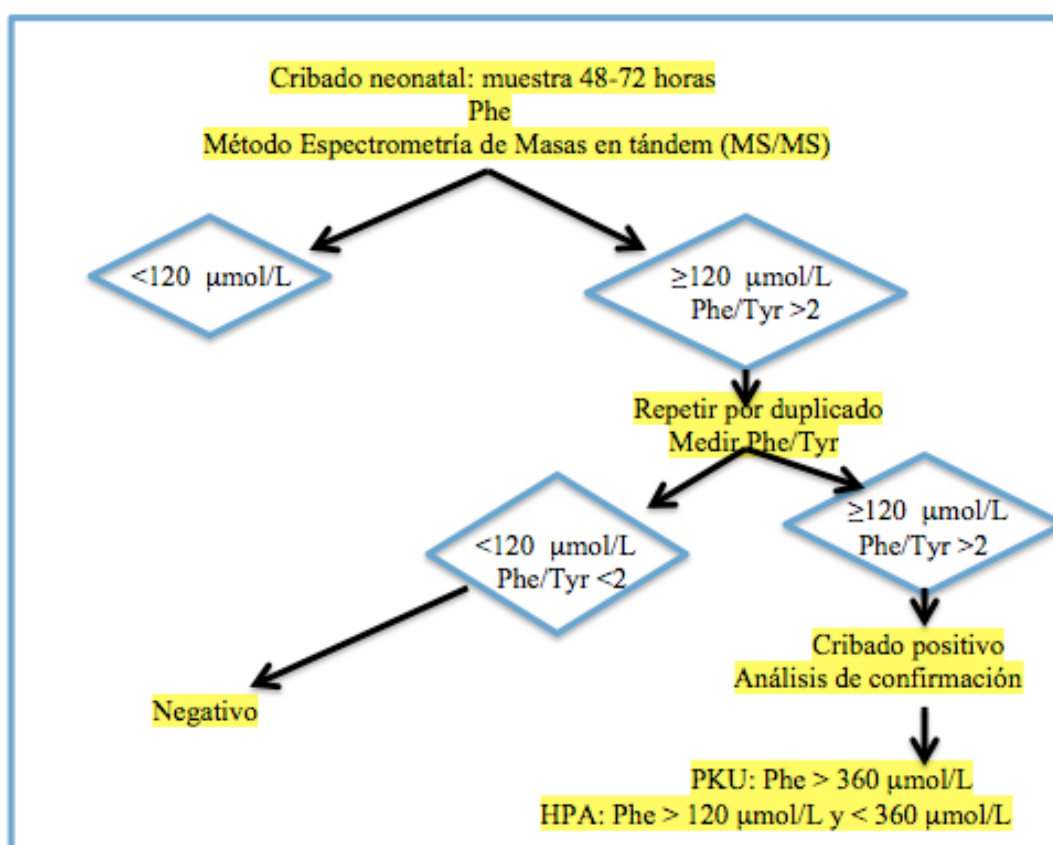


Figura 5. Actuación del cribado de fenilcetonuria en Galicia.

2.4.1 DEFICIENCIA DE PAH:

Se distinguen varios fenotipos clínicos según los niveles de Phe al diagnóstico:

1. **PKU clásica:** Phe >20 mg/dL (>1.200 µmol/L).
2. **PKU moderada:** Phe entre 10 y 20 mg/dL (600 – 1.200 µmol/L).

3. **PKU leve:** Phe entre 6 y 10 mg/dL (360 – 600 $\mu\text{mol/L}$). En algunos países se considera hiperfenilalaninemia benigna si es < 10 mg/dL (600 $\mu\text{mol/L}$)
4. **Hiperfenilalaninemia benigna (HPA)** Phe entre 2,5 y 6 mg/dL (150 y 360 $\mu\text{mol/L}$) medida por fluorimetría o entre 2 y 6 mg/dL (120-360 $\mu\text{mol/L}$) si la determinación ha sido mediante MS/MS (análisis cuantitativo de aminoácidos).

Hiperfenilalaninemia transitoria: Phe $>2,5$ mg/dl, sin aumento de tirosina, secundaria a inmadurez hepática transitoria, prematuridad, fármacos (trimetoprim) y patología renal.

También pueden identificarse hiperfenilalaninemias con hipertirosinemia (con o sin hipermetioninemia) en las que tendremos que descartar como causas más habituales la prematuridad, alta ingesta proteica, alimentación parenteral con aminoácidos, tirosinemia, galactosemia y/o patología hepática de diferente etiología.

2.4.2 DEFECTOS DEL COFACTOR BH₄:

Aproximadamente un 1-2% de las elevaciones de Phe detectadas en el cribado neonatal son debidas a alteraciones en el metabolismo de la BH₄⁽²³⁾. Las alteraciones de la BH₄ son más severas que la PKU por deficiencia enzimática, en el sentido de que su respuesta al tratamiento es sustancialmente diferente, ya que no responden a la dieta restrictiva en proteínas naturales. El análisis de orina, como veremos más adelante, para el estudio de neopterina y biopterina y la medición de la actividad de dihidropteridín reductasa (DHPR), es imprescindible para el diagnóstico de esta entidad, y ha de llevarse a cabo lo antes posible.

En los defectos del cofactor BH₄, los niveles de fenilalanina son muy variables, desde 2.5mg/dL hasta incluso 60mg/dL. La actividad DHPR en eritrocitos se encuentra disminuída en las deficiencias de DHPR. En las deficiencias de guanosín-trifosfato-ciclohidrolasa (GTP-CH) y en las de la 6 piruvoil-tetrahidro-biopterina-sintetasa (PTPS), la actividad DHPR es normal⁽²⁴⁾.

Con la valoración de excreción de pterinas en orina se puede precisar ante qué déficit concreto nos encontramos⁽²⁵⁾:

1. Neopterina normal, biopterina muy aumentada, con un porcentaje de biopterinas >84 %: **Deficiencia de DHPR**
2. Neopterina y biopterina muy disminuidas. Porcentaje de biopterina del 50 %: **Deficiencia de GTP-CH**
3. Neopterina muy aumentada, biopterina muy disminuida, % de biopterina <12 %: **Deficiencia en PTPS**
4. Presencia de primapterina (“7– biopterina”) en orina: **Deficiencia de Pterina-4 acarbinolamina dehidratasa (PCD)**

Ante la sospecha de una deficiencia en la síntesis y/o en el reciclaje de la BH4, deberemos efectuar dos pruebas más⁽²⁶⁾ :

- **Determinación de pterinas y neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo (LCR)**, ya que los niveles de ácido homovanílico (HMOV) y ácido 5 hidroxindolacético (5HIA) en LCR están muy disminuidos⁽²⁶⁾, así como las diferencias en los ratios de los niveles de neurotransmisores, que proporciona información diagnóstica relevante en cuanto a la severidad del déficit de BH4⁽²⁷⁾.
- **Sobrecarga con BH4 oral**: esta prueba consiste en la administración al paciente de 20 mg/kg de BH4, tomando muestras de sangre basal (antes de la sobrecarga), y a las 4, 8, 12 y 24 horas de la misma⁽¹⁹⁾.

En las deficiencias de síntesis de BH4 (deficiencias de GTP-CH y de PTPS) se normalizan los valores de Phe a las 4 horas postBH4 y se mantiene normal en las siguientes tomas de la sobrecarga. En las deficiencias de DHPR, disminuye la Phe basal un 30-40% entre las 4 y 8 horas pero posteriormente vuelve a aumentar hasta los niveles basales.

2.4.3. SOBRECARGA DE BH4

Antes se utilizaba esta prueba únicamente en las deficiencias de síntesis o de regeneración del cofactor pero tras los estudios de Kure ⁽²⁸⁾, en los que se constató que algunos pacientes PKU responden a la sobrecarga de BH4, se practica en todos los pacientes con hiperfenilalaninemia que precisen tratamiento.

El test de sobrecarga de BH4 permite así identificar a los pacientes PKU que responden a la administración de BH4. Esto es importante ya que en estos pacientes la administración de BH4 disminuye los niveles sanguíneos de Phe, o incluso puede llegar a normalizarlos ⁽²⁹⁾.

La mayoría de protocolos de test de sobrecarga de BH4 que se utilizan para diagnosticar la respuesta a la BH4, se han descrito con dosis iniciales de 10-20 mg/kg de sapropterina⁽³⁻³⁵⁾. Una concentración plasmática de 400 $\mu\text{mol/L}$ al comienzo del test se considera un punto de corte razonable para poder observarse un efecto clínico sustancial de la medicación, si bien es cierto, que límites más bajos pueden ser también valorables para los pacientes más jóvenes. Una reducción de la Phe sanguínea del 30% se considera una respuesta positiva al tratamiento; aunque se reconoce en ficha técnica la libertad del médico prescriptor para individualizar el punto de corte a partir del cual considera la respuesta positiva en función de cada caso individual. Si los niveles sanguíneos de Phe se encuentran entre 360 y 400 $\mu\text{mol/L}$, se miden de nuevo los niveles de Phe y se comprueba la tolerancia a la Phe antes del test de sobrecarga con BH4.

La respuesta a la BH4 es más habitual en las formas más moderadas, que son debidas a mutaciones de la PAH en las que esta enzima tiene todavía una actividad residual ^(36,37).

La tasa de respuesta a la BH4 varía, y los respondedores lentos (pacientes que no responden con una reducción sustancial en los niveles sanguíneos de Phe dentro de las 24 horas de iniciada la sobrecarga), suponen un 20-30% del total de respondedores ^(35,38).

El protocolo propuesto por el grupo de trabajo europeo⁽³²⁾ propone administrar una dosis de sapropterina a 20 mg/kg y medir los niveles sanguíneos de Phe a las 8, 16 y 24 horas. Si se observa descenso de la Phe sanguínea $\geq 30\%$, se considera positivo. Con ello se consigue identificar a los respondedores iniciales a BH4. Se puede en las siguientes 24 horas, realizar un segundo test a los pacientes no respondedores (descenso de los niveles sanguíneos de Phe $<30\%$), administrándosele otra dosis de sapropterina a 20 mg/kg y si se observa descenso de la Phe sanguínea $\geq 30\%$ se considera positivo. Con este segundo test se consigue por lo tanto identificar a los respondedores lentos.

2.5. TRATAMIENTO DE LA PKU

2.5.1. TRATAMIENTO DIETÉTICO

Hasta hace relativamente poco tiempo, el único tratamiento disponible para la PKU era el dietético, fundamentalmente en las etapas críticas del desarrollo^(4,5). El tratamiento de la PKU ha de realizarse durante toda la vida, y no solamente durante la infancia. El abandono del tratamiento tras la infancia puede dar lugar al desarrollo de alteraciones neuropsicológicas⁽³⁹⁾. Se sabe que el cumplimiento terapéutico suele ser adecuado durante la infancia, sin embargo se ha publicado la dificultad de mantener dicha adherencia terapéutica en la adolescencia y vida adulta⁽⁴⁰⁾.

La dieta restringida en proteínas naturales que deben seguir los pacientes PKU implica que deben evitar alimentos con alto contenido en Phe como la carne, pescado, huevos, pan convencional y frutos secos; así como alimentos o bebidas que contengan aspartamo. Los alimentos con contenido en Phe superior a 30mg ($>1800\mu\text{mol}$)/100g de producto, como las patatas, espinacas, brócoli, guisantes, plátanos, productos lácteos u otros alimentos con proteínas de alto valor biológico (PAVB) deben ser controlados para cuantificar la ingesta dietética de Phe⁽⁴¹⁾.

Los alimentos naturales con bajo contenido en fenilalanina, inferior a 30mg (<1800µmol) /100g de producto, como ocurre con varias frutas y verduras, son habitualmente de libre administración.

La leche materna está claramente indicada para cubrir los mínimos requerimientos proteicos y se puede considerar como un alimento con cantidades relativamente bajas de Phe, comparado con la leche de fórmula, sumado a los ya conocidos beneficios de la lactancia materna⁽⁴²⁾. La importancia de la lactancia materna en la PKU se refuerza por su perfil nutricional, con una ratio Phe/Tyr óptima y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFAs), particularmente ácido araquidónico (AA), que influye positivamente en el crecimiento y en el desarrollo funcional cerebral⁽⁴³⁾. Una aproximación inicial podría ser permitir la ingesta de 300-400 mL de leche materna al día, sin dejar de lado la importancia de la monitorización estrecha de la tolerancia a la Phe de cada individuo concreto⁽⁴⁴⁾. La utilización de la lactancia materna es menos común en los niños PKU que en el resto de la población⁽⁴⁵⁾.

Es preciso asegurar el adecuado aporte proteico global diario. Para ello se administran fórmulas de aminoácidos exentas de Phe (Phe-libre) y suplementadas con Tyr. Además suelen estar enriquecidas con vitaminas, oligoelementos y ácidos grasos esenciales.

Existen fórmulas Phe-libre diseñadas para niños entre 0 y 12 meses y para mayores de un año, adolescentes y adultos. Dentro de cada grupo existen diferentes tipos de productos, con diferentes composiciones^(46,47). Esto supone una ventaja al proporcionar al paciente la opción de elegir el producto que mejor se ciña a sus necesidades y/o gustos. Las mejoras en los últimos años con respecto a la palatabilidad, presentación y composición nutricional de estas fórmulas ha mejorado el cumplimiento de la dieta en los pacientes PKU.

La dieta indicada en los pacientes PKU consta así mismo de una serie de ventajas y limitaciones derivadas del bajo aporte de alimentos de origen animal, similares a las que se producen en las dietas veganas⁽⁴⁴⁾. Por un lado, los beneficios

serían los niveles más bajos de grasas saturadas, colesterol y proteínas animales; así como niveles mayores de carbohidratos, fibra, magnesio y potasio. Por otro lado las limitaciones, como el bajo aporte de micronutrientes, entre los que se incluyen las vitaminas A, C y E, selenio, coenzima Q10, vitamina B₂, B₆ y B₁₂, folatos (cuyo déficit puede elevar en sangre los niveles de homocisteína, aumentando entre otros, el riesgo cardiovascular), hierro, zinc, carnitinas y LCPUFAs. Estos déficits son incluso más importantes en los pacientes PKU deficientemente nutridos que en los veganos, ya que estos últimos sí pueden incluir en su dieta cereales y frutos secos.

En el caso concreto de los LCPUFAs (AA:C20:4n-6 y ácido docosahexaenoico o DHA:C22:6 n-3), hay que tener en cuenta su importancia en cuanto al desarrollo neurológico⁽⁴⁸⁾. Existen estudios que demuestran que el desarrollo visual de los niños alimentados con leche materna es mejor que los alimentados con fórmula artificial, debido precisamente al mayor aporte de LCPUFAs presente en la leche materna⁽⁴⁹⁾. Por lo tanto, dado que en los pacientes PKU la ingesta de LCPUFAs es menor, es importante la suplementación con estos ácidos grasos, especialmente con DHA, de las fórmulas diseñadas para estos pacientes. Esta suplementación ha demostrado mejorar el desarrollo visual de estos pacientes^(50,51).

Con respecto a los antioxidantes, como se explicó en el apartado de fisiopatología del daño neurológico de la PKU, el estrés oxidativo juega un papel importante en dicho deterioro. La dieta restrictiva de los PKU puede llevar a un aumento del estrés oxidativo como resultado de la deficiencia de selenio⁽⁵²⁾ o del coenzima Q10⁽⁵³⁾. Es importante seguir en estos pacientes el estado antioxidante, corrigiendo sus posibles déficits de selenio, vitamina E, etc.

2.5.1.1. REQUERIMIENTOS PROTEICOS

La dosificación de las fórmulas Phe-libre con mezcla de aminoácidos o de los sustitutivos proteicos se determina por la tolerancia individual a la Phe y el requerimiento proteico total. La ingesta de proteínas totales será igual a la suma de proteínas naturales, más la ingesta de mezcla de estos aminoácidos.

Existe todavía controversia sobre la cantidad diaria de proteínas totales, y más concretamente, de sustitutivo proteico que deben ingerir los pacientes PKU. Las guías británicas⁽⁵⁴⁾ recomiendan ingesta de cantidades elevadas de aminoácidos, de tal forma que en los mayores de 2 años, se sugiere que el aporte adecuado sería de 2g/kg/día, basándose en que la asimilación y digestión de los aminoácidos libres es diferente que la de las proteínas. En un estudio cruzado, controlado y randomizado⁽⁵⁵⁾, en el que participaron 25 pacientes PKU, con edades comprendidas entre 2 y 10 años, se comparó la administración de dosis altas de sustitutivo proteico (2 g/kg/día), con la de dosis más bajas (1,2 g/kg/día). Se comprobó que dosis mayores del sustituto proteico contribuyen a disminuir las concentraciones sanguíneas de Phe. Se plantean como hipótesis que justifiquen este resultado la mayor ingesta concomitante de carbohidratos y grasas, lo que aumenta la energía aportada total y disminuye el riesgo de catabolismo proteico, con lo que disminuye la liberación de Phe endógena al torrente sanguíneo.

La otra corriente es la seguida en EEUU y algunos países europeos⁽⁵⁶⁾, que sostienen que no hay motivos por los que los niños PKU deban requerir mayores aportes diarios de proteínas que los niños sanos. Esto enlaza con el hecho de que estudios en adultos han encontrado^(57,58) que la absorción en el intestino de la mezcla de aminoácidos es diferente a la de las proteínas intactas. Las pérdidas de nitrógeno son menores con las proteínas intactas que con las mezclas de aminoácidos, y se destinan más a la síntesis proteica que los aminoácidos, que se destinan más a la oxidación que a la síntesis proteica.

Un paso intermedio consiste en aplicar en estos pacientes un factor de 1,2 como incremento compensatorio (se multiplican las recomendaciones proteicas diarias de los individuos sanos por 1,2 siendo la resultante las recomendaciones proteicas totales de los PKU).

Las recomendaciones de proteínas totales en los PKU se basan en las recomendaciones de ingesta proteica de los individuos sanos. Aunque en realidad no existen de momento estudios totalmente concluyentes en cuanto a demostrar que

estos pacientes precisen compensatoriamente mayores cantidades de proteínas totales a expensas de las mezclas de aminoácidos^(59,60).

Por otro lado, la composición de las mezclas de aminoácidos ha sido poco valorada. El perfil de aminoácidos de estas fórmulas está basado en el de la leche materna. Cada fórmula hace determinadas variaciones sobre dicho perfil, lo que puede influir sobre su biodisponibilidad. Sin embargo, no existen estudios que comparen las tasas de absorción y biodisponibilidad de las diferentes fórmulas.

2.5.1.2 REQUERIMIENTO DE Phe

Los requerimientos de Phe en los pacientes PKU son muy bajos, siendo difícil determinar las necesidades exactas de Phe en PKU. Pencharz propuso que los requerimientos en los pacientes PKU eran inferiores a los de la población general, ya que en los pacientes PKU no hay las pérdidas de Phe al no hidroxilarse ésta para convertirse en Tyr⁽⁶¹⁾. Dicha hidroxilación se estima que comporta el 26% de los requerimientos de Phe en adultos jóvenes⁽⁶²⁾.

En los pacientes PKU la tolerancia individual a la Phe de la dieta está influida por la tasa de hidroxilación in vivo de la Phe, el catabolismo proteico neto, la tasa de energía no proteica ingerida, la velocidad de crecimiento, la edad, el sexo, la cantidad diaria de aminoácidos Phe-libre ingeridos, el tratamiento con BH4 y el embarazo⁽⁵⁹⁾.

Se ha demostrado que hay una relación clara entre la tolerancia a la Phe a los 2 años y a los 10 años de edad⁽⁶³⁾, aunque se desconoce la asociación entre la tolerancia a esta edad y la tolerancia a edades más tardías, en donde las concentraciones objetivo de Phe en sangre son más laxas. Es necesario, de todas formas, evaluar la tolerancia a la Phe de todos los pacientes de forma periódica, sobre todo, en los momentos de crecimiento rápido o en los que se lleven a cabo cambios en el tratamiento.

2.5.1.3. REQUERIMIENTO DE Tyr

Debido a que la Tyr es un aminoácido esencial en los PKU, es fundamental su suplementación en la dieta. La Tyr es un precursor de neurotransmisores catecolaminérgicos (dopamina, adrenalina y noradrenalina), tirosina y melanina. Los requerimientos de Tyr en niños PKU entre 6 y 9 años se estiman en 16,3 a 19,2 mg/kg/día⁽⁶⁴⁾. La Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria MRC⁽⁵⁴⁾ recomendó que los sustitutivos proteicos aporten 100-120 mg/kg/día de Tyr, que es 5 veces la cantidad recomendada para los niños no-PKU⁽⁶⁴⁾.

2.5.1.4. SUSTITUTIVOS PROTEICOS

Los sustitutivos proteicos, como se ha comentado previamente, se recomiendan en todos los pacientes PKU subsidiarios de tratamiento dietético. Aportan un porcentaje elevado de los requerimientos dietéticos, habitualmente en forma de L-aminoácidos, y además constituyen prácticamente su única fuente de Tyr⁽⁶⁵⁾. Las funciones de estos suplementos son varias, incluyendo la no aportación de Phe, el aumento de la retención de nitrógeno y el aumento de la tolerancia de Phe⁽⁶⁶⁾. Clásicamente, el cumplimiento de los pacientes respecto a la ingesta de estas fórmulas fue bajo⁽⁶⁵⁾, aunque la palatabilidad y presentación hayan mejorado los resultados en los últimos años⁽⁴¹⁾.

La dosificación diaria de las mezclas de aminoácidos/sustitutivos proteicos también es un factor clave. Se sabe que algunos pacientes toman todos los sustitutivos proteicos en una o dos dosis diarias aunque las recomendaciones actuales indiquen lo contrario, pues esta mala práctica se asocia a cambios rápidos en la Phe plasmática, aumento de la excreción de nitrógeno, mayor oxidación de los aminoácidos y mayor pérdida urinaria de los mismos⁽⁶⁷⁾.

Se recomienda habitualmente administrar el sustitutivo proteico repartido en tres o cuatro tomas diarias. En un estudio que analizó el momento de administrar dichos sustitutivos con el fin de reducir la variabilidad en los niveles sanguíneos de

Phe, se encontró que su administración en tres o cuatro dosis equitativas a lo largo de 14 horas del día, resultaba en una escasa variabilidad de los niveles de Phe en sangre a lo largo de las 24 horas del día⁽⁶⁸⁾.

2.5.2. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA PKU

2.5.2.1. TETRAHIDROBIOPTERINA (BH4)

Tras iniciarse el tratamiento dietético en los pacientes PKU, se descubrió al poco tiempo que un porcentaje pequeño de alguno de ellos, respondían peor a dicho tratamiento, pese a un control adecuado de los niveles sanguíneos de Phe. Posteriormente se descubrió que estos pacientes lo que presentaban era una deficiencia de BH4 debido a una alteración en la síntesis o en el reciclaje de dicho cofactor^(69,25). A partir de entonces se desarrolló el test de sobrecarga de BH4 con el objetivo de distinguir a los pacientes con alteraciones en el metabolismo de la BH4, de los pacientes con déficit en la actividad de la PAH⁽⁷¹⁾. En el año 1999 se produjeron dos cambios fundamentales: se aumentó la efectividad de la BH4 gracias a un cambio en su formulación; así como un aumento en su dosificación de 10 a 20 mg/kg de peso. Esto permitió detectar a un tercer grupo de pacientes, los llamados respondedores a la BH4. Este grupo, no tenían ni un defecto en el metabolismo de la BH4 ni un déficit de este cofactor, pero en ellos se producía un aumento en la actividad in vivo de la PAH.

Desde entonces se han ido encontrando pacientes respondedores a la BH4^(28,29,63), siendo la mayoría pacientes con déficits de actividad de PAH leves o moderados. De todas formas, algunos pacientes con una mutación en el gen de la PAH, que resulta en una ausencia clara de actividad enzimática, pueden llegar a presentar respuesta a la BH4⁽⁷²⁾; de ahí la importancia de realizar el test a todos los pacientes PKU independientemente del fenotipo, siendo conscientes de la menor probabilidad de respuesta en los más severos.

La introducción del tratamiento con BH4 en los pacientes respondedores permite cierto grado de liberalización de su dieta, al aumentar la tolerancia a la Phe,

siendo posible en un grupo pequeño de pacientes la liberalización completa de la misma. Aproximadamente un 20-30% de los pacientes PKU han alcanzado un 30% de reducción de los niveles sanguíneos de Phe con el diclorhidrato de sapropterina (saproterina) o con la formulación previa de BH4^(31,32, 36,73,74,).

La sapropterina es la forma sintética y biológicamente activa del cofactor BH4, Kuvan® (Merck Serono, Geneva, Switzerland; BioMarin Pharmaceutical, Inc., Novato, CA, USA), y la única fórmula registrada disponible para ser prescrita. En España el Ministerio de Sanidad autorizó este fármaco en el año 2009. No se han registrado por su utilización efectos secundarios importantes⁽³⁵⁾, entre los efectos secundarios descritos: cefalea, infecciones de tracto respiratorio superior y rinorrea⁽⁷³⁾.

La autorización actual en Europa de este fármaco, como medicamento huérfano, es a partir de los 4 años de edad. No obstante ya hay varias publicaciones en donde se constata su eficacia igualmente en los primeros años de la vida sin que se hayan descrito efectos secundarios importantes^(75, 76).

2.5.2.1.1. AJUSTE DE LA DIETA EN PACIENTES CON BH4

El grado de liberalización de la dieta dependerá de la tolerancia a la Phe y los niveles de Phe sanguíneos objetivos de cada paciente concreto.

Cualquier aumento en la ingesta dietética debe ser estrictamente monitorizado, vigilando los niveles sanguíneos de Phe y ajustando la dosis de sapropterina si procede. Existen varios protocolos con el fin de orientar sobre cómo realizar el aumento de la Phe en la dieta: Lambruschinii y cols⁽⁷⁷⁾ sugerían un aumento de la ingesta de Phe de 200 mg al día durante una semana, en pacientes con PKU leve o moderada. Singh y cols⁽⁷⁸⁾ proponen la introducción de 10 mg/kg/día de sapropterina; aunque una forma de introducción más conservadora consistiría en una dosis estándar adicional de 100 mg/día, en combinación con la monitorización regular de los niveles de Phe sanguínea. La Phe de la dieta debería irse aumentando de forma sistemática cada 7 días, hasta que las concentraciones de Phe sanguíneas

alcancen los límites tolerables. Tras cada nuevo ajuste dietético se deben determinar los niveles de Phe sanguíneos. Algunos pacientes pueden presentar un aumento más retardado en los niveles de Phe, por lo que resulta un desafío establecer la tolerancia definitiva a la Phe cuando la Phe adicional se añade rápidamente.

Una vez alcanzada la tolerancia máxima con la dosis de BH4 elegida y según lo que interese en cada caso, se puede intentar reducir la dosis de BH4 o aumentarla y observar si con ello se consigue aún mayor tolerancia.

Los pacientes capaces de tolerar una dieta normal podrán suspender el producto proteico sin fenilalanina, pero la mayoría de los pacientes van a requerir una pequeña cantidad. De hecho varios expertos consideran que el sustitutivo proteico debe de continuar administrándose⁽⁷⁸⁾, debido al papel importante que desempeña en estos pacientes: descenso de las concentraciones plasmáticas de Phe^(79,65), aporte dietético de Tyr y aporte de ácidos grasos esenciales y DHA. El sustitutivo proteico cobra todavía más relevancia durante enfermedades intercurrentes, para facilitar durante dichos procesos el control de los niveles de Phe en sangre. También resulta esencial que los pacientes continúen habituados al uso y sabor de estos productos para cuando sea precisa su utilización (durante enfermedades, embarazo o cuando el tratamiento con sapropterina no pueda ser continuado).

2.5.2.2. GLICOMACROPEPTIDO (GMP)

El GMP es una proteína derivada del suero lácteo, rica en aminoácidos esenciales específicos, con la particularidad de que es la única proteína natural conocida cuya forma purificada no contiene apenas ningún aminoácido aromático (Tyr, Trp y Phe). Esto posibilita una fuente proteica alternativa para los pacientes PKU, siempre y cuando se suplementen los demás aminoácidos aromáticos que no son Phe⁽⁸⁰⁾. Por otro lado, las concentraciones de aminoácidos neutros de cadena larga (LNAA: isoleucina y treonina), son de dos a tres veces superiores en el GMP, comparado con otras proteínas de la dieta⁽⁸¹⁾. Gracias a las altas concentraciones sanguíneas alcanzadas de LNAA con la ingesta de GMP, se ha demostrado en

estudios en modelos con ratones PKU, que la GMP no sólo disminuye los niveles de Phe en sangre, sino también en gran medida en el tejido cerebral, debido probablemente a la inhibición competitiva del transporte de Phe a través de la barrera hematoencefálica que consiguen los LNAA⁽⁸²⁾.

Pero la ventajas más notorias del GMP se derivan de su estabilidad con el calor, su solubilidad en medio ácido, y la posibilidad de presentarse como gel o espuma⁽⁸¹⁾. Todo ello permite que puedan realizarse una gran variedad de alimentos y bebidas, con el objetivo de mejorar el sabor y la variedad en la dieta de los PKU. En un estudio reciente realizado con 11 pacientes PKU, la dieta con GMP fue preferida a la dieta con mezcla de aminoácidos⁽⁸³⁾. La importancia de este hecho radica en que esta proteína puede ayudar a mejorar el cumplimiento dietético durante la adolescencia y la edad adulta, momentos en los que ésta se sabe que es más difícil. La mejoría en el cumplimiento terapéutico más allá de la infancia, evita el deterioro neuropsicológico que se produce con el abandono de la dieta a estas edades, así como puede ayudar a evitar las consecuencias sobre el feto de la PKU materna.

2.5.2.3. AMINOÁCIDOS NEUTROS DE CADENA LARGA (LNAA)

Los LNAA son la Phe, Tyr, Trp, treonina (Thr), metionina, valina, isoleucina, leucina e histidina. En los individuos sanos, todos estos aminoácidos, salvo la Tyr, son esenciales. En los pacientes PKU, debido al stop en la transformación de Phe en Tyr, la Tyr también es un aminoácido esencial.

El tratamiento con LNAA surgió como una alternativa a la restricción de Phe ya en el año 1953⁽⁸⁴⁾, basándose inicialmente en la competición de estos aminoácidos con la Phe por el transportador en el intestino y/o en la barrera hematoencefálica.

Con el tiempo los objetivos del tratamiento con LNAA se han ido extendiendo:

- La reducción de los niveles cerebrales de Phe^(84,85), por el mecanismo previamente mencionado de competición del resto de aminoácidos LNAA con la Phe por el transportador a través de la barrera hematoencefálica
- La reducción de los niveles sanguíneos de Phe⁽⁸⁶⁾: el transporte de los LNAA no sólo ocurre a través de la barrera hematoencefálica, sino también a nivel de la barrera intestinal. En un estudio realizado en 2006 se demostró una reducción superior al 50% en los niveles sanguíneos de Phe en 11 adultos que recibieron suplementos de LNAA de 0,5-1 g/kg/día⁽⁸⁷⁾. Además, si la reducción de la absorción intestinal de Phe es la que explica en este caso la reducción de los niveles sanguíneos de Phe, la suplementación con Thr a 50 mg/kg sería suficiente para reducir un 20-50% la concentración sanguínea de Phe⁽⁸⁷⁾. No obstante, de momento ninguno de los estudios llevados a cabo con LNAA han cuantificado la cantidad de proteínas naturales y totales ingeridas por los pacientes participantes en los mismos, lo que limita su utilización en la práctica clínica en la actualidad.
- El aumento de la síntesis cerebral de neurotransmisores: las concentraciones elevadas de Phe en sangre producen un descenso en la concentración de neurotransmisores (explicado ya en el apartado de la etiopatogenia de la PKU). En los pacientes con dietas no restrictivas en proteínas naturales, la suplementación con Tyr y Trp mejora el metabolismo de los neurotransmisores^(88,89), sugiriéndose así que el tratamiento clásico podría ser sustituido por una combinación de Tyr y Trp. Sin embargo, estudios posteriores con suplementación con dosis altas de Tyr y su metabolito L-dopa, no encontraron resultados positivos en este sentido^(90,91).
- Elevación a nivel cerebral de las concentraciones de LNAA exceptuando la Phe⁽⁹²⁾, esta hipótesis se basa en la importancia que tiene para el metabolismo proteico cerebral, mantener adecuadas concentraciones de LNAA, en vez de basarse en el descenso de la concentración de Phe cerebral. Según esta teoría, al suplementar con LNAA, dado que comparten el mismo sistema de transporte que la Phe para entrar en el cerebro, además de conseguirse una menor

concentración cerebral de Phe, se consigue fundamentalmente, aumentar la llegada de LNAA al cerebro, mejorando así el metabolismo proteico cerebral.

El tratamiento con LNAA es una alternativa al tratamiento dietético convencional en los PKU. Existen dos estrategias terapéuticas en el uso de los LNAA. Por un lado una dieta con ingesta de proteínas naturales siguiendo las RDA y suplementada con LNAA; y por otro lado, la terapia convencional (restrictiva en proteínas naturales) combinada con suplementos de LNAA. Existen además otras variantes en las que la suplementación se hace con un único aminoácido LNAA, como la Tyr, el Trp o la Thr, basándose cada una de ellas en las diferentes teorías sobre la utilidad de los LNAA expuestas previamente.

2.5.2.4. FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL)

La PAL es una enzima de origen vegetal, capaz de degradar la Phe (sin sintetizar Tyr), pero es más estable que la PAH y no requiere de ningún cofactor. La PAL pegilada (PEG-PAL), es una nueva formulación de PAH que está siendo sometida en la actualidad a varios ensayos clínicos. Recientemente, en ratones PKU, la PEG-PAL administrada por vía oral mostró resultados prometedores con una reducción media de los niveles sanguíneos de Phe del 40%, sin efectos secundarios importantes⁽⁹³⁾. Por ello, aunque está todavía en estudio, la terapia con PAL oral podría ser un tratamiento útil en los pacientes PKU, probablemente de forma conjunta con la dieta, independientemente del genotipo de la PAH.

2.6. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES PKU

2.6.1 MONITORIZACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE Phe

Existe un acuerdo generalizado sobre la necesidad de realizar una monitorización rigurosa de los niveles de Phe y más frecuente en los niños de menor edad, pero las recomendaciones sobre las concentraciones objetivo de Phe difieren a veces entre los diferentes Centros^(40,94,95). (Tabla 1).

En un estudio llevado a cabo con pacientes PKU diagnosticados precozmente por cribado neonatal⁽⁹⁶⁾ se demostró un descenso gradual en el coeficiente intelectual (CI) en relación con aumentos progresivos de la Phe sanguínea en los primeros cuatro años de vida. Sugieren la importancia de mantener los niveles sanguíneos de Phe por debajo de 360 $\mu\text{mol/L}$ en los primeros años de vida. Niveles medios de Phe sanguínea de 650 $\mu\text{mol/L}$, resultaron en un descenso de 11 puntos del CI.

El efecto producido por la Phe en el cerebro no es solamente consecuencia de niveles elevados de Phe de forma constante, sino que también refleja la variabilidad en la Phe sanguínea, que puede afectar a la función cognitiva. Esta variabilidad, puede estar relacionada no solo con la ingesta de Phe, sino también con la distribución del sustitutivo proteico a lo largo del día⁽⁹⁷⁾.

Con respecto a los adolescentes y adultos, hay evidencia de que algunas alteraciones neuropsicológicas pueden aparecer si no se controlan bien los niveles de Phe a estas edades^(98,99). La elevación permanente de los niveles de Phe puede producir déficits en funciones ejecutivas, velocidad de procesamiento mental y control motor fino. Las anomalías neurológicas como el temblor y la espasticidad, así como problemas de tipo psiquiátrico/emocional, pueden también presentarse.

Edad	Australia	Suiza	Reino Unido	USA	Hungría	Alemania	Turquía	Francia	Japón
0-2 a	<350	<300	<360	<360	<360	<240	<240	<300	<240
3-6 a		<400							<360
7-9 a			<480		<480				
10-12 a	<450	<600				<900	<600	<600	<480
13-15 a			<700	<600				<900	<600
>16 a				<900	<600 (<14 a)	<1200	<900	<1200	<900

Tabla 1. Límites superiores de las concentraciones objetivo de Phe ($\mu\text{mol/L}$)

recomendada para el tratamiento de PKU en diferentes países⁽⁴⁰⁾. a: años.

2.6.2. FRECUENCIA DE LA MONITORIZACIÓN DE LA Phe SANGUÍNEA

La interpretación de un valor puntual de Phe sanguínea no es siempre reflejo del control metabólico de un paciente dado. Algunos factores como las infecciones, las variaciones inter- e intradiarias en las concentraciones sanguíneas de Phe, la ingesta energética, la dosis y distribución a lo largo del día del sustitutivo proteico, la ingesta de proteínas naturales y la velocidad de crecimiento, pueden afectar a la interpretación de los resultados^(99,100). Las guías británicas⁽⁵⁴⁾ recomiendan que la Phe sea monitorizada al menos una vez a la semana hasta los 4 años de edad, bisemanalmente hasta los 10 años y mensualmente desde los 10 años en adelante. Así mismo, dichas guías indican que la recogida de la muestra sanguínea sea a primera hora de la mañana, en ayunas, que es el momento en el que se alcanza el pico plasmático de Phe.

La muestra de sangre se recoge habitualmente en el papel absorbente, y se realiza en plasma cuando se deseen conocer los niveles de otros aminoácidos, como Tyr (al menos 2 veces por año).

2.6.3 MONITORIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE Tyr

Los valores de referencia para las concentraciones plasmáticas de Tyr varían entre 35 y 102 $\mu\text{mol/L}$ para los diferentes grupos de edad y sexo, medidos a primera hora de la mañana tras ayuno nocturno⁽¹⁰¹⁾. Desde los comienzos del tratamiento de la PKU en 1954, se ha añadido Tyr a los sustitutivos proteicos en una concentración igual a la Tyr contenida en la leche materna⁽⁵⁾. Esta suplementación con Tyr aminora o incluso evita los síntomas relacionados con el déficit de atención e hiperactividad y la depresión en esta población^(102,103).

Los estudios realizados en los marcadores bioquímicos asociados con trastornos de las habilidades cognitivas, en niños con PKU diagnosticada y tratada

precozmente, siguen centrados en la Phe de forma exclusiva, pese a que hay datos experimentales que demuestran que una ratio Phe/Tyr elevada se asocia más con estas alteraciones que los niveles de Phe por sí solos. Una ratio Phe/Tyr elevada se cree es nociva para las funciones cerebrales porque conduce a una reducción de la síntesis de dopamina cerebral⁽¹⁰⁴⁾.

2.7. COMPLICACIONES DE LA FENILCETONURIA

2.7.1 NEUROLÓGICAS/NEUROPSIQUIÁTRICAS

Los adultos con PKU que fueron tratados desde la infancia temprana, tienen una inteligencia normal, pero sus puntuaciones en los test neuropsicológicos son inferiores a los de la población general, sus padres y sus hermanos no afectados de PKU⁽¹⁰⁵⁾. Algunas funciones neurológicas, como la velocidad motora, el lenguaje y algunos aspectos de la memoria se desarrollan con normalidad en los pacientes PKU tratados. Sin embargo, funciones como el razonamiento abstracto, funciones ejecutivas y la atención, han sido identificadas como áreas más débiles en estos pacientes⁽¹⁰⁶⁾.

Se ha demostrado que pacientes PKU adultos que seguían el tratamiento dietético de forma continuada, pero que habían relajado su dieta, presentaban anomalías en la sustancia blanca visibles en la resonancia magnética (RM)^(107,108), que se consideran secundarias a una reducción de la mielina⁽¹⁰⁹⁾. Estas anomalías desaparecen al reintroducir una dieta estricta. La hipótesis que puede explicar estos hechos consistiría en que las concentraciones elevadas de Phe influyen negativamente en la síntesis de Phe y en su mantenimiento; lo que Joseph y Dyer pudieron demostrar en ratones⁽¹¹⁰⁾.

Investigaciones neurológicas llevadas a cabo en adultos PKU tratados precozmente en la infancia, pero que en la vida adulta han suspendido la dieta, revelan una incidencia elevada de signos neurológicos menores, incluido el temblor, reflejos osteotendinosos exaltados y coordinación motora torpe^(109,111). Son raros los casos en los que el deterioro neurológico es muy severo tras interrumpir la dieta,

pero puede ocurrir⁽¹¹²⁾; siendo los síntomas muy similares a los que aparecen en los PKU no tratados (paresia espástica, epilepsia, ataxia, temblor...).

2.7.2 PROBLEMAS PSICOLÓGICOS

Se han publicado casos de pacientes adultos con inteligencia normal, que tras suspender la dieta restrictiva en Phe, desarrollaron problemas psiquiátricos/psicológicos, incluyendo depresión, ansiedad, aislamiento social, agorafobia, baja autoestima, comportamiento neurótico y otras fobias^(112,113).

Los niveles elevados de Phe en sangre producen alteraciones en la neurotransmisión, al ocasionar un déficit tanto de serotonina como de dopamina. Se ha demostrado una mejoría clínica en individuos PKU deprimidos tratados con LNAA⁽¹¹⁴⁾.

2.7.3 DÉFICITS VITAMÍNICOS

Los individuos PKU que han abandonado la dieta restrictiva en Phe y ya no toman los sustitutivos proteicos, suelen seguir una dieta en la que por hábito previo toman menos productos proteicos, como los productos de origen animal. Esto lleva a que presenten más predisposición a déficit de vitamina B₁₂, B₆, ácido fólico y hierro⁽¹¹⁵⁾. El déficit vitamínico de B₁₂ es el más frecuente.

La vitamina B₁₂ no está implicada en el catabolismo de la Phe, ni el metabolismo de la B₁₂ se ve afectado por niveles elevados de Phe sanguínea. Pero la principal fuente de vitamina B₁₂ son los huevos, la carne, el pescado, la leche y los derivados lácteos; todos ellos alimentos ricos en proteínas, y por lo tanto, evitados por los pacientes PKU. Por ello, como se ha expuesto previamente, si los pacientes no toman los sustitutivos proteicos, que están enriquecidos con vitaminas y oligoelementos, presentarán un déficit carencial de los mismos; lo que ocurre con mucha menos frecuencia en los pacientes que llevan una dieta menos estricta pero siguen tomando los sustitutivos proteicos o los pacientes que continúan con la dieta estricta⁽¹¹⁶⁾.

Para prevenir el déficit de B₁₂ en estos pacientes, es importante que aquellos que estén siguiendo una dieta restrictiva en proteínas naturales tomen suplementos de vitamina B₁₂. En el caso de que tomen los sustitutivos proteicos, esta suplementación no sería necesaria por ir ya incluida en el producto.

El déficit de B₁₂ puede cursar con un amplio abanico de síntomas como neuropatía, degeneración subaguda combinada medular, glositis, anemia megaloblástica, demencia y alteraciones psiquiátricas como la depresión y trastornos psicóticos⁽¹¹⁶⁾. Las manifestaciones clínicas del déficit de B₁₂ aparecen generalmente años después del comienzo de una ingesta inadecuada de la misma⁽¹¹⁷⁾.

Los niveles séricos de B₁₂ se correlacionan mal con el déficit de B₁₂ en los tejidos. Y dado que el déficit de B₁₂ se asocia con frecuencia al déficit de hierro en los pacientes PKU, los parámetros hematológicos como el volumen corpuscular medio (VCM) de la hemoglobina, no son buenos indicadores en este caso. Lo recomendable es monitorizar el metilmalónico en plasma u orina, junto con la homocisteína total plasmática, que se encuentran elevados en los estados carenciales de B₁₂ (Figura 6).

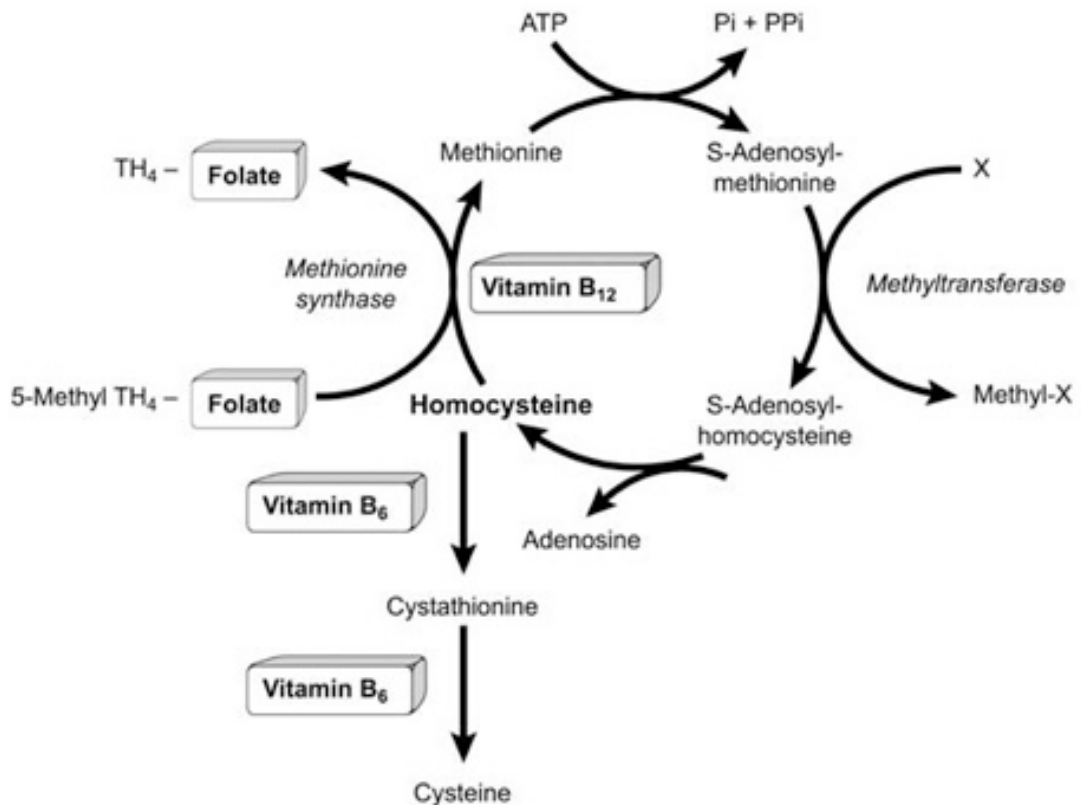


Figura 6. Metabolismo de la Vitamina B₁₂

2.7.4 DÉFICIT DE Phe

Hanley publicó hace años los síntomas secundarios al déficit de Phe⁽¹¹⁸⁾. Entre ellos describía letargia, anorexia, alopecia, rash perianal, etc y aminoaciduria generalizada. Los dos grupos de pacientes PKU con mayor riesgo de presentar déficit de Phe, son los niños pequeños y las embarazadas. En los niños de menor edad puede suceder que rechacen los suplementos proteicos por su mal sabor, quedándose así sin fuente de Phe. Y en el caso de las embarazadas, sobre todo en el tercer trimestre, al metabolizar el hígado fetal la Phe materna y a su vez, aumentar los requerimientos de Phe por parte del feto, pueden quedarse bajo mínimos sus niveles sanguíneos de Phe.

2.8.FENILCETONURIA MATERNA

Para las mujeres PKU o con HPA, que planeen quedarse embarazadas, la

dieta restrictiva en Phe es imprescindible, debido al efecto teratogénico de la Phe materna en el feto, causando el Síndrome de fenilcetonuria materna (SPKUM) o embriopatía por PKU. Este se caracteriza por: retraso mental, dificultades del aprendizaje, dismorfias faciales, microcefalia, retraso del crecimiento intrauterino, y malformaciones cardíacas^(119,120). Menos frecuente: fisura palatina, atresia de esófago, malrotación intestinal, extrofia vesical, defectos oculares. Hay mayor número de abortos espontáneos.

La sintomatología clínica es debida a que la fenilalanina, con un gradiente activo a través de la placenta de 1:1.7 a 2, compite por el transporte placentario de otros aminoácidos neutros de alto peso molecular y afecta al desarrollo fetal por mecanismos patogénicos desconocidos, aunque existe una hipótesis de que pudiera ser el mismo que el del alcohol en el síndrome alcohol fetal.

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

Se aconseja que el rango óptimo de control de Phe en la madre se mantenga entre 100-240 $\mu\text{mol/L}$ desde 3 meses antes de la concepción y durante toda la gestación si la determinación se hace por la mañana en ayunas (Tabla 2). Con ello la prevención del SPKUM es muy seguro, aunque siempre persiste un riesgo ligeramente mayor que en la embarazada sin hiperfenilalaninemia.

Trimestre	Phe	Tyr	Proteínas	Calorías
Edad (años)	(mg/día)	(mg/día)	(g/día)	(Kcal/día)
1°				
15-19	200-600	5,7-7,5	>75	2.500
>19	200-600	4,5-7.0	>70	2.500
2°				
15-19	200-900	5,7-7,5	>75	2500
>19	200-900	4,5-7	>70	2500
3°				
15-19	300-1200	5,7-7,5	>75	2500
>19	300-1200	4,5-7	>70	2500

Tabla 2. Recomendaciones diarias de nutrientes en PKU materna.

2.9. CRECIMIENTO

Un crecimiento dentro de los percentiles normales para la edad es una de las principales preocupaciones y un punto importante a monitorizar, en el seguimiento de los pacientes PKU. En la literatura, en proporción a otros aspectos de esta enfermedad, la población de pacientes PKU ha sido poco estudiada con respecto al crecimiento a largo plazo¹²¹.

En general, todos los estudios publicados hasta la actualidad sobre el crecimiento en los pacientes PKU, son muy heterogéneos, la mayoría coinciden en señalar que los pacientes PKU tienden a presentar menor perímetro craneal (PC) y/o talla, y/o aumento del peso corporal aunque existe variabilidad de resultados con respecto a este tema en los estudios publicados¹²²⁻¹²⁵.

Algunos estudios han demostrado que existe un retraso de crecimiento transitorio en niños PKU en los primeros años de vida, fundamentalmente desde el nacimiento hasta los 3-5 años⁽¹²²⁻¹²⁴⁾. Las causas que se han propuesto para explicar este fenómeno han estado centradas en las bajas concentraciones sanguíneas de Phe, déficit de Tyr o la ingesta deficiente de proteínas totales. Las dos primeras posibles causas, no han sido demostradas⁽¹²⁴⁾. En teoría, la conclusión de que la ingesta de proteínas totales no se relaciona con el crecimiento, no excluye la posibilidad de la relación entre crecimiento y la baja ingesta de proteínas naturales, que es lo que ocurre en los pacientes PKU. En este sentido, un estudio reciente⁽¹²⁵⁾ que compara el crecimiento a largo plazo de pacientes PKU con dieta restrictiva frente a pacientes tratados con BH4 (mayor ingesta de proteínas naturales), no encuentran diferencias entre ambos grupos, lo que indicaría que una mayor ingesta de proteínas naturales, al contrario de lo que cabría pensar, no mejora el crecimiento en los pacientes PKU.

Otros estudios como el de Acosta y cols demuestran que los pacientes PKU sometidos a tratamiento dietético, de entre 2 y 13 años, presentaron un crecimiento lineal normal⁽¹²⁶⁾. E igualmente un estudio reciente de Bélanger-Quintana⁽¹²⁷⁾ revela que el crecimiento y desarrollo físico puede ser normal en los pacientes PKU.

En lo que respecta al PC, se sabe que en niños no PKU con bajo peso, su crecimiento se correlaciona positivamente con la ingesta de proteínas naturales, en mayor medida que la talla y el peso⁽¹²⁸⁾. En realidad el PC, sobre todo en el primer año de vida, es un indicador del crecimiento cerebral. De hecho, se conoce la correlación entre microcefalia en niños y el desarrollo de retraso mental⁽¹²⁹⁾. Es por ello, que dado que el desarrollo neurológico de los pacientes PKU no es todavía igual al de los individuos sanos, el crecimiento del PC en los niños PKU debe ser monitorizado estrechamente y debe ser optimizado con el fin de alcanzar el máximo CI.

Los pacientes PKU, en varios estudios tienden a presentar sobrepeso, sobre todo en EEUU. El fenómeno del rebote del Índice de Masa Corporal (IMC), que consiste en un rebote en el IMC en torno a los 6 años, ha sido descrito en la población general como un predictor de sobrepeso u obesidad posterior⁽¹³⁰⁾. Este mismo fenómeno se aplica también en los niños PKU⁽¹³¹⁾.

El estudio de Bélanger-Quintana observó así mismo, una ganancia excesiva de peso tras la pubertad en los pacientes con los fenotipos más graves⁽¹²⁷⁾. Por otro lado, existen varias publicaciones que describen cómo este sobrepeso puede aparecer ya en la infancia, al describir como los niños PKU pesan más que los niños sanos⁽¹³¹⁻¹³³⁾. Esta predisposición a ganar más peso en los PKU se ha asociado con una alteración en su composición corporal (pocas proteínas corporales, es decir, poca masa muscular), lo que resulta en una reducción del consumo metabólico basal⁽¹³³⁾. Sin embargo, más recientemente, Huemer y cols, tras estudiar el crecimiento y composición corporal de niños con PKU clásica, demostraron que el porcentaje de masa magra corporal estaba dentro del rango normal para la edad y sexo de cada paciente, pero demostraron, sin embargo, que existía una correlación significativa entre la masa magra y la cantidad de proteínas naturales ingeridas⁽¹³⁴⁾.

El sobrepeso en los pacientes PKU podría estar asociado con un cumplimiento terapéutico pobre⁽¹³⁵⁾. Los sustitutivos proteicos utilizados en EEUU habitualmente contienen más calorías que los utilizados en Europa, para el mismo

contenido proteico; lo que puede explicar la mayor tendencia al sobrepeso en los PKU estadounidenses.

Existen limitaciones importantes en el grueso de los estudios publicados. Esto es debido a que en los últimos años se han producido cambios en las prácticas dietéticas pautadas en estos pacientes, incluyendo sustitutivos proteicos más aceptables^(136,66). Por lo que, la evidencia actual sobre el crecimiento en los pacientes PKU está basada en prácticas dietéticas ya desfasadas. Como ejemplo de ello se encuentra la atención que en la actualidad se presta a los micronutrientes, lo que puede influir de forma positiva en el desarrollo físico⁽¹³⁷⁾. Además, muchos de los estudios fueron llevados a cabo en países muy diferentes y por lo tanto, con diferente acceso a los sustitutivos proteicos, diferentes características culturales y diferentes sistemas sanitarios (por ejemplo, el reembolso o no del precio de los sustitutivos proteicos, etc)⁽¹³⁸⁾.

2.10. ENFERMEDAD MINERAL ÓSEA (EMO) EN LA FENILCETONURIA: OSTEOPENIA Y OSTEOPOROSIS

Varios autores han demostrado que la incidencia de baja mineralización ósea y fracturas es alta entre los pacientes PKU⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾.

2.10.1 DEFINICIÓN Y FISIOPATOLOGÍA DE LA EMO

La osteopenia se define operativamente como la densidad ósea (DMO) que disminuye entre 1-2,5 desviaciones estándar (DE) por debajo de la media del adulto joven (T score). En la osteoporosis, la DMO es $> -2,5$ DE (T score), y se caracteriza por una resistencia ósea baja que predispone a un mayor riesgo de fracturas, reflejando la resistencia del hueso la integración entre las variables cantidad y calidad ósea⁽¹⁴²⁾. Mientras que la cantidad de hueso depende directamente de su DMO, la calidad del mismo depende de variables tales como la composición química de los materiales orgánicos e inorgánicos que componen su matriz y de cómo se produce la estructuración espacial de dichos materiales, factores todos ellos dependientes del remodelado óseo.

Fisiopatología:

-Descenso de la masa ósea: el tejido óseo aumenta durante el desarrollo hasta alcanzar su máximo entre los 20 y 30 años de edad. La cantidad máxima o pico de masa ósea que cada individuo llega a acumular, así como la velocidad de pérdida ósea están determinadas genéticamente. Se sabe que este condicionamiento genético explica aproximadamente el 80% del capital óseo de una persona en condiciones habituales^(143,144). Determinados factores externos pueden incrementar o frenar la pérdida ósea; aceleran la pérdida ósea el sedentarismo, la dieta pobre en calcio, el alcohol, el tabaco, los corticoides, síndromes malabsortivos y ciertos trastornos endocrinos (hipogonadismo, hipercortisolismo, hipertiroidismo e hiperparatiroidismo).

-Deterioro de la microarquitectura ósea: cuando la reabsorción ósea supera a la formación, se produce un balance negativo en el ciclo del remodelado óseo, llevando a la osteopenia. Además, la destrucción osteoclástica puede llegar a romper conexiones trabeculares, lo que altera la microestructura del hueso y origina una reducción de la resistencia mecánica al quedar líneas de fuerza del hueso desprovistas de elementos de resistencia mecánica^(145,146).

2.10.2. EMO Y FENILCETONURIA

Varios factores pueden contribuir a la disminución de la DMO en los individuos PKU. Entre ellos se encuentra la restricción prolongada de proteínas naturales, lo que conlleva un escaso aporte de los minerales calcio (Ca) y fósforo (P), vitaminas (vitamina D) y oligoelementos; así como la ingesta insuficiente de los sustitutivos proteicos, las variaciones en las concentraciones plasmáticas de Phe con escaso cumplimiento terapéutico, los niveles de Phe por encima de 1200 $\mu\text{mol/L}$ y la escasa actividad física⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾. La insuficiente ingesta de ácidos grasos de la serie n-3, en especial LCPUFA, cuya procedencia fundamental es el pescado, puede jugar un papel importante en el desarrollo de osteopenia en estos pacientes⁽¹⁵⁰⁾. Es probable que existan factores genéticos ligados a la propia enfermedad que juegan un papel importante en el desarrollo de EMO en estos pacientes, al condicionar cambios en el remodelado óseo. Este punto se vería reforzado por el fuerte componente genético que se sabe subyace al desarrollo de osteoporosis^(151,152).

Si bien se ha demostrado que el aumento del contenido mineral óseo (CMO) del radio es normal hasta los 8 años de vida; después de esta edad, el CMO disminuye progresivamente. El aspecto clave en cualquier caso, es que el pico de masa ósea alcanzado en estos pacientes es menor⁽¹⁴⁷⁾, así como también es menor la densidad mineral ósea^(148,153,154). Todo ello condiciona un mayor riesgo de fracturas y de desarrollo de osteoporosis en la edad adulta, generándoles una clara disminución de la calidad de vida y altos costes económicos.

Sería fundamental conocer la fisiopatología del desarrollo de osteopenia en estos pacientes, averiguando el peso específico de los diferentes factores que, como se ha expuesto previamente, pueden influir en ella (dieta exenta en proteínas naturales, mal control dietético con niveles fluctuantes de Phe, escasa actividad física, factores genéticos ligados a la propia enfermedad, etc), lo que ayudaría a la adopción de medidas encaminadas a la prevención de la osteopenia en estos pacientes.

Independientemente del agente causal, parece que en los pacientes con PKU existe desde la infancia un aumento marcado en la resorción ósea⁽¹⁵¹⁾, sumándose en la edad adulta una disminución de la formación de hueso, contribuyendo ambos factores al desarrollo de osteopenia⁽¹⁴⁰⁾.

2.10.3 DIAGNÓSTICO DE LA EMO

Aunque existe un acuerdo general con respecto a la necesidad de evaluar el estado mineral óseo en pacientes PKU, la puesta en marcha de dicha evaluación difiere entre los distintos centros. En el estudio llevado a cabo por van Spronsen⁽¹⁵⁵⁾, sólo uno de los 14 centros encuestados, evaluaban la DMO en niños por debajo de los 10 años de edad. En los pacientes de más edad la frecuencia de estas determinaciones era mayor, pero no se realizaba de todas formas en el 50% de los centros para individuos entre 10 y 16 años y en el 41% para pacientes de más edad. No hay dudas sin embargo, de la importancia de evaluar el estado mineral óseo, así como, la composición corporal de los pacientes PKU.

En lo que existe todavía controversia es en la elección de la mejor herramienta para monitorizar el estado óseo en estos pacientes:

2.10.3.1 DENSITOMETRÍA ÓSEA

La absorcitometría de doble haz de rayos x (densitometría, DEXA) determina la masa de mineral de una región esquelética seleccionada, tanto de forma absoluta (CMO), como relativo a su superficie de proyección (DMO). Se trata de la técnica

“gold standard” de medición de la DMO, por su baja exposición a radiación, razonable precisión, reproducibilidad y coste relativamente bajo; además, también es útil para monitorizar la respuesta terapéutica. Sin embargo, la clasificación de la OMS tiene una aplicabilidad limitada en los menores de 20 años porque todavía no han alcanzado el pico de masa ósea⁽¹⁵⁶⁾, y además define la osteopenia en función del grado de desviación con respecto a la normalidad de la DMO de un paciente adulto joven (puntuación T)⁽¹⁵⁷⁾. En su lugar debería utilizarse la puntuación Z, que compara la DMO con la masa ósea media de la población de la misma edad y sexo del paciente. Además, el diagnóstico de osteoporosis en la infancia no debería basarse de forma exclusiva en parámetros densitométricos, ya que el valor de la DMO para predecir fracturas en esta edad no está claro⁽¹⁵⁸⁾.

Las limitaciones fundamentales de la DEXA en la edad pediátrica se deberían por un lado, a la ya citada ausencia de bases de datos disponibles que actúen como estándares fiables; la ausencia de correlación entre los datos aportados por la DEXA y su significación clínica^(159,160); así como, las dificultades añadidas a la hora de interpretar los resultados de la DEXA teniendo en cuenta las variaciones óseas y de la composición corporal secundarias al crecimiento. Otro punto débil de la técnica, independiente de la edad del paciente, es que la determinación de la DMO usando la DEXA se basa en una medición bidimensional de una estructura tridimensional. De este modo, los resultados obtenidos dependen no sólo del hueso (tamaño, volumen y densidad), sino también de la cantidad y distribución de las partes blandas que lo rodean⁽¹⁶¹⁾. Por otro lado, la DEXA tiene un valor escaso a la hora de evaluar la resistencia ósea, no siendo capaz de predecir de forma exacta el riesgo de fractura⁽¹⁶²⁾.

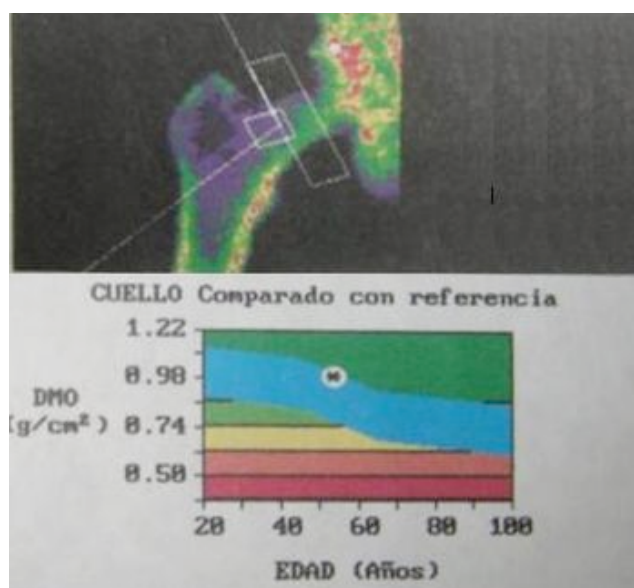


Figura 7. Ejemplo de densitometría de cuello de fémur

2.10.3.2 ULTRASONOGRAFÍA CUANTITATIVA (QUS)

Varios estudios han mostrado que la QUS puede reflejar no sólo características cuantitativas del hueso (DMO), sino también sus propiedades cualitativas como la elasticidad, estructura y microarquitectura, que están estrechamente relacionadas con la resistencia ósea⁽¹⁶³⁾. De este modo, los datos obtenidos de la QUS pueden ser utilizados como factor de riesgo independiente de fracturas⁽¹⁶⁴⁾. Se ha demostrado que la combinación de DEXA y QUS es un predictor de riesgo de fracturas más sensible que el empleo de dichas técnicas de forma individualizada⁽¹⁶⁵⁾. Existen diferentes aparatos que realizan QUS; en general la QUS del talón ha sido la testada con más frecuencia y la que ha demostrado mayor efectividad.

Pese a las ventajas evidentes de la ultrasonografía, como la ausencia de radiación ionizante, su bajo coste y su fácil transporte, todavía existen dificultades a la hora de garantizar la exactitud y precisión de esta técnica.

2.10.3.3 TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA CUANTITATIVA (Q-TC)

Es la única técnica no invasiva que mide en tres dimensiones la verdadera densidad volumétrica (mg/cm^3); además es capaz de diferenciar entre hueso trabecular y cortical, por lo que facilita la evaluación de la respuesta de cada uno de estos subtipos tisulares al tratamiento^(162,166). Sin embargo, esta técnica es de difícil aplicación en la práctica clínica, dado su elevado coste y alta irradiación para el paciente.

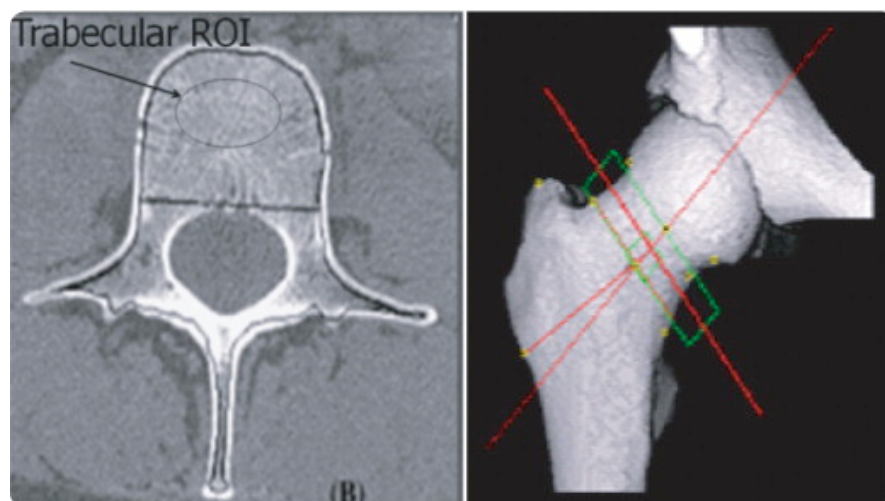


Figura 8. Ejemplo de Q-TC vertebral y de cuello de fémur

2.10.3.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

Los marcadores de remodelado óseo (MRO) son los niveles plasmáticos y urinarios de los productos generados durante el proceso metabólico óseo, se emplean para la valoración y seguimiento de las osteopenia y osteoporosis, ya que informan de la actividad biológica ósea. El hueso se compone de mineral (cristales de hidroxiapatita) y matriz ósea u osteoide (fibras de colágeno tipo I, en el que abundan la glicina e hidroxiprolina (OH-P), con enlaces que actúan como puentes intermoleculares de piridinolina (Pir); y proteínas no colágenas, siendo la osteocalcina (OC) la más abundante.

La utilidad de los MRO para identificar la osteoporosis secundaria, como sería en el caso de los pacientes PKU, es poco conocida, ya que estos marcadores se han validado fundamentalmente para su empleo en el diagnóstico y monitorización terapéutica de la osteopenia/osteoporosis primaria⁽¹⁶⁷⁾. Los niveles de MRO están elevados en algunas EMO (como la enfermedad de Paget y la osteomalacia), trastornos endocrinos (tirototoxicosis, hiperparatiroidismo primario) y en enfermedades malignas que afectan al hueso (mieloma múltiple, etc). Niveles bajos de MRO se pueden encontrar en la osteoporosis inducida por corticoides.

2.10.3.4.1 MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

Son productos derivados directa o indirectamente, de la actividad de los osteoblastos, se expresan durante diferentes fases de su actividad y consecuentemente, los diferentes marcadores de formación ósea reflejan diferentes aspectos de la actividad osteoblástica:

- **FOSFATASA ALCALINA (FA):** es una glicoproteína que circula en suero y cuya actividad comprende varias isoformas que se originan en diferentes tejidos (hígado, hueso, bazo, intestino, riñones, placenta o por expresión de tumores), siendo las dos fracciones mayoritarias la ósea y la hepática^(168,169). En condiciones normales, los niveles sanguíneos de fosfatasa alcalina ósea (FAO) corresponden a sólo el 40% de FA; en niños y adolescentes la isoenzima predominante es la FAO que puede alcanzar un nivel entre 70 y 90% de la FA⁽¹⁶⁸⁾. La FA es un marcador inespecífico de hueso, pues la actividad poblacional sérica presenta una variación mayor que la intraindividual, por lo que no es posible detectar fallos menores en su concentración. Por su fácil realización y bajo costo se continúa utilizando para evaluar cambios en el remodelamiento óseo en sujetos con función hepática normal.

-**FAO:** se eleva durante la infancia y adolescencia; actualmente las técnicas inmunológicas permiten su determinación, si bien tiene una reactividad cruzada del 15-20% con la isoenzima hepática, por lo que en pacientes con hepatopatía podría ser difícil su interpretación. Su vida media es larga y su actividad poco

influenciada por las variaciones diurnas, lo que da fiabilidad a su determinación⁽¹⁷⁰⁾.

- El colágeno tipo I (Figura 9) es la principal proteína extracelular de la matriz ósea; y aunque no es específico del hueso, entre aquellos tejidos que lo contienen, el hueso es el que presenta más remodelamiento, por ello sus propéptidos reflejan la actividad total de formación ósea. Los osteoblastos secretan el precursor del colágeno tipo I (la molécula de procolágeno), en cuyos extremos están situados los péptidos de extensión: **propéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (PNP-1)** y propéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (PCP 1). Estos propéptidos son separados del procolágeno durante el proceso de formación ósea, siendo entonces liberados a la circulación⁽¹⁷¹⁾. El PNP-1 es de los dos propéptidos, el de más utilidad clínica⁽¹⁷¹⁾. La determinación de la concentración de PNP-1 total sufre variaciones circadianas y sesionales mínimas (aprox. 6%)^(172,173) mientras que la alimentación o dieta no influyen de forma reseñable sobre los niveles séricos analizados. La determinación es cuantitativa y se realiza en suero mediante un test inmunológico in vitro. El PCP-1 presenta poca especificidad y falta de respuesta en condiciones de bajo remodelado óseo⁽¹⁷⁴⁾.

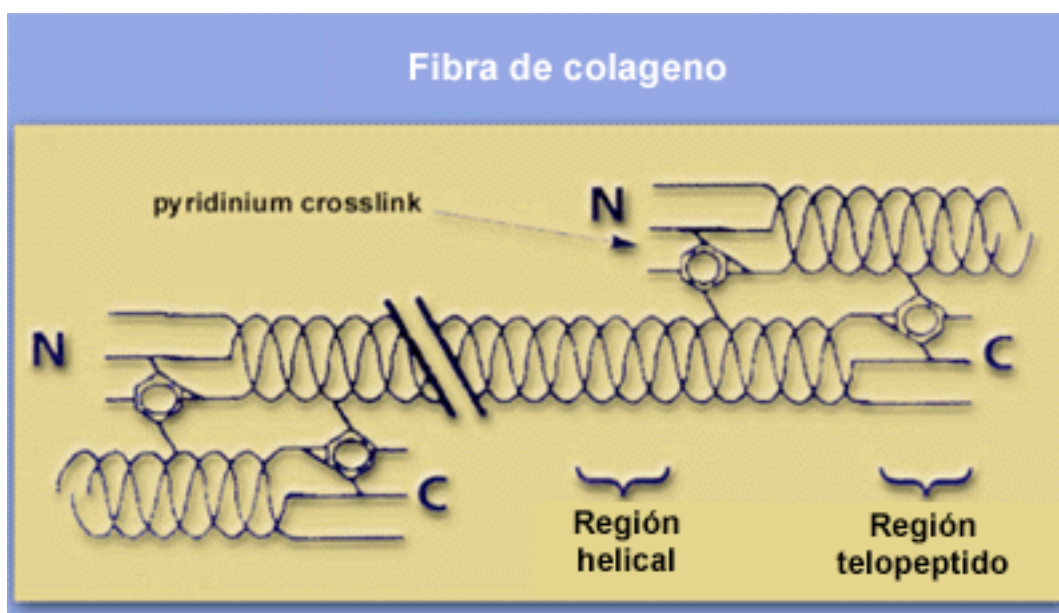


Figura 9. Colágeno tipo I

- **OSTEOCALCINA:** La OC es el constituyente proteico no colágeno más importante de la matriz ósea. Es sintetizada por los osteoblastos en los últimos estadios de la formación ósea como una molécula precursora, llamada pro-osteocalcina. La fracción propéptica se elimina de la molécula al mismo tiempo que la proteína carboxilada se vuelve al espacio extracelular, donde se une a la hidroxiapatita. Así, parte de la OC pasa a la circulación, donde es rápidamente degradada por el riñón. Su medición podría ser útil a la hora de predecir la masa ósea y el riesgo de fracturas⁽¹⁷⁵⁾.

2.10.3.4.2 MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

Son productos que se liberan al torrente sanguíneo y/o la orina cuando se produce la destrucción ósea.

- **CALCIO EN ORINA:** la determinación de Ca en orina de 24 horas tiene escasa sensibilidad y especificidad al estar influida por la dieta (ingesta de Ca, sodio, potasio y proteínas), así como la función renal; por lo que resulta más útil la determinación de la relación Ca/Cr en orina. Ésta tampoco alcanza demasiada especificidad y sensibilidad, pero como se trata de un marcador muy económico y accesible, se utiliza actualmente para detectar cambios en el remodelado óseo⁽¹⁶⁹⁾.
- **HIDROXIPROLINA EN ORINA:** La OH-P es un aminoácido que constituye el 10% del contenido del colágeno maduro. El 90% de la OH-P es liberada durante la degradación del colágeno tipo I, y tras ser metabolizada en hígado, es excretada por la orina. Su excreción es mayor en niños que en adultos y además puede estar influida por el contenido de carne o gelatina de la dieta, por lo que debe realizarse una dieta exenta de productos que la aporten durante las 48 horas previas a la recolección de la orina⁽¹⁷⁶⁾. Sólo el 10% de la OH-P proviene del colágeno tipo I degradado del hueso, ya que otras proteínas lo aportan, lo que determina que sea un marcador inespecífico para determinar la degradación de tejido óseo⁽¹⁷⁷⁾.

- **PIRIDINOLINAS:** Son estructuras cíclicas que participan en la estabilización de las fibras de colágeno I en el hueso. Existen dos formas: la Pir y la deoxipiridinolina (D-Pir) (Figura 10). Cuando el colágeno es degradado por osteoclastos, ambas se vuelcan a la circulación, y a diferencia de la OH-P, no sufren metabolización posterior y son excretadas directamente en la orina⁽¹⁶⁹⁾. La Pir está presente en el colágeno tipo II del cartílago y otros tejidos conectivos, mientras que la D-Pir se ubica casi exclusivamente en el hueso y dentina. Por ello la D-Pir urinaria es más específica como marcador de resorción ósea. Una ventaja de la D-Pir respecto a la determinación de OH-P es que no es necesaria una dieta previa a la toma de muestra⁽¹⁷⁶⁾.
- **FOSFATASA ÁCIDA TARTRATO RESISTENTE (TRAP):** Existen dos subtipos conocidos de TRAP: 5a y 5b; el 5a proviene de los osteoclastos. Los niveles de TRAP-5b representan el número y actividad de los osteoclastos, más que el nivel de degradación ósea, aún así su actividad en suero aumenta en las condiciones clínicas en que el remodelamiento óseo se encuentra aumentado⁽¹⁷⁷⁾ y un cambio en su concentración sérica se considera un índice específico de alteración aguda de la resorción ósea⁽¹⁷⁸⁾. En la actualidad existen inmunoensayos con anticuerpos monoclonales específicos para TRAP-5b.
- **TELOPÉPTIDOS AMINO (NTX) Y CARBOXILO (CTX) TERMINAL DEL COLÁGENO TIPO I:** Son los marcadores más sensibles y específicos de la resorción ósea. Aparecen en cantidades significativas tanto en sangre como en orina. La medición sérica proporciona una ventaja con respecto al ensayo en orina porque evita el efecto aditivo de la variabilidad biológica de la excreción de creatinina urinaria⁽¹⁷⁹⁾. El CTX (Figura 10) a su vez, puede presentarse en dos formas: α -CTX, que corresponde a hueso degradado de menor edad biológica y β -CTX (también llamado beta-crosslaps), de hueso degradado más antiguo.

En la región telopeptídica C-terminal se produce por acción enzimática otro telopéptido denominado anteriormente ICTP, en la actualidad CTX-MMP. Este fue el primer marcador de resorción evaluado en suero, pero es menos

sensible y específico que NTX y CTX para evaluar cambios en el remodelado óseo inducidos por osteoporosis.

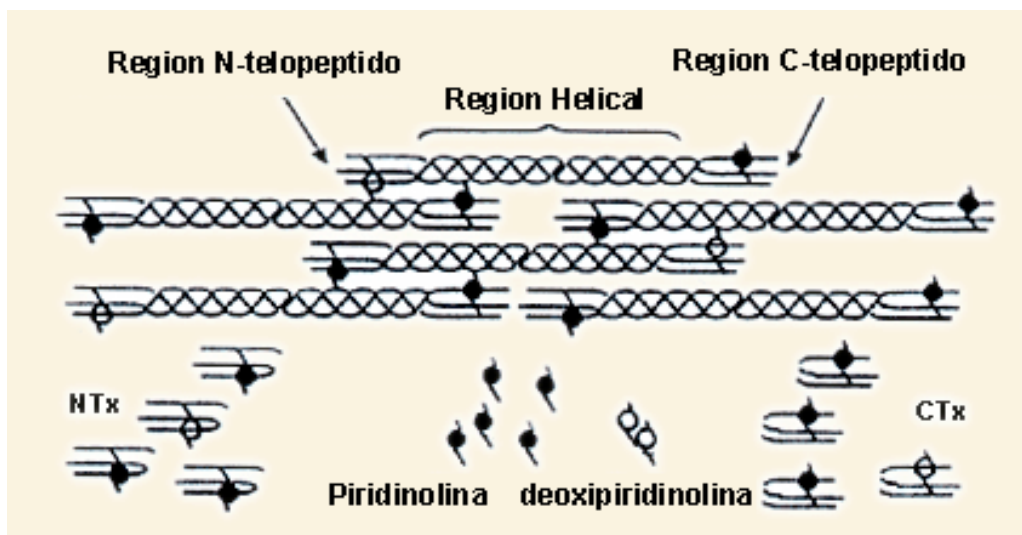


Figura 10. Marcadores de resorción ósea

2.10.3.5. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN LA INFANCIA

Debido al crecimiento, los marcadores de remodelado óseo, tanto de formación como de resorción, tienen valores muy distintos en la infancia al compararlos con la edad adulta⁽¹⁸⁰⁻¹⁸³⁾. Se sabe que los marcadores de formación se mantienen estables a lo largo de la infancia, con valores más elevados que en la edad adulta por la continua formación ósea. Los marcadores de resorción guardan, sin embargo, una correlación negativa con la edad⁽¹⁷⁶⁾. Todo ello debido a la adquisición progresiva de masa ósea con la edad.

Por ello, dado que los niveles son claramente dependientes del momento de crecimiento en el que se encuentra el niño, los valores que se obtengan de cada paciente van a ser comparados con valores de referencia para la misma edad y sexo⁽¹⁸³⁾.

2.10.4. MANEJO TERAPÉUTICO DE LA EMO EN LA PKU

Si bien existen todavía muy pocos estudios que analicen el disturbio metabólico óseo en pacientes con PKU, todavía son menos los que se centran en el manejo terapéutico de dicha complicación de la PKU. Sin embargo, parece que tanto un buen control dietético como algunos fármacos podrían ser de utilidad en estos pacientes:

- **CALCITRIOL (25(OH)D):** La vitamina D es importante para la salud ósea gracias a su efecto contrarregulador sobre la hormona paratiroidea (PTH), que promueve la pérdida ósea, y su capacidad de estimular la absorción intestinal y la de Ca. En el déficit de vitamina D los niveles de PTH aumentan, promoviéndose así la destrucción ósea. El nivel óptimo de 25(OH)D en suero no está claramente esclarecido, al igual que las dosis óptimas para su mantenimiento. De forma general, se define el déficit de vitamina D como los niveles de 25(OH)D por debajo de 20 ng/mL⁽¹⁸⁴⁾. Dado que niveles de 25(OH)D por debajo de 30 ng/mL se asocia en ocasiones con aumento de la PTH, un nivel sérico de al menos 30 ng/mL ha sido recomendado por varios autores^(185,186). Se ha comprobado que el calcitriol es eficaz mejorando la DMO en pacientes fenilketonúricos con osteopenia⁽¹⁴¹⁾, lo que iría a favor de que la EMO sería secundaria a un déficit vitamínico secundario a la dieta restrictiva a la que se ven sometidos estos pacientes.
- **CALCIO Y VITAMINA D:** existen estudios que demuestran que la suplementación con Ca reduce el riesgo de fracturas, siempre y cuando el cumplimiento terapéutico sea al menos del 80%⁽¹⁸⁷⁾. La mayoría de estudios disponibles sobre la suplementación con Ca se han realizado en combinación con suplementación con vitamina D.

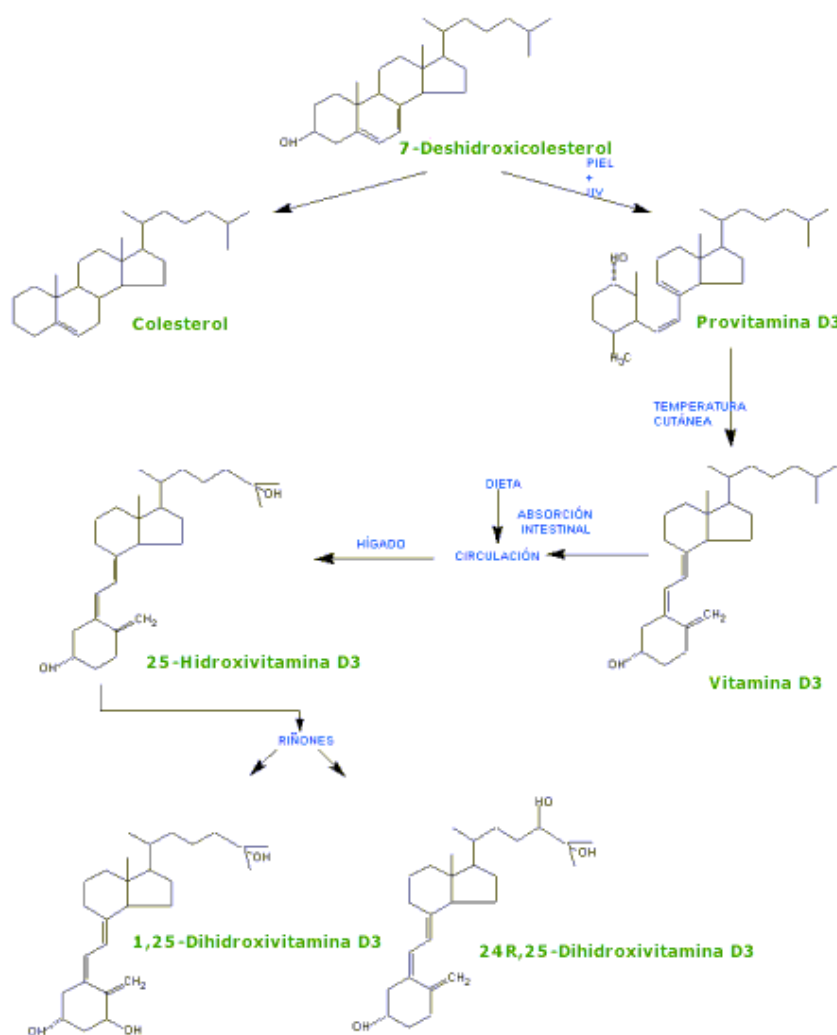


Figura 10. Metabolismo de la vitamina D

- **AUMENTO DEL APORTE DE PROTEÍNAS NATURALES:** se ha argumentado que la ingesta deficiente en proteínas también podría actuar como factor causal, esta hipótesis cobra sentido en un estudio realizado en mujeres premenopáusicas, en el que se demostró que variaciones en la ingesta proteica, con aporte de Ca y P constantes, influían en el remodelado óseo, con aumento de la resorción ósea si la ingesta proteica aumentaba (1,5 g/kg/día) e hiperparatiroidismo secundario con ingesta baja (0,7 g/kg/día)⁽¹⁸⁸⁾.

- **AUMENTO DE LA INGESTA DE ÁCIDOS GRASOS:** estudios realizados en animales demuestran que los LCPUFA (ácido eicosapentaenoico (EPA) y DHA) presentes en el pescado, pueden atenuar la pérdida ósea tras la menopausia. El tratamiento con EPA ha sido eficaz en modelos in vitro, a la hora de favorecer la formación ósea. Su suplementación en los pacientes con PKU, podría ser una herramienta a la hora de prevenir la EMO.
- **BIFOSFONATOS:** son fármacos que actúan disminuyendo el recambio óseo, al disminuir el número de lugares de remodelado activo donde tiene lugar la resorción ósea excesiva, habiendo demostrado su utilidad en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres adultas postmenopáusicas. En la EMO asociada a la PKU, todavía no conocemos el mecanismo fisiopatológico subyacente, por lo que no sabemos todavía si es debido a aumento del remodelado óseo y si, por lo tanto, se podrían beneficiar los pacientes PKU de esta terapia.

2.11. GENÉTICA DE LA FENILCETONURIA

El gen de la PAH (NM_000277.1) se haya localizado en la región q22-q24.1 del cromosoma 12 y está constituido por 13 exones que codifica por un mRNA de 2.4kb.

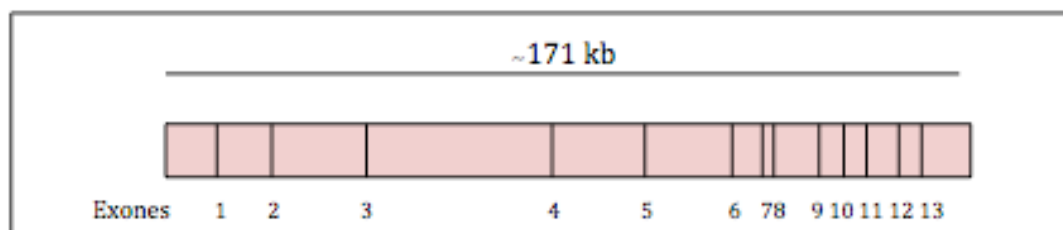


Figura 11 .- Organización estructural del gen *PAH*⁽¹⁸⁹⁾

Existen en la actualidad más de 700 mutaciones descritas, estando el 60% de las mutaciones europeas en 5 alelos. La gran heterogeneidad genética de la PKU, debido a numerosas mutaciones alélicas y diferencias interpoblacionales hace que la base genética de la enfermedad sea compleja. Por ello, se creó la base de datos pública “Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase”⁽¹⁹⁰⁾, que permite un registro de todas las variantes alélicas encontradas en los pacientes diagnosticados de PKU en todo el mundo. Esta base de datos es mantenida y actualizada en el McGill Hospital (<http://www.pahdb.mcgill.ca/>). Concretamente, esta base de datos ha conseguido catalogar hasta el momento un total de 567 mutaciones de la PAH; de las cuales un 60,5% son mutaciones de cambio de aminoácido (missense), 13,5% deleciones, 11% mutaciones que afectan al procesamiento del mRAN (splice site mutations), 5,7% mutaciones silentes, 5% mutaciones sin sentido y 1,8% inserciones⁽¹⁹⁾. De tal forma que, la mayoría de los pacientes PKU son heterocigotos compuestos, es decir, que portan diferentes mutaciones en cada uno de sus alelos.

Existe otra base de datos creada por la universidad de Zurich, llamada BIOPKU (www.biopku.org), que hasta el momento ha conseguido analizar el genotipo completo de 730 pacientes PKU, junto con su fenotipo (basado en los

niveles de Phe más altos previo al inicio del tratamiento) y su respuesta a la BH4. De esta base de datos se han encontrado 430 diferentes combinaciones de mutaciones.

El diagnóstico molecular de la PKU se hizo posible gracias a la clonación y caracterización del gen de la PAH^(191,192). La enzima PAH tiene 3 dominios: un dominio regulador N-terminal (residuos 1-142), un dominio catalítico (residuos 143-410) y un dominio tetramerizador C-terminal (residuos 411-452). Debido a la dificultad de cristalizar su completa extensión, no existe la estructura tetramérica completa de PAH. Sin embargo, sí se han podido componer formas incompletas: como una forma dimérica que contiene los dominios regulador y catalítico⁽¹⁹³⁾ y una forma tetramérica truncada (incompleta) que contiene los dominios catalítico y tetramerizador⁽¹⁹⁴⁾. Basándose en estas estructuras, se construyó un modelo por superposición de dominios catalíticos⁽¹⁹⁵⁾. De ahí han surgido innumerables avances en el conocimiento de la genética de la PKU. Es decir, las cristalizaciones de estructuras de diferentes formas incompletas de la PAH, han permitido la construcción de un modelo para una PAH tetramérica (Figuras 12 y 13) de extensión ampliada y ha proporcionado una base estructural para el estudio de las numerosas mutaciones que resultan en una actividad de PAH deficiente.

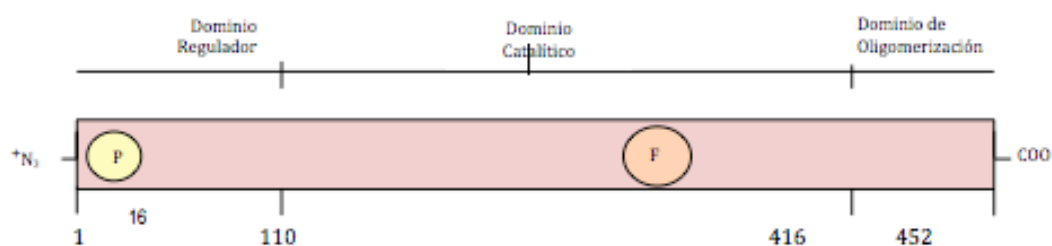


Figura 12. Estructura primaria de la proteína PAH, donde se localizan los dominios funcionales, el átomo de hierro y el sitio de fosforilación⁽¹⁹⁵⁾

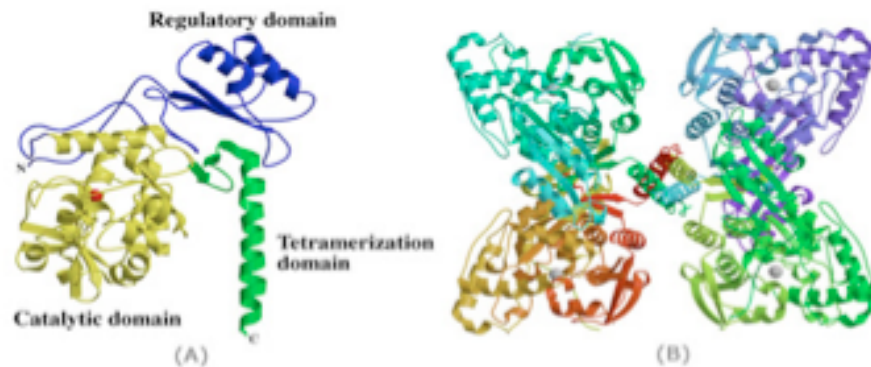


Figura 13. A) Modelo tridimensional propuesto para la PAH en forma monomérica⁽¹⁹⁶⁾ B) Modelo tridimensional propuesto para la forma tetramérica de la PAH⁽¹⁹⁷⁾.

La mayoría de los pacientes PKU (75%) son compuestos heterocigotos de 2 mutaciones diferentes y, con excepción de la población del Norte de Europa o la población del Este del continente, donde se han descrito 2 mutaciones mayoritarias (p.R408W e IVS12nt1g>a), en el resto de las poblaciones estudiadas las mutaciones encontradas suponen cada una de ellas menos de un 10% de todos los alelos mutantes. Las mutaciones más frecuentes en la población europea aparecen reflejadas en la figura. (Figura 14).



Figura 14. Mutaciones más prevalentes en Europa (1. R408W; 2.IVS10-11G>A; 3.IVS12+1G>A; 4. Y414C)⁽¹⁹⁸⁾

2.11.1. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

La PKU es un desorden metabólico muy heterogéneo, tanto en su expresión clínica (fenotipo), como en sus bases genéticas (genotipo). Se ha demostrado una buena correlación entre el fenotipo y el genotipo; de tal forma que el fenotipo bioquímico y los resultados clínicos pueden ser inferidos determinando las mutaciones genéticas subyacentes⁽¹⁹⁹⁾. O lo que es lo mismo, el análisis genotípico puede complementar los resultados analíticos para establecer el fenotipo y así predecir la severidad de la enfermedad.

En un estudio multicéntrico realizado a nivel europeo⁽²⁰⁰⁾, en el que participaron centros de 7 países, con un total de 686 pacientes, se establecieron categorías fenotípicas arbitrarias en función de las mutaciones encontradas, sin conocerse la actividad residual de la PAH de cada paciente, hallándose posteriormente una concordancia del 79% con el fenotipo clínico (basado en la tolerancia a la Phe, y en el caso de la HPA en los niveles sanguíneos de Phe pre-tratamiento) con el que estaba catalogado el paciente. Este estudio reforzó la idea de que el genotipo es el determinante mayor del fenotipo bioquímico de la mayoría de los pacientes PKU.

En el caso concreto de España, Desviat y cols.^(201, 202) llevaron a cabo en el año 1999 un estudio multicéntrico en el que analizaban el genotipo de 195 pacientes PKU de varias regiones del país. Encontraron hasta 67 mutaciones diferentes. 93 de los pacientes presentaban fenotipo correspondiente a HPA, encontrándose en ellos hasta 13 mutaciones. El análisis genético de estas mutaciones asociadas a la HPA, independientemente de la mutación del otro alelo, permite distinguir a los individuos que requerirán tratamiento dietético de los que no lo necesitarán.

Aunque es poco frecuente, puede tener lugar una complementación intraalélica negativa, lo que significa que aunque la enzima esté compuesta de varias subunidades, cada cual con sus mutaciones, aunque dichas mutaciones lleven a una actividad residual determinada, la presencia de esas mutaciones juntas, puede no resultar en una suma de la actividad residual de cada una de ellas⁽²⁰²⁾.

La complementación negativa intraalélica, que aunque infrecuente puede ocurrir, junto con el hecho de que se desconoce la actividad enzimática residual *in vitro* de algunas de las mutaciones, hacen que la predicción del fenotipo basada en el genotipo tenga algunas limitaciones.

2.10.2. MUTACIONES ASOCIADAS A RESPUESTA A BH4

Los exámenes funcionales y estructurales de las mutaciones identificadas en los pacientes que responden al tratamiento con BH4 han permitido identificar

aquellas mutaciones que potencialmente podrían responder a este tratamiento. De la base de datos europea BIOPKU (<http://www.bh4.org>) han surgido las siguientes conclusiones en lo referente a la asociación genotipo/fenotipo y más concretamente, en lo referente a la respuesta a la BH4⁽¹⁹⁾:

- La combinación de mutaciones que permite menos de un 15% de actividad enzimática in vitro, causa PKU clásica y no responde a BH4. La combinación de mutaciones que permite más de un 20% de actividad residual responde a BH4. Los fenotipos de los respondedores a BH4 son de PKU moderada o leve.
- Las mutaciones que afectan al procesamiento del mRNA pueden causar formas clásicas o leves dependiendo de la lectura (es decir, después de una mutación a veces el procesamiento del mRNA es normal), y el hecho de que haya diferentes fenotipos asociados se refleja en las bases de datos disponibles
- Combinaciones específicas de mutación leve/mutación clásica con idéntica predicción de actividad residual enzimática pueden tener diferentes fenotipos asociados (por la complementación negativa intraalélica); pero dichas asociaciones de diferentes combinaciones de mutaciones con diferentes fenotipos se pueden encontrar en los listados de las bases de datos disponibles, por lo que hace que las predicciones en estos casos sean innecesarias.
- La respuesta a BH4 de algunas combinaciones de mutaciones (genotipos completos) han sido bien establecidas. De tal forma que los pacientes que tienen esos genotipos pueden no necesitar pasar por la realización de un test de respuesta a BH4.

3.- OBJETIVOS

Los objetivos fundamentales de este trabajo han sido estudiar el desarrollo físico, la incidencia de enfermedad mineral ósea y la genética subyacente de los pacientes fenilcetonúricos seguidos en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Unidad de referencia para estas patologías en Galicia. Con este fin se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. **Estudio del desarrollo físico de los pacientes fenilcetonúricos**, comparando el crecimiento (peso, talla e índice de masa corporal) con la población sana, en función de la edad, el sexo y el fenotipo de PKU.
2. **Estudio de la enfermedad mineral ósea**
 - a) Determinar la incidencia de osteopenia/osteoporosis en un grupo de los pacientes fenilcetonúricos a través de la densitometría ósea
 - b) Analizar los potenciales factores de riesgo que condicionan la aparición de esta complicación
 - c) Valorar el remodelado óseo en los pacientes PKU con el fin de conocer las alteraciones existentes en la formación y/o resorción ósea.
 - d) Averiguar si los marcadores bioquímicos de remodelado óseo pueden ser de utilidad clínica para identificar a los pacientes PKU que presentan riesgo de desarrollar enfermedad mineral ósea
 - e) Correlacionar el genotipo con la respuesta terapéutica a las BH4 y la EMO
3. **Investigar el genotipo, para que pueda permitir:**
 - a) Conocer la epidemiología de las mutaciones de los pacientes PKU en Galicia
 - b) Conocer el espectro mutacional de la población con hiperfenilalaninemia
 - c) Obtener información sobre la correlación genotipo-fenotipo y la EMO

4.- PACIENTES Y MÉTODOS

Los estudios que se realizaron para cumplir los objetivos propuestos fueron los siguientes:

- 1. Estudio del crecimiento en pacientes fenilcetonúricos en Galicia**
- 2. Investigación de la mineralización ósea en pacientes fenilcetonúricos**
- 3. Estudio de la genética en pacientes fenilcetonúricos en Galicia**

Los pacientes incluidos en cada uno de los estudios, fueron pacientes diagnosticados, tratados y seguidos en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Los fenotipos de los pacientes se establecieron en función de las cifras de Phe al diagnóstico. Se incluyeron a los pacientes con PKU clásica (Phe >1.200 $\mu\text{mol/L}$), PKU moderada (Phe entre 600 – 1.200 $\mu\text{mol/L}$) y PKU leve (Phe entre 360 – 600 $\mu\text{mol/L}$) e hiperfenilalaninemias benignas (150-360 $\mu\text{mol/L}$).

Los niveles de Phe en sangre impregnada en papel, se cuantificaron inicialmente usando métodos cromatográficos de capa fina y papel, que fueron seguidamente reemplazados por la espectrometría de tandem masas desde julio del 2000; con un punto de corte para la Phe de 120 μM y ratio Phe/Tyr de 1,5. El diagnóstico se confirmó mediante la mediación plasmática cuantitativa de aminoácidos, utilizándose para ello cromatografía de intercambio de iones (Biochrom 30 amino acid analyzer).

La monitorización de los niveles sanguíneos de Phe en los pacientes PKU fue semanal en los primeros 4 meses de vida, quincenal hasta los dos años y

mensual a partir de entonces. El cálculo del cumplimiento dietético se llevó a cabo periódicamente a través de una encuesta sobre la ingesta llevada a cabo por cada paciente durante una semana, a través del programa www.odimet.es, diseñado por la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Previo a la inclusión de los pacientes en cada uno de los diferentes estudios, estos y/o sus tutores legales, dieron su consentimiento informado para participar en los mismos, siendo aprobados los estudios por el Comité de Ética.

Los estudios estadísticos se llevaron a cabo a través de hojas de cálculo de Excel para la realización de las bases de datos. El análisis estadístico de los datos se realizó a través del programa informático SPSS ®, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.1. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS EN GALICIA

4.1.1 PACIENTES:

Se incluyeron pacientes con hiperfenilalaninemia (HPA benigna y PKU) diagnosticados por cribado metabólico neonatal, con diagnóstico confirmado por análisis bioquímico de aminoácidos plasmáticos, actividad eritrocitaria de DHPR, metabolitos urinarios y excreción de pterinas.

Se incluyeron los pacientes hasta los 18 años.

Se excluyeron los pacientes con diagnóstico tardío, así como aquellos cuyo seguimiento fuese irregular.

4.1.2. METODOLOGÍA CLÍNICA

La recogida de datos se llevó a cabo de forma longitudinal retrospectiva, desde junio de 1980 a diciembre de 2011.

A) DATOS REGISTRADOS:

Las variables recogidas de cada paciente fueron: edad, sexo, niveles de Phe previos al inicio del tratamiento de la PKU, fenotipo (clásica, moderada y leve, incluida la HPA Benigna), medidas antropométricas (peso y longitud/talla) registradas desde el nacimiento y cada 6 meses y tratamiento recibido (tratamiento dietético desde el primer mes de vida en todos los pacientes).

El tratamiento dietético fue llevado a cabo de acuerdo a las guías españolas de PKU⁽²⁵⁾, con una dieta restrictiva en proteínas naturales y suplementos con mezcla de aminoácidos Phe-libre. La ingesta media de proteínas fue 1.3-1.5 veces superior a las RDA⁽¹²⁶⁾.

El grupo de pacientes con niveles sanguíneos de Phe $<360\mu\text{mol/L}$ al diagnóstico no precisaron tratamiento y siguieron una dieta normal.

Los niveles objetivo de Phe en sangre considerados adecuados para niños por debajo de los 6 años fueron $<360\mu\text{mol/L}$; entre los 6 y los 10 años $<480\mu\text{mol/L}$ y en los mayores de 10 años $<600\mu\text{mol/L}$.

B) MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

En los menores de 24 meses se determinó la longitud en supino a través de un infantómetro con dos bases, una base fija, que se orienta en la cabeza y una movable a nivel de los pies; el peso a esta edad se midió con báscula manual para lactantes.

A partir de los 24 meses se determinó la talla de pie con un tallímetro de pared y el peso corporal con básculas digitales con una precisión de 100 g. Los pacientes se pesaban descalzos, sin ropa y por la mañana tras ayuno nocturno.

Las mediciones fueron realizadas siempre por el mismo personal experimentado. El IMC se calculó de acuerdo a la fórmula, $\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{talla}^2 (\text{m}^2)$.

Se consideró como talla final en la adolescencia, la alcanzada tras llegar al estadio IV de Tanner, si la talla no había presentado un aumento de más de 2 cm en los dos años previos.

Para la comparación de los resultados de los datos antropométricos, se utilizó el z-score, comparándose los resultados con los de una población de mismo sexo y edad.

4.1.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Para llevar a cabo el análisis, la altura, peso e índice de masa corporal de los niños se pasó al z-score, ajustado para la edad y sexo, utilizándose como población de referencia el estudio español de crecimiento nacional 2008⁽²⁰³⁾. Los z-score indican el número de desviaciones estándar (SD), la medida es la distancia de la media de una cohorte normal, para la misma edad y sexo.

Se utilizaron modelos no lineales de efectos mixtos con curvas específicas para cada tema, así como el factor de curva por interacciones, para describir los cambios sucedidos a lo largo del tiempo en los z-score. Para ello, se realizaron curvas específicas para cada tema para los datos longitudinales, en donde las curvas individuales se modelaron como splines penalizados con coeficientes aleatorios.

Dado el comportamiento diferente del crecimiento entre hombre y mujeres, para la evaluación de los cambios en los z-score de la altura, peso e índice de masa corporal el siguiente modelo no lineal de efectos mixtos se llevó a cabo de forma separada para cada sexo:

$$y_i = \alpha_0 + \alpha_1 pth_{iPKU} + f(t_i) + h(t_i) pth_{iPKU} + g_i(t_i) + \varepsilon_i \quad (1)$$

Para cada individuo i , la ecuación describe las trayectorias a largo plazo de los z-score. La variable dependiente y es el z-score en las diferentes edades, donde $pth_{iPKU}=1$ si la patología del paciente es PKU y 0 si no lo es. $g_i(\cdot)$ es una función suave que refleja las curvas individuales, $f(\cdot)$ representa el efecto suave de la edad en el grupo con HPA, donde $h(\cdot)$ representa la desviación de ese efecto para aquellos individuos con PKU. En consecuencia, el efecto de la edad en un individuo con PKU es $f(t_i) + h(t_i)$. Por lo tanto, si $h(t) = 0 \forall t$, significa que no hay interacciones entre la edad y el tipo de patología.

Las funciones suaves del modelo completo pueden ser representadas como un modelo mixto como anteriormente;

$$\begin{aligned}
 y_i &= \alpha_0 + \underbrace{\alpha_1 pth_{iPKU}}_{f(t_i)h(t_i)} + \underbrace{X_i \bar{\beta} + Z_i u}_{g_i(t_i)} + \underbrace{X_i \gamma pth_{iPKU} + Z_i w pth_{iPKU}}_{g_i(t_i)} + X_i \beta^i + Z_i u^i + \varepsilon_i \\
 u &\sim N(0, \sigma_u^2 I_{d-2}), w \sim N(0, \sigma_w^2 I_{d-2}), \beta^i \sim N(0, \Sigma), \varepsilon_i \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2), u^i \sim N(0, \sigma_u^2 I_{d-2})
 \end{aligned}$$

Para este análisis, se utilizó el paquete "nlme" (Pinheiro and Bates, 2007). Las estructuras de las matrices de correlación se construyeron siguiendo la aproximación descrita por Durban⁽²⁰⁴⁾.

En el modelo completo, los parámetros de varianza para cada parte aleatoria del modelo son $\sigma_u^2, \sigma_w^2, \sigma_\varepsilon^2$. Para llevar a cabo el test de hipótesis si son iguales a cero o mayores, se utilizó el test RLRT. Para ello se utilizó el paquete "RLRSim" mejorado por **Fabian Scheipl and Ben Bolker, (2013)**, tanto para hombres como para mujeres. Finalmente se mantuvieron las partes aleatorias estadísticamente significativas del modelo y se eliminaron las no significativas ($p > 0,05$).

Ambos paquetes descritos anteriormente son de acceso libre en R project (www.cran-r.com) versión 2.15.1.

4.2. ESTUDIO DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS

4.2.1. PACIENTES:

Se incluyeron a 43 pacientes mayores de 7 años, diagnosticados de PKU, tanto mediante diagnóstico precoz (a través del cribado metabólico neonatal), como por diagnóstico tardío. Los fenotipos de los pacientes se establecieron en función de las cifras de Phe al diagnóstico. Se incluyeron a los pacientes con PKU clásica, PKU moderada y PKU leve. No se incluyeron a los pacientes con HPA benigna.

4.2.2. METODOLOGÍA CLÍNICA:

Se trata de un estudio observacional transversal. La recogida de datos se llevó a cabo desde octubre de 2010 a diciembre de 2011.

A). VARIABLES GENERALES:

Las variables analizadas de cada paciente fueron: edad, sexo, datos antropométricos (peso, talla e IMC), encuesta nutricional (en la que se registra la ingesta realizada durante una semana), encuesta de actividad física, niveles de Phe al diagnóstico, fenotipo y estudio bioquímico: Phe y Tyr actuales, perfil renal (urea, creatinina), perfil hepático (GOT, GPT), FA, proteínas totales, albúmina, niveles sanguíneos de EPA y DHA, Ca, P, 25(OH)D, 1-25 hidroxivitamina D (1-25(OH)2D), paratohormona (PTH), fosfatasa FAO, PNP-1, β -CTx, Ca/Cr en orina y DMO.

B). ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Los datos de los análisis bioquímicos se obtuvieron de una muestra matutina tras ayuno nocturno.

- La determinación de los niveles sanguíneos de Phe y Tyr se efectuó a través de la espectrometría de tandem masas a partir de la muestra de sangre recogida en papel.
- Las proteínas totales, albúmina, urea, creatinina, transaminasas, Ca, P y FA se determinaron por procedimientos estándar con el Advia 2400 Analyser (Siemens Diagnostic Systems, Germany).
- La determinación de la PTH, 25(OH)D y 1-25(OH)₂D se realizó a través de un sistema electroquimioluminiscente totalmente automatizado (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany).
- Los lípidos plasmáticos se extrajeron de la sangre según el método desarrollado por Folch y cols ⁽²⁰⁵⁾. Los fosfolípidos fueron separados por cromatografía de capa fina (TLC Silica gel 60, 20×20 cm, Merck, Spain). Primero se utilizó como eluyente una mezcla de heptano, eter diisopropílico y ácido acético (7/3/0.2v/v), y posteriormente el heptano solo como segundo eluyente. Tras ser separados de la matriz de sílice, los fosfolípidos se trasmetilaron según la técnica de Lepage y Roy ⁽²⁰⁶⁾, usando ácido tridecanoico como estándar interno. Los ácidos grasos metil ésteres, se separaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard GC 5890, usándose un detector de ionización de llama en una columna capilar SP 2330 (30 m×0.25 mm, 0.20 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), con hidrógeno como gas portador.
- La medición de FAO se realizó mediante ELISA (Ostease® BAP, Immundiagnostic Systems Ltd, Boldon, UK), tomándose como valores normales para adultos: 15-40 UI/L en mujeres y 19-52 UI/L en hombres.
- La medición de PNP-1 y β-CTx se realizó en muestra de suero mediante inmunoensayo por electroquimioluminiscencia (Cobase601 Roche) tomando como valores de referencia los aportados por el propio fabricante: 12,7-42,9 ng/mL para PNP-1 y 0,16-0,44 ng/mL para β-CTx.

- La determinación de Ca/Cr en orina se llevó a cabo tras recogida de orina de 24 horas, considerándose normales valores $\leq 0,22$ para todos los pacientes.

C) ENCUESTA DE ACTIVIDAD FÍSICA

Se recogió la actividad física habitual de cada paciente según los resultados obtenidos tras realizarse la encuesta GPAQ (Global Physical Activity Questionnaire)⁽²⁰⁷⁾, clasificándose en tres niveles en función de los resultados obtenidos en la misma. Se consideró actividad física baja si la puntuación era menor de 6; intermedia si se encontraba entre 6 y 10 y alta si la puntuación superaba los 10 puntos.

D) MEDICIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA

La DMO se determinó a través de absorcitometría de doble haz de rayos X (DEXA LUNAR DPX, General Electric), realizándose las mediciones a nivel de la columna lumbar (L2, L3 y L4) y de fémur proximal.

Para la población adulta (mayores de 20 años), se utilizó como referencia la base de datos Hologic NHANES III. La presencia de EMO se definió según los criterios de la OMS, a través de la utilización del t-score: número de desviaciones estándar en comparación con el promedio de una población adulta joven. De tal forma que si el t-score $< -2,5$, se interpreta como osteoporosis, y si el t-score se encuentra entre $-2,5$ y -1 desviaciones estándar, como osteopenia.

En los menores de 20 años, se utilizó el z-score, comparación de la DMO con una población de mismo sexo y edad, usándose para ello la base de datos publicada por Zanchetta y cols, como valores de referencia⁽²⁰⁸⁾.

E) GRUPO CONTROL

Se estableció un grupo control con 39 personas sanas de similares características en edad y sexo para los pacientes de menos de 20 años, a fin de comparar marcadores de remodelación ósea. El grupo control se recogió de niños sanos que acudían a las consultas de atención primaria, a los que se realizaba analítica de sangre, en contexto de control rutinario de salud. Previo a la inclusión de los pacientes en el grupo control, éstos y/o sus tutores legales, dieron su consentimiento informado para participar en el mismo.

Del grupo control se recogieron las siguientes variables: edad, sexo, FAO, PNP-1 y β -CTx.

4.2.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Los resultados del análisis descriptivo se expresan tanto en valores absolutos como en porcentaje. Cuando corresponde, los datos se expresan como media (desviación estándar). Se considerará significativa una $p < 0,05$. La comparación de variables cualitativas y cuantitativas discretas se realizó empleando Chi-cuadrado y el Test exacto de Fisher. Se determinó el ajuste de variables a la normalidad. La comparación de medias de variables cuantitativas de distribución normal se realizó mediante el test de T-student y la prueba de U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas.

4.3. ESTUDIO DE LA GENÉTICA EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS EN GALICIA

4.3.1 PACIENTES:

Se incluyeron a todos los pacientes fenilcetonúricos seguidos en la Unidad a los que se había realizado estudio genético.

Se incluyeron tanto los pacientes diagnosticados precozmente mediante cribado metabólico neonatal, como los diagnosticados tardíamente.

Se incluyeron todos los fenotipos de PKU (clásica, moderada, leve) e hiperfenilalaninemias benignas

4.3.2. METODOLOGÍA CLÍNICA

La recogida de datos se llevó a cabo de forma longitudinal retrospectiva, desde junio de 1980 a diciembre de 2011.

A) DATOS REGISTRADOS:

Las variables recogidas de cada paciente fueron: edad, sexo, niveles de Phe previos al inicio del tratamiento de la PKU, fenotipo (clásica, moderada y leve, incluida la HPA Benigna), tratamiento recibido (tratamiento dietético desde el primer mes de vida en todos los pacientes), edad a la que se realizó la sobrecarga de BH4, porcentaje del descenso de los niveles de Phe a las 24 horas de la sobrecarga de BH4.

Se registraron los alelos mutados de PAH, el cambio de nucleótido, el tipo de mutación, la localización de la mutación, el dominio afectado por la mutación. Se realizó el cálculo de homocigosidad y se determinó la actividad residual esperada para cada mutación.

B) ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR

El DNA de los pacientes se obtuvo de una muestra de 3 mL de sangre en EDTA, extraída en unos de los controles analíticos habituales de cada paciente.

El análisis genético se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), y la Universidad Autónoma de Madrid, usándose Electroforesis de Gel de Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y secuenciación directa a través del kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems®) y electroforesis capilar con el Analizador genético ABI Prism 3700 (Applied Biosystems®).

Todas las muestras de los pacientes en las que sólo se identificaba una mutación causal tras la secuenciación de todos los exones de la PAH, fueron sometidas a análisis MLPA (SALSA MLPA P055 PAH Probemix, MRC-Holland), para descartar deleciones largas o duplicaciones.

La actividad residual de la PAH para cada mutación concreta, se obtuvo a través de las bases de datos recogidas en la PAHdb (www.pahdb.mcgill.ca) y/o en la BH4db (www.bh4.org).

C) CÁLCULO DE HOMOZIGOSIDAD

La homocigosidad para el locus de la PAH en una población dada se determinó por la fórmula $h = \sum x_i^2$, donde x_i es la frecuencia de cada alelo. En nuestra población, donde la determinación de las mutaciones no fue del 100%, y por lo tanto, la frecuencia de cada alelo no es conocida, cada uno de los alelos no caracterizados se definió con una frecuencia de $1/N$, donde N es el número total de cromosomas mutantes investigados.

D) TEST DE SOBRECARGA DE BH4

El test de sobrecarga de BH4 se realizó en nuestra Unidad en los pacientes en los que existía un consentimiento informado para el mismo (firmado por ellos mismos o por sus representantes legales). No se realizó este test en las HPA benignas. En el caso de que dos hermanos afectos tuviesen el mismo genotipo/fenotipo, el test se realizaba solamente en uno de ellos.

El cribado de pacientes respondedores a la BH4 se realiza tras sobrecarga de 20mg/kg de BH4, con análisis durante las primeras 24 horas. Se determinan los valores de Phe sanguíneos basal y a las 4, 8, 15 y 24 horas de la sobrecarga con el cofactor. Cuando se hacía en niños ya a tratamiento con niveles de fenilalanina <360 $\mu\text{mol/L}$, se llevaba a cabo sobrecarga previa de 100 mg/kg de Phe.

Este cribado se inició en el año 2002, y se realiza desde 2005 en el periodo neonatal cuando los niveles de Phe están por encima de los 400 $\mu\text{mol/L}$, por lo que no es necesario hacer la sobrecarga previa con este aminoácido ⁽⁷⁴⁾. Si los niveles sanguíneos de Phe se encuentran entre 360 y 400 $\mu\text{mol/L}$, se miden de nuevo los niveles de Phe y se comprueba la tolerancia a la Phe antes del test de sobrecarga con BH4.

La respuesta a la BH4 se definió como el descenso en la Phe plasmática de más del 30% con respecto al valor basal, siguiendo las guías definidas en el grupo de trabajo EMG de Zurich en junio de 2002 ⁽²⁰⁹⁾.

5.RESULTADOS

Se estudiaron 129 pacientes fenilcetonúricos seguidos desde Junio de 1980 a Diciembre de 2011, en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Unidad de referencia para la fenilcetonuria en la comunidad autónoma de Galicia.

El 59% (76) de estos pacientes eran mujeres. Se realizó estudio de crecimiento a 109 pacientes, genético a 105 y estudio de la mineralización ósea a un grupo de 43 pacientes PKU.

5.1. ESTUDIO DE CRECIMIENTO EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS EN GALICIA

Se estudiaron 109 pacientes, 54 PKU (23 varones, 33 mujeres) y 55 HPA (23 varones y 32 mujeres).

5.1.1. ANÁLISIS DE LA TALLA

La media y desviación estándar, junto con la frecuencia absoluta, para el z-score de la talla de los pacientes HPA y PKU varones se muestran en la Tabla 3, junto a la significación estadística resultado de la comparación de la media para cada grupo de edad entre ambas patologías.

En la tabla 4 se muestran la media, desviación estándar y frecuencia absoluta para el z-score de la talla de las mujeres HPA y PKU, junto con la significación estadística resultado de la comparación de la media para cada grupo de edad entre ambas patologías.

En las figuras 15A, 15B, 15C y 15D se muestran las trayectorias de los z-score de la talla para cada individuo, varones y mujeres respectivamente, con cada tipo de patología del estudio (HPA y PKU). Como se muestra en estas figuras, existe una gran variación en las diferentes trayectorias, lo que representa los z-score a largo plazo de la talla de cada individuo. Esto ocurre tanto en varones como en mujeres, así como tanto en la PKU como en la HPA.

VARONES					
EDAD	HPA	N	PKU	N	Valor de p
6 meses	0.31 (1.001)	23	-0.092 (1.404)	21	0.671
1 año	0.301 (1.053)	23	-0.174 (1.18)	21	0.294
1.5 años	0.151 (1.072)	23	0.231 (1.261)	21	0.732
2 años	0.255 (0.967)	22	0.062 (0.929)	21	0.601
2.5 años	0.498 (1.027)	22	0.026 (0.709)	20	0.158
3 años	0.324 (0.891)	22	0.123 (0.697)	19	0.44
3.5 años	0.425 (0.926)	19	0.317 (0.764)	19	0.455
4 años	0.522 (0.85)	19	0.189 (0.593)	19	0.114
4.5 años	0.695 (0.664)	18	0.359 (0.552)	19	0.1
5 años	0.632 (0.843)	17	0.436 (0.772)	19	0.253
5.5 años	0.667 (1.007)	18	0.429 (0.708)	19	0.301
6 años	0.468 (0.981)	17	0.402 (0.695)	19	0.399
6.5 años	0.605 (0.972)	16	0.606 (0.813)	18	0.666
7 años	0.568 (1.085)	16	0.434 (0.842)	18	0.501
7.5 años	0.745 (1.075)	16	0.475 (0.737)	16	0.273
8 años	0.533 (1.05)	16	0.388 (0.802)	16	0.346
8.5 años	0.696 (0.957)	14	0.39 (0.949)	15	0.213
9 años	0.624 (1.049)	13	0.413 (0.844)	16	0.456
9.5 años	0.501 (1.069)	12	0.347 (0.765)	15	0.66
10 años	0.479 (1)	12	0.285 (0.788)	14	0.718
10.5 años	0.448 (1.026)	12	0.333 (0.846)	12	0.862
11 años	0.413 (1.143)	10	0.32 (1.039)	10	0.344
11.5 años	0.696 (1.11)	8	0.346 (1.032)	10	0.328
12 años	0.7 (1.347)	7	0.375 (1.031)	10	0.494
12.5 años	0.387 (1.387)	6	0.265 (1.148)	10	0.588
13 años	0.318 (1.467)	6	0.182 (1.081)	10	0.48
13.5 años	-0.118 (1.476)	5	0.228 (1.011)	9	0.894
14 años	-0.242 (1.314)	5	0.168 (0.881)	9	0.639
14.5 años	-0.625 (1.173)	4	-0.009 (0.927)	8	0.395
15 años	-0.763 (1.021)	3	-0.169 (0.828)	8	0.347
15.5 años	0.24 (0.391)	3	-0.161 (0.73)	8	0.539
16 años	0.717 (1.231)	3	-0.15 (0.658)	8	0.357
16.5 años	0.23 (0.225)	3	-0.159 (0.567)	8	0.303
17 años	0.405 (0.134)	2	-0.472 (1.032)	9	0.125
17.5 años	0.824 (-)	1	-0.484 (1.015)	9	0.116
18 años	0.851 (-)	1	-0.388 (1.032)	8	0.12

Tabla 3. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score de la talla en PKU y HPA varones, con el correspondiente valor de p para cada edad. N: número de pacientes.

MUJERES					
EDAD	HPA	N	PKU	N	Valor de p
6 meses	0.374 (0.833)	32	0.412 (1.099)	33	0.849
1 año	0.257 (1.007)	32	-0.05 (0.996)	32	0.412
1.5 años	-0.025 (0.718)	29	-0.381 (1.055)	33	0.268
2 años	-0.261 (0.767)	28	-0.33 (0.884)	30	0.809
2.5 años	-0.062 (0.8)	23	-0.079 (1.043)	30	0.879
3 años	-0.019 (0.855)	21	-0.102 (1.066)	28	0.952
3.5 años	0.096 (0.574)	18	-0.257 (0.997)	26	0.176
4 años	0.302 (0.629)	17	-0.246 (1.03)	28	0.084
4.5 años	0.235 (0.417)	16	-0.349 (0.89)	28	0.01
5 años	0.166 (0.529)	15	-0.331 (1.019)	28	0.062
5.5 años	0.316 (0.707)	14	-0.29 (0.995)	28	0.033
6 años	0.249 (0.707)	14	-0.234 (0.898)	28	0.142
6.5 años	0.322 (0.606)	13	-0.201 (0.961)	28	0.133
7 años	0.221 (0.739)	10	-0.154 (1.08)	26	0.447
7.5 años	0.171 (0.775)	7	-0.206 (0.937)	26	0.402
8 años	0.143 (0.822)	6	0.024 (0.842)	25	0.707
8.5 años	-0.102 (0.885)	5	-0.048 (0.873)	25	0.759
9 años	-0.128 (0.981)	5	-0.017 (0.846)	24	0.685
9.5 años	-0.09 (0.837)	4	-0.124 (0.804)	24	1
10 años	-0.022 (1.007)	4	-0.192 (0.797)	24	0.767
10.5 años	-0.1 (1.005)	4	-0.205 (0.881)	23	0.973
11 años	0.005 (0.889)	4	-0.089 (1.01)	23	0.891
11.5 años	-0.213 (0.993)	4	-0.246 (1.016)	22	0.972
12 años	-0.162 (0.956)	4	-0.336 (1.002)	21	0.738
12.5 años	-0.254 (1.028)	4	-0.417 (0.986)	21	0.795
13 años	-0.198 (0.959)	4	-0.548 (1.097)	19	0.516
13.5 años	-0.477 (0.382)	3	-0.647 (1.101)	17	0.711
14 años	-0.643 (0.326)	3	-0.732 (1.089)	17	0.751
14.5 años	-0.67 (0.354)	2	-0.715 (1.021)	17	0.74
15 años	-0.715 (0.46)	2	-0.678 (0.882)	16	0.778
15.5 años	-0.79 (0.453)	2	-0.683 (0.866)	16	0.888
16 años	-0.74 (0.311)	2	-0.667 (0.872)	16	0.725
16.5 años	-0.775 (0.318)	2	-0.605 (0.861)	15	0.94
17 años	-0.58	1	-0.52 (0.89)	14	0.907
17.5 años	-		-0.556 (0.924)	13	-
18 años	-		-0.541 (0.958)	13	-

Tabla 4. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score de la talla en PKU y HPA mujeres, con el correspondiente valor de p para cada edad. N: número de pacientes.

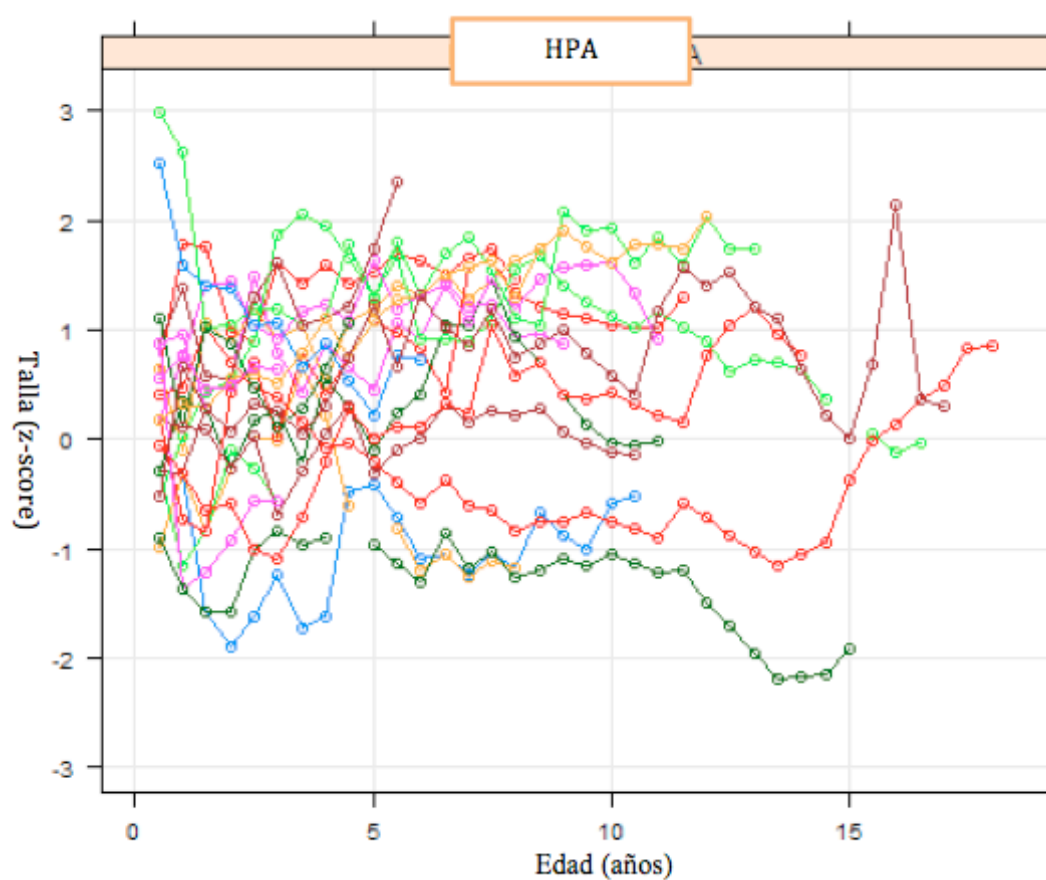


Figura 15A. Trayectoria de las medidas del z-score de la talla de niños varones HPA de entre 6 meses y 18 años.

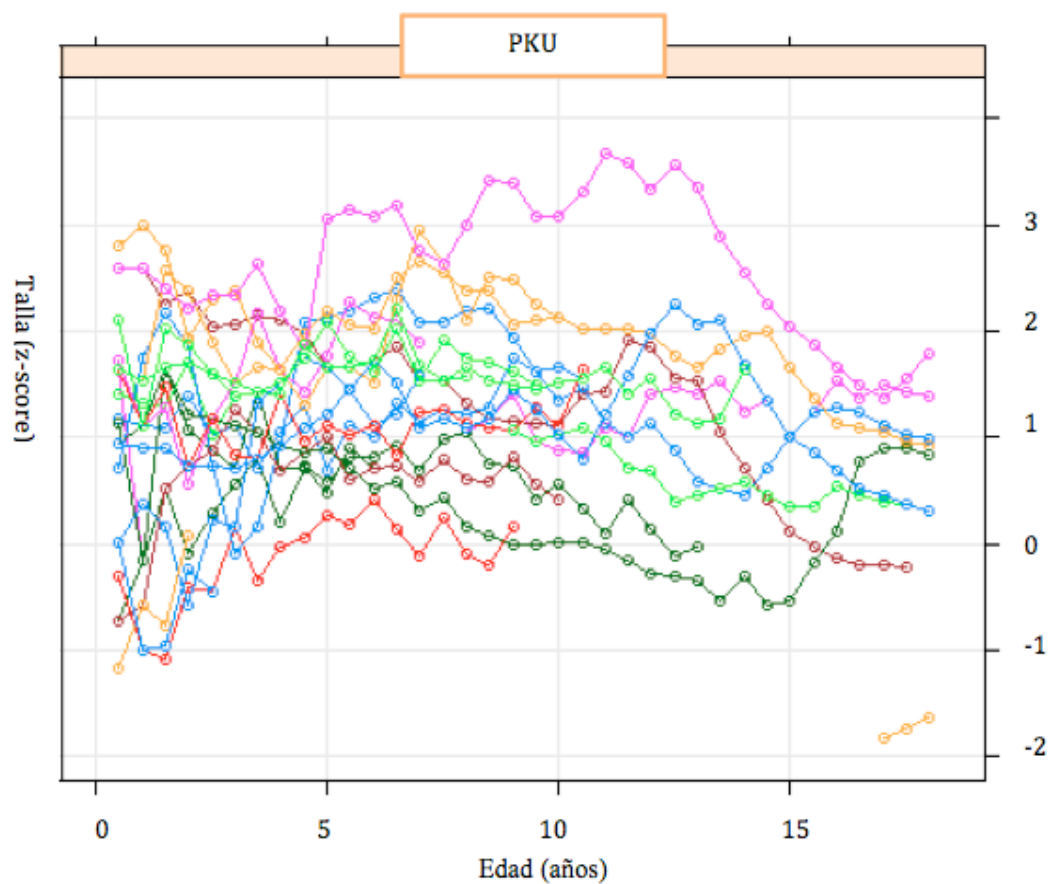


Figura 15B. Trayectoria de las medidas del z-score de la talla de niños varones PKU de entre 6 meses y 18 años

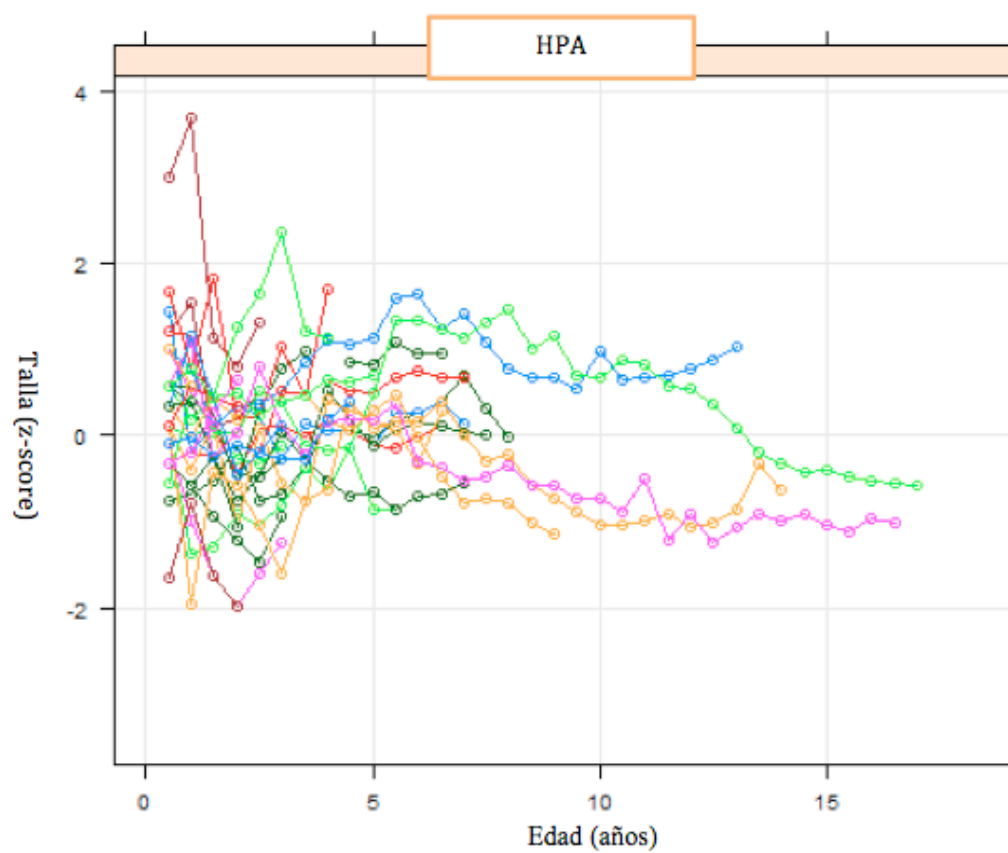


Figura 15C. Trayectoria de las medidas del z-score de la talla de mujeres HPA de entre 6 meses y 18 años

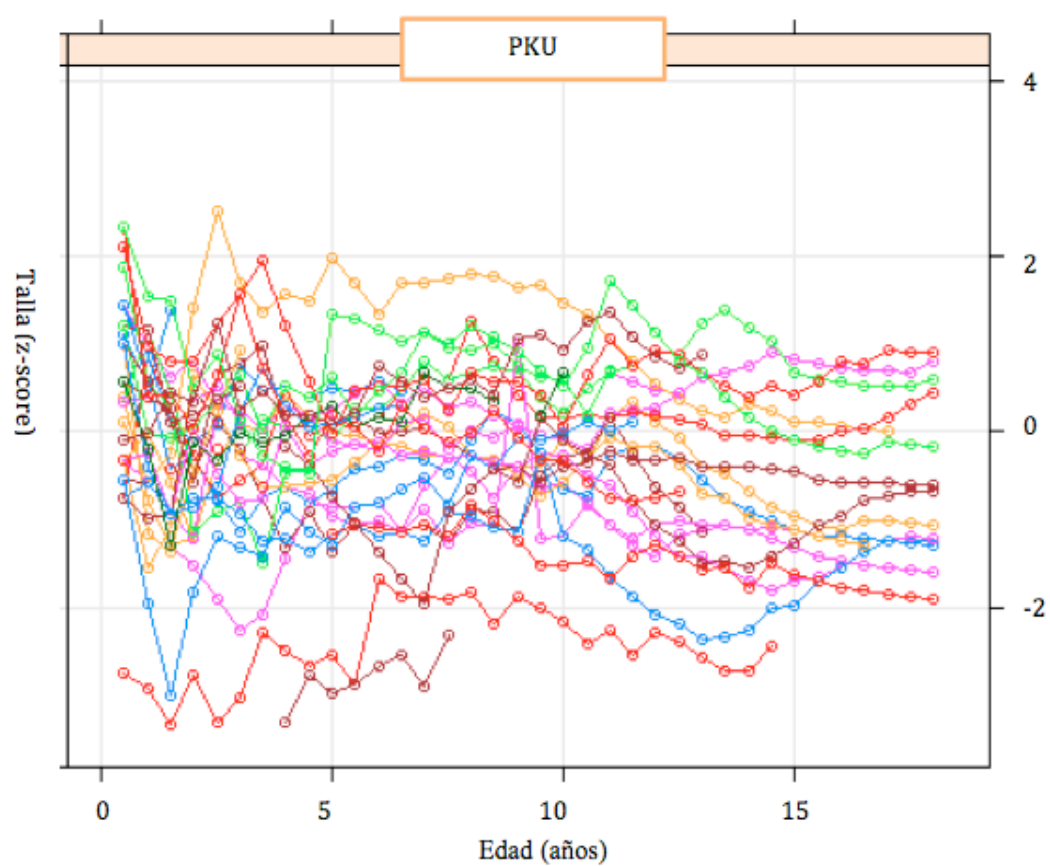


Figura 15D. Trayectoria de las medidas del z-score de la talla de mujeres PKU de entre 6 meses y 18 años

Los resultados de los análisis de los modelos de efecto mixto para los **varones** se detallan en la Tabla 5.

Se observaron los siguientes resultados:

1. Cada sujeto presenta diferentes trayectorias específicas
2. En la evolución a largo plazo de los z-score de la talla, no se han encontrado diferencias estadísticas entre los individuos PKU y HPA
3. Las trayectorias específicas para cada individuo, muestran un patrón no lineal a lo largo del tiempo

Las trayectorias estimadas para cada tipo de patología: HPA y PKU se describen en la figura 16. Las diferencias de estas curvas estimadas y los intervalos de confianza al 95%, se muestran en la figura 17. Como se puede observar en la figura 16, los varones PKU tienen una talla similar a la población general hasta los 8-9 años, momento a partir del cual se objetiva una menor progresión de la talla en los individuos PKU. En el caso de los varones HPA la talla es similar a la de la población general. No existen diferencias significativas en la talla entre los HPA y los PKU (figura 17).

Los resultados de los análisis de los modelos de efectos mixtos para las **mujeres** se detallan en la Tabla 5.

Se observaron los siguientes resultados:

1. Cada sujeto presenta diferentes trayectorias específicas
2. Se detectaron diferencias significativas en la evolución a largo plazo de los z-score de la talla para las niñas PKU y HPA.
3. Las trayectorias específicas para cada individuo muestran un patrón no lineal a lo largo del tiempo.

Las trayectorias estimadas para cada tipo de patología: HPA y PKU, se describen en la figura 18, donde se puede observar como la evolución con el tiempo del z-score de la talla es diferente en cada patología, con la existencia de un cruce entre los 8 y los 12 años, de manera que la talla en las PKU es superior la las HPA entre los 8 y 12 años, descendiendo a partir de dicha edad, siendo la talla de las pacientes PKU menor que la de la población de referencia. La diferencia de las

curvas estimadas entre HPA y PKU y los intervalos de confianza del 95%, se describen en la figura 19; siendo las diferencias en los z-score de la talla entre los HPA y los PKU estadísticamente significativas ($p=0,0186$).

Efectos fijos	Coefficiente	DE	valor de p
Intercept	0,5702	0,2068	0,0060
Tiempo	-0,0294	0,0149	0,0500
PKU (HPA: categoría de referencia)	-0,3699	0,2642	0,1722
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Curvas específicas de cada individuo	327,9234	<0,0000	
	0	1	
Tipo de Patología (σ_{HP}^2)	6,4182	0,028	
Efecto no lineal de la edad (σ_{H}^2)			

Tabla 5. Resultados de los modelos (1) de efectos mixtos para cada individuo varón. El modelo (1) se describe en el apartado de análisis estadístico.
DE: desviación estándar; RLRT: test de razón de verosimilitud restringida.

Para probar los efectos aleatorios del modelo completo, se ha utilizado el RLRT. Los valores de p se dan para probar si cada parámetro de varianza de los efectos aleatorios son superiores a cero. σ_{HP}^2 indica la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave del modelo (1). $[g_i(\cdot)]$, que representa las curvas específicas de cada individuo, σ_{HP}^2 es el parámetro de varianza de la correspondiente parte aleatoria de la función suave $[h(\cdot)]$, y finalmente σ_{H}^2 es la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave $[f(\cdot)]$, que representa el efecto suave de la edad. Los efectos aleatorios y fijos del factor por las interacciones de las curvas, han sido eliminadas del modelo completo. Los efectos fijos se obtuvieron de este modelo final.

Efectos fijos	Coefficiente	DE	valor de p
Intercept	0.8283353	0.2122	0.0015
Tiempo	-0.0896	0.0306	0.0398
PKU (tomando HPA como la categoría de referencia)	0.0378934	0.27018372	0.8889
PKU:tiempo	-0.0172583	0.0379	0.6490
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Curvas específicas de cada individuo(σ_{η}^2)	299.0287	<0.0000	
Tipo de patología (σ_{η}^2)	3.1845	0.0186	
Efectos no lineales de la edad(σ_{η}^2)	33.1793	<0.0000	

Tabla 6. Resultados de los modelos de efectos mixtos para cada individuo mujer. El modelo (1) se describe en el apartado de análisis estadístico. DE: desviación estándar; RLRT: test de razón de verosimilitud restringida.

Para probar los efectos aleatorios del modelo completo, se ha utilizado el RLRT. Los valores de p se dan para probar si cada parámetro de varianza de los efectos aleatorios son superiores a cero. σ_{η}^2 indica la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave del modelo (1). $[\mathbf{g}_i(\cdot)]$, que representa las curvas específicas de cada individuo, σ_{η}^2 es el parámetro de varianza de la correspondiente parte aleatoria de la función suave $[\mathbf{h}(\cdot)]$, y finalmente σ_{η}^2 es la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave $[\mathbf{f}(\cdot)]$, que representa el efecto suave de la edad. Los efectos aleatorios y fijos del factor por las interacciones de las curvas, han sido eliminadas del modelo completo. Los efectos fijos se obtuvieron de este modelo final.

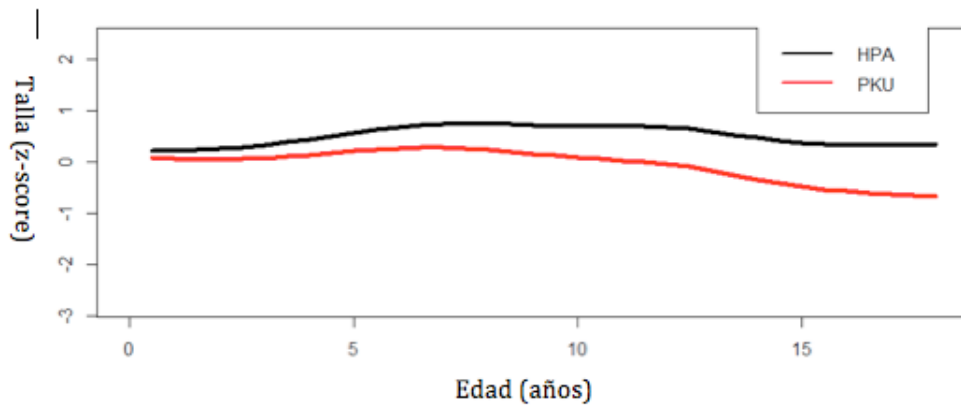


Figura 16. Curvas estimadas de los z-score de la talla de acuerdo a la edad para ambos tipos de patología (HPA y PKU) en individuos varones.

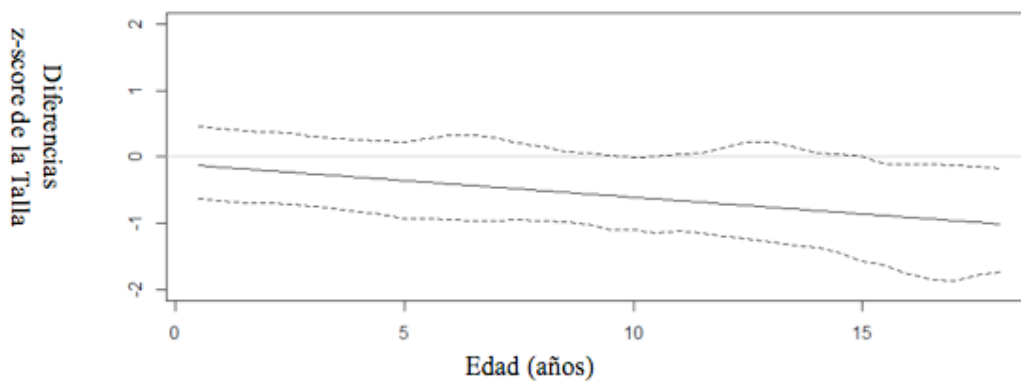


Figura 17. Diferencias entre las curvas del z-score estimado de la talla en ambas patologías según la edad (línea gruesa) y sus intervalos de confianza del 95% (líneas punteadas), en individuos varones.

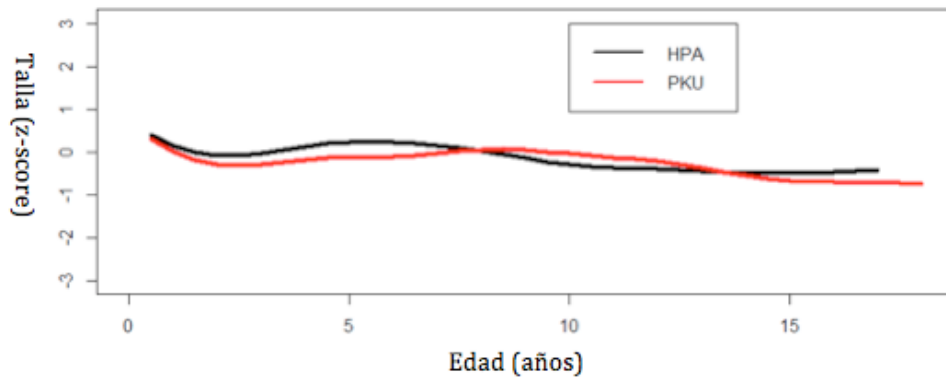


Figura 18. Curvas estimadas de los z-score de la talla de acuerdo a la edad para ambos tipos de patología (HPA y PKU) en mujeres.

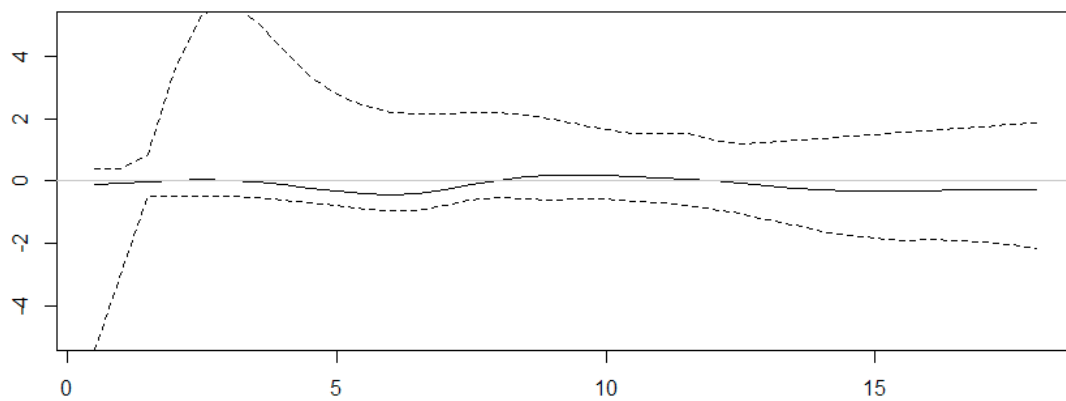


Figura 19. Diferencias entre las curvas de los z-score estimandos en ambos tipos de patologías según la edad (línea gruesa) y su intervalo de confianza del 95% (líneas discontinuas) en mujeres

5.1.2. ANÁLISIS DEL PESO

En las tablas 7 y 8 se muestran las medias y la desviación estándar del z-score del peso para cada grupo de edad, comparando ambas patologías (HPA y PKU), con la significación estadística correspondiente en cada caso (valor de p). Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre los individuos HPA y PKU en cuanto al peso, en ninguno de los grupos de edad, tanto en varones como en mujeres.

Para probar los efectos aleatorios del modelo completo, se ha utilizado el test RLRT. Los valores de p se aportan para comprobar si cada parámetro de varianza de los efectos aleatorios es mayor que cero σ^2_{ω} . la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave del modelo (1). $[g_i(\cdot)]$ representa las curvas específicas de sujeto, es el parámetro de varianza de la correspondiente parte aleatoria de la función suave $[h(\cdot)]$, y finalmente es la parte aleatoria de la representación del modelo mixto de la función suave $[f(\cdot)]$, que representa el efecto suave de la edad. Los efectos aleatorios y fijos del factori por interacciones de la curva ha sido eliminado del modelo completo. Los efectos fijos se obtuvieron del modelo final.

EDAD	VARONES		
	media(DE) - N		
	HPA	PKU	valor de p
6 meses	0.172 (0.916) - 24	0.239 (1.145) - 21	1
1 año	0.762 (1.151) - 24	0.551 (1.099) - 21	0.453
1.5 años	0.721 (0.886) - 24	0.826 (1.03) - 21	0.865
2 años	0.711 (1.013) - 23	0.838 (0.944) - 21	0.698
2.5 años	0.702 (0.9) - 22	0.609 (0.753) - 20	0.811
3 años	0.676 (1.076) - 22	0.626 (0.919) - 19	0.794
3.5 años	0.681 (1.094) - 19	0.796 (0.84) - 19	0.559
4 años	0.768 (1.17) - 19	0.614 (0.753) - 19	0.988
4.5 años	0.956 (1.169) - 19	0.874 (0.731) - 19	0.907
5 años	1.075 (1.138) - 17	0.959 (0.735) - 19	1
5.5 años	1.099 (1.382) - 18	0.884 (0.684) - 19	0.753
6 años	0.544 (2.41) - 18	0.932 (0.77) - 19	0.704
6.5 años	0.946 (1.387) - 16	1.028 (0.741) - 18	0.617
7 años	1.172 (1.42) - 16	1.103 (0.778) - 17	0.971
7.5 años	1.203 (1.417) - 16	1.123 (0.749) - 16	0.665
8 años	1.179 (1.462) - 16	1.218 (0.945) - 16	0.985
8.5 años	1.157 (1.205) - 14	1.261 (0.996) - 15	0.879
9 años	0.958 (1.065) - 13	1.214 (0.819) - 16	0.726
9.5 años	1.08 (1.057) - 12	1.257 (0.711) - 15	0.884
10 años	0.919 (1.063) - 12	1.294 (0.678) - 14	0.662
10.5 años	0,889 (1,088) - 11	1,289 (0,639) 21	0,599
11 años	0.637 (1.004) - 9	0.901 (0.554) - 10	0.968
11.5 años	1.006 (0.926) - 8	1.173 (0.668) - 10	0.965
12 años	0.904 (0.989) - 7	0.983 (0.539) - 10	1
12.5 años	0.82 (1.034) - 6	0.97 (0.629) - 10	0.745
13 años	0.833 (1.027) - 6	0.888 (0.648) - 10	0.635
13.5 años	0.444 (1.362) - 5	0.851 (0.745) - 9	0.438
14 años	0.132 (1.425) - 5	0.718 (0.718) - 9	0.298
14.5 años	-0.512 (1.256) 4	0.749 (0.883) - 8	0.109
15 años	-0.795 (1.26) - 4	0.63 (0.989) - 8	0.089
15.5 años	-0.25 (1.011) - 3	0.737 (1.046) - 8	0.279
16 años	-0.263 (1.111) 3	0.731 (0.951) - 8	0.376
16.5 años	-0.127 (1.108)- 3	0.56 (0.936) - 8	0.497
17 años	-0.54 (0.594) - 2	0.563 (1.208) - 9	0.327
17.5 años	0.28 (-) - 1	0.577 (1.204) - 9	0.485
18 años	0.15 (-) - 1	0.806 (1.161) - 8	0.444

Tabla 7. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score del peso en varones, para cada tipo de patología en función de la edad, con su correspondiente valor de p. N: número de pacientes.

EDAD	MUJERES media(DE) - N		
	HPA	PKU	valor de p
6 meses	0.263 (0.847) - 31	0.268 (0.837) - 33	0.925
1 año	0.481 (0.829) - 31	0.523 (0.727) - 32	0.532
1.5 años	0.454 (0.885) - 28	0.493 (0.799) - 33	0.789
2 años	0.373 (0.841) - 27	0.56 (0.931) - 30	0.318
2.5 años	0.373 (0.844) - 23	0.786 (0.856) - 30	0.064
3 años	0.265 (0.791) - 21	0.724 (1.02) - 28	0.14
3.5 años	0.272 (0.72) - 17	0.608 (1.106) - 26	0.291
4 años	0.323 (0.745) - 16	0.434 (0.979) - 28	0.788
4.5 años	0.254 (0.655) - 15	0.292 (0.991) - 29	0.72
5 años	0.221 (0.762) - 14	0.462 (0.994) - 28	0.23
5.5 años	0.488 (0.866) - 14	0.526 (1.151) - 28	0.831
6 años	0.471 (0.993) - 14	0.647 (1.123) - 28	0.274
6.5 años	0.575 (0.912) - 13	0.62 (1.223) - 28	0.737
7 años	0.612 (1.033) - 10	0.669 (1.126) - 26	0.685
7.5 años	0.815 (1.063) - 7	0.62 (1.193) - 26	0.775
8 años	0.826 (1.308) - 6	0.768 (1.024) - 25	0.981
8.5 años	0.882 (1.331) - 5	0.802 (0.982) - 25	0.956
9 años	0.708 (1.299) - 5	0.744 (0.943) - 24	0.665
9.5 años	0.872 (1.046) - 4	0.72 (0.974) - 24	0.768
10 años	1.04 (1.128) - 4	0.592 (0.963) - 24	0.412
10.5 años	0.758 (0.696) - 4	0.51 (0.649) - 23	0.473
11 años	0.615 (0.839) - 4	0.381 (0.694) - 23	0.517
11.5 años	0.67 (0.771) - 4	0.431 (0.713) - 22	0.5
12 años	0.725 (0.618) - 4	0.413 (0.663) - 21	0.452
12.5 años	0.805 (0.849) - 4	0.287 (0.675) - 21	0.221
13 años	0.47 (0.536) - 4	0.325 (0.685) - 19	0.598
13.5 años	0.523 (0.395) - 3	0.024 (0.679) - 17	0.179
14 años	0.61 (0.496) - 3	-0.008 (0.785) - 17	0.138
14.5 años	0.58 (0.255) - 2	-0.022 (0.826) - 17	0.187
15 años	0.68 (0.071) - 2	0.031 (0.85) - 16	0.261
15.5 años	0.89 (0.156) - 2	0.035 (0.834) - 16	0.157
16 años	0.89 (0.58) - 2	0.072 (0.852) - 16	0.157
16.5 años	0.79 (0.693) - 2	0.05 (0.959) - 15	0.232
17 años	0.57 (-) - 1	-0.019 (0.769) - 14	0.533
17.5 años	- (-) - 0	0.031 (0.651) - 13	
18 años	- (-) - 0	-0.541 (0.958) - 13	

Tabla 8. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score del peso en mujeres, para cada patología, con su valor de p para cada edad. N: número de pacientes.

Efectos fijos	Coefficiente	Error Estándar	valor de p
Intercept	0,5436	0,1822	0,0030
Tiempo	-0,0497	0,0189	0,0088
PKU (tomando HPA como categoría de referencia)	-0,3759	0,2551	0,8126
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Curvas específicas de sujeto (σ^2_{η})	351,6028	< 0,0000	
Tipo de patología (σ^2_{η})	0	1	
Efecto no lineal de la edad (σ^2_{η})	38,3348	< 0,0000	

Tabla 9. Resultados del modelo de efectos mixtos (1) para individuos varones

Efectos fijos	Coefficiente	Error Estándar	valor de p
Intercept	0,3926	0,1660	0,0182
Tiempo	-0,0105	0,0138	0,4483
PKU (tomando HPA como categoría de referencia)	0,1031	0,185	0,5804
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Curvas específicas de sujeto (σ^2_{η})	460,4141	< 0,0000	
Tipo de patología (σ^2_{η})	0,0368	0,3291	
Efecto no lineal de la edad (σ^2_{η})	23,6207	< 0,0000	

Tabla 10. Resultados del modelo de efectos mixtos (1) para mujeres

El modelo (1) se describe en la sección de análisis estadístico.

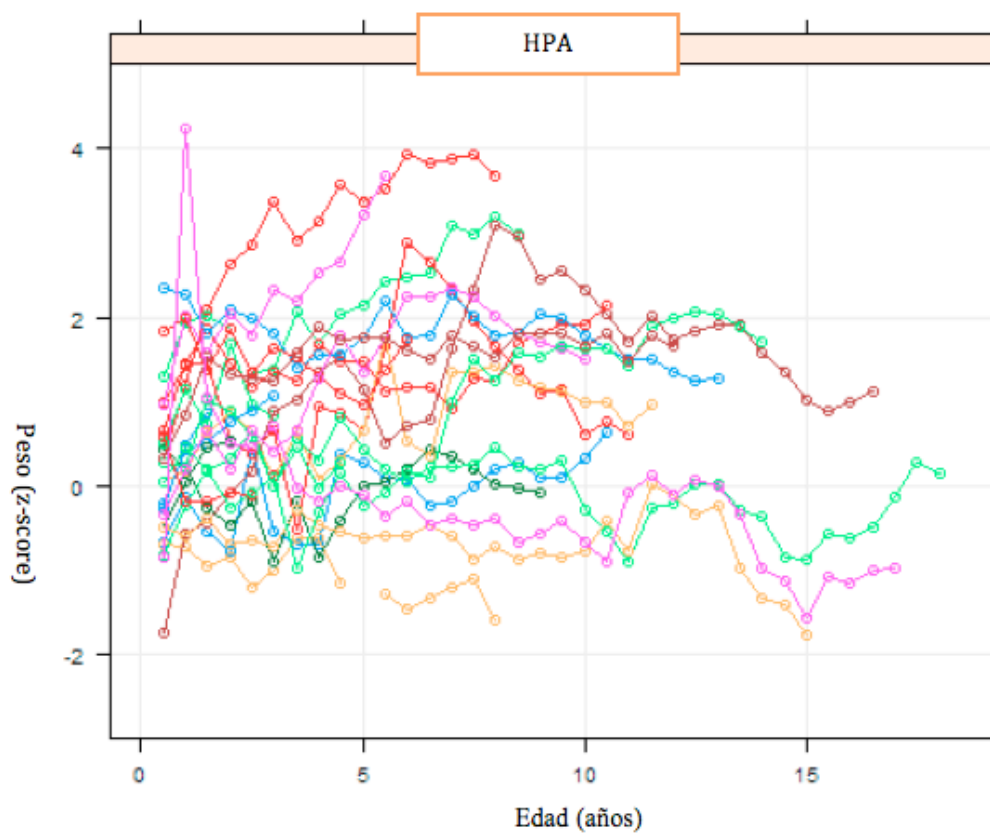


Figura 20 A. Trayectorias de las medias de los z-score del peso correspondientes a niños varones HPA con edades comprendidas entre los 6 meses y los 18 años.

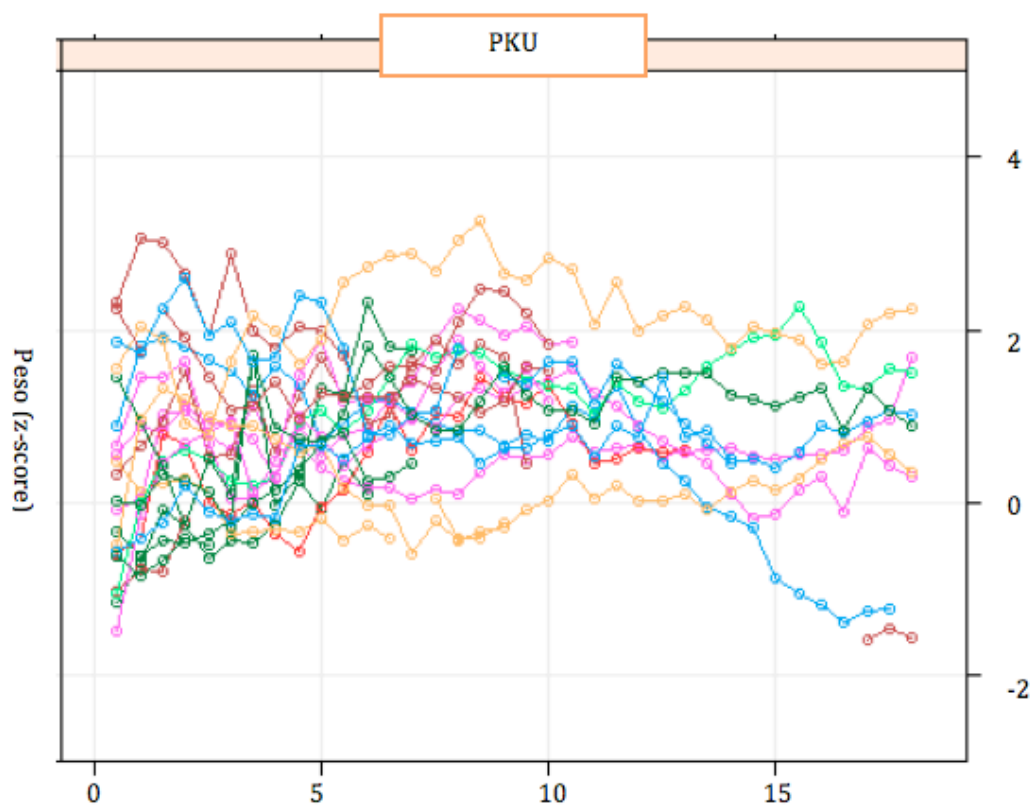


Figura 20 B. Trayectorias de las medidas del z-score del peso correspondientes a niños varones PKU con edades entre los 6 meses y los 18 años.

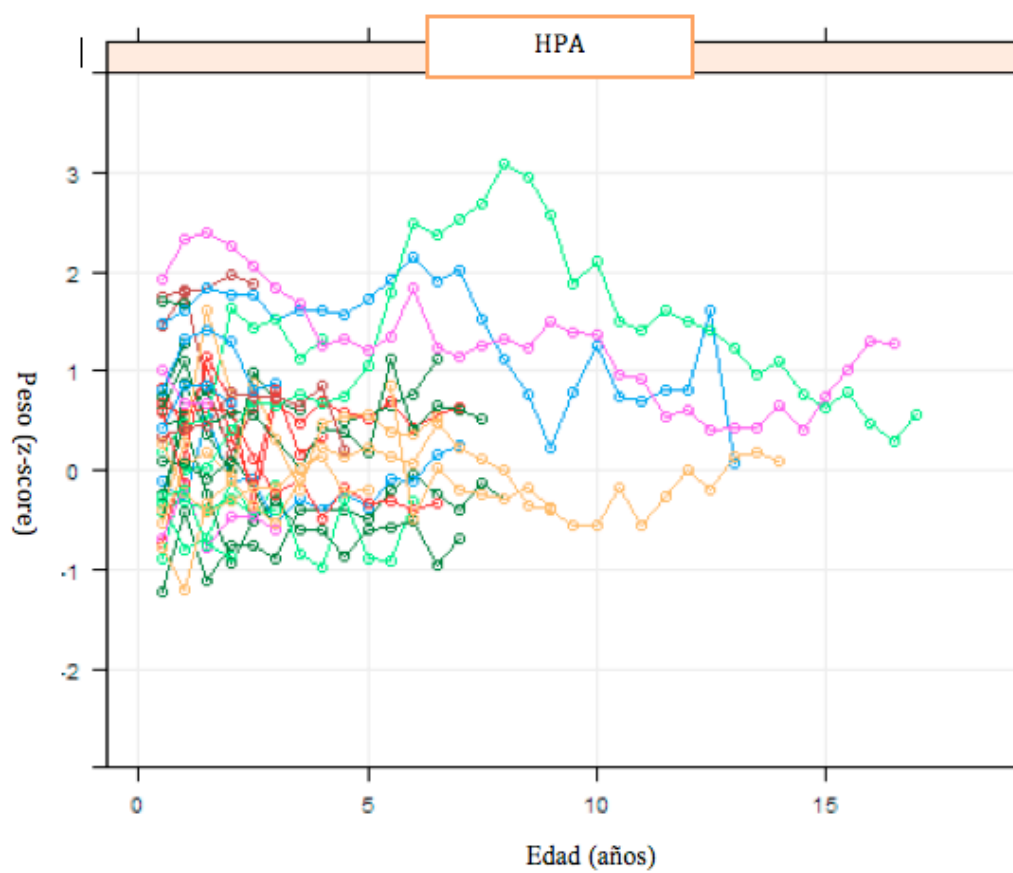


Figura 20 C. Trayectorias de las medidas del z-score del peso correspondientes a niñas HPA con edades entre los 6 meses y los 18 años.

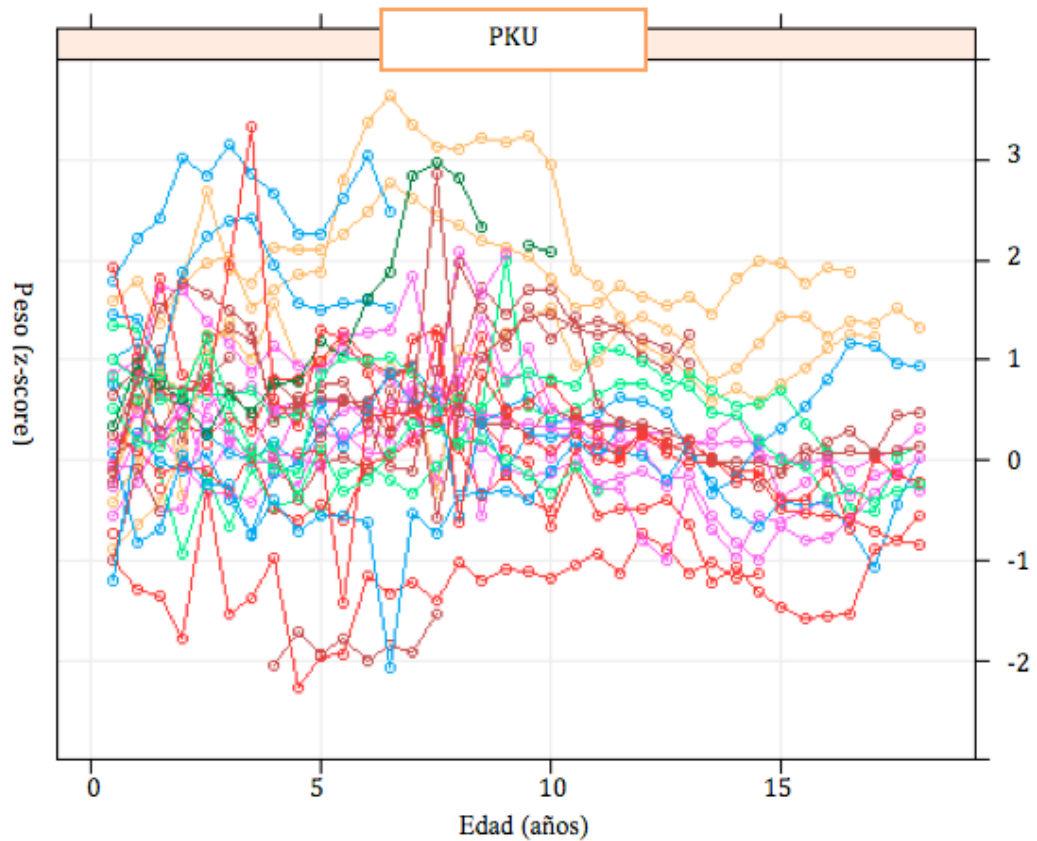


Figura 20 D. Trayectorias de las medidas del z-score del peso correspondientes a niñas PKU con edades entre los 6 meses y los 18 años.

Los niños varones HPA tienen un peso similar a los pacientes PKU en los primeros 5 años de vida, separándose discretamente a partir de esa edad, ya que los HPA presentan tendencia a tener mayor peso, sin ser significativa dicha diferencia (Figura 21).

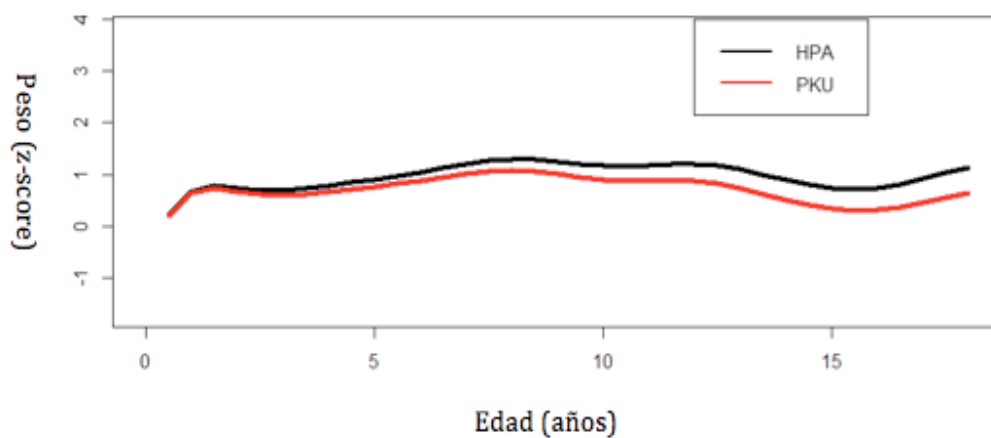


Figura 21. Curvas estimadas para los z-score del peso de acuerdo con la edad para ambos tipos de patología (HPA y PKU) en individuos varones.

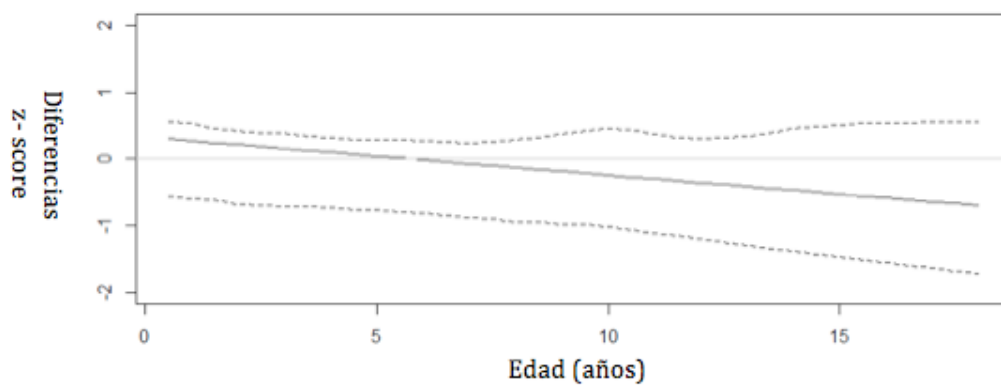


Figura 22. Diferencias entre las curvas de los z-score en ambos tipos de patologías de acuerdo con la edad (línea continua) y su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas) en individuos varones.

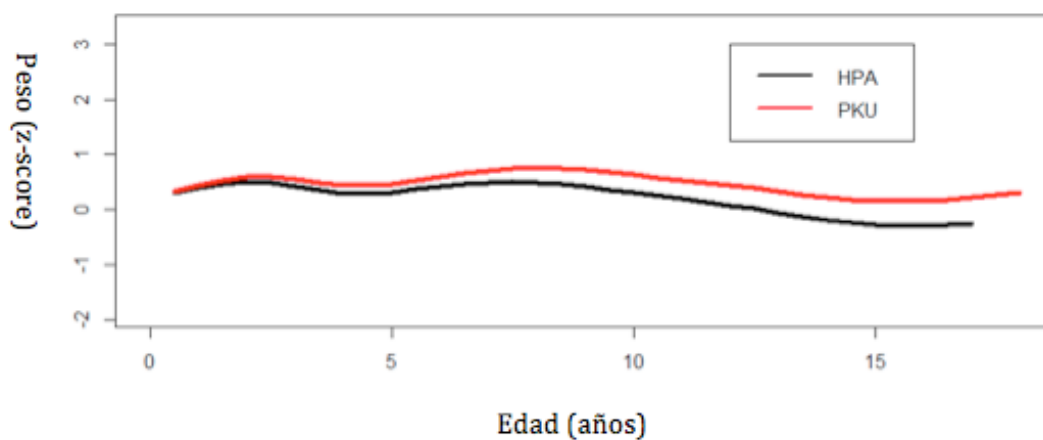


Figura 23. Curvas estimadas para los z-score del peso de acuerdo con la edad para ambos tipos de patología (HPA y PKU) en mujeres.

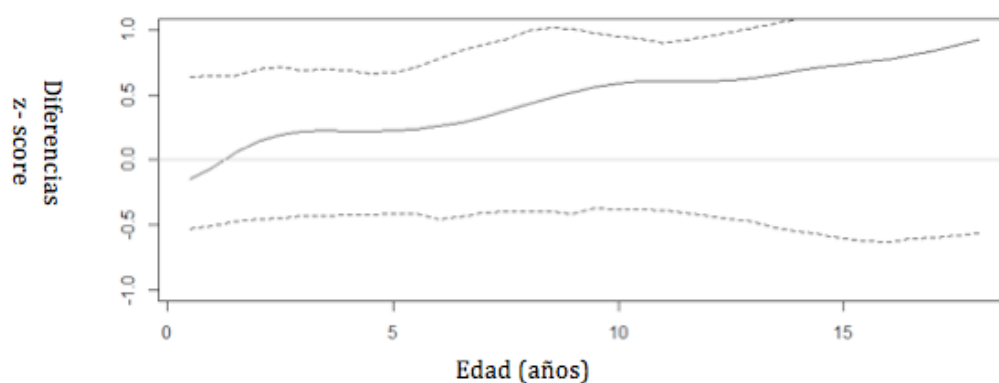


Figura 24. Diferencias entre las curvas de los z-score en ambos tipos de patologías de acuerdo con la edad (línea continua) y su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas) en mujeres.

En las **niñas** observamos, al igual que en los varones, un peso similar en los HPA y PKU, siendo a partir de los 5 años ligeramente superior en este caso, al contrario que en los varones, en el grupo de las PKU (Figura 23).

El aumento de peso en los HPA y PKU con respecto a la población general es más manifiesto en las varones que en las mujeres, como se refleja en la tabla 11.

	PKU		HPA	
	MEDIA $\pm$ DS	RANGO	MEDIA $\pm$ DS	RANGO
VARONES	0,977 $\pm$ 0,197	0,630-1,294	0,872 $\pm$ 0,270	0,132-1,203
MUJERES	0,539 $\pm$ 0,191	0,240-0,802	0,585 $\pm$ 0,220	0,221-1,040

Tabla 11. Media, desviación estándar (DS) y rango de los z-score del peso en ambos sexos y en ambas patologías (HPA y PKU)

5.1.3. ANÁLISIS DEL IMC

VARONES					
	HPA	N	PKU	N	Valor de p
6 meses	0.044 (0.789)	24	0.139 (1.329)	21	0.964
1 año	0.817 (1.015)	24	0.929 (1.044)	21	0.601
1.5 años	0.938 (0.789)	24	1.185 (1.243)	21	0.75
2 años	0.889 (1.199)	23	1.203 (0.976)	21	0.249
2.5 años	0.427 (1.18)	22	0.86 (0.889)	20	0.137
3 años	0.627 (1.16)	21	0.758 (1.009)	19	0.957
3.5 años	0.994 (1.574)	19	1.297 (1.403)	19	0.54
4 años	0.676 (1.468)	19	0.802 (0.796)	19	0.483
4.5 años	0.818 (1.342)	19	0.959 (0.943)	19	0.804
5 años	0.976 (1.216)	17	0.987 (0.629)	19	0.874
5.5 años	0.768 (1.378)	18	0.915 (0.661)	19	0.784
6 años	0.875 (1.585)	17	0.826 (0.627)	19	0.547
6.5 años	0.872 (1.535)	16	0.946 (0.71)	17	0.843
7 años	0.995 (1.438)	16	0.965 (0.708)	18	0.876
7.5 años	1.039 (1.467)	16	1.193 (0.837)	16	0.865
8 años	1.038 (1.464)	16	1.256 (0.952)	16	0.821
8.5 años	0.964 (1.227)	14	1.42 (0.912)	15	0.444
9 años	0.784 (1.156)	13	1.459 (0.91)	16	0.281
9.5 años	1.083 (1.081)	12	1.558 (0.699)	16	0.365
10 años	0.902 (1.12)	12	1.678 (0.658)	14	0.067
10.5 años	0.799 (1.174)	12	1.474 (0.543)	12	0.141
11 años	0.547 (1.178)	9	1.321 (0.498)	10	0.252
11.5 años	0.668 (1.395)	8	1.326 (0.654)	9	0.177
12 años	0.724 (1.551)	7	1.167 (0.724)	10	0.406
12.5 años	0.818 (1.698)	6	1.002 (0.846)	10	0.792
13 años	0.713 (1.648)	6	0.993 (0.815)	10	0.587
13.5 años	0.562 (1.78)	5	0.878 (0.835)	9	0.894
14 años	0.234 (1.623)	5	0.706 (0.796)	9	0.689
14.5 años	-0.44 (1.405)	4	0.91 (0.876)	8	0.109
15 años	-0.558 (1.282)	4	0.979 (0.876)	8	0.048
15.5 años	-0.477 (1.332)	3	0.956 (0.971)	8	0.082
16 años	-0.457 (1.383)	3	0.885 (0.918)	8	0.085
16.5 años	-0.273 (1.327)	3	0.714 (0.853)	8	0.133
17 años	-1.02 (0.368)	2	0.621 (0.722)	9	0.036
17.5 años	-0.65	1	0.562 (0.751)	9	0.22
18 años	-0.85	1	0.54 (0.647)	8	0.222

Tabla 12. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score del IMC en varones, para cada tipo de patología en función de la edad, con su correspondiente valor de p

MUJERES					
	HPA	N	PKU	N	Valor de p
6 meses	0.064 (0.858)	33	-0.055 (0.665)	31	0.629
1 año	0.539 (0.893)	33	0.693 (0.974)	31	0.623
1.5 años	0.739 (1.109)	30	1.025 (1.105)	31	0.386
2 años	0.871 (1.171)	28	1.001 (1.105)	30	0.846
2.5 años	0.672 (1.142)	24	1.005 (1.03)	29	0.234
3 años	0.413 (1.004)	22	1.034 (1.111)	28	0.018
3.5 años	0.444 (1.046)	18	0.897 (1.251)	27	0.084
4 años	0.303 (1.064)	17	0.72 (1.147)	28	0.202
4.5 años	0.274 (0.931)	16	0.671 (1.17)	27	0.263
5 años	0.249 (0.958)	15	0.844 (1.119)	27	0.125
5.5 años	0.38 (0.889)	15	1.092 (1.215)	27	0.06
6 años	0.581 (1.083)	15	1.08 (1.282)	27	0.222
6.5 años	0.586 (1.003)	14	1.069 (1.302)	27	0.308
7 años	0.614 (1.113)	10	1.035 (1.239)	26	0.396
7.5 años	0.939 (1.061)	7	1.083 (1.28)	26	0.965
8 años	0.973 (1.27)	6	1.253 (1.352)	25	0.822
8.5 años	1.274 (1.345)	5	1.213 (1.335)	25	0.824
9 años	1.236 (1.256)	5	1.075 (1.24)	24	0.817
9.5 años	1.373 (1.132)	4	1.134 (1.218)	24	0.718
10 años	1.423 (1.224)	4	0.96 (1.152)	24	0.554
10.5 años	1.347 (1.147)	4	0.798 (1.091)	23	0.432
11 años	1.16 (1.169)	4	0.72 (1.112)	23	0.562
11.5 años	1.358 (1.167)	4	0.878 (1.166)	21	0.481
12 años	1.39 (0.992)	4	0.923 (1.153)	21	0.504
12.5 años	1.222 (0.818)	4	0.912 (1.218)	21	0.528
13 años	1.298 (0.687)	4	0.955 (1.167)	19	0.31
13.5 años	1.433 (0.762)	3	0.751 (1.069)	17	0.168
14 años	1.47 (0.762)	3	0.664 (1.118)	17	0.138
14.5 años	1.695 (0.276)	2	0.698 (1.232)	16	0.14
15 años	1.58 (0.467)	2	0.785 (1.222)	16	0.182
15.5 años	1.68 (0.577)	3	0.801 (1.219)	15	0.123
16 años	1.703 (0.707)	3	0.763 (1.242)	15	0.164
16.5 años	1.603 (0.78)	3	0.726 (1.337)	14	0.207
17 años	1.26 (0.523)	2	0.496 (1.035)	14	0.266
17.5 años	1.65	1	0.511 (1.035)	13	0.429
18 años	1.4	1	0.51 (0.95)	13	0.32

Tabla 13. Frecuencia, media y desviación estándar del z-score del IMC en mujeres, para cada tipo de patología en función de la edad, con su correspondiente valor de p.

En las figuras 24 A-D se muestran las trayectorias individuales de los z-score del IMC para cada individuo, varones y mujeres, con cada tipo de patología del estudio (PKU y HPA). Como se muestra en estas figuras, existe una gran variación en las diferentes trayectorias. Esto ocurre tanto en varones como en mujeres, así como tanto en la PKU como en la HPA.

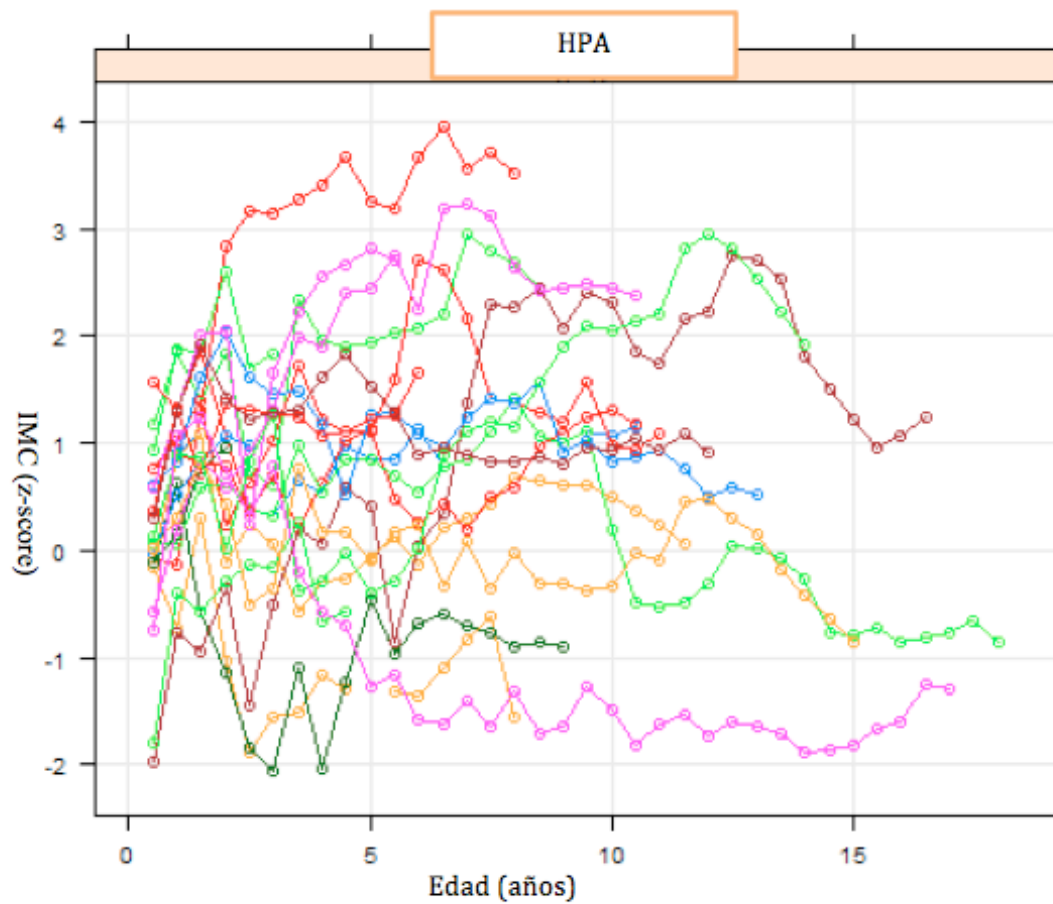


Figura 25 A. Trayectorias de las medidas del z-score del IMC para varones HPA entre 6 meses y 18 años.

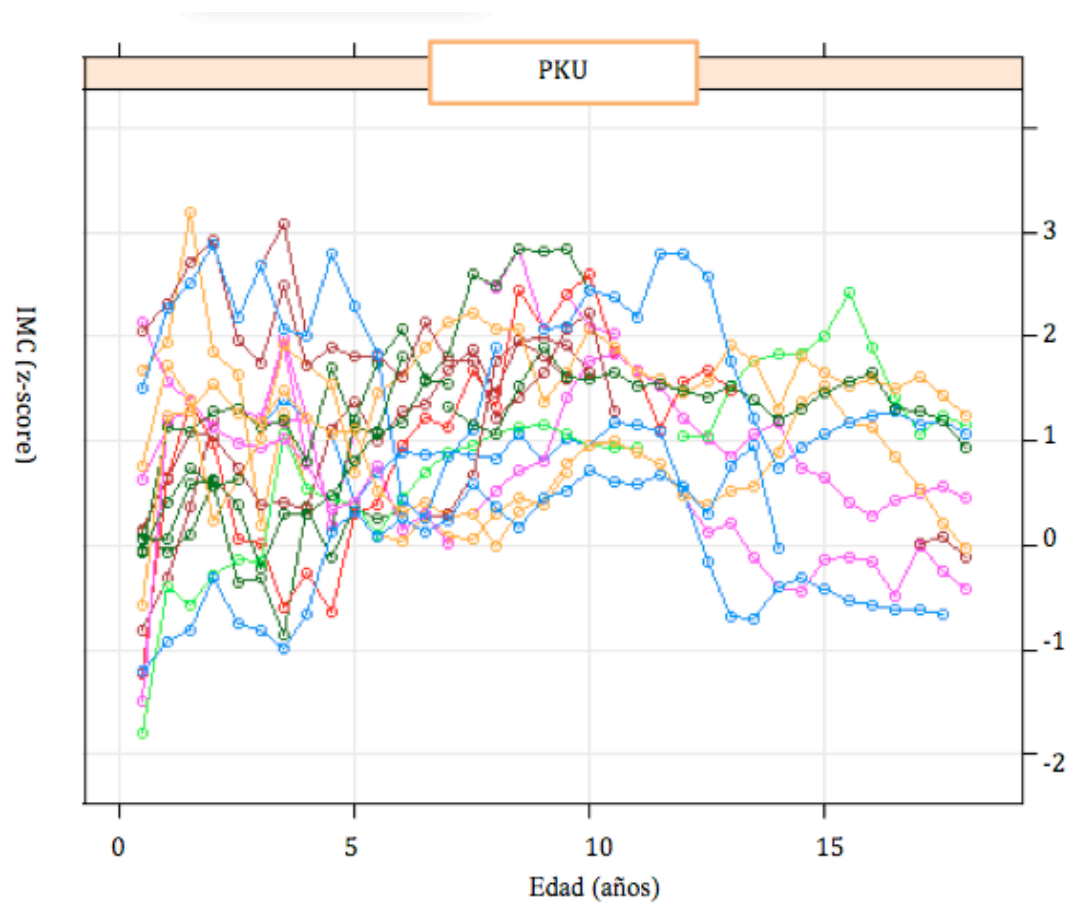


Figura 25 B. Trayectorias de las medidas del z-score del IMC para varones PKU entre 6 meses y 18 años.

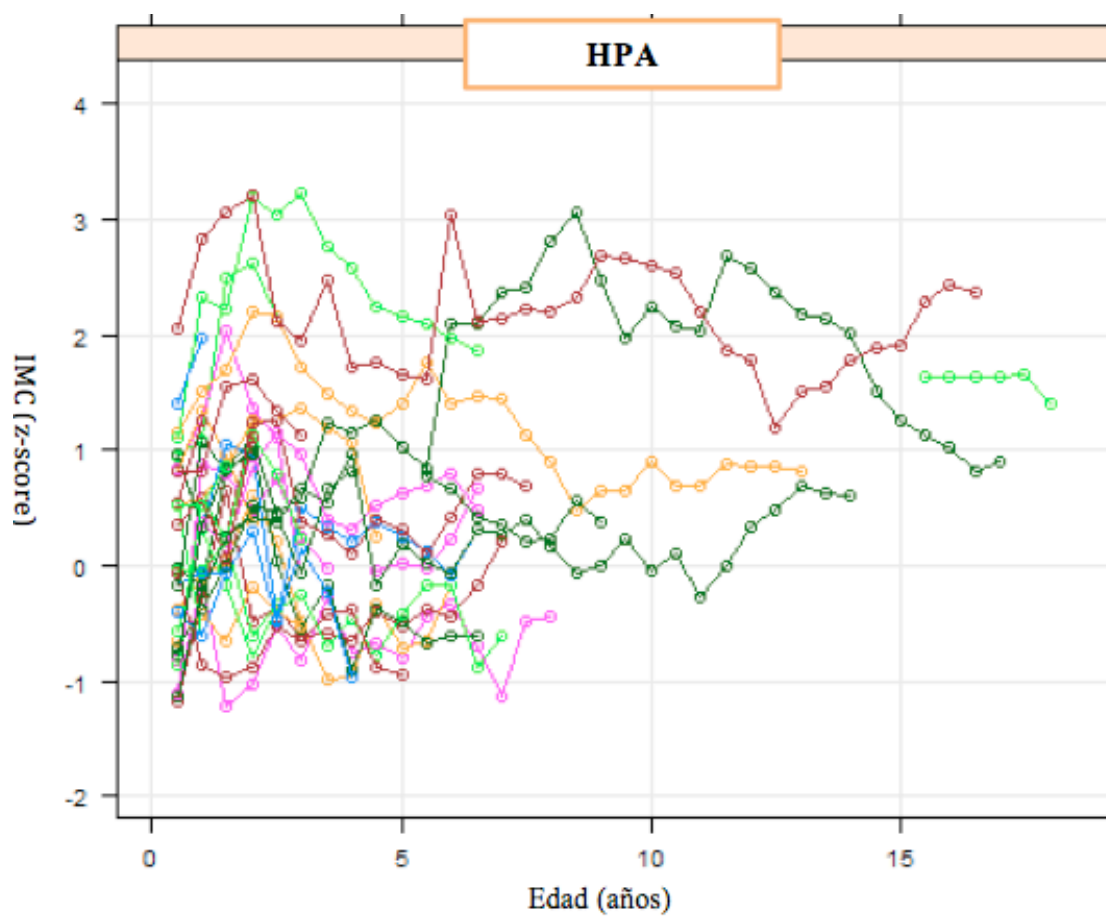


Figura 25 C. Trayectorias de las medidas del z-score del IMC para mujeres HPA entre 6 meses y 18 años.

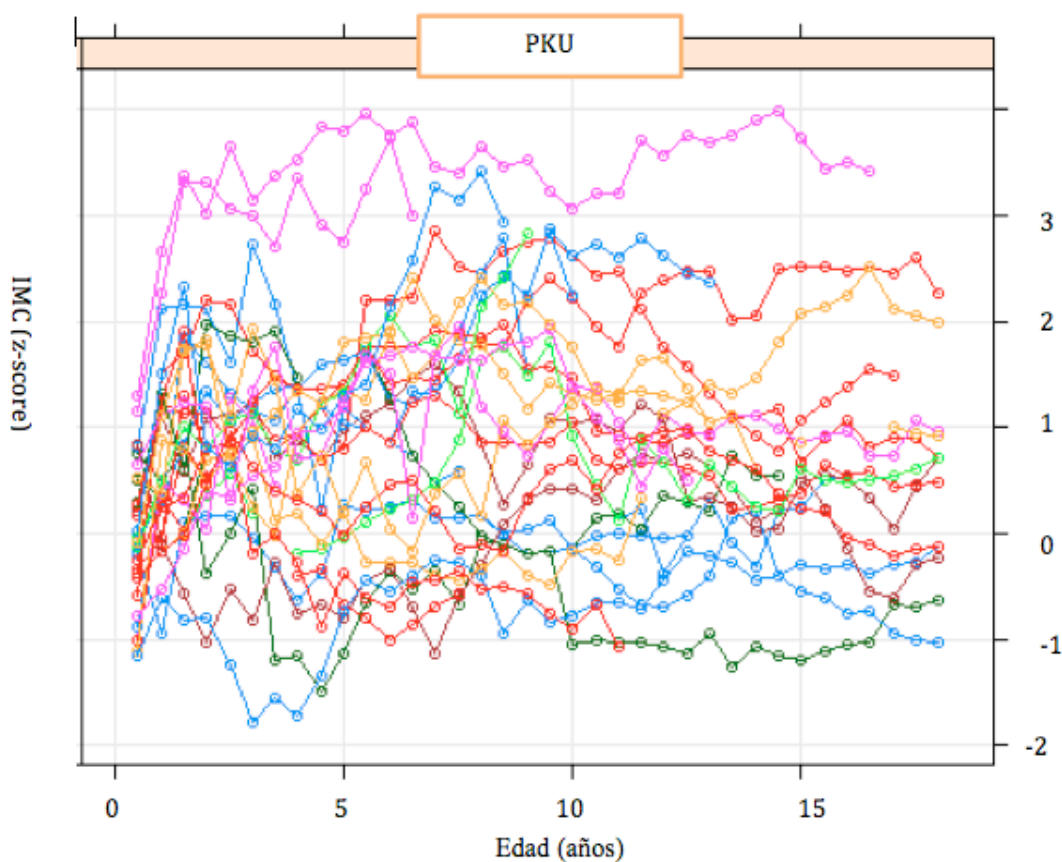


Figura 25 D. Trayectorias de las medidas del z-score del IMC para mujeres PKU entre 6 meses y 18 años.

Las trayectorias estimadas para cada tipo de patología: HPA y PKU se describen en la figura 26, donde se puede observar como el IMC de los HPA y PKU varones está discretamente por encima del de la población de referencia. Las diferencias de las curvas estimadas de los HPA y PKU y los intervalos de confianza al 95%, se muestran en la figura 27. Como se puede observar, la evolución de los varones es similar en ambos tipos de patologías, ligeramente mayor en los PKU sin diferencias significativas entre ambas patologías.

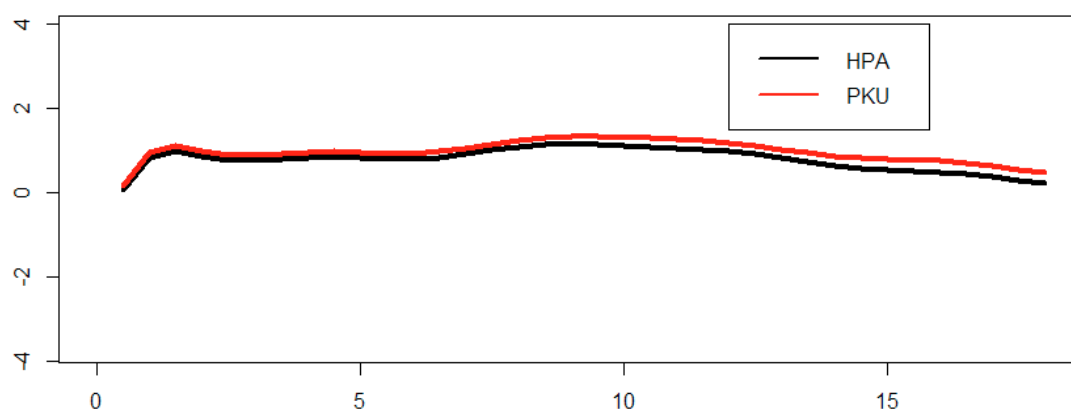


Figura 26. Curvas estimadas del z-score del IMC estimado a largo plazo para varones HPA y PKU.

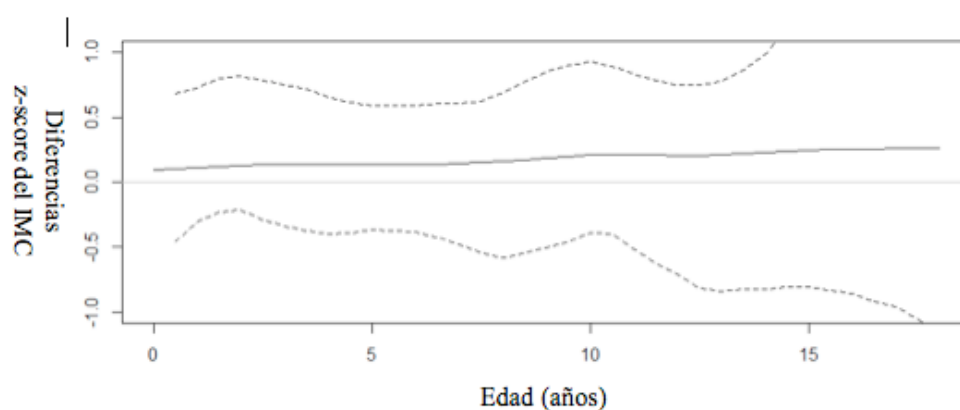


Figura 27. Curvas que representan las diferencias estimadas en el z-score del IMC en varones entre los HPA y los PKU.

En la figura 28 se representan las curvas que indican la evolución con el tiempo de los z-score del IMC de las **mujeres** en ambas patologías; observándose un cruce a los 8 y los 12 años, momento en el que las pacientes PKU presentan mayor IMC. El IMC al final del crecimiento, es menor en las pacientes PKU, sin existir diferencias estadísticamente significativas en el IMC entre ambas patologías (figura 29).

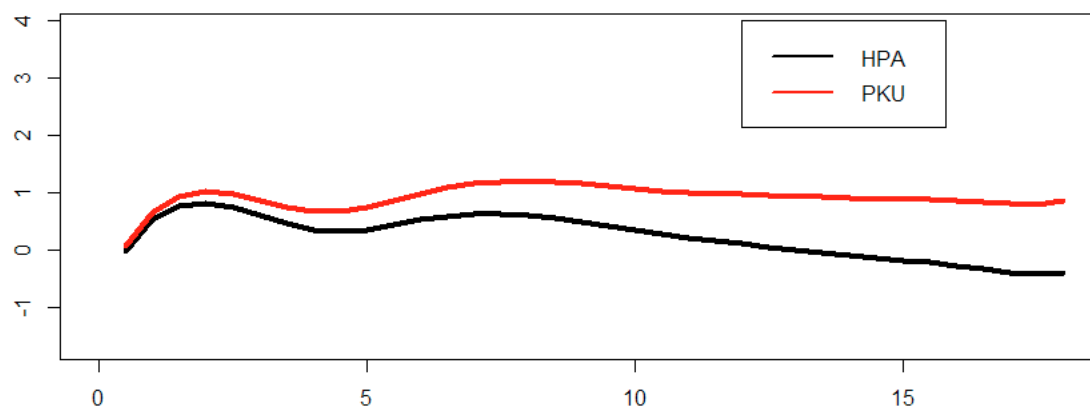


Figura 28. Curvas estimadas del z-score del IMC estimado a largo plazo para mujeres HPA y PKU.

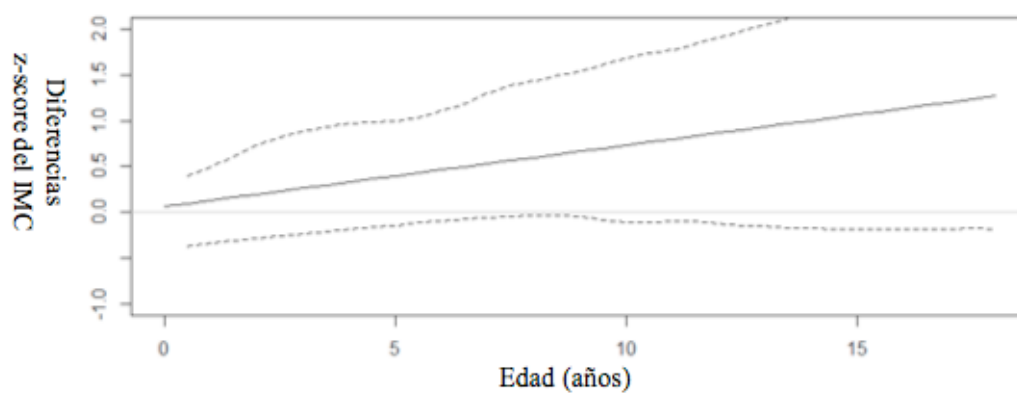


Figura 29. Curvas de las diferencias estimadas en el IMC en mujeres HPA y PKU

Efectos fijos	Coefficiente	DS	valor de p
Intercept	0.5180311	0.17840994	0.0038
Tiempo	0.0428615	0.02040831	0.0360
PKU (tomando la HPA como población de referencia)	0.1524018	0.24263678	0.5333
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Curvas específicas de sujeto (σ^2_{η})	396.0658	< 0.0000	
Tipo de Patología (σ^2_{η})	0	1	
Efecto no lineal de la edad (σ^2_{η})	81.2977	< 0.0000	

Tabla 14. Resultado del modelo de efectos mixtos para el z-score del IMC de los varones.

Efectos fijos	Coefficiente	DS	valor de p
Intercept	-1.8231	0.3930	0.0000
Tiempo	0.1958	0.0456	0.0000
PKU:tiempo	0.1695	0.2000	0.3998
Efectos aleatorios	RLRT	valor de p	
Subject specific curves (σ^2_{η})	531.6713	< 0.0000	
Tipo de Patología (σ^2_{η})	0	1	
Efecto no lineal de la edad (σ^2_{η})	119.915	< 0.0000	

Tabla 15. Resultado del modelo de efectos mixtos para el z-score del IMC de los mujeres.

5.1.4. RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LOS PACIENTES CON EMO

Dentro del grupo de pacientes que desarrollaron EMO, 3 de ellos eran pacientes seguidos desde el nacimiento (pacientes 16, 30 y 36), por lo que fueron incluidos en el estudio de crecimiento. Los z-score del peso y talla se recogen en la tabla 16.

PACIENTES CON EMO				
EDAD	TALLA	N	PESO	N
0 meses	0.41 (1,89)	3	0,55 (1,14)	3
6 meses	-0,42 (2,14)	3	-0.02 (1,07)	3
1 año	-0,71 (1,072)	3	-0.23 (0,91)	3
1.5 años	-0,83 (2,04)	3	0.32 (1,25)	3
2 años	-0,71 (3,05)	3	0,49 (1,06)	3
2.5 años	-0,52 (3,40)	3	0,16 (1,07)	3
3 años	-0,50 (3,7)	3	0,16 (0,86)	3
3.5 años	-0,53 (3,96)	3	-0,11 (0,87)	3
4 años	0.45 (4,19)	3	0,16 (0,84)	3
4.5 años	-0,14 (4,41)	3	0,16 (0,83)	3
5 años	-0,53 (4,63)	3	0,09 (0,75)	3
5.5 años	-0,16 (4,74)	3	0,51 (0,91)	3
6 años	-0,18 (4,95)	3	0,15 (0,80)	3
6.5 años	-0,17 (-)	2	-0,65 (-)	2
7 años	-0,01 (-)	2	0,06 (-)	2
7.5 años	-0,28 (-)	2	-0,04 (-)	2
8 años	0,03 (-)	2	-0,01 (-)	2
8.5 años	-0,12 (-)	2	-0,10 (-)	2
9 años	-0,01 (-)	2	-0,20 (-)	2
9.5 años	-0,06 (-)	2	-0,28 (-)	2
10 años	-0,06 (-)	2	0,23 (-)	2
10.5 años	-0,04 (-)	2	0,19 (-)	2
11 años	0,11 (-)	2	0,45 (-)	2
11.5 años	0,17 (-)	2	1,18 (-)	2

Tabla 16. Media y desviación estándar de los z-score de la talla y el peso de pacientes con EMO.

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS

Se estudió la mineralización ósea en un total de 43 de los pacientes fenilcetonúricos (41,9% varones, media de edad: 17,6 años, rango (7- 41 años), de los que 28 (65,1%) eran menores de 20 años de edad.

El 62,8% de los pacientes (27) fueron diagnosticados de PKU clásica, 9 (20,9%) de PKU moderada y 7 (16,3%) de PKU leve. 14 pacientes se diagnosticaron de PKU tardíamente, mediante síntomas clínicos (32,6%). El 28% (12 pacientes) reciben tratamiento con BH4, de los cuales, uno de ellos es una PKU clásica, 5 PKU moderada y 6 PKU leve. En la Tabla 17 aparecen reflejados la edad, el sexo, el fenotipo, el genotipo y edad al diagnóstico de cada uno de los pacientes.

En la Tabla 18 se muestran las características nutricionales de los pacientes del estudio.

Paciente	Edad	Sexo	Fenotipo	Genotipo	Diagnóstico
1	7	V	Clásica	R243Q/C728G>A	<1 mes
2	13	M	Leve	R243Q/E390G	<1 mes
3	8	V	Moderada	R68S/delF39	<1 mes
4	20	M	Moderada	R261Q/IVS10-11G>A	<1 mes
5	37	V	Clásica	R408W/ND	10 años
6	14	V	Clásica	IVS10/R261Q	<1 mes
7	17	M	Moderada	P244L/R261Q	<1 mes
8	28	V	Clásica	-	5 meses
9	32	V	Clásica	R158Q/R158Q	3 meses
10	7	V	Leve	P211T/IVS10-11G>A	<1 mes
11	29	M	Clásica	IVS10-11G>A/R243Q	20 años
12	9	M	Clásica	V388M/E280K	<1 mes
13	30	V	Moderada	E280K/V388M	6 años
14	11	V	Clásica	I65T/R243X	<1 mes
15	7	V	Clásica	IVS10-11G>A/I65T	<1 mes
16	28	M	Clásica	R261Q/IVS10-11G>A	<1 mes
17	14	M	Moderada	R158Q/L48S	<1 mes
18	11	M	Clásica	IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	<1 mes
19	10	M	Clásica	IVS10-11G>A/R243X	<1 mes
20	7	M	Clásica	F55fs/R261Q	<1 mes
21	23	M	Clásica	IVS10-11G>A/I65T	<1 mes
22	11	M	Leve	R176L/ND	4 meses
23	17	V	Clásica	E280K/IVS10-11G>A	<1 mes
24	9	M	Clásica	R261Q/R176X	<1 mes
25	18	M	Clásica	E280K/R261Q	<1 mes
26	13	V	Leve	S303A/G46S	5 meses
27	16	M	Leve	R243Q/E390G	7 años
28	7	V	Clásica	S349P/IVS10-11G>A	2 meses
29	23	M	Clásica	V388M/ND	<1 mes
30	7	V	Clásica	R270K/IVS10-11G>A	<1 mes
31	28	V	Clásica	R261Q/F55f	<1 mes
32	9	V	Clásica	R261Q/IVS10-11G>A	<1 mes
33	41	V	Clásica	I65T/R2T43X	29 años
34	38	M	Clásica	E280K/C838G>A	35 años
35	11	M	Clásica	-	<1mes
36	10	M	Clásica	R243X/V388M	<1 mes
37	36	M	Leve	IVS10-11G>A/I65T	6 años
38	36	M	Clásica	R243X/IVS10-11G>A	<1 mes
39	7	M	Moderada	L48S/Y277D	<1 mes
40	7	M	Moderada	L48S/Y277D	<1 mes
41	22	V	Moderada	Q304Q/R176L	3 meses
42	33	M	Moderada	R243X/L48S	3 años
43	7	M	Leve	A300S/C203Y	7 años

Tabla 17. Características generales de los pacientes del estudio. Edad en años. Sexo: V (varón), M (mujer). ND: no determinada

Paciente (edad)	Tto con BH4	kcal/día	Prot totales (g/kg/día)	Prot naturales (g/kg/día)	Ingesta de Ca (mg/día) (N:800)	Ingesta de P (mg/día) (N:800)	Media Phe sangre
1 (7 a)	No	2300 (1300-2300)	2,80 (0,87)	0,58	1261	1384	287,8 ($<480 \mu\text{mol/L}$)
2 (13 a)	Sí	2172 (1650-3300)	2,40 (0,92)	2	1438	1086	279,4 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
3 (8 a)	No	2124 (1300-2300)	-	-	1232	1370	190,4 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
4 (21 a)	No	2211 (1400-2500)	1,70 (0,84)	1,69	243*	1366	1234,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
5 (37 a)	No	2254 (2000-3300)	0,80 (0,84)	0,13	953	1143	630,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
6 (14 a)	No	2000 (1650-3300)	1,50 (0,92)	0,37	1212	1424	642,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
7 (17 a)	Sí	1845 (1400-2500)	1,20 (0,84)	0,34	963	1213	302,4 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
8 (28 a)	No	-	-	-	-	-	1129,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
9 (32 a)	No	-	-	-	-	-	1203,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
10 (7 a)	Sí	1694 (1300-2300)	1,80 (0,87)	1,00	699*	851	285,6 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
11 (29 a)	No	1967 (1400-2500)	0,90 (0,84)	0,27	1045	971	352,8 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
12 (9 a)	No	1768 (1300-2300)	1,10 (0,87)	0,23	1077	1163	224,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
13 (30 a)	No	2927 (2000-3300)	1,50 (0,84)	0,19	2989	3037	394,0 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
14 (11 a)	Sí	2014 (1650-3300)	1,20 (0,92)	0,34	1038	1190	207,2 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
15 (7 a)	No	1955 (1300-2300)	3,40 (0,87)	0,68	1190	1239	212,8 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
16 (28 a)	No	1506 (1400-2500)	1,40 (0,84)	0,31	1271	1405	737,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
17 (14 a)	Sí	1666 (1650-3300)	1,50 (0,92)	0,50	1138	1321	882,6* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
18 (11 a)	No	2998 (1650-3300)	1,00 (0,92)	0,30	961	1334	330,4 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
19 (10 a)	No	2476 (1650-3300)	1,30 (0,92)	0,38	1110	1218	89,6 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
20 (7 a)	No	1622 (1300-2300)	2,50 (0,87)	0,49	1348	1562	238,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
21 (23 a)	No	1486 (1400-2500)	0,86 (0,84)	0,4	1132	1233	649,6* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
22 (11 a)	Sí	1524* (1650-3300)	1,40 (0,92)	1,70	108*	488*	198,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
23 (17 a)	No	2323 (2000-3300)	0,85 (0,84)	0,18	988	1266	361,0 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
24 (9a)	No	2193 (1300-2300)	2,30 (0,87)	0,47	1328	1431	391,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)

25 (18 a)	No	1981 (1400-2500)	1,10 (0,84)	0,22	845	1028	612,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
26 (13 a)	Sí	1867 (1650-3300)	1,60 (0,92)	1,60	877	831	213,0 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
27 (16 a)	Sí	1852 (1400-2500)	0,87 (0,84)	0,71	1007	1052	180,0 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
28 (7 a)	No	1460 (1300-2300)	1,80 (0,87)	0,33	979	1091	690,0* ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
29 (23 a)	No	1852 (1400-2500)	0,85 (0,84)	0,30	911	992	788,5* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
30 (7 a)	No	1408 (1300-2300)	2,80 (0,87)	0,73	1179	1227	138,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
31 (28 a)	No	2620 (2000-3300)	1,10 (0,84)	0,29	1575	1969	927,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
32 (9 a)	No	2046 (1300-2300)	2,00 (0,87)	0,31	1366	1436	570,0* ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
33 (41 a)	No	2479 (2000-3300)	0,80 (0,84)	0,46	1008	1179	786,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
34 (38 a)	No	1365* (1400-2500)	1,00 (0,84)	0,27	1242	1264	672,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
35 (11a)	No	2119 (1650-3300)	1,30 (0,92)	0,37	994	1060	128,8 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
36 (10 a)	No	2000 (1650-3300)	1,34 (0,92)	0,26	984	1104	518,0* ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
37 (36 a)	No	2200 (1400-2500)	0,90 (0,84)	0,32	1214	1364	1083,0* ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
38 (36 a)	No	-	-	-	-	-	61,8 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
39 (7 a)	Sí	1250* (1300-2300)	1,70 (0,87)	0,95	799*	851	124,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
40 (7 a)	Sí	1250* (1300-2300)	1,60 (0,87)	0,90	799*	851	115,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)
41 (22 a)	Sí	1900 (2000-3300)	-	-	619*	982	207,2 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
42 (33 a)	No	1363* (2000-3300)	0,38 (0,84)	0,19	414*	493*	459,0 ($< 600 \mu\text{mol/L}$)
43 (7 a)	Sí	1664 (1300-2300)	3,44 (0,87)	3,40	872	1117	302,0 ($< 480 \mu\text{mol/L}$)

Tabla 18. Características nutricionales de los pacientes del estudio.

En paréntesis: recomendaciones diarias para cada edad. Proteínas totales/kg: los valores entre paréntesis son los niveles seguros recomendados por la OMS para la población⁽²¹⁰⁾

*: Valores fuera del rango recomendado.

5.2.1. ENFERMEDAD MINERAL ÓSEA

Se detectó EMO, según la determinación de la DMO por densitometría, en un total de 6 pacientes (14%), 3 varones y 3 mujeres, con una media de edad de $24,17 \pm 14,55$ años (rango de edad 7-41 años). Dos de ellos habían sido diagnosticados de PKU moderada, el resto de PKU clásica. Dentro de la EMO, 4 de ellos presentaron osteopenia, y 2 osteoporosis (Tablas 19 y 20). La PKU fue diagnosticada tardíamente con más frecuencia en el grupo de pacientes con EMO (66,7% vs 27%, $p=0,077$).

El espectro mutacional encontrado fue amplio, pues se encontraron hasta 30 genotipos diferentes lo que demuestra una gran heterogeneidad genética. La mayoría de las mutaciones pertenecen a la categoría de mutaciones de cambio de aminoácido (missense). No se encontró relación entre el estudio genético y el desarrollo o no de EMO. En ambos grupos (tanto entre los que desarrollaron EMO y entre los que no la desarrollaron), se encontraron mutaciones con actividad in vitro de la PAH nula o muy baja. Ninguno de los pacientes que desarrollaron EMO presentaba historia familiar de osteopenia/osteoporosis.

Paciente	Edad	Sexo	Fenotipo	Genotipo	Edad al diagnóstico	Actividad Física	IMC (kg/m ²)	EMO
13	30 a	V	Moderada	p.E280K/ p.V388M	6,2 a	Alta	24,2	Osteoporosis
16	26 a	M	Clásica	p.R261Q/ IVS10-G>A	<1 mes	Baja	19,2	Osteoporosis
30	8 a	V	Clásica	IVS10- G>A/ p.R243Q	<1 mes	Intermedia	15	Osteopenia
33	41 a	V	Clásica	p.165T/ p.R2T43X	29 a	Intermedia	23,2	Osteopenia
36	10 a	M	Clásica	p.R158Q/ p.L48S	<1 mes	Alta	15,3	Osteopenia
42	31 a	M	Moderada	p.E280K/ IVS10-G>A	3,3 a	Intermedia	22,2	Osteopenia

Tabla 19. Principales características de los pacientes PKU que desarrollaron enfermedad mineral ósea (EMO). IMC: índice de masa corporal. a: años.

Paciente	Edad	Sexo	DEXA (L2-L4 DMO)	DEXA (Cuello de fémur)	EMO
13	30	V	0,85 (T< -2,5)	0,71 (T< -2,5)	Osteoporosis
16	26	M	0,8 (T< -2,5)	0,6 (T< -2,5)	Osteoporosis
30	8	V	0,4 (Z<-2)	0,47 (Z>-2)	Osteopenia
33	41	V	1,05 (T: -1 -2,5)	0,79 (T: -1 -2,5)	Osteopenia
36	10	M	0,52 (Z<-2)	0,6 (Z<-2)	Osteopenia
42	31	M	0,836 (T: -1 -2,5)	0,71 (T: -1 -2,5)	Osteopenia

Tabla 20. Densitometría de los pacientes que desarrollaron EMO.

T: t-score; Z: z-score

5.2.2. ENCUESTA NUTRICIONAL

Tanto los pacientes osteopénicos como osteoporóticos presentaron una menor ingesta diaria de proteínas naturales con respecto al resto de los pacientes PKU ($14,33 \pm 8,95$ g/día vs $21,25 \pm 20,85$ g/día, $p < 0,05$), así como una menor ratio de ingesta de proteínas naturales/kg de peso ($0,35 \pm 0,21$ g/kg peso/día vs $0,68 \pm 0,74$ g/kg de peso día, $p = 0,067$).

En la Tabla 21 se muestran las características nutricionales del grupo de pacientes que desarrollaron EMO. Dos pacientes (16 y 33) no tenían un cumplimiento dietético adecuado, con una ingesta diaria de Phe superior a la recomendada, y presentaron niveles sanguíneos altos de Phe. La ingesta de Ca y P en un paciente (42) era inferior de lo recomendado.

Paciente (edad)	kcal/día	Prot totales (g/kg/día)	Prot naturales (g/kg/día)	Ingesta de Ca (mg/día) (N:800)	Ingesta de P (mg/día) (N:800)	Media Phe sangre
13 (30 a)	2927 (2000-3300)	1,50 (0,84)	0,19	1489	1537	475 (< 600 $\mu\text{mol/L}$)
16 (28 a)	1506 (1400-2500)	1,40 (0,84)	0,31	1271	1405	688* (< 600 $\mu\text{mol/L}$)
30 (7 a)	1408 (1300-2300)	2,80 (0,87)	0,73	1179	1227	148,0 (< 480 $\mu\text{mol/L}$)
33 (41 a)	2479 (2000-3300)	0,80 (0,84)	0,46	1008	1179	762,0* (< 600 $\mu\text{mol/L}$)
36 (10 a)	2000 (1650-3300)	1,34 (0,92)	0,26	984	1104	518,0 (< 600 $\mu\text{mol/L}$)
42 (33 a)	1363* (2000-3300)	0,38 (0,84)	0,19	414*	493*	459,0 (< 600 $\mu\text{mol/L}$)

Tabla 21. Características nutricionales de los pacientes con EMO.

*: Valores fuera del rango recomendado

En paréntesis: recomendaciones diarias para cada edad. Proteínas totales/kg: los valores entre paréntesis son los niveles seguros recomendados por la OMS para la población⁽²¹⁰⁾

5.2.3. OTRAS VARIABLES ESTUDIADAS COMO FACTORES DE RIESGO DE EMO

En la Tabla 22 se representan los datos clínicos, de actividad física, nutricionales y bioquímicos de los pacientes PKU en función de si desarrollaron o no enfermedad metabólica ósea.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad física semanal, ingesta de Ca, P y ácidos grasos. Tampoco hubo diferencias entre ambos grupos en los niveles sanguíneos de DHA y EPA, ni en el metabolismo fosfo-cálcico (niveles de 1-25(OH)2D, 25(OH)D y PTH) en los pacientes con EMO en comparación con los que no desarrollaron esta complicación.

PKU sin EMO		PKU con EMO
Media de edad	16,46 ± 10,29 a	24,17 ± 14,55 a
Edad		
≤ 20 años	26 (92%)	2 (7,1%)
> 20 años	11 (73,3%)	4 (26,7%)
Sexo (V/M)	15/22	3/3
Fenotipo		
Clásico	23 (62,2%)	4 (66,7%)
Leve/Moderado	14 (37,8%)	2 (33,3%)
Diagnóstico Tardío	10 (27%)	4 (66,7%)
Tto con BH4*	14 (32,6%)	0 (0%)
Actividad física		
Baja	4 (10,8%)	0 (0%)
Intermedia	11 (29,7%)	3 (50%)
Alta	19 (45,9%)	2 (33,3%)
IMC (kg/m²)		
≤ 20 años*	19,5± 3.18	15.15 ± 0.21
> 20 años*	26.6 ± 5.2	22 ± 2.04
Ingesta proteínas naturales (g/día)	21,25±20,85	14,33±8,95
Ingesta de Ca (mg/día)	1016,56±301,29 (N)	1307,50±876,12 (N)
Ingesta de P (mg/día)	1180,62±263,4 (N)	1407,50±856,56 (N)
% Ingesta de grasa	31,91±3,72 (N)	31±5,86 (N)
Niveles actuales de Phe (μmol/L)	459,32±338,28	505,33±237,52
Niveles de DHA (mg/100 g de ácidos grasos totales)	2786±1463	3026±536
Niveles de EPA (mg/100 g de ácidos grasos totales)	553,6±312,65	429,83±195,49
Niveles 1-25(OH)2D (pg/mL)	61,34±22,55 (N,↑)	55,25±12,36 (N,↑)
Niveles 25(OH)D (ng/mL)	28,1±10,34 (↓, N)	37,25±7,6 (N)
Niveles de PTH (pg/mL)	31,3±9,4 (N)	36,0±16,14 (N)

Tabla 22. Comparación de las características epidemiológicas, clínicas, actividad física, nutricional y bioquímica entre los pacientes PKU con y sin EMO.

Entre paréntesis: N: valores dentro de rangos normales.;↑: por encima de lo normal. ↓: por debajo de lo normal.

* Diferencias significativas entre los dos grupos (p<0,05).

Encontramos que el IMC era inferior en los pacientes con EMO, tanto en el grupo de ≤ 20 años ($15.15 \pm 0.21 \text{ kg/m}^2$ vs $19.5 \pm 3.18 \text{ kg/m}^2$, $p<0,05$), como en los de mayor edad ($22 \pm 2.04 \text{ kg/m}^2$ vs $26.6 \pm 5.2 \text{ kg/m}^2$, $p<0,05$) (Tabla 22).

5.2.4 TRATAMIENTO CON BH4

Paciente	Fenotipo	Genotipo	Edad (Test BH4)	Media dosis BH4	Duración Tto BH4	Tolerancia Phe post BH4
2	Leve	R243Q-E390G	14 a	8,9	5 a 10 m	Dieta libre controlada
7	Moderado	P244L-R261Q	20 a 1m	9,3	7 a 11 m	750
10	Leve	P211T- IVS10-11G>A	8 a 4 m	10	8 a 3 m	Dieta libre controlada
14	Clásico	I65T-R243X	12 a	12,5	3 a 6 m	513
17	Moderado	R158Q-L48S	15 a 10m	9,5	7 a 2 m	739
22	Leve	R176L- C527G>T	12 a 6 m	9,4	8 a 3 m	Dieta libre controlada
26	Leve	S303A-G46S	14 a 1 m	10	8 a 3 m	Dieta libre controlada
27	Leve	R243Q-E390G	18 a	10	8 a 3 m	Dieta libre controlada
39	Moderado	L48S-Y277D	7 a	11,6	7 a	830
40	Moderado	L48S-Y277D	7 a	10	7 a	Dieta libre controlada
41	Moderado	Q304Q-R176L	22 a 3m	9,7	7 a	Dieta libre controlada
43	Leve	A300S-898G>T	22 a	9,1	8 a	Dieta libre controlada

Tabla 23. Pacientes tratados con BH4.

a: años. m: meses. ND: no determinado. Dosis de BH4 en mg/kg/día. Tolerancia a la Phe post-BH4: en mg/kg/día.

De los pacientes tratados con BH4 (Tabla 23), durante una media de 7 años y un mes, ninguno de ellos desarrolló EMO ($p<0,05$). La media de edad de estos pacientes cuando se realizó el estudio fue de 14 años y 5 meses, siendo 3 de ellos (25%) mayores de 20 años.

Los pacientes PKU respondedores a BH4 toleran mayores cantidades de proteínas, por lo que en este grupo, la ingesta de proteínas naturales fue mayor ($33,62 \pm 28,42$ vs $12,73 \pm 6,22$ g/día, $p < 0,05$). Los niveles sanguíneos de EPA fueron significativamente superiores en este grupo de pacientes ($718,4 \pm 371,1$ vs $461,3 \pm 235$ mg/100 g del total de ácidos grasos, $p < 0,05$). La ingesta de Ca fue menor en los pacientes tratados con BH4 ($834,07 \pm 345,41$ vs $1197,17 \pm 453,95$ mg/día, $p < 0,05$). (Tabla 24).

Pacientes	Niveles de EPA (mg/100g total ácidos grasos)	Niveles de DHA (mg/100g total ácidos grasos)	Ingesta de Ca (mg/día)	Ingesta de P (mg/día)	Prot totales (g/kg/día)
2	1554	5246	1438	1086	2,40 (0,92)
7	627,8	2718,6	963	1213	1,20 (0,84)
10	453	1522	699	851	1,80 (0,87)
14	649	4267	1038	1190	1,20 (0,92)
17	682,1	3258	1138	1321	1,50 (0,92)
22	1231	7753	108	488	1,40 (0,92)
26	512	1908	877	831	1,60 (0,92)
27	583	2142	1007	1052	0,70 (0,84)
39	628	2719	799	851	1,70 (0,87)
40	380	1801	799	851	1,60 (0,87)
41	803	3862	619	982	-
43	ND	ND	872	1117	3,44 (0,87)

Tabla 24. Niveles sanguíneos de DHA y EPA en los tratados con BH4, así como su ingesta de Ca, P y proteínas totales.

En paréntesis: recomendaciones diarias para cada edad. Proteínas totales/kg: los valores entre paréntesis son los niveles seguros recomendados por la OMS para la población⁽²¹⁰⁾. ND: no determinada.

5.2.5. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO

Diez (20,9%) de los 43 pacientes a estudio presentaron algunos de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo patológicos (FAO, β -CTx, PNP-1 en sangre y/o Ca/Cr en orina) (Tabla 25). Todos los pacientes excepto uno tenían más de 20 años de edad (edad media: $28,7 \pm 11,3$). El marcador más frecuentemente alterado en estos pacientes fue la FAO, que estaba disminuida en el 70%; de éstos, el 42,8% (3/7 pacientes) también presentaban disminución de β -CTx. Los valores de FAO fueron patológicos con más frecuencia en los pacientes que habían sido diagnosticados de PKU tardíamente (41,7% vs 10,7%, $p < 0,05$) y en el grupo de pacientes con EMO (60% vs 14,3%, $p < 0,05$). Los niveles de PNP1 y Ca/Cr fueron similares entre todos los pacientes PKU, independientemente de presentar EMO, diagnóstico tardío o tratamiento con BH4.

N	Edad	Sexo	Fenotipo	Dx Tardío	EMO	BH4	FAO (mcg/L)	β -CTX (ng/mL)	PNP-1 (ng/mL)	Ca/Cr
5	37	V	Clásica	Sí	No	No	25,5	0,5**	55,8	0,2
13	30	V	Moderada	Sí	Sí	No	15,2*	0,1*	37,9	0,2
16	26	M	Clásica	Sí	Sí	No	22,1	0,3	46,9	0,3**
21	23	M	Clásica	No	No	No	12,5*	0,4	52,4	0,1
29	23	M	Clásica	No	No	No	7*	0,2	31,6	0,1
30	8	V	Clásica	No	Sí	No	140**	0,7	632,4	-
33	41	V	Clásica	Sí	Sí	No	16,4*	0,3	36,7	0,2
34	38	M	Clásica	Sí	No	No	11,7*	0,2	23,1	0,3**
37	36	M	Moderada	Sí	No	No	14,5*	0,1*	35,9	0,2

Tabla 25. Pacientes con niveles alterados de marcadores de remodelado óseo. N (nº del paciente). Edad (años). Sexo: V (varón), M (mujer), Dx Tardío (diagnóstico tardío). BH4 (Tratados con BH4). Ca/Cr (mg/mg). *: niveles por debajo de lo normal. **: niveles por encima de lo normal.

Todos los pacientes menores de 20 años, salvo uno que presentaba cifras elevadas, tenían valores de FAO para la edad similares a los del grupo control. (Tabla 26).

	Controles	PKU	Significación
N	29	23	
Edad (años)	8.8±3.2	9.5±3.1	0.423
FAO (ng/ml)	99.0±36	96.1±36	0.932
PNP-1 (ng/ml)	560±193	614.5±156	0.088
β-CTx (ng/ml)	1.25±0.35	1.11±0.33	0.121
Ca/Cr Orina	0,16±0,07	0,12±0,06	0,117

Tabla 26. Valores del grupo control y de nuestros pacientes menores de 20 años. Datos expresados como media ± SD.

Los pacientes con niveles disminuidos tanto de FAO como de β-CTx recibieron menor ingesta de proteínas naturales por kg de peso, que los pacientes con valores normales (FAO (0,21±0,13 g/kg vs 0,65±0,65 g/kg $p<0,05$); β-CTx (0,29±0,23 g/kg vs 0,65±0,66 g/kg, $p<0,05$)); en cambio, los valores de 1-25(OH)2D fueron más elevados, aunque sin diferencias significativas y no se hallaron diferencias en cuanto a los niveles de PTH, ni de 25(OH)D.

La ingesta de Ca fue significativamente mayor en los pacientes con FAO y β-CTx bajas, y en los que presentaban índices de Ca/Cr en orina elevados. La ingesta de fósforo sólo fue mayor en los pacientes con niveles bajos de β-CTx (Tabla 27).

	Pacientes β -CTx $\downarrow$	Pacientes β -CTx normal	Pacientes FAO $\downarrow$	Pacientes FAO normal	Pacientes Ca/Cr $\uparrow$	Pacientes Ca/Cr normal
1-25(OH)2D (ng/mL)	29,5 $\pm$ 0,70	29,25 $\pm$ 11,74	31,66 $\pm$ 12,22	27,23 $\pm$ 9,74	21,0 $\pm$ 3,07	29,27 $\pm$ 10,22
25(OH)D (pg/mL)	86,33 $\pm$ 38,37*	59,17 $\pm$ 19,07*	79,57 $\pm$ 31,66*	56,36 $\pm$ 17,23*	57,0 $\pm$ 17,02	63,41 $\pm$ 23,06
PTH (pg/mL)	33,0 $\pm$ 9,16	32,11 $\pm$ 10,42	31,57 $\pm$ 10,13	30,67 $\pm$ 9,07	32,0 $\pm$ 1,04	31,41 $\pm$ 8,73
Ingesta Ca (mg/día)	2101,5 $\pm$ 125,51*	1015,84 $\pm$ 300,64*	1416,00 $\pm$ 780,71*	1015,94 $\pm$ 309,66*	1256,5 $\pm$ 20,5*	1068,22 $\pm$ 453,10*
Ingesta de P (mg/día)	2200,5 $\pm$ 118,2*	1167,65 $\pm$ 275,95*	1511,50 $\pm$ 757,385	1179,94 $\pm$ 270,107	1334,5 $\pm$ 99,7	1242,91 $\pm$ 423,29

Tabla 27. Comparación de los niveles sanguíneos de 1-25(OH)2D, 25(OH)D, PTH e ingesta de Ca y P entre los pacientes con niveles normales de β -CTX,FAO y Ca/ Cr y los pacientes con niveles alterados. Datos expresados como media $\pm$ SD. *p<0,05

Ninguno de los pacientes tratados con BH4, con una mayor ratio de ingesta de proteínas naturales (1,03 $\pm$ 0,89 g/kg vs 0,37 $\pm$ 0,31 g/kg, P<0,05), presentó niveles alterados de FAO, β -CTX, PNP-1 ni Ca/Cr (Tabla 28).

Paciente	FAO μ g/L	β -CTx ng/mL	PNP-1 ng/mL	Ca/Cr
2	79,6	0,6	356,3	-
7	28	0,4	29,8	0,2
10	85	1,3	654,7	0,1
14	85	0,9	472,3	0,2
17	80,1	1,9	494,0	0,1
22	88	1,4	892,4	0,1
26	90	1,1	535,8	0,1
27	16,8	0,5	71,9	0,1
39	79	0,9	527,5	0,2
40	74,1	0,8	506,1	0,1
41	-	-	-	-
43	36,6	0,3	68,8	-

Tabla 28. Marcadores de remodelado óseo en pacientes tratados con BH4 y sin EMO.

5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA GENÉTICA EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS EN GALICIA

5.3.1. ESTUDIO GENÉTICO

Durante los 31 años que duró el periodo de estudio, se realizó estudio genético molecular a un total de 105 pacientes, 42 varones y 63 mujeres, correspondientes a 205 alelos mutantes.

Los fenotipos de los pacientes a los que se les realizó estudio genético son los siguientes: 39 PKU clásicas, 20 PKU moderadas, 8 PKU leves y 38 HPA. En el análisis del espectro mutacional se encontraron 47 mutaciones diferentes (Tabla 29): 37 (78,7%) debidas a mutaciones de cambio de aminoácido, 3 (6,4%) mutaciones sin sentido, 2 (4,2%) splicing sites- mutaciones del sitio de empalme (afectan al procesamiento del ARNm), 4 (8,5%) deleciones, 3 de ellas deleciones pequeñas y una de ellas larga y una mutación silente.

No se detectaron mutaciones en los exones 1, 4 y 13. El exón 7 fue el que mostró el mayor número de mutaciones (10), encontrándose afectado en el 21,3% del total de alelos mutantes. El 74% (35) de mutaciones se localizaron en el dominio catalítico, 17% (8) en el dominio regulador y dos en el dominio tetramerizador (Tabla 29); en dos de las mutaciones no se identificó el dominio.

Las mutaciones más prevalentes de las HPA en Galicia son las mutaciones Mediterráneas comunes: IVS10-11G>A (c.1066-11G>A), con una frecuencia relativa del 13,8%; y p.R261Q (c.782G>A), con una frecuencia del 10,5%. Las siguientes mutaciones en frecuencia son p.V388M, p.R176L, p.E280K y p.A300S, mostrando cada una de ellas una frecuencia relativa entre el 4,8 y 6,2%. Se encontró una nueva mutación: p.K361Q (c.1081A>C).

Las 47 mutaciones diferentes encontradas están combinadas en diferentes genotipos, de tal forma que, 90 pacientes son heterocigotos compuestos para dos mutaciones diferentes, y 10

son homocigotos (IVS10-11G>A (4), p.E280K(3), p.A300S, p.A403V, p.F39del). En 5 pacientes se encontró solamente una mutación.

Se llevó a cabo también el análisis genético en los padres de los pacientes homocigotos, con el objetivo de descartar delecciones largas. Se encontraron 9 genotipos más de una vez en pacientes no emparentados y 11 genotipos se repiten en hermanos. La tasa de homocigosidad fue de 0,054.

Mutación PAH	Cambio de Nucleótido	Tipo	Localización	Dominio	% Actividad	N alelos/%
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	Splic	I10	-	Ns	29/13,8
p.R261Q	c.782G>A	Miss	E7	Catalítico	27-47	22/10,5
p.V388M	c.1162G>A	Miss	E11	Catalítico	15-43	13/6,2
p.R176L	c.527G>T	Miss	E6	Catalítico	21-42	13/6,2
p.E280K	c.838G>A	Miss	E7	Catalítico	ND	12/5,7
p.A300S	c.898G>T	Miss	E8	Catalítico	NS	10/4,8
p.L48S	c.143C>T	Miss	E2	Regulador	0-39	9/4,3
p.R243X	c.727C>T	Non	E7	Catalítico	<1	9/4,3
p.R243Q	c.728G>A	Miss	E7	Catalítico	10-18	7/3,3
p.A313V	c.938C>T	Miss	E9	Catalítico	NS	5/2,4
p.A403V	c.1208C>T	Miss	E12	Catalítico	32	5/2,4
p.F55Lfs	c.165delT	Del	E2	Regulador	NS	5/2,4
p.G46S	c.136G>A	Miss	E2	Regulador	32-62	5/2,4
p.I65T	c.194T>C	Miss	E3	Regulador	27-60	5/2,4
p.F39del	c.115_117delTTC	Del	E2	Regulador	20-83	4/1,9
p.R158Q	c.473G>A	Miss	E5	Catalítico	1,7-29	3/1,4
p.R252W	c.754C>T	Miss	E7	Catalítico	<1	3/1,4
p.T380M	c.1139C>T	Miss	E11	Catalítico	NS	3/1,4
p.Y414C	c.1241A>G	Miss	E12	Tetrameriz	28-80	3/1,4
p.Y277D	c.754C>T	Miss	E7	Catalítico	ND	3/1,4
p.C203Y	c.608G>A	Miss	E6	Catalítico	NS	2/1
p.E390G	c.1169A>G	Miss	E11	Catalítico	70-85	2/1
IVS12 +1G>A	c.1315 +1G>A	Splic	I12	-	<1	2/1
p.R68S	c.204A>T	Miss	E3	Regulador	18-76	2/1
p.R261X	c.781C>T	Non	E7	Catalítico	NS	2/1
p.R408W	c.1222C>T	Miss	E12	Catalítico	0-2	2/1
p.S303A	c.907T>G	Miss	E8	Catalítico	NS	2/1
p.S349P	c.1045T>C	Miss	E10	Catalítico	0-0,3	2/1
p.S87R	c.261C>A	Miss	E3	Regulador	25-82	2/1
p.Y417H	c.1249T>C	Miss	E12	Tetrameriz	NS	2/1
p.D415N	c.1243G>A	Miss	E12	Catalítico	NS	1/0,5

p.EX5del	c.442-?_509+?del	Large Del	E5	Catalítico	NS	1/0,5
p.I269L	c.805A>C	Miss	E7	Catalítico	NS	1/0,5
p.I174V	c.520A>G	Miss	E6	Catalítico	NS	1/0,5
p.K42E	c.124A>G	Miss	E2	Regulador	NS	1/0,5
p.K361Q	c.1081A>C	Miss	E11	Catalítico	NS	1/0,5
p.L348V	c.1042C>G	Miss	E10	Catalítico	25-44	1/0,5
p.P211T	c.631C>A	Miss	E6	Catalítico	72	1/0,5
p.P244L	c.731C>T	Miss	E7	Catalítico	68	1/0,5
p.Q304Q	c.912G>A	Sin	E8	Catalítico	NS	1/0,5
p.R270K	c.809G>A	Miss	E7	Catalítico	NS	1/0,5
p.R420M	c.1259G>T	Miss	E12	Catalítico	NS	1/0,5
p.R176Q	c.527G>A	Miss	E6	Catalítico	NS	1/0,5
p.R176X	c.526C>T	Non	E6	Catalítico	NS	1/0,5
p.V230I	c.688G>A	Miss	E6	Catalítico	52-63	1/0,5
p.V177M	c.529G>A	Miss	E6	Catalítico	NS	1/0,5
p.Y198fs	c.593_614del22	Del	E6	Catalítico	NS	1/0,5
n.d.						5/2,4

Tabla 29. Espectro mutacional de la población PKU en Galicia, indicando la frecuencia de los alelos y la actividad residual in vitro de la PAH /<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

Secuencia de referencia: NM_000277. Non: sin sentido; Miss: missense (cambio de aminoácido); Del: delección; Splic: splicing (procesamiento del ARNm); Sin: sinónima; I: intrón; E: exón; NS: no testado; ND: no detectable.

5.3.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL Y GENOTIPO

Con respecto a la actividad enzimática asociada a cada mutación, determinante en teoría del fenotipo clínico de cada paciente, las mutaciones p.E280K, p.R243X, p.R243Q, p.R158Q, p.R252W, IVS12+1G>A, p.S349P y p.R408W se asociaron con actividad nula o muy baja de la PAH. Las mutaciones p.R261Q, p.V388M, p.R176L y p.L348V se asociaron a actividad enzimática moderada. Las mutaciones p.E390G, p.V230I, p.P244L y p.P211T se correlacionaron con actividad residual alta.

Para otras mutaciones se encontró un amplio abanico de niveles de actividad residual, dependiendo del sistema de expresión empleado. Aunque se observó una buena correlación genotipo-fenotipo, no existe correlación para algunos pacientes con el mismo genotipo; como es el caso de IVS10-11G>A en homocigosidad y pacientes con genotipos p.I65T/p.R261 o p.R261Q/IVS10-11G>A, que pueden ser tanto PKU clásicas como moderadas.

5.3.3. TEST DE SOBRECARGA DE BH4 Y GENOTIPO

Se realizó test de sobrecarga en 40 de estos pacientes, 18 (38,3%) respondieron positivamente al test. De los respondedores, 3/27 fueron PKU clásicas, 8/13 PKU moderadas y 7/7 PKU leves (Tabla 30).

Las predicciones del genotipo basadas en la respuesta a la BH4 se determinaron en casi todos los pacientes. Se observó que los pacientes PKU portadores de dos mutaciones no respondedoras, no respondían a la BH4. Los pacientes con mutaciones asociadas a respuesta a la BH4 en los dos alelos, excepto 5 pacientes con las mutaciones p.R261Q, p.I65T y p.R68S, presentaron una respuesta claramente positiva al test. Los pacientes con al menos una mutación con una actividad residual in vitro del $\geq 20\%$ (incluidas 3 PKU clásicas), mostraron también una respuesta positiva al test.

A los pacientes fenilcetonúricos que mostraron un descenso del 25-30% en los niveles de Phe en el test de 24 horas, se les realizó una sobrecarga semanal de BH4. Este test fue positivo en un paciente (paciente14) que presentó un descenso de los niveles de Phe del 28% con el test de 24 horas y entre el 30 y 40% con el test de una semana.

Paciente	Sexo	Edad Test BH4	Fenotipo	Alelo 1	Alelo2	Respuesta test 24h ↓ niveles Phe (%)
<i>Pacientes con <30% de descenso en los niveles de Phe en el test de 24 hr</i>						
1	V	10d	PKU Clásica	p.R243Q c.728G>A	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 0
25	M	11a 2m	PKU Clásica	p.E280K c.838G>A	↓ p.R261Q c.782G>A	↑ 0
30	V	10d	PKU Clásica	p.R270K	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 0
32	V	1a 6m	PKU Clásica	p.R261Q c.782G>A	↑ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 0
36	M	3a	PKU Clásica	p.R243X c.727C>T	↓ p.V388M c.1162G>A	↑ 0
38	M	35a	PKU Clásica	p.R243X c.727C>T	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 0
98	M	9 d	PKU Clásica	p.E280K c.838G>A	↓ p.E280K c.838G>A	↓ 0
105	M	9d	PKU Clásica	p.R261X c.781C>T	↓ p.R261X c.781C>T	↓ 0
15	V	7d	PKU Clásica	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ p.I65T c.194T>C	↑ 6.4
118	M	17a	PKU Clásica	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 8.2
19	M	4a 10m	PKU Clásica	p.R243X c.727C>T	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 9.6
13	V	23a 3m	PKU Clásica	p.E280K c.838G>A	↓ p.V388M c.1162G>A	↑ 10.3
18	M	4a 3m	PKU Clásica	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 10.6
21	M	17a 8m	PKU Clásica	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ p.I65T c.194T>C	↑ 10.6
20	M	15d	PKU Clásica	p.F55Lfs c.165delT	↓ p.R261Q c.782G>A	↑ 15.3
29	M	16a 9m	PKU Clásica	p.V388M c.1162G>A	↑ nd	- 16.6
5	V	32a 1m	PKU Clásica	p.R408W c.1222C>T	↓ nd	- 17
24	M	2a 1m	PKU Clásica	p.R176X	↑ p.R261Q c.782G>A	↑ 17.9
3	V	1a 8m	PKU Moderada	p.R68S c.204A>T	↑ p.F39del c.115_117delTTC	↑ 18.4
6	V	8y 1m	PKU Moderada	p.R261Q c.782G>A	↑ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 18.9
11	M	22a 6m	PKU Clásica	p.R243Q c.728G>A	↓ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 21.8
88	M	29a 9m	PKU Clásica	p.I65T c.194T>C	↑ p.R261Q c.782G>A	↑ 22.1
94	V	26a	PKU Moderada	p.I65T c.194T>C	↑ p.R261Q c.782G>A	↑ 22.1
4	M	14a	PKU Moderada	p.R261Q c.782G>A	↑ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 22.7
16	M	21a 9m	PKU Clásica	p.R261Q c.782G>A	↑ IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓ 24
119	M	25a 9m	PKU Clásica	p.F55Lfs c.165delT	↑ p.R261Q c.782G>A	↑ 25.3
42	M	27a	PKU Moderada	p.R243X c.727C>T	↓ p.L48S c.143T>C	↑ 26.2
12	M	1a 8m	PKU Clásica	p.E280K c.838G>A	↓ p.V388M c.1162G>A	↑ 27 (Semanal sin respuesta)

14	V	4a 5m	PKU Clásica	p.I65T c.194T>C	↑	p.R243X c.727C>T	↓	28 Semanal 31,6
<i>Pacientes con 30-50% de descenso en los niveles de Phe en el test de 24 hr</i>								
77	V	19a 5m	PKU Moderada	p.V388M c.1162G>A	↑	p.L48S c.143T>C	↑	33.7
7	M	9a 7m	PKU Moderada	p.P244L c.731C>T	-	p.R261Q c.782G>A	↑	34.3
89	M	13a 10m	PKU Clásica	p.R243Q c.728G>A	↓	p.V388M c.1162G>A	↑	37.1
102	M	16a 4m	PKU Clásica	p.G46S c.136G>A	-	p.R243Q c.728G>A	↓	40.3
17	M	6a 7m	PKU Moderada	p.R158Q c.473G>A	↑	p.L48S c.143T>C	↑	43
<i>Pacientes con 50-70% de descenso en los niveles de Phe en el test de 24 hr</i>								
74	V	13d	PKU Clásica	p.R243Q c.728G>A	↓	p.V388M c.1162G>A	↑	51.3
40	M	2m	PKU Moderada	p.L48S c.143T>C	↑	p.Y277D c.829T>G	-	57.2
39	M	2m	PKU Moderada	p.L48S c.143T>C	↑	p.Y277D c.829T>G	-	60.3
69	V	16a	PKU Moderada	p.V388M c.1162G>A	↑	p.Y414C c.1241A>G	↑	62
93	M	14d	PKU Moderada	p.R68S c.204A>T	↑	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓	62.1
95	M	1m	PKU Leve	p.A300S c.898G>T	↑	p.C203Y c.608G>A	-	64.1
10	V	15d	PKU Leve	p.P211T c.631C>A	↑	IVS10-11G>A c.1066-11G>A	↓	64.1
2	M	5a 3m	PKU Leve	p.R243Q c.728G>A	↓	p.E390G c.1169A>G	↓	64.8
43	M	6a	PKU Leve	p.A300S c.898G>T	↑	p.C203Y c.608G>A	-	65
<i>Pacientes con >70% de descenso en los niveles de Phe en el test de 24 hr</i>								
22	M	3a 9m	PKU Leve	p.R176L c.527G>T	-	nd	-	76
41	V	16a 5m	PKU Moderada	p.Q304Q c.912G>A	-	p.R176L c.527G>T	-	80.7
27	M	10a 2m	PKU Leve	p.S303A c.907T>G	-	p.G46S c.136G>A	-	90.2
96	V	7a	PKU Leve	p.S303A c.907T>G	-	p.G46S c.136G>A	-	90.2

Tabla 30. Respuesta al test de 24 horas de BH4. M (mujer), V (varón). a (años). m (meses). nd (no detectada). ↓: mutaciones no asociadas con respuesta a BH4. ↑: mutaciones previamente asociadas con respuesta a BH4. -: mutaciones con una asociación todavía no definida a la respuesta a BH4.

6. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se recogen los datos y estudios realizados en los últimos 31 años a los pacientes fenilcetonúricos seguidos en la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Esta unidad es el centro de referencia de la Comunidad Autónoma de Galicia para el seguimiento de los pacientes con enfermedades metabólicas congénitas, dentro de las que se encuentra la PKU.

Tras el descubrimiento de la PKU y el inicio del cribado metabólico neonatal universal, se ha podido realizar el diagnóstico precoz de estos pacientes y consecuentemente el tratamiento dietético desde edades tempranas, lo que ha permitido evitar el desarrollo de secuelas neurológicas que derivarían en retraso mental profundo. Con ello, se ha conseguido que estos pacientes lleven una vida prácticamente normal, salvo por las peculiaridades de su dieta; sin embargo han ido apareciendo otros aspectos derivados o bien de la propia enfermedad, o quizá secundarios al propio tratamiento de la misma, que inciden directamente en la calidad de vida de estos pacientes. Entre ellos destaca la osteopenia/osteoporosis, de la que no se conoce con exactitud su incidencia en los pacientes PKU, ni tampoco los factores de riesgo implicados en su aparición. Por otro lado, la verificación de la mayor incidencia de afectación del metabolismo óseo en los pacientes con PKU, justificaría la búsqueda sistemática de dicha complicación en estos pacientes. Para realizar esa búsqueda sería de gran utilidad clínica la identificación de los marcadores bioquímicos más óptimos y que sirvan de estándar de referencia en este grupo poblacional. La detección precoz de afectación del metabolismo óseo en los pacientes con PKU, permitiría un tratamiento previo al desarrollo de secuelas secundarias a la osteoporosis, que supondrían una merma importante en la calidad de vida del paciente, así como un elevado coste económico sanitario y social.

Además de la EMO, existe una evidencia creciente de que otros parámetros como el crecimiento, son subóptimos en estos pacientes; aunque no hay un consenso claro entre los estudios publicados. La introducción del tratamiento con BH₄, que ha

permitido una liberalización de la dieta en estos pacientes, o incluso una normalización completa de la misma, es probable que incida directamente en el crecimiento y en el desarrollo mineral óseo de estos pacientes, motivo por el que en esta tesis se han incluido pacientes PKU con diferentes regímenes terapéuticos, desde aquéllos con dieta restrictiva en proteínas naturales, pacientes con menor restricción o incluso pacientes con dieta prácticamente libre tras la terapéutica con BH4.

Respecto al análisis genético, dada la gran heterogeneidad existente en las mutaciones del gen *PAH* es importante conocer la epidemiología de las mutaciones de la PKU en grupos étnicos concretos. Dado que en esta tesis doctoral se recoge el genotipo de los pacientes PKU de la comunidad autónoma gallega, junto con fenotipo clínico, control de la enfermedad, respuesta a la BH4, nutrición, crecimiento, desarrollo de EMO etc, podemos obtener información sobre la correlación genotipo-fenotipo. Esta correlación será además útil para predecir una mejor o peor respuesta a la BH4.

6.1. DISCUSIÓN SOBRE EL ESTUDIO DEL DESARROLLO FÍSICO EN LOS PACIENTES FENILCETONÚRICOS

El crecimiento de los pacientes fenilcetonúricos es un aspecto en la actualidad todavía no dilucidado. Existe una importante controversia entre los estudios publicados^(79,123,126,127, 211), acerca de si dicho crecimiento se ve alterado o no en estos pacientes.

Un estudio reciente publicado por Belanguer-Quintana y cols⁽¹²⁷⁾, en el que se estudian 160 pacientes PKU con tratamiento dietético exclusivo, revela que no existen diferencias entre el crecimiento de los pacientes PKU y la población sana. En nuestro estudio, observamos en este sentido, resultados similares, si bien es cierto que la talla final alcanzada tanto en hombres como en mujeres es discretamente inferior que en la población general. Un punto divergente importante con este estudio tiene que ver con la severidad de la PKU, ya que Belanguer-Quintana y cols⁽¹²⁷⁾ en su estudio encuentran que el crecimiento de los pacientes PKU es independiente del fenotipo; en nuestra población, sin embargo, se objetivan diferencias entre el grupo de pacientes PKU y los pacientes HPA, que alcanzan significación estadística en la talla final adquirida por las mujeres, que es significativamente inferior en el grupo de las PKU. Esta divergencia entre ambos estudios puede ser debida al diferente diseño de los mismos, ya que en el estudio de Belanguer-Quintana y cols⁽¹²⁷⁾, sólo se incluían pacientes que recibían tratamiento dietético exclusivo, lo que no sucedía en nuestro caso. En esta misma línea, se han publicado varios estudios que al igual que en nuestro caso, encuentran que el crecimiento se afecta en mayor medida en los pacientes PKU frente a los HPA^(123,212,213). En el estudio de Aldámiz-Echevarría y cols⁽²¹²⁾, existen dos momentos a lo largo del desarrollo en donde el peso y la talla de los pacientes PKU se encuentran más disminuidos en comparación con la población de referencia: entre los 0 y 2 años y al final del crecimiento; alcanzando finalmente en la vida adulta un peso y una talla cercanas a la normalidad (z-score cercano al cero). Esta merma en el crecimiento en los

primeros años de vida puede ser debida al déficit proteico de la dieta, ya que encuentran en este estudio, una correlación positiva entre mayor ingesta de Phe y mayor peso y talla en las fases tempranas del desarrollo.

Un aspecto llamativo de nuestro estudio es la diferencia entre la talla final alcanzada por las mujeres HPA respecto a las PKU. Las pacientes PKU superan en talla a las HPA a partir de los 8 años de forma mantenida, hasta los 12 años, momento en el que la talla pasa a estar nuevamente por debajo de la presentada por las HPA. Una hipótesis que podría justificar estos datos, sería una edad ósea acelerada en las pacientes PKU, que justifica un pico de crecimiento más precoz, a los 8 años, con una detención del crecimiento también más adelantada, a los 12 años; lo que explica una talla final menor. No se realizó determinación de la edad ósea en los pacientes, por lo que este punto no lo podemos demostrar. En la literatura a penas se hace referencia a la edad ósea y/o a la pubertad precoz en los pacientes PKU⁽²¹⁴⁾, de hecho, hemos encontrado sólo un artículo referente a este tema, en el que se describe a una paciente fenilcetonúrica, con pobre cumplimiento dietético y cifras de Phe elevadas en sangre, que desarrolla pubertad precoz. Sería interesante indagar sobre la edad ósea de estos pacientes, puesto que es un aspecto que determina la talla final alcanzada.

En el caso de los varones, también encontramos un patrón similar al de las mujeres con respecto a la talla, aunque menos marcado y sin diferencias estadísticas entre los HPA y los PKU. Los pacientes varones con PKU, presentan un progreso de la talla similar al de la población sana hasta los 8-9 años, momento en el que la progresión de de la talla se ralentiza. En este sentido, también la edad ósea podría estar jugando un papel importante.

Existen varias publicaciones que hacen referencia a la mayor tendencia al sobrepeso/obesidad de los pacientes fenilcetonúricos^(131,132). Una hipótesis que se barajó como causante de esta mayor propensión a ganar peso, era la posible alteración en la composición corporal de estos pacientes, al presentar menos masa muscular por ingerir menos proteínas naturales, y en consecuencia, presentar menor gasto energético

basal. Sin embargo, se han hecho estudios⁽¹³⁴⁾ que demuestran que el porcentaje de masa magra en los pacientes fenilcetonúricos es normal. Es posible que la mayor ganancia de peso de los pacientes PKU se relacione con la ingesta de los sustitutivos proteicos, que tienen un alto contenido calórico. En nuestro estudio encontramos que el IMC es discretamente superior en los pacientes varones HPA y PKU que en la población de referencia, y dentro de ambos, mayor en los PKU, sin alcanzar dicha diferencia significación estadística. En el caso de las mujeres el IMC alcanzado es superior al de la población general; el pequeño tamaño muestral del grupo de pacientes HPA, sobre todo a partir de los 9,5 años, hace que sea difícil que la diferencia entre HPA y PKU alcance significación estadística.

Con respecto a la dieta llevada a cabo por estos pacientes y su influencia sobre el crecimiento, un estudio previo⁽²¹¹⁾ intentaba relacionar la ingesta de proteínas totales, proteínas naturales y sustitutivo proteico con el crecimiento, la altura y el perímetro craneal (PC) en niños con PKU. Llegan a la conclusión de que tanto la ingesta diaria de proteínas totales, como de proteínas naturales, demuestran una relación significativa con el crecimiento del PC, pero no con el aumento de la longitud/altura en los 3 primeros años de vida. Así mismo, estos autores no encontraron una correlación del aumento de la longitud y PC con la ingesta calórica durante el primer año, lo que indica que las demandas nutricionales estaban siendo adecuadamente cubiertas. Por último, encontraron que el crecimiento del PC se veía afectado por la ingesta de proteínas naturales y no por el de las proteínas procedentes del sustitutivo proteico.

En la actualidad no está claro cuál debe ser el aporte proteico adecuado en los pacientes fenilcetonúricos; en algunos protocolos los pacientes siguen las RDA para la ingesta de proteínas totales^(126,135) y en otros se recomienda un aumento del aporte proteico por encima de las RDA^(211,215). En nuestro protocolo se recomienda aumentar el aporte proteico por encima de las RDA, a través de las fórmulas con mezcla de aminoácidos. De todas formas, es probable, que más que la cantidad de proteínas totales ingeridas, lo que influya en el desarrollo de estos pacientes, sea el porcentaje de proteínas naturales. Esto es importante tenerlo en cuenta, porque una ingesta proteica

excesiva en edades tempranas de la vida se relaciona con la aparición en edades posteriores, de obesidad, disfunción renal e incluso peor pronóstico neurológico. Por ello se debe ser cautos en cuanto a la recomendación de aportar cantidades excesivas de proteínas (sustitutivo proteico) a los niños PKU⁽²¹⁶⁾.

Uno de los puntos novedosos de este trabajo es la flexibilidad del modelo que hemos utilizado para analizar los datos. Los modelos de efectos mixtos no lineales se utilizaron para describir los cambios con el tiempo de los z-score de la talla, el peso y el IMC. Estos modelos proporcionan flexibilidad para modelar los datos de medidas repetitivas. Las observaciones procedentes de diferentes individuos se asumen que son independientes y las observaciones de cada individuo se supone que están correlacionadas. Existe una variabilidad a través de las mediciones repetitivas procedentes de un mismo individuo, así como una variabilidad entre individuos. Además, los perfiles longitudinales muestran claramente trayectorias no lineales. Por lo tanto, se debe emplear un método flexible para tener en cuenta estas trayectorias. Para este propósito, se realizaron curvas específicas para cada sujeto para los datos longitudinales, en donde las curvas individuales fueron modeladas como splines penalizados con coeficientes aleatorios. La representación del modelo mixto de splines penalizados, permite aventajar la metodología existente para los análisis de modelo mixto y el uso del software existente.

6.2 DISCUSIÓN SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD MINERAL ÓSEA EN LOS PACIENTES FENILCETONÚRICOS

En este estudio, se ha incluido un grupo heterogéneo de pacientes fenilcetonúricos, en cuanto al amplio rango de edad, el fenotipo (PKU clásica, moderada y leve), detección de la enfermedad (diagnóstico precoz mediante cribado metabólico neonatal o tardío) y al tratamiento (dieta restrictiva en proteínas naturales vs liberalización de la dieta en grado variable en los pacientes tratados con BH4).

Esta heterogeneidad permite extraer conclusiones sobre potenciales factores de riesgo determinantes en la aparición de enfermedad mineral ósea en los pacientes PKU.

Además de analizar datos procedentes de la encuesta nutricional y de los niveles sanguíneos de Phe, Ca y P; en este estudio se incluyen otras variables no analizadas clásicamente en la literatura, como los niveles de LCPUFA y otros factores importantes en la aparición de EMO, como la actividad física habitual de cada paciente.

La prevalencia de EMO encontrada en este estudio es del 14%, es inferior a la publicada en la literatura. Pérez Dueñas y cols⁽¹⁴¹⁾ encontraron una mayor prevalencia (50%), al estudiar 28 pacientes entre 10 y 33 años, midiendo la DMO a nivel de la columna lumbar. Modan-Moses y cols⁽¹⁴⁷⁾, encontraron así mismo una prevalencia elevada (42%), al incluir 31 pacientes, todos ellos adultos diagnosticados de PKU clásica, y teniendo en cuenta para el diagnóstico de EMO, no sólo la DMO lumbar, sino también la femoral y la total. Koura y cols⁽²¹⁶⁾ encontraron una incidencia del 31,25% al analizar 32 pacientes con PKU clásica de entre 3 y 19 años y determinar la DMO en columna lumbar y cuello de fémur. Groot y cols⁽²¹⁸⁾ publicaron recientemente una incidencia del 19%, con una muestra de 53 pacientes, con un rango de edad superior al de los estudios previos (2-35 años), incluyendo PKU leves, moderadas y clásicas, definiendo la EMO mediante la densitometría en columna lumbar. Mendes y cols⁽²¹⁹⁾

encontraron una incidencia similar (15,4%) tras estudiar 13 pacientes con edades comprendidas entre los 8 y 16 años, todos ellos con PKU clásica, definiendo la EMO tras medir la DMO en la región lumbar.

Por lo tanto, hay una gran variedad en la incidencia de EMO en la PKU en los estudios publicados, dependiendo de los pacientes incluidos, el rango de edad, el fenotipo de PKU y el lugar en el que se mide la DMO (lumbar, cuello de fémur o general). La proporción de PKU leve, moderada o clásica, con diferente tolerancia a la Phe (y por lo tanto, a las proteínas naturales), podría explicar estas diferencias encontradas entre las diferentes series publicadas.

En este estudio los pacientes con EMO presentan una menor ingesta de proteínas naturales. Existen estudios que relacionaron la ingesta proteica con el desarrollo de osteopenia/osteoporosis. Algunos autores concluyen que la ingesta de cantidades elevadas de proteínas de origen animal, promueve la pérdida de Ca urinario al actuar este ión como tampón por la acidosis metabólica secundaria al metabolismo proteico^(220, 221); pero esta teoría no ha sido aceptada^(222, 223). De hecho, varios estudios han encontrado una correlación positiva entre la ingesta proteica y la DMO^(224, 225), específicamente en el estudio Framingham de Osteoporosis⁽²²⁶⁾. Este estudio incluye una cohorte extensa de hombres y mujeres ancianos seguidos durante cuatro años, demostrando que el aumento de la ingesta proteica, es protector frente a la pérdida de masa ósea espinal. Podría postularse que esto es debido a que cuando aumenta la ingesta proteica, se libera IGF-1, lo que aumenta la masa ósea, al promover la actividad osteoblástica. Esto último explica por qué precisamente, en los pacientes fenilcetonúricos, que tienen una menor ingesta proteica, la tendencia es a presentar cifras menores de FAO, lo que indica una menor actividad osteoblástica.

El tratamiento con BH4 se inició en Galicia en el año 2004. No existen hasta la actualidad estudios que reflejen el impacto que el tratamiento con BH4 puede tener en el metabolismo óseo en los pacientes PKU. Por lo que, un aspecto novedoso de este estudio es precisamente analizar la presencia de EMO en pacientes tratados con BH4, es

decir, en pacientes que toleran cantidades mayores de Phe y en consecuencia, mayor ingesta de proteínas naturales.

No se encontraron casos de EMO entre los pacientes PKU tratados con BH4, lo que va a favor de una relación positiva entre la ingesta proteica y la DMO. El aumento en la ingesta de proteínas naturales aumenta también el aporte de micronutrientes, lo que Lambruschini y cols⁽⁷⁷⁾ demostraron que favorece el crecimiento en niños PKU, y por esa misma razón, probablemente mejore la DMO.

Los niveles sanguíneos de EPA y DHA fueron superiores en el grupo de pacientes tratados con BH4, siendo esta diferencia significativa en el caso del EPA. Esta diferencia puede ser debida al aumento de la ingesta de proteínas naturales de este grupo de pacientes; pero también puede ser debida al menor estrés oxidativo, ya que el EPA disminuye cuando existe inflamación. Lage y cols⁽¹⁵⁰⁾, encontraron una asociación entre un perfil bajo en sangre de ácidos grasos de cadena larga, y el desarrollo de EMO. De tal manera, que aunque en nuestro estudio no pudimos demostrar este punto, el hecho de que los niveles de EPA y DHA fuesen superiores en el grupo de pacientes tratados con BH4, va a favor de que dichos ácidos grasos puedan desempeñar un papel importante en la DMO.

Curiosamente, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la ingesta de Ca entre los pacientes que desarrollaron EMO y entre los que no la desarrollaron; siendo incluso la ingesta de Ca superior en el grupo de pacientes con EMO, aunque no de manera significativa. En este sentido, algunos estudios^(222, 223, 226) demuestran que a pesar de una ingesta adecuada de Ca y vitamina D, si la ingesta proteica es deficiente, existe una alteración en la masa ósea. Otro argumento que explica esta teoría es el hecho de que en el grupo de pacientes tratados con BH4, en el que como ya se ha referido, ningún paciente desarrolló EMO, la ingesta de Ca fue significativamente inferior que en los pacientes no tratados con BH4. Es decir, en el grupo de pacientes que tienen una dieta restrictiva en proteínas naturales, a pesar de recibir suplementos

proteicos con fórmulas Phe-libre suplementadas con Ca, alcanzando niveles normales de Ca en sangre, tienen mayor predisposición a desarrollar EMO.

Nagasaka y cols⁽²²⁷⁾, en un estudio reciente realizado en pacientes adultos con PKU clásica, diagnosticados tempranamente mediante cribado neonatal, encontraron que dichos pacientes presentaban niveles sanguíneos bajos de 25(OH)D y más altos de 1-25(OH)2D, al compararlos con controles sanos de la misma edad. Esto lo atribuyeron los autores a un aumento compensatorio de la actividad de la PTH. En nuestro estudio, analizamos los niveles de 25(OH)D, 1-25(OH)2D y PTH de nuestros pacientes PKU, no encontrando diferencias significativas en dichos niveles, entre los que desarrollaron EMO y los que no la desarrollaron.

La presencia de un índice de masa corporal (IMC) bajo, se incluye en el modelo de la OMS que predice el riesgo de fractura⁽²²⁸⁾, que combina datos clínicos junto con la DMO para predecir dicho riesgo. En nuestro estudio se encontró que los pacientes que desarrollaron EMO presentaron menor IMC (≤ 20 años: 15.15 ± 0.21 vs. 19.5 ± 3.18 ; >20 años: 22 ± 2.04 vs 26.6 ± 5.2 ; $p < 0,05$), tanto en la infancia como en la vida adulta.

Al igual que en estudios previos^(141, 147), no se hallaron diferencias significativas en los niveles sanguíneos de Phe entre los pacientes PKU que desarrollaron EMO y los que no la desarrollaron. Por lo que, la falta de cumplimiento de la dieta, no parece tener relación con el desarrollo de EMO.

Aunque el sedentarismo aparece en algunas guías como factor de riesgo para el desarrollo de EMO, se ha demostrado que el ejercicio físico reduce el riesgo de fractura al aumentar la masa ósea⁽²²⁹⁾. En nuestro estudio, en el que a los pacientes se les entregó un cuestionario de actividad física, no pudimos demostrar que una menor actividad física se relacionase con el desarrollo de EMO en los pacientes PKU.

Es probable que existan factores genéticos ligados a la propia enfermedad que jueguen un papel importante en el desarrollo de osteopenia/osteoporosis en estos

pacientes, dado que los factores genéticos pueden condicionar el remodelado óseo. Este punto puede verse reforzado por el fuerte componente genético que subyace al desarrollo de osteoporosis^(152,153). En nuestro estudio, se recogió el genotipo PKU de cada paciente, no identificándose ningún alelo que fuese más frecuente en el grupo de pacientes que presentaron EMO.

En conclusión, la prevalencia de EMO en los pacientes PKU es superior a la de la población general, aunque su patogenia global siga siendo desconocida y por lo tanto, tampoco se conozcan todos los factores de riesgo que la determinan. Además de la restricción proteica implícita al tratamiento de la enfermedad, es posible que existan factores genéticos desconocidos que influyan en el metabolismo óseo. El tratamiento con tetrahidrobiopterina puede actuar como un factor protector contra el desarrollo de EMO, ya que permite una menor o nula restricción proteica en la dieta y/o por la reducción en el estrés oxidativo.

6.3. DISCUSIÓN SOBRE LA UTILIDAD DE LOS MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO EN LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD METABÓLICA ÓSEA EN LOS PACIENTES FENILCETONÚRICOS

Dado que la EMO es más frecuente en los pacientes PKU^(140,141,154,217-220,230,231), sería interesante disponer de métodos no invasivos que nos permitan conocer el remodelado óseo y así poder anticiparnos a su aparición. Así como, informar sobre las alteraciones del remodelado óseo que nos justifiquen el desarrollo de la EMO en estos pacientes.

Observamos en nuestro estudio, al igual que en el de Millet y cols⁽²³¹⁾ niveles de FAO disminuidos en el 53,8% del grupo de pacientes mayores de 20 años, reflejando una menor formación ósea en la edad adulta, lo que podría justificar per se, la mayor predisposición a EMO en estos pacientes. Sin embargo, los valores son normales en menores de 20 años (salvo en un paciente en el que se encontraba elevado) en contraposición con otros estudios^(230,231) que objetivan también disminución de marcadores FAO, OC, OPG tanto en niños como adultos. El motivo por el que en nuestro caso, ninguno de los pacientes menores de 20 años presentase disminuidos los marcadores de formación ósea lo desconocemos, de todas formas, la heterogeneidad de las poblaciones a estudio, en cuanto a la precocidad del tratamiento de la PKU, el control de la dieta o el tratamiento con la BH₄, podrían justificar estas diferencias.

Los valores de PNP-1, no estaban alterados en ninguno de los pacientes que desarrollaron EMO; por lo que parecen poco útiles para valorar el remodelado óseo en estos pacientes; en la literatura no existe referencia a la utilidad de este marcador en el estudio de la EMO en los PKU.

Con respecto a los marcadores de resorción, β -CTX y Ca/Cr en orina, no estaban elevados en ningún grupo de edad. Esto coincide con lo publicado por Hillman et al⁽²³⁰⁾,

que analiza el Ca/Cr y la FATR en niños PKU y con Ambroszkiewicz et al⁽²³²⁾ que encuentra niveles de β -CTx más bajos en los PKU. Millet et al⁽²³¹⁾, en contraposición, encuentran excreción urinaria aumentada de deoxipiridinolina en todos los grupos de edad. En esta misma línea De Groot et al⁽²¹⁸⁾ sostiene que la resorción ósea puede ser un mecanismo clave en el desarrollo de la EMO en los PKU, al comprobar mayores niveles de P y FA en los niños PKU con menores z-score en la DMO; aunque el P y la FA en realidad, son marcadores muy poco específicos para determinar la resorción ósea.

Por otro lado, en los pacientes con cifras bajas de FAO la ingesta de proteínas naturales por kg de peso fue inferior ($p=0,002$) y se sabe que una ingesta proteica adecuada es fundamental para la formación ósea^(225,226). El tratamiento con BH4 permite una mayor ingesta de proteínas, y en nuestro estudio, como ya se ha referido previamente, ninguno de los que recibieron dicho tratamiento presentó descenso en la DMO en la densitometría, ni disminución en la formación ósea cuantificado por descenso en la FAO; lo que refuerza la importancia de la ingesta proteica en el desarrollo de la EMO.

La vitamina D, participa en la formación ósea al facilitar la absorción de Ca y fósforo de la dieta. En nuestro estudio encontramos niveles significativamente mayores de 1-25(OH)₂D en los pacientes con niveles menores de FAO, aunque los niveles de 25(OH)D y PTH fueron similares a los demás pacientes PKU; siendo también similar la ingesta de P y significativamente superior la de Ca; habiendo sido observada también en estudios previos la independencia de desarrollo de EMO de la ingesta de Ca en la PKU^(129,136). De todo ello podemos concluir que el estudio de la vitamina D no sería un buen parámetro para valorar el riesgo de desarrollo de EMO en los pacientes PKU.

La mayor predisposición de los pacientes PKU a desarrollar EMO es una realidad. Nos faltan todavía por conocer cuáles son los mecanismos fisiopatológicos que la desencadenan; pero sabemos que factores como la deficiente ingesta de Ca y vitamina D no parecen tener relevancia en la EMO de la PKU. A la vista de nuestros resultados consideramos que la determinación de β -CTX, PNP-1 y Ca/Cr, no son de

utilidad para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar EMO, pero si la FAO, ya que niveles bajos de este marcador, pueden alertar sobre una menor formación de hueso, lo que sucede con más frecuencia en los PKU.

La menor DMO en los PKU parece por lo tanto no estar condicionada por una alteración en la mineralización ósea, sino por una alteración en la matriz orgánica del hueso, debida quizá a la menor ingesta proteica en los PKU. Los niveles de FAO bajos pueden ser útiles para identificar a estos pacientes.

6.4. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LA GENÉTICA DE LOS PACIENTES FENILCETONÚRICOS DE GALICIA

La tasa de detección de mutaciones de PKU llevada a cabo en los pacientes de nuestra región (Galicia) es del 97,6%; encontrándose en el límite superior de las tasas publicadas de diferentes poblaciones a lo largo del mundo (90-99%)^(198,229,230). El espectro mutacional encontrado, comprende 47 mutaciones en 105 pacientes diagnosticados desde 1980, procedentes de 89 familias. El 47,2% de los alelos investigados corresponden a 6 mutaciones, cada uno de ellos con una frecuencia $\geq 5\%$ (IVS10-11G>A, p.R261Q, p.V388M, p.R176L, p.E280K y p.A300S).

Nuestro estudio confirma un alto grado de heterogeneidad en las mutaciones de la HPA en Galicia, con un índice de homocigosidad de 0,054 similar a lo publicado del Sur de Europa^(200,201,235,236).

El espectro mutacional publicado de la PKU es diferente en los países del Norte y Centro de Europa, en donde las mutaciones prevalentes son IVS12+1G>A y p.R408W^(237,238). La mutación más frecuente en nuestra población es IVS10-11G>A (13.8%), considerada como la principal mutación mediterránea^(236,239-241). La segunda mutación identificada más prevalente fue p.R261Q, en el exón 7, presente en el 10,5% de los alelos. Ésta es una mutación frecuente en el mundo^(200, 241), y ha sido publicada previamente como una de las mutaciones relativamente más frecuente en varias poblaciones, fundamentalmente en el área mediterránea y en el Sur de Europa^(235, 243). En el caso de España, Desviat y cols⁽²⁰¹⁾ publicaron en el año 1999 el espectro mutacional de los PKU en España. Las mutaciones más prevalentes encontradas en dicho estudio fueron IVSnt-11, asociada a los fenotipos más graves; A403V, relacionada con hiperfenilalaninemias benignas y en relación con fenotipos leves de PKU las mutaciones 165T y v388M. En este estudio se evidencia la alta incidencia de mutaciones con bajo nivel de severidad, lo que explica la mayor prevalencia de PKU leves e hiperfenilalaninemias benignas en España.

Todas las mutaciones identificadas en nuestros pacientes, habían sido previamente descritas en otras poblaciones, excepto la mutación p.K361Q. Esta mutación de cambio de aminoácido, se sitúa en el dominio catalítico, en el exón 11 del gen de la PAH. Se supone que es una mutación muy leve, porque combinada con la mutación grave p.R243X, resulta en un fenotipo en el paciente de HPA benigna. En consecuencia, el cambio se puede predecir será tolerado con un score de 0,25, usando el SIFT (<http://blocks.fhcr.org/sift/SIF.html>) con un rango de score desde 0 (dañino) hasta 1 (neutro); y posiblemente dañino con un score de 0,71 usando el PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) con un rango de score desde 0 (neutro) hasta 1 (dañino).

Varios estudios han demostrado inconsistencias en la correlación genotipo/fenotipo⁽²³⁴⁾. Nuestros resultados revelan, sin embargo, una buena correlación, con pacientes que portan mutaciones nulas en ambos alelos que muestran altos niveles de concordancia con los fenotipos más graves como ha sido publicado previamente⁽²⁴⁴⁾. De todas formas, el paciente 88, con dos mutaciones leves-moderadas, asociadas in vitro con respuesta a la BH4, p.165T y p.R261Q, presentó un fenotipo clásico y no respondedor a BH4. Ya había sido descrito previamente por algunos autores que el fenotipo metabólico observado no era consistente con el efecto genotipo previsto para estas dos mutaciones^(236, 245, 246). Dado que ambas mutaciones no se localizan en el dominio tetramerizador del gen de la PAH, se ha sugerido que podrían afectar a las interacciones entre las subunidades de las interfases, sobre los cambios conformacionales ocurridos en la interfase dimérica sobre la activación por L-Phe⁽²⁴⁵⁾.

Se encontraron otras inconsistencias en la correlación genotipo-fenotipo, todas ellas implicando a dos mutaciones específicas: p.R261Q (10 casos) y IVS10-11G>A (4 casos), en donde pacientes con el mismo genotipo, presentaron fenotipos moderado unos y clásico otros.

Con respecto a la respuesta a BH4, encontramos una correlación entre el genotipo y la respuesta prevista con la respuesta in vivo a la BH4, similar a lo descrito en estudios previos^(73, 247, 248).

6.5. PROPUESTA DE ESQUEMA DE SEGUIMIENTO Y MANEJO NUTRICIONAL DE LOS PACIENTES PKU

PERÍODO NEONATAL: estudio de aminoácidos plasmáticos, DHPR y pterinas en orina, test de sobrecarga de BH₄.

SEGUIMIENTO ANTROPOMÉTRICO: Mensualmente los 3 primeros meses, trimestral desde los 3 meses al año de vida y seguidamente semestral: determinación de peso, IMC, longitud/talla (hasta cese de crecimiento, considerándose éste cuando durante 2 años consecutivos se mantenga con la misma talla) y perímetro de cráneo (hasta los 7 años).

FENILALANINA: semanal en los primeros 4 meses de vida, quincenal hasta los dos años y mensual a partir de entonces mensual.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS (semestral): Aminoácidos plasmáticos, bioquímica general con proteínas, albúmina, urea, creatinina, transaminasas, Sodio, Potasio, Calcio, Fósforo, cociente Ca/P, fosfatasa alcalina, prealbúmina, LC-PUFAS, proteína transportadora del retinol, ferritina, 25(OH)D, B12, 1-25(OH)2D, ácido fólico, Zn, Se, Fosfatasa alcalina ósea (a partir de los 7 años).

DENSITOMETRÍA DE CUELLO FEMORAL Y DE VÉRTEBRAS LUMBARES a partir de los 7 años de edad, cada 4 años (con más frecuencia si osteopenia/osteoporosis o disminución de los niveles de FAO).

ENCUESTA NUTRICIONAL: semestral. Tratamiento dietético según fenotipo, tolerancia individual a la Phe y respuesta a la BH₄. Mantener aporte de proteínas naturales en rango alto manteniendo niveles de Phe según niveles objetivos para cada edad. Repartir ingesta de sustitutivo proteico en cuatro tomas diarias.

7. CONCLUSIONES

1. No existen diferencias significativas en la talla entre los varones PKU y los HPA. Con respecto a la población de referencia, la talla de los pacientes PKU es similar a la dicha población hasta los 8-9 años, momento a partir del cual se observa una menor progresión de la talla en estos pacientes. Sin embargo, la talla final de los pacientes HPA es similar a la talla final de la población de referencia.
2. En las mujeres existen diferencias en la talla entre las PKU y las HPA, debido a que existe un cruce entre los 8 y 12 años, al aumentar la talla en las pacientes PKU a los 8 años y situarse por encima de la talla de las HPA, volviendo a descender a los 12 años, siendo la talla final de las pacientes PKU más baja.
3. En los varones, la progresión del peso durante los cinco primeros años de vida es similar entre los PKU y los HPA. A partir de esa edad, se observa una discreta diferencia entre ambos, tendiendo a presentar más peso el grupo de pacientes HPA. Los varones tanto HPA como PKU tienden a presentar más peso que la población de referencia a lo largo de la infancia.
4. En las mujeres, la progresión del peso durante los cinco primeros años de vida es similar entre las PKU y las HPA. A partir de esa edad, se observa una discreta diferencia entre ambos, tendiendo a presentar más peso el grupo de pacientes PKU. Las mujeres tanto HPA como PKU tienden a presentar más peso que la población de referencia a lo largo de la infancia, aunque en menor medida que los varones.
5. El IMC en los varones es discretamente superior en el grupo de pacientes PKU, sin existir diferencias significativas entre HPA y PKU. El IMC de los pacientes HPA y PKU es ligeramente superior al de la población de referencia. En el caso de las mujeres el IMC es mayor en las PKU que en las HPA, sin existir

diferencias significativas; siendo el IMC en las PKU superior al de la población de referencia.

6. Tanto la talla, como el peso y el IMC no siguen para cada individuo un patrón lineal a lo largo de la infancia, sino un patrón curvilíneo, por lo que la utilización de modelos estadísticos mixtos flexibles es muy útil para estudiar estas variables.
7. El tratamiento de la fenilcetonuria, consistente en una restricción más o menos estricta de los alimentos ricos en proteínas de origen natural, puede favorecer por sí misma la aparición de alteraciones en la mineralización ósea, pudiendo ocasionar osteopenia u osteoporosis, al verse mermada la matriz orgánica (proteica) del hueso.
8. El tratamiento con tetrahidrobiopterina, al que responden un porcentaje de pacientes fenilcetonúricos, puede actuar como un factor protector contra el desarrollo de osteopenia/osteoporosis, al permitir una menor o nula restricción proteica en la dieta y/o por la reducción en el estrés oxidativo.
9. La predisposición a presentar una menor densidad mineral ósea de los pacientes fenilcetonúricos no parece estar condicionada por una alteración en la mineralización ósea, ya que tanto la ingesta de calcio y vitamina D, así como sus niveles en sangre se encuentran dentro de la normalidad en estos pacientes fenilcetonúricos, incluso en los que desarrollan osteopenia/osteoporosis.
10. La FAO, marcador específico de formación de hueso, está disminuida con más frecuencia en los pacientes fenilcetonúricos. Esto sugiere una predisposición a una menor formación de hueso en este grupo de pacientes, lo que puede justificar el desarrollo de enfermedad mineral ósea por una disminución en el ciclo de remodelado óseo. De esta forma, la determinación de FAO en los

pacientes fenilcetonúricos puede ser útil como indicador de riesgo de desarrollo de EMO cuando los niveles están bajos.

11. No se ha podido demostrar la utilidad de otros marcadores de remodelado óseo como PNP-1 (marcador de formación ósea) y β -CTX y Ca/Cr (marcadores de resorción ósea), para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad mineral ósea, al no encontrarse alterados en los pacientes fenilcetonúricos.
12. La tasa de detección de mutaciones en la población fenilcetonúrica en Galicia es elevada (97,6%), lo que permite comprobar que existe una gran heterogeneidad genotípica en esta población.
13. Existe una buena correlación entre el genotipo, el fenotipo bioquímico y la respuesta a la BH₄, siendo esta última del 38,3% en nuestro estudio.
14. El diagnóstico molecular de los pacientes fenilcetonúricos permite, en general, una buena aproximación para determinar si un paciente deber ser sometido al test de respuesta a BH₄.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Fölling A.** Über Ausscheidung von Phenylbrenztrauben-säure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 1934; 277:169–176.
2. **Penrose LS.** Inheritance of phenylpyruvic amentia (Phenylketonuria). Lancet 1935; 226:192–194.
3. **Jervis GA.** Phenylpyruvic oligophrenia: deficiency of phenylalanine oxidizing system. Proc Soc Exp Biol Med 1953; 82: 514–515.
4. **Armstrong MD, Tyler FH.** Studies on phenylketonuria. I. Restriction phenylalanine intake in phenylketonuria. J Clin Invest 1955; 34: 565–580.
5. **Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM.** Influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. Acta Paediat 1954; 43: 64–77.
6. **Woolf LI, Griffiths R, Moncrieff.** Treatment of phenylketonuria with a diet low in phenylalanine. Br Med J 1955; 1: 57–64.
7. **Guthrie R, Susi A.** A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32:338–334.
8. **National Academy of Sciences. Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism DoMSAoLS.** 1975. Genetic Screening: Programs, Principles, and Research. Washington, DC: National Academy Press.
9. **Campistol J, Lambruschini N, Gómez-López L, Gutiérrez A, Fuste E, Vilaseca MA.** Hiperfenilalaninemias. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Cap. 29. 3a ed. Majadahonda: Ergon; 2010. p. 423–39.
10. **Krause W, Halminski M, McDonald L, Dembure P, Salvo R, Freides D, Elsas L.** Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. J Clin Invest 1985; 75:40–48.
11. **Smith I, Wolff OH.** Natural history of phenylketonuria and influence of early treatment. Lancet 1974;2:540–544.

12. **Kaufman S.** A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3160–3164.
13. **Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V.** Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *NeuroReport* 2000;11:1361–1364.
14. **Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS.** The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:427–448.
15. **Huttenlocher PR.** The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr* 2000;159 (Suppl 2):S102–S106.
16. **Radi R, Cassina A, Hodara R.** Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002;383:401–409.
17. **Wyse AT, Bavaresco CS, Bandinelli C, Streck EL, Franzon R, Dutra-Filho CS, Wajner M.** Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem Res* 2001;26:515–520.
18. **Halliwell B.** Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001;18:685–716.
19. **Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U.** Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Gen Metab.* 2011; 104:S2-S9.
20. **Correcher Medina P, Pedrón Marzal G, Rey Simón R, Calvo Rigual F.** Venopunción en el dorso de la mano. ¿Una alternativa a la punción del talón?. *An Pediatr (Barc)* 2012; 77:381-385.
21. **Arai N, Narisaya K, Hayakawa H, Tada K.** Hyperphenylalaninemia due to dihydropterine reductase deficiency: diagnosis by enzyme assay on dried blood spots. *Pediatrics* 1982; 98:426-430.
22. **Blau N, Blaskovics ME.** Hyperphenylalaninemia. En: Nenad Blau, Marinus Duran, Milan E, Blaskovics (eds). *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. 1a ed. Chapman & Hall Medical 1996:65-78.

23. **Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K.** Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, B. Vogelstein (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1725–1776.
24. **Opladen T, Abu Seda B, Rassi A, Thöny B, Hoffmann GF, Blau N.** Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34:819–826.
25. **Martínez-Pardo M, Marchante C, Dalmau J, Pérez M, Bellón. J.** Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. *An Esp Ped* 1998;114 Suppl:3–8.
26. **Mena MA, Aguado EG, Yébenes JG.** Monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. HPLC/ED method. *Acta Neurol Scand* 1984; 69: 218-225.
27. **Jäggi L, Zurflüh MR, Schuler A, Ponzzone A, Porta F, Fiori L, Giovannini M, Santer R, Hoffmann GF, Ibel H, Wendel U, Ballhausen D, M Baumgartner MR, NBlau N.** Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 93:295–305.
28. **Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K.** Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135:375–378.
29. **Muntau A. C, Röschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA.** Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002; 347: 2122–2132
30. **Blau N.** Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010; 5:483–494.
31. **Levy H, Burton B, Cederbaum S, Scriver C.** Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment. *Mol Genet Metab* 2007; 92:287–291.
32. **Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ.** Optimizing the use of sapropterin

- (BH(4)) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009; 96: 158 – 163.
33. **Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G, et al.** Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab* 2005; 86, Suppl. 1:S75–S80.
34. **Burlina A, Blau N.** Effect of BH(4) supplementation on phenylalanine tolerance. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 40–45.
35. **Nielsen JB, Nielsen KE, Güttler F.** Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 9–16.
36. **Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, Abadie V, Harding CO, Cederbaum S, Dobbelaere D, Smith A, Dorenbaum A.** The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:700–707.
37. **Fiege B, Blau N.** Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 2007; 150:627–630.
38. **Desviat LR, Pérez B, Bèlanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Ugarte M.** Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab* 2004; 83:157–162.
39. **Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC.** The hyperphenylalaninemias. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7 edition. Edited by: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw-Hill, New York; 1995:1015-1075.
40. **Blau N, van Spronsen FJ, Levy H.** Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376:1417-1427.
41. **Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E.** Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9:7.

42. **MacDonald A, Depondt E, Evans S, Daly A, Hendriksz C, Chakrapani AA, Saudubray JM.** Breast feeding in IMD. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:299-303.
43. **Agostoni C, Harvie A, McCulloch DL, Demellweek C, Cockburn F, Giovannini M, Murray G, Harkness RA, Riva E.** A randomised trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants with phenylketonuria. *Dev Med Child Neurol* 2006 ;48:207-212.
44. **Feillet F, Agostoni C.** Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33:659-664.
45. **Agostoni C, Verduci E, Fiori L, Riva E, Giovannini M.** Breastfeeding rates among hyperphenylalaninemic infants. *Acta Paediatr* 2000; 89:366-367.
46. **Cleary MA, Feillet F, White FJ, Vidailhet M, MacDonald A, Grimsley A, Maurin N, de Baulny HO, Rutherford PJ.** Randomised controlled trial of essential fatty acid supplementation in phenylketonuria. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60:915-920.
47. **MacDonald A, Lilburn M, Davies P, Evans S, Daly A, Hall SK, Hendriksz C, Chakrapani A, Lee P.** 'Ready to drink' protein substitute is easier is for people with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:526-531.
48. **Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campy C, Cetin I, Decsi T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Hoizgreve W, Lapillonne A, Pulet G, Secher NJ, Symonds M, Szajewska H, Willatts P, Uauy R; World Association of Perinatal Medicine Dietary Guidelines Working Group.** The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 2008; 36:5-14.
49. **Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT.** Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:525- 535.
50. **Agostoni C, Massetto N, Biasucci G, Rottoli A, Bonvissuto M, Bruzzese MG, Giovannini M, Riva E.** Effects of long- chain polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty acid status and visual function in treated children with hyperphenylalaninemia. *J Pediatr* 2000; 137:504-509.

51. **Beblo S, Reinhardt H, Muntau AC, Mueller-Felber W, Roscher AA, Koletzko B.** Fish oil supplementation improves visual evoked potentials in children with phenylketonuria. *Neurology* 2001; 57:1488–1491.
52. **van Bakel MM, Printzen G, Wermuth B, Wiesmann UN.** Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:976–981.
53. **Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA.** A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 2004; 37:198–203.
54. **Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria.** Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1993;68:426–427.
55. **Macdonald A, Chakrapani A, Hendriksz C, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall K, Booth IW.** Protein substitute dosage in PKU: how much do young patients need? *Arch Dis Child* 2006; 91:588–593.
56. **Przyrembel H.** Recommendations for protein and amino acid intake in phenylketonuria patients. *Eur J Pediatr* 1996;155:S130–1.
57. **Gropper SS, Acosta PB.** Effect of simultaneous ingestion of L-amino acids and whole protein on plasma amino acid and urea nitrogen concentrations in humans. *J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15: 48–53.
58. **Gropper SS, Gropper DM, Acosta PB.** Plasma amino acid response to ingestion of L-amino acids and whole protein, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16:143–150.
59. **MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M, Feillet F.** Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 104:S10-S18.
60. **F.a.N.B. Institute of Medicine of the National Academies.** Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fibre, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids, The National Academies Press, Washington DC, 2002 Appendix D-14.
61. **Pencharz PB, Ball O.** Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr* 2003; 23:101–116.

62. **Zello GA, Pencharz PB, Ball RO.** Phenylalanine flux, oxidation, and conversion to tyrosine in humans studied with L-[1-13C]phenylalanine. *Am J Physiol* 1990; 259:E835–E843.
63. **van Spronsen FJ, van Rijn M, Dorgelo B, Hoeksma M, Bosch AM, Mulder MF, de Klerk JB, de Koning T, Rubio-Gozalbo ME de Vries M, Verkerk PH.** Phenylalanine tolerance can already reliably be assessed at the age of 2 years in patients with PKU. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:27–31.
64. **Bross R, Ball RO, J.T. Clarke JT, Pencharz PB.** Tyrosine requirements in children with classical PKU determined by indicator amino acid oxidation, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E195–E201.
65. **MacDonald A.** Diet and compliance in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl): S136-S141.
66. **MacDonald A, Daly A, Davies P, Asplin D, Hall SK, Rylance G, Chakrapani A.** Protein substitutes for PKU: What's new? *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 363-371.
67. **MacDonald A, Gökmen-Özel H, Daly A.** Changing dietary practices in phenylketonuria. *Turk J Pediatr* 2009; 51: 409-415.
68. **MacDonald A, Rylance G, Davies P, Asplin D, Hall SK, Booth IW.** Administration of protein substitute and quality of control in phenylketonuria: a randomized study. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 319-326.
69. **Blaskovics ME, Schaeffler GE, Hack S.** Phenylalaninaemia. Differential diagnosis. *Arch Dis Child* 1974 ;49:835–843.
70. **Longo N.** Disorders of bipterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:333–342.
71. **Ponzone A, Guardamagna O, Spada M, Ferraris S, Ponzone R, Kierat L, Blau N.** Differential diagnosis of hyperphenylalaninaemia by a combined phenylalanine–tetrahydrobiopterin loading test. *Eur J Pediatr* 1993; 152:655–661.
72. **Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, FFlagler FB, Sommerhoff CP, Roscher AA, Muntau AC.** Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet* 2008; 83:5–17.

73. **Trefz FK, Burton B, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, Kakkis ED, Crombez EA, Grange DK, Harmatz P, Lipson MH, Milanowski A, Randolph LM, Vockley J, Whitke CB, Wolff JA, Bebachuk J, Christ-Schmidt H, Hennermann JB; Sapropterin Study Group.** Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr* 2009; 154:700-707.
74. **Bóveda MD, Couce ML, Castiñeiras DE, Cocho JA, Pérez B, Ugarte M, Fraga JM.** The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30, 8-12.
75. **Couce ML, Bóveda MD, Valerio E, Pérez-Muñuzuri A, Fraga JM.** Long-Term pharmacological management of Phenylketonuria, including patients below the age of four years. *J Inherit Metab Dis* 2012; 2:91-96.
76. **Feillet F, Chery C, Namour F, Kimmoun A, Favre E, Lorentz E, Battaglia-Hsu SF, Guéant JL.** Evaluation of neonatal BH4 loading test in neonatae screened for hyperphenylalaninemia. *Early Hum Dev* 2008; 84:561–567.
77. **Lambruschini N, Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Artuch R, Gassió R, Gómez L, Gutiérrez A, Campistol J.** Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy. *Mol Genet Metab* 2005; 86:S54 – S60.
78. **Singh R, Jurecki E, Rohr F.** Recommendations for personalized dietary adjustments based on patient response of tetrahydrobiopterin in phenylketonuria. *Top Clin Nutr* 2008; 23:149 –157.
79. **Acosta PB, Yannicelli S.** Protein intake affects phenylalanine requirements and growth of infants with phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407, 66 – 67.
80. **Laclair CE, Ney DM, MacLeod EL, Etzel MR.** Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria. *J Food Sci* 2009; 74:E199-206.
81. **Etzel MR.** Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr* 2004; 134:996S–1002S.

82. **Ney DM, Gleason ST, van Calcar SC, MacLeod EL, Nelson KL, Etzel MR, Rice GM, Wolff JA.** Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 32-39.
83. **van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, Etzel MR, Clayton MK, Wolff JA, Ney DM:** Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:1068-1077.
84. **Jordan MK, Brunner RL, Hunt MM, Berry HK.** Preliminary support for the oral administration of valine, isoleucine and leucine for phenylketonuria. *Dev Med Child Neurol* 1985; 27:33–39.
85. **Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, Bremer HJ.** Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 1999; 103:1169–1178.
86. **Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, Grady J, Tyring SK, Guttler F.** Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:732–738.
87. **Sanjurjo P, Aldamiz L, Georgi G, Jelinek J, Ruiz JI, Boehm G.** Dietary threonine reduces plasma phenylalanine levels in patients with hyperphenylalaninemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:23–26.
88. **Güttler F, Lou H.** Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function. *J Inherit Metab Dis* 1986; 9(Suppl 2):169–177.
89. **Lou HC, Lykkelund C, Gerdes AM, Udesen H, Bruhn P.** Increased vigilance and dopamine synthesis by large doses of tyrosine or phenylalanine restriction in phenylketonuria. *Acta Paediatr Scand* 1987; 76:560–565.
90. **Lou HC.** Dopamine precursors and brain function in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407:86–88.
91. **Pietz J, Landwehr R, Schmidt H, Sonnevile L, Kutscha A, Trefz FK.** Effect of high-dose tyrosine supplementation on brain function in adults with phenylketonuria. *J Pediatr* 1995; 127:936–943.

92. **Van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ.** Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inherit Metab Dis* 2009; 32:46–51.
93. **Sarkissian CN, Kang TS, Gámez A, Scriver CR, Stevens RC.** Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 104:249-225
94. **Van Spronsen FJ, Burgard P.** The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood. The need for a new guideline. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31:673–679.
95. **Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ,** contributing European PKU centres. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 centres. *Mol Genet Metab* 2010; 99:109–115.
96. **Smith I, Beasley MG, Ades AE.** Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990; 65:472–478.
97. **MacDonald A, Rylance GW, Asplin D, Hall SK, Booth IW.** Does a single plasma phenylalanine predict quality of control in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1998; 78:122–126.
98. **Channon S, Mockler, Lee CP.** Executive functioning and speed of processing in phenylketonuria. *Neuropsychology* 2005; 19:679–686.
99. **Channon S, Goodman G, Zlotowitz S, Mockler C, Lee PJ.** Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome, *Arch Dis Child* 2007; 92:213–218.
100. **van Spronsen FJ, van Rijn M, van Dijk T, Smit GP, Reijngoud DJ, Berger R, Heymans HS.** Plasma phenylalanine and tyrosine responses to different nutritional conditions (fasting/postprandial) in patients with phenylketonuria: effect of sample timing, *Pediatrics* 1993; 92:570–573.
101. **Armstrong MD, Stave U.** A study of plasma free amino acid levels. II. Normal values for children and adults, *Metabolism* 1973; 22: 561–569.

102. **Posner J, Gorman D, Nagel BJ.** Tyrosine supplements for ADHD symptoms with comorbid phenylketonuria, *J. Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2009; 21: 228–230.
103. **Webster D, Wildgoose J.** Tyrosine supplementation for phenylketonuria, *Cochrane Database Syst Rev* 4 (8) (2010) CD001507.
104. **Sharman R, Sullivan K, Young R, McGill J.** A preliminary investigation of the role of the phenylalanine:tyrosine ratio in children with early and continuously treated phenylketonuria: toward identification of “safe” levels. *Dev Neuropsychol* 2010; 35:57–65.
105. **Weglage J, Funders B, Wilken B, Schubert D, Ullrich K.** School performance and intellectual outcome in adolescents with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1993;81:582-6.
106. **Waisbren SE, Brown MJ, de Sonnevile LM, Levy HL.** Review of neuropsychological functioning in treated phenylketonuria: an information processing approach. *Acta Paediatr* 1994;407:98-110
107. **Cleary MA, Walter JH, Wraight JE, Jenkins JP, Alani SM, Tyler K, Whittle D.** Magnetic resonance imaging in phenylketonuria. *Lancet* 1994;344:87-90.
108. **Sener RN.** Diffusion MRI findings in phenylketonuria. *Eur Radiol* 2003;13:226-229.
109. **Thompson AJ, Smith I, Youl BD, Rylance G, Davidson DC.** Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1990;336:602-605
110. **Joseph B, Dyer CA.** Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem* 2003; 86:615-626.
111. **Pietz J, Dunkelmann R, Rupp A, Rating D, Menick HM, Schmidt H, Bremer HJ.** Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1998;157:824-830.
112. **Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, Scott R, Wolff J, Stern AM, Guttler F, Nelson M, de la Cruz F, Coldwell J, Erbe R, Geraghty MT, Shear C, Thomas J, Azen C.** Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:333-346.

113. **Waisbren SE, Levy HL.** Agoraphobia in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1991;14:755-764.
114. **Koch R, Moseley KD, Yano S, Nelson M, Moats RA.** Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol Genet Metab* 2003;79:110-113.
115. **Hvas AM, Nexø E, Nielsen JB.** Vitamin B12 and vitamin B6 supplementation is needed among adults with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:47-53.
116. **Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH.** Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr* 2000; 136:545–547.
117. **Wiersinga WJ, de Rooij SEJA, Huijman JGM, Fischer JC, Hoekstra JBL.** Diagnosis of vitamin B12 deficiency revised. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005;149:2789-2794.
118. **Hanley WB, Linsao L, Davidson W, Moes CA.** Malnutrition with early treatment of phenylketonuria. *Pediatr Res* 1970; 4:318–327.
119. **Lee PJ, Lilburn M, Baudin J.** Maternal phenylketonuria: experiences from the United Kingdom. *Pediatrics* 2003;112:1553-1556.
120. **Rohr F, Munier A, Sullivan D, Bailey I, Gennaccaro M, Levy H, Brereton H, Gleason S, Goss B, Lesperance E, Moseley K, Singh R, Tonyes L, Vespa H, Waisbren S.** The resource mothers study of maternal phenylketonuria: preliminary findings. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:145-155.
121. **Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, Lammardo AM, Motzfeldt K, Robert M, Rocha JC, van Rijn M, Ahring K, Bélanger-Quintana A, MacDonald A.** Optimising growth in phenylketonuria. Current state of the clinical evidence base. *Clin Nutr* 2012; 31:16-21.
122. **van der Schot LW, Doesburg WH, Sengers RC.** The phenylalanine response curve in relation to growth and mental development in the first years of life, *Acta Paediatr* 1994; 407: S68–S69.

123. **Verkerk PH, van Spronsen FJ, Smit GP, Sengers RC.** Impaired prenatal and postnatal growth in Dutch patients with phenylketonuria, The National PKU Steering Committee. *Arch Dis Child* 1994; 71:114–118.
124. **van Spronsen FJ, Verkerk PH, van Houten M.** Does impaired growth of PKU patients correlate with the strictness of dietary treatment? National Dutch PKU Steering Committee. *Acta Paediatr* 1997; 86:816–818.
125. **Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, Andrade F, Llarena M, Blasco J, Alcalde C, Gil D, García MC, González-Lamuño D, Ruiz M, Ruiz MA, González D, Sánchez-Valverde F.** Tetrahydrobiopterin therapy vs phenylalanine-restricted diet: Impact on growth in PKU. *Mol Genet Metab* 2013;109:331-338.
126. **Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, Mofidi S, Steiner R, DeVincentis E, Jurecki E, Bernstein L, Gleason S, Chetty M, Rourse B.** Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 1167–1173.
127. **Belanguer-Quintana A, Martínez-Pardo M.** Physical development in patients with phenylketonuria on dietary treatment: A retrospective study. *Mol Genet Metab* 2011; 104:480-484.
128. **Carver JD, Wu PY, Hall RT, Ziegler EE, Sosa R, Jacobs J, Baggs G, Auestad N, Lloyd B.** Growth of preterm infants fed nutrient-enriched or term formula after hospital discharge. *Pediatrics* 2001; 107:683-689.
129. **Watemberg N, Silver S, Harel S, Lernan-Sagie T.** Significance of microcephaly among children with developmental disabilities. *J Child Neurol* 2002; 71: 114-118.
130. **He Q, Karlberg J.** Probability of adult overweight and risk change during the BMI rebound period. *Obes Res* 2002;10:135e40.
131. **Scaglioni S, Verduci E, Fiori L, Lammardo AM, Rossi S, Radaelli G, Riva E, Giovannini M.** Body mass index rebound and overweight at 8 years of age in hyperphenylalaninaemic children. *Acta Paediatr* 2004; 93:1596–1600.
132. **Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E.** Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis* 2006; 30:145–152.

133. **Allen Jr, Mccauley Jc, Waters DI, O'connor J, Roberts Dc, Gaskin Kj.** Resting energy expenditure in children with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:797–801.
134. **Huemer M, Huemer C, Moslinger D, Huter D.** Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:694–699.
135. **McBurnie MA, Kronmal RA, Schuett VE, Koch R, Azeng CG.** Physical growth of children treated for phenylketonuria. *Ann Hum Biol* 1991;18:357e68.
136. **Ahring K, Belanger-Quintana A, Dokoupil K, Gokmen Ozel H, Lammardo AM, MacDonald A, Motzfeldt K, Nowacka M, Robert M, van Rijn M.** Dietary management practices in phenylketonuria across European centres. *Clin Nutr* 2009; 28:231-236.
137. **Hoeks MP, den Heijer M, Janssen MC.** Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med* 2009;67:2e7.
138. **Lammardo AM, Bélanger-Quintana A, Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, MacDonald A, Motzfeldt K.** Cost of diet therapy in Phenylketonuria in 10 European centres. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(Suppl. 1):167
139. **Greeves LG, Carson DJ, Magee A, Patterson CC.** Fractures and phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1997; 86:242–244.
140. **Zeman J, Bayer M, Êtépan J,** Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1999; 88:1348–1351.
141. **Perez-Dueñas B, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho JA.** New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 2002; 99: 899–904.
142. **NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy.** Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285: 785-791.
143. **Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW.** Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 eupdate. *J Endocrinol* 2003; 177: 147-196.
144. **Zmuda JM, Sheu YT, Moffett SP.** Genetic epidemiology of osteoporosis: past, present and future. *Curr Osteoporos Rep* 2005; 3: 111-115.

- 145.**Currey JD**. The design of mineralised tissues for their mechanical functions. *J Exp Biol* 1999; 202: 3285-3291.
- 146.**Landis WJ**. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organisation of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 1995; 16:533-539.
- 147.**Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R, Efrati O**. Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:202–208.
- 148.**McMurry MP, Chan GM, Leonard CO, Ernst SL**. Related bone mineral status in children with phenylketonuria-relationship to nutritional intake and phenylal- anine control. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:997–1004.
- 149.**Barat P, Barthe N, Redonnet-Vernhet I, Parrot F**. The impact of the control of serum phenylalanine levels on osteopenia in patients with phenylketonuria. *Eur J Paediatr* 2002; 161:687–688.
- 150.**Lage S, Bueno M, Andrade F, Prieto JA, Delgado C, Legarda M, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarria LJ**. Fatty acid profile in patients with phenylketonuria and its relationship with bone mineral density. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33 suppl 3:363-371.
- 151.**Schwahn B, Mokov E, Scheidhauer K, Lettgen B, Schönau E**. Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography. *Acta Paediatr* 1998;87:61–63.
- 152.**Yannicelli S, Medeiros DM**. Elevated plasma phenylalanine concentrations may adversely affect bone status of phenylketonuric mice. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25:347–361.
- 153.**Allen JR, Humphries IR, Waters DL, Roberts DC, Lipson AH, Howman-Giles RG, Gaskin KJ**. Decreased bone mineral density in children with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 419–422.
- 154.**Al-Qadreh A, Schulpis KH, Athanasopoulou H, Mengreli C, Skarpalezou A, Voskaki I**. Bone mineral status in children with phenylketonuria under treatment. *Acta Paediatr* 1998;87:1162– 1166.

- 155.**van Spronsen FJ, Ahring K, Gizewska M.** PKU — what is daily practice in various centres in europe? *J Inher Metab Dis* 2009; 32:58–64.
- 156.**Bachrat LK, Sills IN and The Section of Endocrinology.** Clinical report- bone densitometry in children and adolescents. *Pediatrics* 2011; 127:189-194.
- 157.**Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, Petak SM, Baxhrach LK, Sheperd JA, Downs RW Jr; International Society for Clinical Densitometry.** Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3651–3655.
- 158.**Gilsanz V, Wren T.** Assessment of Bone Acquisition in Childhood and Adolescence. *Pediatrics* 2007; 119:S145-149.
- 159.**Carter DR, Bouxsein ML, Marcus R.** New approaches for interpreting projected bone densitometry data. *J Bone Miner Res* 1992;7:137–145.
- 160.**Gilsanz V.** Bone density in children: a review of the techniques available and indications. *Eur J Radiol* 1998; 26:177–182.
- 161.**Hangartner TN.** Influence of fat on bone measurements with dual-energy absorptiometry. *Bone Miner* 1990;9:71–78.
- 162.**Kanis JA.** Prediction of fracture from low bone mineral density measurements overestimates risk. *Bone* 2000; 26: 387-93.
- 163.**Njeh CF, Fuerst T, Diessel E, Genant HK.** Is quantitative ultrasound dependent on bone structure? A reflection. *Osteoporosis Int* 2001; 12: 1-15.
- 164.**Gonnelli S, Cepollaro C, Gennari L, Montagni A, Caffarelli C, Merlotti D, Rossi S, Cadirni A, Nuti R.** Quantitative ultrasound an dual-energy X-ray absorptiometry in the prediction of fragility fracture in men. *Osteoporosis Int* 2005; 16:963-968.
- 165.**Hans D, Srivastav SK, Singal C, Barkmann R, Njeh CF, Kantorovich E, Gluer CC, Genant Hk.** Does combining the results from multiple bone sites measured by a new quantitative ultrasound device improve discrimination of hip fracture? *J Bone Miner Res* 1999; 14:644-651.
- 166.**Schneider P, Reiners C, Cointy GR, Capozza RF, Ferretti JL.** Bone quality parameters of the distal radius as assessed by pQCT in normal and fractured women. *Osteoporosis Int* 2001; 12: 639-646.

- 167.**Mole PA, Walkinshaw MH, Robins SP, Paterson CR.** Can urinary pyridinium crosslinks and urinary oestrogens predict bone mass and rate of bone loss after the menopause? *Eur J Clin Invest* 1992; 22:767-771.
- 168.**Seibel MJ.** Biochemical markers of bone turnover. Part II: Clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006; 27:123-138.
- 169.**Jamal SA, Leiter RE, Bayoumi AM, Bauer DC, Cummings SR.** Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. *Osteopor Int* 2005; 16:534-540.
- 170.**del Pino J, Martín-Gómez E, Martín-Rodríguez M, López-Sosa C, Cordero M, Lanchares JL.** Influence of sex, age and menopause in serum osteocalcin (BGP) levels. *Klin Wocher* 1991; 69:1135-1138.
- 171.**Brandt J, Frederiksen JK, Jensen CH and Teisner B.** The N- and C- terminal propeptides of human procollagen type 1 (P1NP and P1CP): molecular heterogeneity and assay technology. Pgs. 73-81 In *Bone Markers Biochemical and Clinical perspectives*. Eds. Eastell R, Baumann M, Hoyle NR and Wiczorek L. Dunitz, London 2001.
- 172.**Ahmad AM, Hopkins MT, Fraser WD, Ooi CG, Durham BH, Vora JP.** Parathyroid hormone secretory pattern, circulating activity, and effect upon bone turnover in adult growth hormone deficiency. *Bone* 2003; 32(2):170-179.
- 173.**Blumsohn A, Naylor KE, Timm W, Eagleton AC, Hannon RA, Eastell R.** Absence of marked seasonal change in bone turnover: A longitudinal and multicentre cross-sectional study. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1274-1281.
- 174.**Kanis JA, Delmas PD.** European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in post-menopausal women. *Osteoporos Int* 2008; 19:99-428.
- 175.**Khosla S, Kleerekoper M.** En: Favus MJ editor. *Primer in the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*. 5th.ed. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2003.
- 176.**Manjón Llorente G, Fernández Espuelas C.** Normal values of bone turnover markers in childhood. *An Pediatr (Barc)* 2004; 60: 330-336.
- 177.**Ross PF, Christiano AM.** Nothing but skin and bone. *J Clin Invest* 2006; 116:1140-1149.

- 178.**Bjoerm H, Christian E, Feld M, Zichner L, Kurth A.** Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cement less total hip replacement. *Acta Orthopaedic* 2007; 78:221-25.
- 179.**Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Wilson JM, Baumgartner RN.** Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 2001; 34:639-44.
- 180.**Crofton PM, Wade JC, Taylor MR, Holland CV.** Serum concentrations of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen, amino-terminal propeptide of type III procollagen, cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen, and their interrelationships in schoolchildren. *Clin Chem* 1997;43:1577–1581.
- 181.**Crofton PM, Evans N, Taylor MR, Holland CV.** Serum CrossLaps: pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002; 48:671–673.
- 182.**Zanze M, Souberbielle JC, Kindermans C, Rossignol C, Garabedian M.** Procollagen propeptide and pyridinium cross-links as markers of type I collagen turnover: sex- and age-related changes in healthy children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2971–2977.
- 183.**Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, Finkenstedt G, Högler W.** Sex- and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 443-449.
- 184.**Holick MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357 (3): 266–281.
- 185.**Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ.** Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7 (5):439–443.
- 186.**Holick MF, Siris ES, N. Binkley, Beard NK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp AE.** Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (6):3215–3224.

187. **Prince RL, Devine A, Dhaliwal SS, Dick IM.** Effects of calcium supplementation on clinical fracture and bone structure: results of a 5-year, double-blind, placebo-controlled trial in elderly women. *Arch Intern Med* 2006; 166(8):869–875.
188. **Kerstetter JE, Mitnick ME, Gundberg CM, Caseira DM, Ellison AF, Carpenter TO, Insogna KL.** Changes in bone turnover in young women consuming different levels of dietary protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1052-1055.
189. **Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martinez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M, Martinez A.** Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 2004; 24(5):388–399.
190. **Hoang L, Byck S, Prevost L, Scriver CR.** PAH mutation analysis consortium data- base — a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus, *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:127–131.
191. **Woo SL, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJ.** Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983; 306:151–155.
192. **Kwok S, Ledley FD, Robson JH, Woo SLC.** Nucleotide sequence of a full-length DNA clone of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 1985; 24:556-561.
193. **Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RG, Kemp BE.** Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol* 1999; 6:442–448.
194. **Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC.** Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* 1998; 273:16962–16967.
195. **Erlandsen H, Stevens RC.** The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68:103–125.
196. **Konecki D, Lichter-Konecki U.** (2001) GenBank AF4044777.

197. **Scriver CR, Kaufman S.** Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8a Edición). Ed: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS. McGraw-Hil. Cambridge 2001; pp 1667-1724.
198. **Okano Y, Eisensmith RC, Güttler F, Lichter-Konecki U, DKonecki DS, Trefz FK, Dasovich M, Wang T, Henriksen K, Lou H, et al.** Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 1991; 324:1232-1238.
199. **Guldborg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzzone A, Rey J, Güttler F.** A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype- based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63:71–79.
200. **Zschocke J.** Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003; 21: 345–356.
201. **Desviat LR, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Marchante C, Bóveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernández A, Cabello ML, Ugarte M.** Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet*; 1999; 7:386-392.
202. **Kaufman S.** Phenylketonuria: Biochemical Mechanisms, in: B.W. Agranoff, M.H. Aprison (Eds.), *Advances in Neurochemistry*, Plenum Press, New York, 1976 pp. 1–132.
203. **Carrascosa A, Fernández JM, Fernández C, Fernández A, López-Siguero JP, Sánchez E, Sobradillo B, Yeste D.** Estudios españoles de crecimiento. Nuevos patrones antropométricos. *Endocrinol nutr* 2008; 55:484-506.
204. **Durban M, Harezlak J, Wand MP, Carroll RJ.** Simple fitting of subject-specific curves for longitudinal data. *Statist. Med.* 2004; 00:1–24.
205. **Folch J, Lees M, Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 26:497–509.

- 206.**Lepage G, Roy CC.** Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction, *J Lipid Res* 1986; 27: 114–120.
- 207.**Bull FC, Maslin TS, Armstrong T.** Global physical activity questionnaire (GPAQ): nine country reliability and validity study. *J Phys Act Health* 2009; 6:790–804.
- 208.**Zancheta JR, Plotkin H, Alvarez Filgueira ML.** Bone mass in children: normative values for the 2–20-year-old population. *Bone* 1995; 16: 393S–399S.
- 209.**Blau N, Muntau A.** 2002. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *EMG Workshop Results*. Milupa, Friedrichsdorf.
- 210.**WHO/FAO/UNU Expert Consultation.** Protein and amino acid requirements in human nutrition. *Joint World Health Organ Tech Rep Ser, World Health Organ Tech Rep Ser* 2007; 935: 1–265.
- 211.**Hoeksma M, Van Rijn M, Verkerk PH, Bosch AM, Mulder MF, de Klerk JB, de Koning TJ, Rubio-Gozalbo E, de Vries M, Sauer PJ, van Spronsen FJ.** The intake of total protein, natural protein and protein substitute and growth of height and head circumference in Dutch infants with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28:845-854
- 212.**Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, Andrade F, Blasco J, Alcalde C, Gil D, García MC, González-Lamuño D, Ruiz M, Peña-Quintana L, Ruiz MA, González D, Sánchez-Valverde F.** Anthropometric characteristics and nutrition in a cohort of PAH-deficient patients. *Clin Nutr* 2013; Sep 26. doi:pii: S0261-5614(13)00249-5. 10.1016/j.clnu.2013.09.011.
- 213.**Dhondt JL, Largillière C, Moreno L, Farriaux JP.** Physical growth in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1995;18:135-137.
- 214.**Büyükgebiz B, Eroglu Y, Büyükgebiz A.** True precocious puberty associated with phenylketonuria. *J Pediatr Endocrinol* 1994; 7(4):361-363
- 215.**Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, Farriaux JP.** Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26:1–11.

- 216.**Dewey GK, Beaton G, Fjeld C, Lönnerdal B, Reeds P.** Protein requirements of infants and children. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50 (S1): S119-150.
- 217.**Koura HM, Abdallah Ismail N, Kamel AF, Ahmed AM, Saad Hussein A, Effat LK.** A long-term study of bone mineral density in patients with phenylketonuria under diet therapy. *Arch Med Sci* 2011; 7: 493–500.
- 218.**de Groot MJ, Hoeksma M, van Rijn M, Slart RH, van Spronsen FJ.** Relationship between lumbar bone mineral density and biochemical parameters in phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 566–557.
- 219.**Mendes AB, Martins FF, Cruz WM, da Silva LE, Abadesso CB, Boaventura GT.** Bone development in children and adolescents with PKU. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 425–430.
- 220.**Barzel US.** The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid–base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1431–1436.
- 221.**Barzel US, Massey LK.** Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr* 1998; 128: 1051–1053.
- 222.**Bonjour JP.** Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 526S–536S.
- 223.**Fenton TR, Tough SC, Lyon AW, Eliasziw M, Hanley DA.** Causal assessment of dietary acid load and bone disease: a systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality. *Nutr J* 2011; 30: 10–41.
- 224.**Delmi M, Rapin CH, Bengoa JM, Delmas PD, Vasey, Bonjour JP.** Dietary supplementation in elderly patients with fractured neck of the femur. *Lancet* 1990; 335:1013–1016.
- 225.**Teegarden D, Lyle RM, McGabe GP, McGabe LD, Proulx WR, Michon K, Knight AP, Johnston CC, Weaver CM.** Dietary calcium, protein and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 749–758.
- 226.**Hannam MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP.** Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the

- Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2504–2512.
227. **Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Wada M, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Hirayama S, Milda T, Fujimoto H, Mochizuki H, Hattori T, Okano Y.** Cross-sectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening, *J Bone Miner Metab* 2011; 29: 737–743.
228. **Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, Burckhardt P, Cooper C, Christiansen C, Cummings S, Eisman JA, Fujiwara S, Glüer C, Goltzman D, Hans D, Krieg MA, La Croix A, McCloskey E, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Sanders K, Schott AM, Silman A, Torgerson D, van Staa T, Watts NB, Yoshimura N.** The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007; 18: 1033–1046.
229. **Sievanem H, Kannus P.** Physical activity reduces the risk of fragility fracture. *PLoS Med* 2007; 4: e222.
230. **Hillman L, Schlotzhauer C, Lee D, Grasela J, Witter S, Allen S, Hillman R.** Decreased bone mineralization in children with phenylketonuria under treatment. *Eur J Paediatr* 1996; 155 Suppl 1:148–152.
231. **Millet P, Vilaseca MA, Valls C, Pérez Dueñas B, Artuch R, Gómez L, Lambruschini N, Campistol J.** Is deoxypyridinoline a good resorption marker to detect osteopenia in phenylketonuria? *Clin Biochem* 2005;38: 1127-1132
232. **Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Chelchowska M, Oltarzewski M, Laskowska-Klita T, Nowacka M, Milanowski A.** Concentration of osteoprotegerin, bone formation and resorption markers in patients with phenylketonuria. *Pol Merkur Lekarski* 2008; 25:57-60.
233. **Guldborg P, Levy HL, Hanley WB, Koch R, Matalon R, Rouse BM, Trefz F, de la Cruz F, Henriksen KF, Güttler F.** Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 84–94.

234. **Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY.** Phenylketonuria mutations in Northern China. *Mol Genet Metab* 2005; 86: S107–S118.
235. **Daniele A, Cardillo G, Pennino C, Carbone MT, Scognamiglio D, Correra A, Pignero A, Castaldo G, Salvatore.** Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet* 2007; 71: 185–193.
236. **Rivera, I, Mendes D, Afonso Â, Barroso M, Ramos R, Janeiro P, Oliveira A, gaspar A, Tavares de Almedida I.** Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab* 2011; 104: S86–S92.
237. **Guldborg, P, Levy HL, Koch R, Berlin CM Jr, Francois B, Henriksen KF, Güttler F.** Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency: inheritance and expression of the hyperphenylalaninemia. *J Inherit Metab Dis* 1994; 17: 645–651.
238. **Sterl E, Paul K, Paschke E, Zschocke J, Bruner-Krainz M, Windisch E, Möslinger D, Karall D, Scholl-Bürgi S, Sperl W, Lagler F, Plecko B.** Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 7–13.
239. **Guldborg P, Romano V, Ceratto M, Bosco P, Ciuna M, Indelicato A, Mollica F, Meli C, Giovannini M, Riva E, et al.** Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1703–1707.
240. **Ozgüç M, Ozalp I, Coşkun T, Yilmaz E, Erdem H, Ayter S.** Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J Med Genet* 1993; 30: 129–130.
241. **Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kalogerakou M, Soulpi K, Missiou-Tsangaraki S, Kattamis C.** Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Hum Genet* 1994; 94: 573–575.
242. **Groselj U, Tansek MZ, Kovac J, Hovnik T, Podkrajsek KT, Battelino T.**

- Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 142–148.
243. **Zare-Karizi S.H, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, Seifati SM, Shahsavan-Behboodi B, Akbari MT, Koochmeshgi J.** Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. *Mol Genet Metab* 2011; 102: 29–32.
244. **Santos, Fonseca CG, Starling AL, Januário JN, Aguiar MJ, Peixoto MG, Carvalho MR.** Variations in genotype–phenotype correlations in phenylketonuria patients. *Genet Mol Res* 2010; 9: 1–8.
245. **Leandro J, Nascimento C, de Almeida IT, Leandro P.** Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 544–550.
246. **Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, Milà M.** Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype–phenotype correlation. *Hum Genet* 1999; 105: 468–473.
247. **Daniele, A, Scala I, Cardillo G, Pennino C, Ungaro C, Sibilio M, Parenti G, Esposito L, Zagari A, Andria G, Salvatore F.** Functional and structural characterization of novel mutations and genotype–phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. *FEBS J.* 2009; 276: 2048–2059.
248. **Zurflüh, MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B, Blau N.** Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29: 167–175.

9. PUBLICACIONES

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

1. **Mirás A, Bóveda MD, Leis MR, Mera A, Aldámiz-Echevarría L, Fernández-Lorenzo JR, Fraga JM, Couce ML.** Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab* 2013; 108:149-54.
2. **Couce ML, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A, Mirás A, Pérez B, Desviat MR, Fraga JR.** Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene* 2013; 521:100-4.
3. **Mirás A, Freire A, Rodríguez J, Leis R, Aldámiz-Echevarría L, Couce ML.** Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral ósea en los pacientes fenilcetonúricos. *Med Clin* 2013. Aceptado para publicación.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients

Alicia Mirás^a, M. Dolores Bóveda^b, María R. Leis^c, Antonio Mera^d, Luís Aldámiz-Echevarría^e, José R. Fernández-Lorenzo^f, José M. Fraga^a, María L. Couce^{a,*}

^a Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

^b Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Metabolic Laboratory, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

^c Unit of Nutrition and Metabolism, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

^d Rheumatology Service, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

^e Unit of Metabolism, Department of Pediatrics, Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, 48903, Barakaldo, Vizcaya, Spain

^f Pediatric Service, Hospital Xeral Cies, C/Pizarro 2, 36204 Vigo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form 30 December 2012

Accepted 30 December 2012

Available online xxxx

Keywords:

Phenylketonuria

Osteopenia

Tetrahydrobiopterin

Densitometry

Nutrition

Bone mineralization

ABSTRACT

There is a compromised bone mass in phenylketonuria patients compared with normal population, but the mechanisms responsible are still a matter of investigation. In addition, tetrahydrobiopterin therapy is a new option for a significant proportion of these patients and the prevalence of mineral bone disease (MBD) in these patients is unknown.

We conducted a cross-sectional observational study including 43 phenylketonuric patients. Bone densitometry, nutritional assessment, physical activity questionnaire, biochemical parameters, and molecular study were performed in all patients. Patients were stratified by phenotype, age and type of treatment.

The MBD prevalence in phenylketonuria was 14%. Osteopenic and osteoporotic ($n = 6$ patients) had an average daily natural protein intake significantly lower than the remaining ($n = 37$) patients with PKU (14.33 ± 8.95 g vs 21.25 ± 20.85 g). Besides, a lower body mass index was found. There were no statistical differences in physical activity level, calcium, phosphorus and fat intake, and in phenylalanine, vitamin D, parathormone, docosa-hexaenoic and eicosapentaenoic acid blood levels. Mutational spectrum was found in up to 30 different PAH genotypes and no relationship was established among genotype and development of MBD. None of the twelve phenylketonuric patients treated with tetrahydrobiopterin (27.9%), for an average of 7.1 years, developed MBD. Natural protein intake and blood levels of eicosapentaenoic acid were significantly higher while calcium intake was lower in these patients.

This study shows that the decrease in natural protein intake can play an important role in MBD development in phenylketonuric patients. Therapy with tetrahydrobiopterin allows a more relaxed protein diet, which is associated with better bone mass.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU, OMIM 261600) is an autosomal recessive inborn error of metabolism due to mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene (NM_000277); this enzyme deficiency leads to elevated levels of phenylalanine (Phe) in the blood and in other

tissues including the brain, as well as to corresponding neurotoxic effects. The treatment of PAH deficiency is based on the dietary restriction of phenylalanine and therefore, natural proteins. Synthetic protein supplementation with special formula is needed to prevent malnutrition. In those patients who respond positively to BH4, administration of the cofactor increases the residual enzymatic activity, allowing liberalization of the diet [1–4].

PKU is usually detected by newborn screening, enabling an early diagnosis and treatment, thus preventing the development of profound and irreversible neurological sequelae. The prevention of mental retardation and other complications typical of the disease highlights less-known aspects of it, which determine the quality of life, including mineral bone disease (MBD) [5–8].

MBD is characterized by reduced bone strength, leading to an increased risk of fracture. Bone strength depends on the density and quality of bone. Bone mineral density (BMD) is determined from the peak

Abbreviations: BH4, 6R-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; BMI, body mass index; DEXA, bone densitometry; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; MBD, mineral bone disease; PHE, phenylalanine; PTH, parathyroid hormone; PKU, phenylketonuria; WHO, World Health Organization.

* Corresponding author.

E-mail addresses: amirvei@hotmail.com (A. Mirás), maria.boveda.fontan@sergas.es (M.D. Bóveda), mariarosa.leis@usc.es (M.R. Leis), Antonio.Mera.Varela@sergas.es (A. Mera), luisjose.aldamiz-echevarazuara@osakidetza.net (L. Aldámiz-Echevarría), jose.ramon.fernandez.lorenzo@sergas.es (J.R. Fernández-Lorenzo), pdneonat@usc.es (J.M. Fraga), maria.luz.couce.pico@sergas.es (M.L. Couce).

1096-7192/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.12.008>

Please cite this article as: A. Mirás, et al., Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients, Mol. Genet. Metab. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.12.008>

bone mass and the amount of bone loss. Bone quality, however, refers to the macro- and micro-architecture, bone turnover, size, accumulated damage (e.g., microfractures) and mineralization [9]. MBD is asymptomatic until a fracture occurs.

The pathophysiology of MBD is characterized by two factors; on one hand, the decrease in bone mass in 80% of the cases is genetically determined, and the remaining 20% is due to external factors such as sedentary lifestyle or low calcium diet [10,11]. The other factor is the deterioration of bone microarchitecture, which occurs when bone resorption exceeds formation. In some PKU patients there is an increase in circulating osteoclast precursors [12], which increases bone resorption and favors the development of MBD.

The current incidence and etiology of MBD in PKU patients is unknown. Several theories have been proposed, such as dietary deficiencies due to the protein restriction implicit in treating the disease, irregular diet compliance, which causes fluctuating blood Phe levels [6], sedentary and genetic factors linked to the disease itself that can determine changes in bone remodeling [7,8].

The definition–classification of osteoporosis by the World Health Organization (WHO) is used to identify patients who develop this complication. This definition is based on the measurement of BMD by bone densitometry (DEXA).

The aim of our study was to determine the incidence of MBD in a group of patients with PKU and to analyze potential risk factors involved in its appearance.

2. Subjects and methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario de Santiago. All patients or their parents (children under 16 years) were properly informed and signed an informed consent to enter the study.

2.1. Study design

A cross-sectional observational study was conducted from October 2010 to December 2011. We included all patients over 7 years old, diagnosed with PKU, followed-up in our reference center for congenital metabolic diseases, in Galicia, north-west Spain. We included both patients diagnosed by newborn screening as well as those diagnosed later. Those with benign hyperphenylalaninemia (Phe <360 $\mu\text{mol/L}$) were excluded, as well as those cases in which informed consent was not signed by parents and/or patients.

2.2. Data collection

The variables collected from each patient were: age, sex, anthropometric data, nutritional survey by collecting intake for a week, survey on physical activity, levels of Phe at diagnosis, phenotype (mild hyper-Phe 120–600 $\mu\text{mol/L}$; mild PKU 600–900 $\mu\text{mol/L}$; moderate PKU 900–1200 $\mu\text{mol/L}$; classic >1200 $\mu\text{mol/L}$), blood chemistry (Phe, renal and liver function, electrolytes, levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), 25-hydroxy vitamin D (25(OH)D), 1–25 hydroxy vitamin D (1-25(OH)2D), parathyroid hormone (PTH), and bone mineral density. All biochemical measurements were obtained from fasting morning plasma samples.

2.3. Methods

Tandem mass-spectrometry was used for measuring the Phe levels from dried blood spots. Proteins, urea, creatinine, transaminases, calcium, phosphate, magnesium and total alkaline phosphatase were determined by standard procedures with the Advia 2400 Analyser (Siemens Diagnostic Systems, Germany). PTH, 25 (OH) D and 1–25 (OH) 2D were determined by a fully automated electrochemiluminescence system (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Plasma lipids were

extracted from the blood according to the method developed by Folch et al. [13]. Phospholipids were subsequently isolated by thin-layer chromatography (TLC Silica gel 60, 20×20 cm, Merck, Spain). First, a mixture of heptane, diisopropyl ether, and acetic acid (7/3/0.2 v/v) was employed as the eluent and then heptane as the second eluent. After being removed from the silica matrix, the phospholipids were transmethyated according to Lepage and Roy [14] using tridecanoic acid as the internal standard. The fatty acid methyl esters were separated on a Hewlett Packard GC 5890 gas chromatograph using a flame-ionization detector on a capillary column SP 2330 (30 m×0.25 mm, 0.20 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), with hydrogen as the carrier gas. The results were expressed as mg fatty acid/g total fatty acids in PLs.

The calculation of the nutritional diet was assessed, by survey of the intake by a week through self-designed software: www.odimet.es.

Regular physical activity of each patient was assessed according to the results obtained after completing the GPAQ (Global Physical Activity Questionnaire), and classified into three levels: low (if score <6), intermediate (score 6–10), and high (score >10) [15].

BMD was measured by bone densitometry of lumbar spine (L2, L3 and L4) and proximal femur by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA LUNAR DPX, General Electric). For the adult population, using the normal database Hologic NHANES III, the presence of MBD was defined following the WHO criteria using the t-score: number of standard deviations compared to a reference normal young population; a t-score <−2.5 was interpreted as osteoporosis, and a t-score between −2.5 and −1 as osteopenia. The z-score, comparing BMD with a population of similar age and sex, was used in children under 20 years, using the data published by Zanchetta et al. [16], as reference values.

2.4. Statistical analysis

We used the statistical program SPSS®, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). The descriptive analysis results are expressed both in absolute units and as percentages. When appropriate, data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. A $p < 0.05$ was considered significant. Comparison of qualitative and quantitative discrete variables was performed using Chi-square and Fisher exact test was determined by the adjustment of variables to normal. Comparison of the means of quantitative variables was done using the Student-t test if they followed normal distribution, and using the Mann–Whitney U test if not.

3. Results

A total of 43 PKU patients were included (41.9% male, mean age 17.6 years, range: 7.1–41 years), of whom 28 (65.1%) were under 20 years. Almost two-thirds of the patients (27, 62.8%) were diagnosed with classical PKU, 9 (20.9%) with moderate PKU, and 7 (16.3%) with mild PKU. Fourteen patients were diagnosed late by clinical symptoms (32.6%). Twelve patients (28%) were treated with BH4, of which one was with classic PKU, 6 were with mild PKU and 5 with moderate PKU.

MBD was detected, according to the BMD, in 6 patients (14%), 3 females and 3 males, with a mean age of 24.17 ± 14.55 years (range 7–41 years). Two of them were diagnosed with moderate PKU, the rest with classical PKU. Of these, 4 had osteopenia and 2 had osteoporosis (Table 1). The PKU was diagnosed late more often in the patient group with MBD (66.7% vs 27%, $p = 0.077$).

Mutational spectrum was found in up to 30 different genotypes, showing great genetic heterogeneity, most of them falling on the category of missense types. There is no relation between the genetic study and the development or not of MBD in the patients (data not shown of all mutations). There are mutations with a null or very low PAH activity in vitro in both groups.

No family history consists of osteopenia/osteoporosis in any patient with BMD.

Table 1

Main features of PKU patients who developed mineral bone disease (MBD).

Patient	Age	Sex	MBD	Phenotype	Genotype	Time at diagnosis	Physical activity	BMI (kg/m ²)	DEXA (L2–L4 BMD)	DEXA (femur neck)
13	30	M	Osteoporosis	Moderate	p.E280K/p.V388M	6.2 years	High	24.1	0.85 (T<−2.5)	0.71 (T<−2.5)
16	26	F	Osteoporosis	Classical	p.R261Q/IVS10-ntG>A	<1 month	Low	19.2	0.8 (T<−2.5)	0.6 (T<−2.5)
30	8	M	Osteopenia	Classical	IVS10-ntG>A/p.R243Q	<1 month	Intermediate	15.0	0.4 (Z<−2)	0.47 (Z>−2)
33	41	M	Osteopenia	Classical	p.165T/p.R243X	29 years	Intermediate	–	1.05 (T−1 y −2.5)	0.79 (T: −1 y −2.5)
36	10	F	Osteopenia	Classical	p.R158Q/p. L48S	<1 month	High	15.3	0.52 (Z: <−2)	0.6 (Z<−2)
42	31	F	Osteopenia	Moderate	p.E280K/IVS10ntG>A	3.3 years	Intermediate	22.2	0.836 (T: −1 y −2.5)	0.71 (T: −1 y −2.5)

BMI: body mass index; BMD: bone mineral density; T: t-score; Z: z-score

3.1. Nutritional survey

We found a lower intake of total protein in the group of patients with osteopenia (39 ± 13.63 g/day vs 59.21 ± 19.71 g/day, $p < 0.05$). This difference in total protein intake was not found in the two patients with osteoporosis. Osteopenic and osteoporotic patients had a lower average daily natural protein intake than the remaining patients with PKU (14.33 ± 8.95 g vs. 21.25 ± 20.85 g, $p < 0.05$).

Table 2 summarizes the nutritional characteristics of the group of patients who developed MBD [17]. Two patients (patients 16 and 33) did not have adequate dietary compliance, with a higher daily intake of Phe than recommended, and had high levels of Phe. The calcium and phosphorus intake in one patient (patient 42) was lower than recommended.

3.2. Other variables studied

Table 3 shows clinical, physical activity, nutritional and biochemical data among PKU patients with and without mineral bone disease. There were no statistical differences in weekly physical activity, dietary intake of calcium, phosphorus and fat, and in blood levels of DHA and EPA in patients with MBD compared with patients who did not develop this complication.

We found that BMI was lower in patients with MBD, both in the ≤ 20 years group (15.15 ± 0.21 kg/m² vs 19.5 ± 3.18 kg/m², $p < 0.05$) and in the older ones (22 ± 2.04 kg/m² vs 26.6 ± 5.2 kg/m², $p < 0.05$) (Table 3).

3.3. Treatment with BH4

Patients were treated with BH4 (Table 4), for an average of 7 years and 1 month, and none developed MBD ($P < 0.05$). The mean age of the patients when the study was done is 14 years 5 months, being three of them (25%) older than 20 years. PKU patients who respond to BH4 tolerate higher amounts of proteins, though in this group, natural protein intake was higher (33.62 ± 28.42 g vs. 12.73 ± 6.22 g/day, $p < 0.05$). Blood levels of EPA were significantly higher in this patient group (718.4 ± 371.1 vs. 461.3 ± 235 mg/100 g total fatty acids, $p < 0.05$) and calcium intake was lower (834.07 ± 345.41 vs 1197.17 ± 453.95 mg/day, $p < 0.05$).

4. Discussion

This study analyzes a heterogeneous sample of PKU patients, with wide age range, phenotype (classic PKU, moderate and mild), disease detection (early and late diagnosis), and treatment (restrictive protein diet vs. liberalized diet in patients treated with BH4), which allow conclusions to be drawn on potential risk factors that determine the appearance of MBD. Besides data such as a nutritional survey and blood levels of Phe, Ca and P, we also included other variables in the analysis not classically undertaken in the literature, such as the PUFA levels and other important factors for BMD as the regular physical activity of each patient.

The prevalence of MBD found in our study is 14%, which is lower than that reported in the literature. Perez-Dueñas et al. [5] found a

Table 2

Nutritional characteristics of MBD patients.

Patient number (age)	kcal/day	Total proteins (g/kg day)	Natural proteins (g/kg day)	Ca intake mg/day (N: 800 mg/day)	P Intake mg/day (N: 800 mg/day)	Phe(b) medium (range)
13 (30 years)	2927 (2000–3300)	1.5 (0.84)	0.19	1489	1537	475(394–537) (<600 μmol/L)
16 (26 years)	1506 (1400–2500)	1.4 (0.84)	0.31	1271	1405	688(428–900)* (<600 μmol/L)
30 (8 years)	1408 (1300–2300)	2.8 (0.87)	0.73	1179	1227	148.0 (72–405) (<360 μmol/L)
33 (41 years)	2479 (2000–3300)	0.52 (0.84)	0.46	1008	1179	762(602–1018)* (<600 μmol/L)
36 (10 years)	2000 (1650–3300)	1.8 (0.92)	0.26	984	1104	518 (430–605) (<600 μmol/L)
42 (31 years)	1363 (2000–3300)	0.38 (0.84)	0.19	414*	493*	459.0 (<600 μmol/L)

In parentheses: recommended daily allowances for age. Total proteins/kg: values in parentheses are the WHO safe level recommendations for the typical population¹⁷.

N: normal; b: blood; *: values outside of recommended range.

Table 3

Comparison of epidemiological, clinical, physical activity, nutritional and biochemical data between PKU patients with and without mineral bone disease (MBD).

	PKU without MBD	PKU with MBD
Mean age	16.46 ± 10.29	24.17 ± 14.55
Age	26 (92%)	2 (7.1%)
≤20 years	11 (73.3%)	4 (26.7%)
>20 years		
Gender (M/F)	15/22	3/3
Phenotype	23 (62.2%)	4 (66.7%)
Classical	14 (37.8%)	2 (33.3%)
Mild/moderate		
Late diagnosis	10 (27%)	4 (66.7%)
BH4 Treatment*	14 (32.6%)	0 (0%)
Physical activity	4 (10.8%)	0 (0%)
Low	11 (29.7%)	3 (50%)
Intermediate	17 (45.9%)	2 (33.3%)
High		
BMI (kg/m ²)	19.5 ± 3.18	15.15 ± 0.21
≤20 years*	26.6 ± 5.2	22 ± 2.04
>20 years*		
Natural protein intake (g/day)	21.25 ± 20.85	14.33 ± 8.95
Calcium intake (mg/day)	1016.56 ± 301.29	1307.50 ± 876.12
Phosphorus intake (mg/day)	1180.62 ± 263.4	1407.50 ± 856.56
% Fat intake	31.91 ± 3.72	31 ± 5.86
Current levels of Phe (μmol/L)	459.32 ± 338.28	505.33 ± 237.52
DHA levels (mg/100 g total fatty acids)	2786 ± 1463	3026 ± 536
EPA levels (mg/100 g total fatty acids)	553.6 ± 312.65	429.83 ± 195.49
1-25OH vit D levels (pg/mL)	61.34 ± 22.55	55.25 ± 12.36
25 OH Vit D levels (ng/mL)	28.1 ± 10.34	37.25 ± 7.6
PTH levels (pg/mL)	31.3 ± 9.4	36.0 ± 16.14

BMI: body mass index.

* Significant difference between two groups (p<0.05)

higher prevalence (50%), when they studied 28 patients between 10 and 33 years and measured BMD at the lumbar level. Modan-Moses et al. [18] found a high prevalence (42%), including 31 patients, all of them adults with classic PKU, and took into account the total BMD, besides lumbar and femoral for measurement of BMD. Koura et al. [19] found an incidence of 31.25% when analyzing 32 patients with classical PKU aged 3–19 years, and determining lumbar and femoral neck BMD. Groot et al. [20] published an incidence of 19%, with a sample of 53 patients with a wider age range than previous series (2–35 years), including mild, moderate and classical PKU, defining BMD by lumbar DEXA. Mendes et al. [21] found a similar incidence (15.4%) after studying 13 patients aged 8–16 years old, all with classical PKU, using lumbar DEXA. Therefore, there is a wide variation in terms of the patients included regarding age range, phenotype, and different references for BMD (since not all the groups performed the measurement at the same site). The proportion of mild, moderate or classical PKU with different Phe (and therefore

protein) tolerance might explain these different series found in the literature.

In our study, patients with osteopenia or osteoporosis had a lower intake of natural proteins. There are various studies that also relate protein intake with BMD. Some authors claim that eating high amounts of animal protein promotes urinary calcium loss by acting as a buffer for this ion, producing a metabolic acidosis by the protein metabolism [22,23]; but this theory has not been accepted [24,25]. In fact, several studies have found a positive relationship between protein intake and BMD [26,27]; specifically in the Framingham Osteoporosis Study [28]. This study, including a large cohort of elderly men and women followed up for four years, shows that the increase in protein intake is protective against spinal bone loss. This could be postulated to be due to the fact that when protein intake increases IGF-1 is released and this increases bone mass by promoting osteoblastic activity.

BH4 treatment was started in Galicia in 2004, and there are no studies to date that reflect the impact of such treatment on bone metabolism in patients with PKU. Therefore, a novel point of this study was to analyze the presence of MBD in patients treated with BH4, that is to say, in patients who tolerate larger amounts of Phe and so higher natural protein intake. No cases of MBD were found among these patients, which is in favor of a positive relationship between protein intake and BMD. Increasing the intake of natural proteins also improves the supply of micronutrients, which Lambruschini et al. [3] showed that it promotes the growth in children with PKU, and for that reason probably also improves BMD. Blood levels of EPA and DHA were higher in the group of patients treated with BH4, and this difference was significant in the case of EPA. This difference may be due to increased intake of natural proteins of this group of patients but this difference could also be due to lower oxidative stress, as EPA decreases when there is an inflammation. Lage et al. [29] found an association between lower plasma fatty acid profile and the development of BMD; therefore, although we could not find such result, the fact that the EPA and DHA levels are higher in the group of patients treated with BH4 favors that such fatty acids may have played some role in BMD, as none of them developed MBD.

Interestingly, in our study, there were no differences in calcium intake between patients who developed MBD and those who did not develop it, with the intake of calcium being even higher, although not significantly, in the group of patients with BMD. In this sense, some studies [23,25,28] show that, despite an adequate intake of calcium and vitamin D, if there is a deficit in protein intake, there is an alteration in bone mass. Another argument supporting this theory is the fact that in the group of patients treated with BH4, in which none developed MBD, calcium intake was significantly lower than in patients without BH4. That is, patients who have a diet restricted in natural proteins despite receiving Phe-free formula supplemented with calcium, and reach normal levels of blood calcium, are more likely to develop BMD.

Table 4

Patients treated with BH4.

Patients	Phenotype	Genotype	Age at study	BH4 mean dose (mg/kg/day)	Treatment BH4 duration	Phe tolerance post-BH4 (mg/kg/day)	EPA levels (mg/100g total fatty acids)	DHA levels (mg/100g total fatty acids)	Ca Intake mg/day	P Intake mg/day
2	Mild	p.R243Q/p.E390G	14 y	8.9	5 y10 m	Controlled free diet	1554	5246	1438	1086
7	Moderate	p.P244L/p.R261Q	20 y1 m	9.3	7 y11 m	750	627,8	2718,6	963	1213
10	Mild	p.P211T/IVS10-11G>A	8 y4 m	10	8 y3 m	Controlled free diet	453	1522	699	851
14	Classic	p.165T/p.R243X	12 y	12.5	3 y6 m	513	649	4267	1038	1190
17	Moderate	p.R158Q/p.L48S	15 y10 m	9.5	7 y2 m	739	682,1	3258	1138	1321
22	Mild	p.R176L/ND	12 y6 m	9.4	8 y3 m	Controlled free diet	1231	7753	108	488
26	Mild	p.S303A/p.G46S	14 y1 m	10	8 y3 m	Controlled free diet	512	1908	877	831
27	Mild	p.S303A/p.G46S	18 y	10	8 y3 m	Controlled free diet	583	2142	1007	1052
39	Moderate	p.Y277D/p.L48S	7 y	11.6	7 y	830	628	2719	799	851
40	Moderate	p.Y277D/p.L48S	7 y	10	7 y	Controlled free diet	380	1801	799	851
41	Moderate	p.Q304Q/p.R176L	23 y3 m	9.7	7 y	Controlled free diet	803	3862	619	982
43	Mild	p.C203Y/p.A300S	22 y	9.1	8 y	Controlled free diet	ND	ND	872	1117

y: year; m: month; ND: not determined.

Nagasaka et al. [30], in a recent study of adult patients with classical PKU, diagnosed by neonatal screening, found that these patients have had lower blood levels of 25(OH)D and higher levels of 1-25(OH)2D when compared with healthy age-matched controls, which they attributed to a compensatory increase in PTH activity. We analyzed 25(OH)D, 1-25(OH)2D, and PTH levels in PKU patients and found no statistical differences between those who developed MBD and those who did not.

Low BMI is included in the WHO model to predict risk of fracture (FRAX) [31], which combines clinical data in addition to BMD to predict fracture risk. We found that patients who developed MBD had a lower BMI (≤ 20 years: 15.15 ± 0.21 vs. 19.5 ± 3.18 ; > 20 years: 22 ± 2.04 vs. 26.6 ± 5.2 ; $p < 0.05$), both in childhood and in adulthood.

As in previous studies [5,18], there were no differences in the blood levels of Phe between PKU patients who developed MBD and those who did not. Thus, the lack of diet compliance does not appear to be related to MBD.

Although physical inactivity is mentioned in a few guides as a risk factor for development of MBD, it has been shown that physical exercise reduces the risk of fractures by improving bone mass [32]. In our study, in which patients were given a physical activity questionnaire, we could not demonstrate that lack of physical activity was related to the development of MBD in PKU patients.

There are probably genetic factors linked to the disease itself that play an important role in the development of osteopenia/osteoporosis in these patients, to determine changes in bone remodeling. This point may be reinforced by the strong genetic component known to underlie the development of osteoporosis [33,34]. In our study, we recorded the genotype of each patient, being unable to identify any that was more frequent in the group of patients who developed MBD.

In conclusion, the prevalence of PKU patients with MBD is higher than in the healthy population, although its pathogenesis remains unknown and thus, the risk factors determining this, in addition to the protein restriction implicit in the treatment of the disease, are as yet unknown genetic factors that influence bone metabolism. Therapy with tetrahydrobiopterin could act as a protective factor against the development of MBD, by allowing a more relaxed protein diet and/or by reducing oxidative stress. Further research is needed to explore how BH4 therapy influences bone metabolism of phenylketonuric patients.

Conflict of interest statement

None of the authors have any conflicts of interest to declare.

Contributors

M.L.C., J.R.F. and J.M.F. reviewed the literature and conceived the study. A.Mi. was involved in patient selection, monitoring and data collection. L.A., M.R.L., M.D.B. and A.Me. interpreted the results, drafted the manuscript and were involved in the statistical analysis. A.Mi., M.L.C. and M.D.B. reviewed and edited the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the final version.

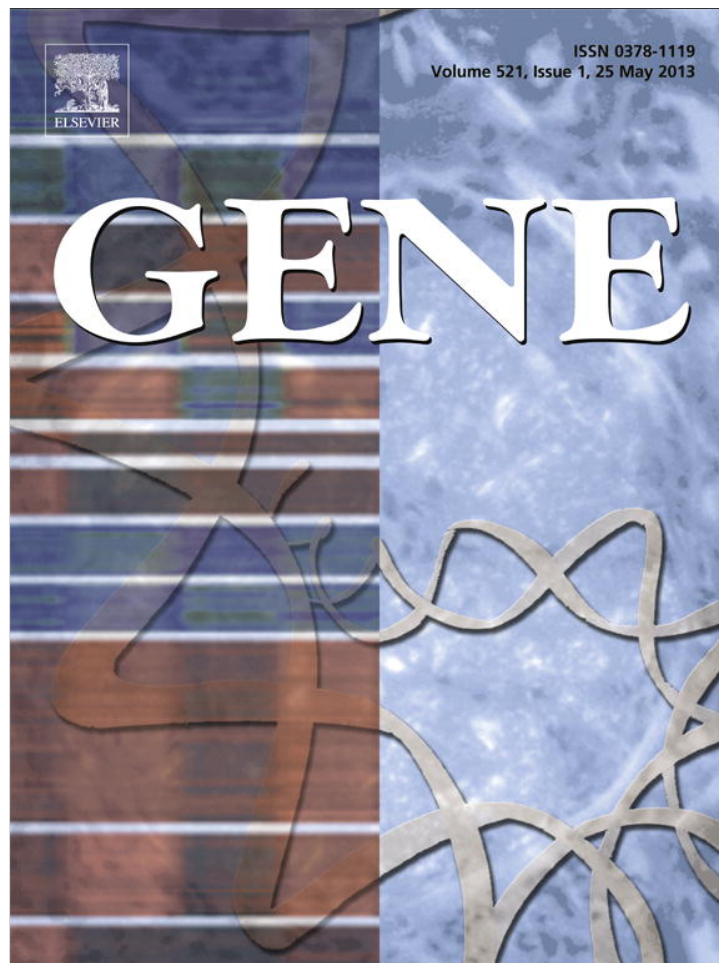
Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Nenad Blau for the help in scientific discussions. We thank all patients and their families for kindly participating in the study. The research has not received external funding from any public or private institutions.

References

- [1] F.K. Trefz, B.K. Burton, N. Longo, M.M. Casanova, D.J. Gruskin, A. Dorenbaum, E.D. Kakakis, E.A. Crombez, D.K. Grange, P. Harmatz, M.H. Lipson, A. Milanowski, L.M. Randolph, J. Vockley, C.B. Whitley, J.A. Wolff, J. Bechuk, H. Christ-Schmidt, J.B. Hennermann, Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study, *J. Pediatr.* 154 (2009) 700–707.
- [2] K. Dokoupil, H. Gokmen-Ozel, A.M. Lammardo, K. Motzfeldt, M. Robert, J.C. Rocha, M. van Rijn, K. Ahring, A. Bélanger-Quintana, A. MacDonald, Optimising growth in phenylketonuria: current state of the clinical evidence base, *Clin. Nutr.* 31 (2012) 16–21.
- [3] N. Lambruschini, B. Pérez-Dueñas, M.A. Vilaseca, A. Mas, R. Artuch, R. Gassió, L. Gómez, A. Gutiérrez, J. Campistol, Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy, *Mol. Genet. Metab.* 86 (Suppl.) (2005) S54–S60.
- [4] M.D. Bóveda, M.L. Couce, D.E. Castiñeiras, J.A. Cocho, B. Perez, M. Ugarte, J.M. Fraga, The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment, *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2007) 812.
- [5] B. Pérez Dueñas, F.J. Cambra, M.A. Vilaseca, N. Lambruschini, J. Campistol, J.A. Camacho, New approach to osteopenia in phenylketonuric patients, *Acta Paediatr.* 91 (2002) 899–904.
- [6] P. Barat, N. Barthe, I. Redonnet-Vernhet, F. Parrot, The impact of the control of serum phenylalanine levels on osteopenia in patients with phenylketonuria, *Eur. J. Pediatr.* 161 (2002) 687–688.
- [7] B. Schwahn, E. Mokov, K. Scheidhauer, B. Lettgen, E. Schöna, Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography, *Acta Paediatr.* 87 (1998) 61–63.
- [8] S. Yannicelli, D.M. Medeiros, Elevated plasma phenylalanine concentrations may adversely affect bone status of phenylketonuric mice, *J. Inher. Metab. Dis.* 25 (2002) 347–361.
- [9] NIH Consensus Development Panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy, *JAMA* 285 (2001) 785–795.
- [10] J.M. Zmuda, Y.T. Sheu, S.P. Moffett, Genetic epidemiology of osteoporosis: past, present and future, *Curr. Osteoporos. Rep.* 3 (2005) 111–115.
- [11] F.C. Bull, T.S. Maslin, T. Armstrong, Global physical activity questionnaire (GPAQ): nine country reliability and validity study, *J. Phys. Act. Health* 6 (2009) 790–804.
- [12] Y.Z. Liu, Y.J. Liu, R.R. Recker, H.W. Deng, Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update, *J. Endocrinol.* 177 (2003) 147–196.
- [13] J. Folch, M. Lees, G.H. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 26 (1957) 497–509.
- [14] G. Lepage, C.C. Roy, Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction, *J. Lipid Res.* 27 (1986) 114–120.
- [15] I. Roato, F. Porta, A. Mussa, L. D'Amico, L. Fiore, D. Garelli, M. Spada, R. Ferracini, Bone impairment in phenylketonuria is characterized by circulating osteoclast precursors and activated T cell increase, *PLoS One* 5 (2010) e14167.
- [16] J.R. Zancheta, H. Plotkin, M.L. Alvarez Filgueira, Bone mass in children: normative values for the 2–20-year-old population, *Bone* 16 (1995) 393S–399S.
- [17] WHO/FAO/UNU Expert Consultation, Protein and amino acid requirements in human nutrition. Joint World Health Organ Tech Rep Ser, World Health Organ. Tech. Rep. Ser., 935, 2007, pp. 1–265.
- [18] D. Modan-Moses, I. Vered, G. Schwartz, Y. Anikster, S. Abraham, R. Segev, O. Efrati, Peak bone mass in patients with phenylketonuria, *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2007) 202–208.
- [19] H.M. Koura, N. Abdallah Ismail, A.F. Kamel, A.M. Ahmed, A. Saad Hussein, L.K. Effat, A long-term study of bone mineral density in patients with phenylketonuria under diet therapy, *Arch. Med. Sci.* 7 (2011) 493–500.
- [20] M.J. de Groot, M. Hoesksma, M. van Rijn, R.H. Slart, F.J. van Spronsen, Relationship between lumbar bone mineral density and biochemical parameters in phenylketonuria patients, *Mol. Genet. Metab.* 105 (2012) 566–570.
- [21] A.B. Mendes, F.F. Martins, W.M. Cruz, L.E. da Silva, C.B. Abadesso, G.T. Boaventura, Bone development in children and adolescents with PKU, *J. Inher. Metab. Dis.* 35 (2012) 425–430.
- [22] U.S. Barzel, The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid–base imbalance in the genesis of osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.* 10 (1995) 1431–1436.
- [23] U.S. Barzel, L.K. Massey, Excess dietary protein can adversely affect bone, *J. Nutr.* 128 (1998) 1051–1053.
- [24] J.P. Bonjour, Dietary protein: an essential nutrient for bone health, *J. Am. Coll. Nutr.* 24 (2005) S26S–S36S.
- [25] T.R. Fenton, S.C. Tough, A.W. Lyon, M. Eliasziw, D.A. Hanley, Causal assessment of dietary acid load and bone disease: a systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality, *Nutr. J.* 30 (2011) 10–41.
- [26] M. Delmi, C.-H. Rapin, J.-M. Bengoa, P.D. Delmas, Vasey, J.-P. Bonjour, Dietary supplementation in elderly patients with fractured neck of the femur, *Lancet* 335 (1990) 1013–1016.
- [27] D. Teegarden, R.M. Lyle, G.P. McGabe, L.D. McGabe, W.R. Proulx, K. Michon, A.P. Knight, C.C. Johnston, C.M. Weaver, Dietary calcium, protein and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women, *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 749–758.
- [28] M.T. Hannam, K.L. Tucker, B. Dawson-Hughes, L.A. Cupples, D.T. Felson, D.P. Kiel, Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study, *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 2504–2512.
- [29] S. Lage, M. Bueno, F. Andrade, J.A. Prieto, C. Delgado, M. Legarda, P. Sanjurjo, L.J. Aldámiz-Echevarría, Fatty acid profile in patients with phenylketonuria and its relationship with bone mineral density, *J. Inher. Metab. Dis.* (2010), <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-010-9189-0>.
- [30] H. Nagasaka, H. Tsukahara, T. Takatani, Y. Sanayama, M. Takayanagi, T. Ohura, O. Sakamoto, T. Ito, M. Wada, M. Yoshino, A. Ohtake, T. Yorifuji, S. Hirayama, T. Milda, H. Fujimoto, H. Mochizuki, T. Hattori, Y. Okano, Cross-sectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening, *J. Bone Miner. Metab.* 29 (2011) 737–743.
- [31] J.A. Kanis, A. Oden, O. Johnell, H. Johansson, C. De Laet, J. Brown, P. Burckhardt, C. Cooper, C. Christiansen, S. Cummings, J.A. Eisman, S. Fujiwara, C. Glüer, D.

- Goltzman, D. Hans, M.A. Krieg, A. La Croix, E. McCloskey, D. Mellstrom, L.J. Melton, H. Pols, J. Reeve, K. Sanders, A.M. Schott, A. Silman, D. Torgerson, T. van Staa, N.B. Watts, N. Yoshimura, The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women, *Osteoporos. Int.* 18 (2007) 1033–1046.
- [32] H. Sievanem, P. Kannus, Physical activity reduces the risk of fragility fracture, *PLoS Med.* 4 (2007) e222.
- [33] B. Schwahn, E. Mokov, K. Scheidhauer, B. Lettgen, E. Schönau, Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography, *Acta Paediatr.* 87 (1998) 61–63.
- [34] S. Yannicelli, D.M. Medeiros, Elevated plasma phenylalanine concentrations may adversely affect bone status of phenylketonuric mice, *J. Inherit. Metab. Dis.* 25 (2002) 347–361.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain

M.L. Couce ^{a,*}, M.D. Bóveda ^a, A. Fernández-Marmiesse ^a, A. Mirás ^a, B. Pérez ^b, L.R. Desviat ^b, J.M. Fraga ^a

^a Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

^b Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM, CIBERER, IdiPaz, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 March 2013

Available online 14 March 2013

Keywords:

BH4-responsiveness

Hyperphenylalaninemia molecular epidemiology

PAH mutation

Phenylketonuria

ABSTRACT

Knowledge of hyperphenylalaninemia (HPA) mutational spectrum in a population allows in many cases an accurate prediction of the phenotype and tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness, thus selecting an adequate treatment. In this work, we have performed the molecular characterization of 105 HPA patients from Galicia, in the northwest region of Spain, evaluating their phenotype and BH4 response.

The mutational spectrum analysis showed 47 distinct mutations in 89 families, 37 of them (78.7%) corresponding to missense mutations. Six mutations account for 47.2% of all the investigated alleles, each one with a frequency $\geq 5\%$ (IVS10-11G>A, p.R261Q, p.V388M, p.R176L, p.E280K, p.A300S). The most prevalent HPA mutations in Galicia are the common Mediterranean mutation IVS10-11G>A and p.R261Q, with frequencies of 13.8% and 10.5%, respectively. One novel mutation (p.K361Q; c.1081A>C) was also reported. Although a good genotype–phenotype correlation is observed, there is no exact correlation for some genotypes involving mutations p.R261Q, p.I65T or IVS10-11G>A.

Forty seven patients were monitored for post-challenge BH4, establishing genotype-based predictions of BH4-responsiveness in all of them. All phenylketonuric patients with 2 nonresponsive mutations were unresponsive to BH4 and patients with mutations previously associated with BH4 responsiveness in the two alleles had a clear positive response to the test, with the exception of 5 patients with mutations p.R261Q, p.I65T and p.R68S.

Our study supports a similar degree of heterogeneity of the HPA mutation spectrum in Galicia compared to reported data from Southern Europe. Patients carrying null mutations in both alleles showed the highest degree of concordance with the most severe phenotypes. Genotype is a good predictor of BH4 response.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Deficiency of the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH; E.C.1.14.16.1) causes phenylketonuria (PKU; OMIM 261600), which is the most frequent inborn error of amino acid metabolism in Caucasians with a prevalence of 1 in 10,000 individuals, corresponding to a carrier frequency of about 1 in 50 (Blau and van Spronsen, 2010; Mathias and Bickel, 1986).

The PAH gene (NM_000277.1) has been mapped to the 12q22–24.2 locus, covers 100 kb of genomic DNA and is structured in 13 exons separated by introns. Thus far, more than 700 mutations and sequence variants are listed in the PAH Mutation Analysis Consortium Database

(<http://www.pahdb.mcgill.ca>). Approximately 60% of these molecular defects are missense mutations, 11% are splicing mutations, 5.7% nonsense mutations, 13% small deletions and 1.8% small insertions (Blau et al., 2011; Scriver et al., 2003; Sterl et al., 2013). Large deletions are generally rare (Moller and Nygren, 2007).

A systematic review of PKU in Europe identified 29 mutations that may be regarded as prevalent in European populations (Zschocke, 2003). There are marked differences in the spectrum of mutations between different populations. In most Central and Northern European countries 3–5 mutations account for more than 50% of the mutant alleles in the population (Sterl et al., 2013; Zschocke, 2003). A greater degree of heterogeneity is shown in Southern Europe (Daniele et al., 2006; Desviat et al., 1999; Pérez et al., 1997; Rivera et al., 2011).

Most individuals affected with PKU are compound heterozygotes carrying different mutations on both alleles. Knowledge of the functional effects of the mutations allows prediction of the likely residual enzyme function, but there are still unknown factors that influence the phenotype (Gulderberg et al., 1998; Kayaalp et al., 1997). PAH deficiency is associated with a wide range of phenotypes for which

Abbreviations: HPA, hyperphenylalaninemia; Phe, phenylalanine; PAH, phenylalanine hydroxylase; PKU, phenylketonuria; BH4, tetrahydrobiopterin.

* Corresponding author at: Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. Tel.: +34 981950167; fax: +34 981951135.

E-mail address: maria.luz.couce.pico@sergas.es (M.L. Couce).

various classifications are used (Blau et al., 2011; Burgard et al., 1999; Gulderberg et al., 1998). In general, there is a continuum of biochemical phenotypes, which are grouped from the most severe phenotype named classical PKU through milder PKU forms to mild hyperphenylalaninemia (mHPA) or non-PKU HPA. Groups are defined by pretreatment blood phenylalanine levels and/or dietary tolerance. There is general agreement regarding the classical PKU definition (phenylalanine (Phe) pre-treatment levels > 1200 $\mu\text{mol/L}$) but definitions for milder PKU forms and mHPA vary not only between countries but between different centers in the same country, especially in regard to mHPA definition, whose Phe levels' upper limit on unrestricted nutrition can vary between 360 and 600 $\mu\text{mol/L}$ (Blau et al., 2010). This is important as the decision of treatment also depends on the definition.

A recently defined subgroup of PKU patients (mostly with mild and moderate phenotypes) refers to those with a positive response to tetrahydrobiopterin (BH4) in a standard loading test. Several groups have reported the characterization of each patient genotype to assess the potential responsiveness to BH4 therapy (Desviat et al., 2004; Elsas et al., 2011; Leuzzi et al., 2006; Pérez-Dueñas et al., 2004; Quirk et al., 2012; Trefz et al., 2009). Almost 1200 genotypes associated with BH4 responsiveness are described and listed in the BIOPKU database (www.biopku.org/biopku).

Given the wide heterogeneity of PAH mutations it is crucial to know the mutation epidemiology of PKU in individual ethnic groups (Zschocke, 2003). To date, two reports have described the molecular basis of PKU overall in Spain (Desviat et al., 1999) and in Catalonia, a region of Spain (Mallolas et al., 1999). Here we report the mutational spectrum of the HPA population in Galicia (in northwest of Spain), that reflects the population history, provides information about genotype–phenotype correlations and may be very useful to predict a better or worse response to BH4.

2. Materials and methods

HPA patients detected since June of 1980 to December of 2011 were evaluated for diagnosis and treatment at the Metabolic Disorders Unit of the Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, a reference unit for the Galician population. All patients who underwent genotype analysis were included in the present study.

2.1. Subjects

In this period 150 HPA patients were diagnosed, 123 were detected by NBS and 27 by clinical symptoms or family study. This second group, except one false negative (with mPKU phenotype) for newborn screening, were older people that had not been benefited from the screening program.

All the patients studied with transient HPA were excluded. None of the patients with HPA was caused by defects in the synthesis or recycling of the cofactor BH4.

Phenotypes were classified on the basis of pre-treatment blood phenylalanine level and Phe dietary tolerance in: classic PKU (Phe $\geq$ 1200 μM , tolerance $\leq$ 350 mg/day), moderate PKU (Phe between 600 and 1200 μM , tolerance 350 and 500 mg/day), mild PKU (Phe between 360 and 600 μM , tolerance up to 650 mg/day) and mild HPA (Phe < 360 μM , free diet) (Campistol et al., 2010; Pérez-Dueñas et al., 2004). From the 150 HPA patients detected, 76 were mild HPA, 8 mild PKU, 22 moderate PKU and 44 classic PKU. The incidence in our region is 1/13,683 phenylketonuric patients and 1/8462 patients with mild HPA.

This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from our patients or from parents for molecular studies and BH4-loading test.

2.2. Phe levels

Phe levels on dried blood spots were initially quantified using paper and thin-layer chromatographic methods, which were subsequently replaced by tandem mass spectrometry; cut-off value for phenylalanine is 120 μM and Phe/tyrosine ratio is 1.5. The diagnosis was confirmed by quantitative plasma Phe measurement using ion-exchange chromatography (Biochrom 30 amino acid analyzer).

2.3. Molecular genetic analysis

Genomic DNA of patients and their families was obtained from 3 mL of EDTA blood sample; it was drawn as part of regular blood sampling. Genetic analyses were performed at the Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Universidad Autónoma de Madrid, by a combined approach using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and direct sequencing using the BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems®) kit and capillary electrophoresis with a genetic Analyzer ABI Prism 3700 (Applied Biosystems®). Patient samples where only one causative mutation was identified after sequencing all PAH exons were subjected to MLPA analysis (SALSA MLPA P055 PAH Probemix, MRC-Holland) to exclude large deletions/duplications.

PAH residual activity for each mutant protein was assessed from data compiled in the PAHdb (www.pahdb.mcgill.ca) and/or BH4db (www.bh4.org).

2.4. Calculation of homozygosity

Homozygosity (h) at the PAH locus in a given population is determined by $h = \sum x_i^2$, x_i being the frequency of each allele. In our population, where ascertainment of mutations was not 100%, each of the uncharacterized alleles was defined as having a frequency of $1/N$, where N is the total number of mutant chromosomes investigated.

2.5. BH4 loading test

BH4 loading test was carried out in PKU patients for whom we had a signed informed consent (signed by parents or by adult patients themselves). No test was made for mHPA patients. When two affected siblings had the same genotype/phenotype the test was only performed for one of them. The screening of the BH4 responsive patients' group was based on loading with a cofactor: 24-hour testing with 20 mg/kg of BH4 with a previous loading of a dose of 100 mg/kg of phenylalanine and baseline Phe endpoints at 4, 8, 15, and 24 h. This screening was started on 2002, since then, BH4 loading is carried out in the neonatal period when the level of Phe is over 400 $\mu\text{mol/L}$ and there is no previous loading with this amino acid (Bóveda et al., 2007). With levels between 360 and 400 $\mu\text{mol/L}$ we measure Phe levels again and check Phe tolerance before the loading test.

BH4-responsiveness was defined as a decrease in plasma Phe of more than 30% of the value before the BH4 challenge (20 mg/kg body weight) within maximally 24 h post-load, following the guidelines defined at the EMG workshop in Zurich, June 1st, 2002 (Blau and Muntau, 2002).

3. Results

During the 31-year study period we performed the molecular characterization of 105 patients, 42 males and 63 females, corresponding to 205 mutant alleles.

The mutational spectrum analysis demonstrated 47 distinct mutations, 37 (78.7%) corresponding to different missense mutations leading to amino acid substitutions, 3 (6.4%) nonsense, 2 (4.2%) splicing sites, and 4 deletions (8.5%), 3 of them small deletions and one large deletion. No mutation was detected in exons 1, 4 and 13. Exon 7 exhibits the greatest number of different mutations (ten) and is affected in 21.3%

of the total mutant alleles. Thirty-five mutations were located in the catalytic domain (74%), 8 in the regulatory domain (17%) and two in the tetramerization domain (Table 1).

The most prevalent HPA mutations in Galicia are the common Mediterranean mutation IVS10-11G>A (c.1066-11G>A) with a relative frequency of 13.8%, and p.R261Q (c.782G>A) with a frequency of 10.5%. The next most frequent mutations are p.V388M, p.R176L, p.E280K and p.A300S, each of them showing a relative frequency between 4.8 and 6.2%. One novel mutation was reported, p.K361Q (c.1081A>C).

Among the 105 patients, 39 are classical PKU, 20 moderate PKU, 8 mild PKU, and 38 mHPA. The 47 different mutations are combined in different genotypes, 90 patients are compound heterozygous for two different mutations, and 10 are homozygous (IVS10-11G>A (4), p.E280K(3), p.A300S, p.A403V, p.F39del); in 5 patients only one mutation was found. Genetic analysis was performed in parents of homozygous patients in order to discard large deletions. Just 9 genotypes were present more than once in unrelated patients and 11 genotypes are repeated in siblings. Homozygosity rate index was 0054.

Regarding the enzymatic activity associated to each mutation, thus determinant of the theoretical clinical phenotype of each patient, mutations p.E280K, p.R243X, p.R243Q, p.R158Q, p.R252W, IVS12 + 1G>A, p.S349P, and p.R408W are associated with a null to very low PAH activity, p.R261Q, p.V388M, p.R176L, and p.L348V with a moderate enzymatic activity and p.E390G, p.V230I, p.P244L, and p.P211T with a high residual activity (Table 1). For other mutations a wide range of residual activity levels has been reported, depending on the expression system used. Although a good genotype–phenotype correlation is observed, there is no exact correlation for some patients with the same genotype (e.g. IVS10-11G>A homozygotes and patients with the genotypes p.I65T/p.R261 or p.R261Q/IVS10-11G>A are classical or moderate PKU).

Forty seven patients were monitored for 24 h post-challenge with 20 mg/kg of BH4. Among these, 18 patients (38.3%) were responsive, including 3/27 classic PKU, 8/13 moderate PKU, and 7/7 mild PKU (Table 2). Genotype-based predictions of BH4-responsiveness were assessed in almost all the patients. PKU patients with 2 nonresponsive mutations were unresponsive to BH4. Patients with mutations previously

associated with BH4 responsiveness in the two alleles except 5 patients with mutations p.R261Q, p.I65T and p.R68S had a clear positive response to the test. In addition, patients with at least one mutation with an in vitro residual activity $\geq 20\%$ (including 3 classic PKU) showed also a positive response.

Phenylketonuric patients who exhibited a 25–30% decrease in Phe levels in the 24-h test, underwent a weekly BH4 loading test. This test was positive in another patient (p29), who had a 28% decrease in Phe levels with the 24 h-test and between 30 and 40% with the one-week test. Data on long term-response to BH4 treatment in several of these responsive patients were recently published (Couce et al., 2012).

4. Discussion

The mutation detection rate in our region is 97.6%, at the upper limit of the reports from different populations throughout the world (90–99%) (Zschocke et al., 2003; Guldberg et al., 1996; Song et al., 2005). The mutational spectrum involves 47 mutations in 105 patients diagnosed since 1980 from 89 families. Six mutations account for 47.2% of investigated alleles, each one with a frequency of $\geq 5\%$ (IVS10-11G>A, p.R261Q, p.V388M, p.R176L, p.E280K, and p.A300S). Our study confirms a high degree of heterogeneity of HPA mutations in Galicia, with a homozygosity index of 0054, similar to reported data from Southern Europe (Daniele et al., 2006; Desviat et al., 1999; Rivera et al., 2011; Zschocke, 2003).

The reported PKU mutational spectrum is different from North and central European countries where the prevalent mutations are IVS12 + 1G>A and p.R408W (Guldberg et al., 1994; Sterl et al., 2013). The most frequent mutation in our population is IVS10-11G>A (13.8%), designated as the major Mediterranean mutation (Guldberg et al., 1993, 1994; Özgüç et al., 1993; Rivera et al., 2011; Traeger-Synodinos et al., 1994). The second most prevalent mutation identified was p.R261Q in exon 7, which accounted for 10.5% of the alleles. This mutation is a common mutation in the world (Groselj et al., 2012; Zschocke, 2003) and it has previously been reported in relatively high frequencies in various populations, primarily in the Mediterranean and southern Europe (Daniele et al., 2006; Zare-Karizi et al., 2011).

Table 1
Mutational spectrum in the Galician HPA population, indicating the frequency of alleles and their relative residual PAH activity in vitro (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

PAH mutation	Nucleotide change	Type	Location	Domain	Activity %	Alleles N%	PAH mutation	Nucleotide change	Type	Location	Domain	Activity %	Alleles N%
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	Splic	I10	–	NS	29/13.8	p.R261X	c.781C>T	Non	E7	Catalytic	NS	2/1
p.R261Q	c.782G>A	Miss	E7	Catalytic	27–47	22/10.5	p.R408W	c.1222C>T	Miss	E12	Catalytic	0–2	2/1
p.V388M	c.1162G>A	Miss	E11	Catalytic	15–43	13/6.2	p.S303A	c.907T>G	Miss	E8	Catalytic	NS	2/1
p.R176L	c.527G>T	Miss	E6	Catalytic	21–42	13/6.2	p.S349P	c.1045T>C	Miss	E10	Catalytic	0–0.3	2/1
p.E280K	c.838G>A	Miss	E7	Catalytic	ND	12/5.7	p.S87R	c.261C>A	Miss	E3	Regulatory	25–82	2/1
p.A300S	c.898G>T	Miss	E8	Catalytic	NS	10/4.8	p.Y417H	c.1249T>C	Miss	E12	Tetramerization	NS	2/1
p.L48S	c.143C>T	Miss	E2	Regulatory	0–39	9/4.3	p.D415N	c.1243G>A	Miss	E12	Catalytic	NS	1/0.5
p.R243X	c.727C>T	Non	E7	Catalytic	<1	9/4.3	p.EX5del	c.442–?_509+?del	Large Del	E5	Catalytic	NS	1/0.5
p.R243Q	c.728G>A	Miss	E7	Catalytic	10–18	7/3.3	p.I269L	c.805A>C	Miss	E7	Catalytic	NS	1/0.5
p.A313V	c.938C>T	Miss	E9	Catalytic	NS	5/2.4	p.I174V	c.520A>G	Miss	E6	Catalytic	NS	1/0.5
p.A403V	c.1208C>T	Miss	E12	Catalytic	32	5/2.4	p.K42E	c.124A>G	Miss	E2	Regulatory	NS	1/0.5
p.F55Lfs	c.165delT	Del	E2	Regulatory	NS	5/2.4	p.K361Q	c.1081A>C	Miss	E11	Catalytic	NS	1/0.5
p.G46S	c.136G>A	Miss	E2	Regulatory	32–62	5/2.4	p.L348V	c.1042C>G	Miss	E10	Catalytic	25–44	1/0.5
p.I65T	c.194T>C	Miss	E3	Regulatory	27–60	5/2.4	p.P211T	c.631C>A	Miss	E6	Catalytic	72	1/0.5
p.F39del	c.115_117delTTC	Del	E2	Regulatory	20–83	4/1.9	p.P244L	c.731C>T	Miss	E7	Catalytic	68	1/0.5
p.R158Q	c.473G>A	Miss	E5	Catalytic	1.7–29	3/1.4	p.Q304Q	c.912G>A	Syn	E8	Catalytic	NS	1/0.5
p.R252W	c.754C>T	Miss	E7	Catalytic	<1	3/1.4	p.R270K	c.809G>A	Miss	E7	Catalytic	NS	1/0.5
p.T380M	c.1139C>T	Miss	E11	Catalytic	NS	3/1.4	p.R420M	c.1259G>T	Miss	E12	Catalytic	NS	1/0.5
p.Y414C	c.1241A>G	Miss	E12	Tetramerization	28–80	3/1.4	p.R176Q	c.527G>A	Miss	E6	Catalytic	NS	1/0.5
p.Y277D	c.754C>T	Miss	E7	Catalytic	ND	3/1.4	p.R176X	c.526C>T	Non	E6	Catalytic	NS	1/0.5
p.C203Y	c.608G>A	Miss	E6	Catalytic	NS	2/1	p.V230I	c.688G>A	Miss	E6	Catalytic	52–63	1/0.5
p.E390G	c.1169A>G	Miss	E11	Catalytic	70–85	2/1	p.V177M	c.529G>A	Miss	E6	Catalytic	NS	1/0.5
IVS12 + 1G>A	c.1315 + 1G>A	Splic	I12	–	<1	2/1	p.Y198fs	c.593_614del22	Del	E6	Catalytic	NS	1/0.5
p.R68S	c.204A>T	Miss	E3	Regulatory	18–76	2/1	n.d.						5/2.4

Reference sequence: NM_000277. Non: nonsense; Miss: missense; Del: deletion; Splic: splicing; Syn: synonymous; I: intron; E: exon; NS: not stated; ND: not detectable.

Table 2

Response to the 24 h BH4 loading test.

Patient	Sex	Pre-treatment Phe level (μM)	Age at BH4 testing	Phenotype	Allele 1		Allele 2		Response test 24 h ↓Phe levels (%)
<i>Patients with <30% decrease in Phe levels in the 24 h test</i>									
1	F	1776	9 d	CPKU	p.E280K	↓	p.E280K	↓	0
2	F	1279	11 y 2 m	CPKU	p.E280K	↓	p.R261Q	↑	0
3	M	1617	10 d	CPKU	p.R243Q	↓	IVS10-11G>A	↓	0
4	F	1715	35 y	CPKU	p.R243X	↓	IVS10-11G>A	↓	0
5	F	2028	3 y	CPKU	p.R243X	↓	p.V388M	↑	0
6	M	2149	1 y 6 m	CPKU	p.R261Q	↑	IVS10-11G>A	↓	0
7	F	1636	9 d	CPKU	p.R261X	↓	p.R261X	↓	0
8	M	1587	10 d	CPKU	p.R270K	↓	IVS10-11G>A	↓	0
9	F	2262	17 y	CPKU	IVS10-11G>A	↓	IVS10-11G>A	↓	8.2
10	M	1446	7 d	CPKU	IVS10-11G>A	↓	p.I65T	↑	6.4
11	M	1026	23 y 3 m	CPKU	p.E280K	↓	p.V388M	↑	10.3
12	F	1371	4 y 10 m	CPKU	p.R243X	↓	IVS10-11G>A	↓	9.6
13	F	1934	4 y 3 m	CPKU	IVS10-11G>A	↓	IVS10-11G>A	↓	10.6
14	F	1781	17 y 8 m	CPKU	IVS10-11G>A	↓	p.I65T	↑	10.6
15	M	3430	32 y 1 m	CPKU	p.R408W	↓	nd	–	17
16	F	1382	15 d	CPKU	p.F55Lfs	↑	p.R261Q	↑	15.3
17	M	902	1 y 8 m	MPKU	p.R68S	↑	p.F39del	↑	18.4
18	F	1764	16 y 9 m	CPKU	p.V388M	↑	nd	–	16.6
19	F	1339	29 y 9 m	CPKU	p.I65T	↑	p.R261Q	↑	22.1
20	M	717	26 y	MPKU	p.I65T	↑	p.R261Q	↑	22.1
21	F	1328	21 y 9 m	CPKU	p.R261Q	↑	IVS10-11G>A	↓	24
22	F	1453	2 y 1 m	CPKU	p.R176X	↓	p.R261Q	↑	17.9
23	F	2036	1 y 8 m	CPKU	p.E280K	↓	p.V388M	↑	27
24	M	1560	8 y 1 m	MPKU	p.R261Q	↑	IVS10-11G>A	↓	18.9
25	F	1465	25 y 9 m	CPKU	p.F55Lfs	↑	p.R261Q	↑	25.3
26	F	812	27 y	MPKU	p.R243X	↓	p.L48S	↑	26.2
27	F	1263	22 y 6 m	CPKU	p.R243Q	↓	IVS10-11G>A	↓	21.8
28	F	1640	14 y	MPKU	p.R261Q	↑	IVS10-11G>A	↓	22.7
29	M	1504	4 y 5 m	CPKU	p.I65T	↑	p.R243X	↓	28
<i>Patients with 30–50% decrease in Phe levels in the 24 h test</i>									
30	M	939	19 y 5 m	MPKU	p.V388M	↑	p.L48S	↑	33.7
31	F	836	9 y 7 m	MPKU	p.P244L	~	p.R261Q	↑	34.3
32	F	1428	13 y 10 m	CPKU	p.R243Q	↓	p.V388M	↑	37.1
33	F	1748	16 y 4 m	CPKU	p.G46S	~	p.R243Q	↓	40.3
34	F	1065	6 y 7 m	MPKU	p.R158Q	↑	p.L48S	↑	43
<i>Patients with 50–70% decrease in Phe levels in the 24 h test</i>									
35	M	1569	13 d	CPKU	p.R243Q	↓	p.V388M	↑	51.3
36	F	636	2 m	MPKU	p.L48S	↑	p.Y277D	~	57.2
37	F	614	2 m	MPKU	p.L48S	↑	p.Y277D	~	60.3
38	M	865	16 y	MPKU	p.V388M	↑	p.Y414C	↑	62
39	F	604	14 d	MPKU	p.R68S	↑	IVS10-11G>A	↓	62.1
40	F	418	1 m	mPKU	p.A300S	↑	p.C203Y	~	64.1
41	F	551	6 y	mPKU	p.A300S	↑	p.C203Y	~	65
42	M	502	15 d	mPKU	p.P211T	↑	IVS10-11G>A	↓	64.1
43	F	442	5 y 3 m	mPKU	p.R243Q	↓	p.E390G	↑	64.8
<i>Patients with >70% decrease in Phe levels in the 24 h test</i>									
44	F	416	3 y 9 m	mPKU	p.R176L	~	nd	–	76
45	M	1091	16 y 5 m	MPKU	p.Q304Q	~	p.R176L	~	80.7
46	F	420	10 y 2 m	mPKU	p.S303A	~	p.G46S	~	90.2
47	M	400	7 y	mPKU	p.S303A	~	p.G46S	~	90.2

M: male; F: female; y: years; d: days; m: months; nd: not detected; †: mutations previously associated with BH4 responsiveness; ↓: mutations not associated with BH4 responsiveness; ~: mutations with yet undefined association to BH4 responsiveness; CPKU: classic PKU; MPKU: moderate PKU; mPKU: mild PKU.

All the mutations identified in our patients have already been described in other populations, except for the novel mutation p.K361Q. This missense mutation is situated in the catalytic domain in exon 11 of PAH gene; and it is supposed to be a very mild mutation because combined with the severe mutation p.R243X it results in a benign HPA phenotype in the patient. Accordingly, the change is predicted to be tolerated with a score of 0.25 using SIFT (<http://blocks.fhcr.org/sift/SIF.html>) with a score range from 0 (damaging) to 1 (neutral); and possibly damaging with a score of 0.71 using PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) with a score range from 0 (neutral) to 1 (damaging).

Many studies have reported inconsistencies in genotype/phenotype correlations (Song et al., 2005). Our results revealed a good correlation, with patients carrying null mutations in both alleles showing the

highest degree of concordance with the most severe phenotypes as previously reported (Santos et al., 2010). However, one patient with two moderate-mild mutations in vitro associated with BH4 responsiveness, p.I65T and p.R261Q, had an unresponsive classic PKU phenotype. It has already been described by several authors that the observed metabolic phenotype was not consistent with the predicted genotypic effect for these two mutations (Leandro et al., 2006; Mallolas et al., 1999; Rivera et al., 2011). As both mutations are not located in the tetramerization domain of PAH, it was suggested that they could affect the interactions between the subunit interfaces, namely upon the conformational changes occurring at the dimer interface upon activation by L-phenylalanine (Leandro et al., 2006). There were also other inconsistent genotype–phenotype correlations, all of them involving two specific mutations: p.R261Q (10 cases) and

IVS10-11G>A (4 cases), where patients with equal genotype present moderate or classic PKU phenotype.

Regarding BH4 responsiveness, we usually found a correlation between genotype and its predicted responsiveness and in vivo response to BH4, similar to what has been described in other studies (Daniele et al., 2009; Trefz et al., 2009; Zurflüh et al., 2008).

This study presents the mutational spectrum of Galicia, a region of Spain. A high heterogeneity of HPA and a good correlation between the genotype and biochemical and BH4-responsive phenotype were observed. Molecular diagnosis is in general a good approach to determine if a patient should be tested and treated or not.

References

- Blau, N., Muntau, A., 2002. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. EMG Workshop Results. Milupa, Friedrichsdorf.
- Blau, N., van Spronsen, H.L., 2010. Phenylketonuria. Lancet 376, 1417–1427.
- Blau, N., et al., 2010. Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. Mol. Genet. Metab. 99, 109–115.
- Blau, N., Hennermann, J.B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U., 2011. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. Mol. Genet. Metab. 104, S2–S9.
- Bóveda, M.D., et al., 2007. The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment. J. Inher. Metab. Dis. 30, 812.
- Burgard, P., et al., 1999. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria. Eur. J. Pediatr. 158, 46–54.
- Campistol, J., Lambruschini, N., Gómez-López, L., Gutierrez, A., Fusté, E., Vilaseca, M.A., 2010. Hiperfenilalaninemas. In: Sanjurjo, P., Baldellou, A. (Eds.), Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias, 3rd ed. Ergon, Majadahonda, pp. 423–439.
- 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 Reports 2, 91–96.
- Daniele, A., et al., 2006. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. Ann. Hum. Genet. 71, 185–193.
- Daniele, A., et al., 2009. Functional and structural characterization of novel mutations and genotype–phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. FEBS J. 276, 2048–2059.
- Desviat, L.R., et al., 1999. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. Eur. J. Hum. Genet. 7, 386–392.
- Desviat, L.R., et al., 2004. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. Mol. Genet. Metab. 83, 157–162.
- Elsas, L.J., Greto, J., Wierenga, A., 2011. The effect of blood phenylalanine concentration on Kuvan response in phenylketonuria. Mol. Genet. Metab. 102, 407–412.
- 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, 142–148.
- Guldborg, P., et al., 1993. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. Hum. Mol. Genet. 2, 1703–1707.
- Guldborg, P., et al., 1994. Mutation analysis in families with discordant phenotypes of phenylalanine hydroxylase deficiency: inheritance and expression of the hyperphenylalaninemia. J. Inher. Metab. Dis. 17, 645–651.
- Guldborg, P., et al., 1996. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. Am. J. Hum. Genet. 59, 84–94.
- Gulderberg, P., et al., 1998. European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. Am. J. Hum. Genet. 63, 71–79.
- Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P.J., Byck, S., Nowacki, P., Scriver, C.R., 1997. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninaemia phenotypes: a metanalysis of genotype–phenotype correlations. Am. J. Hum. Genet. 61, 1309–1317.
- Leandro, J., Nascimento, C., de Almeida, I.T., Leandro, P., 2006. Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. Biochim. Biophys. Acta 1762, 544–550.
- Leuzzi, V., Carducci, C., Chiarotti, F., Artioli, C., Giovanniello, T., Antonozzi, I., 2006. The spectrum of phenylalanine variations under tetrahydrobiopterin load in subjects affected by phenylalanine hydroxylase deficiency. J. Inher. Metab. Dis. 29, 38–46.
- Mallolas, J., et al., 1999. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype–phenotype correlation. Hum. Genet. 105, 468–473.
- Mathias, D., Bickel, H., 1986. Follow-up study of 16 years neonatal screening for inborn errors of metabolism in West Germany. Eur. J. Pediatr. 45, 310–312.
- Moller, L.B., Nygren, A.O., 2007. Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. Hum. Mutat. 28, 207.
- Ozgüç, M., Ozalp, I., Coşkun, T., Yilmaz, E., Erdem, H., Ayter, S., 1993. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. J. Med. Genet. 30, 129–130.
- 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., et al., 2004. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. Clin. Biochem. 37, 1083–1090.
- Quirk, M.E., Dobrowolski, S.F., Nelson, B.E., Coffee, B., Singh, R.H., 2012. Utility of phenylalanine hydroxylase genotype for tetrahydrobiopterin responsiveness classification in patients with phenylketonuria. Mol. Genet. Metab. 107, 31–36.
- Rivera, I., et al., 2011. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. Mol. Genet. Metab. 104, S86–S92.
- Santos, L.L., et al., 2010. Variations in genotype–phenotype correlations in phenylketonuria patients. Genet. Mol. Res. 9, 1–8.
- Scriver, C.R., et al., 2003. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do? Hum. Mutat. 21, 333–344.
- Song, F., Qu, Y.J., Zhang, T., Jin, Y.W., Wang, H., Zheng, X.Y., 2005. Phenylketonuria mutations in Northern China. Mol. Genet. Metab. 86, S107–S118.
- Sterl, E., et al., 2013. Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. J. Inher. Metab. Dis. 36, 7–13.
- Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Kalogerakou, M., Souli, K., Missiou-Tsangarakis, S., Kattamis, C., 1994. Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. Hum. Genet. 94, 573–575.
- Trefz, F.K., Scheible, D., Götz, H., Frauendienst-Egger, G., 2009. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. J. Inher. Metab. Dis. 32, 22–26.
- Zare-Karizi, S.H., et al., 2011. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. Mol. Genet. Metab. 102, 29–32.
- Zschocke, J., 2003. Phenylketonuria mutations in Europe. Hum. Mutat. 21, 345–356.
- Zurflüh, M.R., et al., 2008. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. Hum. Mutat. 29, 67–75.

Manuscript Number: MEDCLI-D-13-00607R1

Title: Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral ósea en pacientes con fenilcetonuria. Utility of bone turnover markers in metabolic bone disease detection in patients with Phenylketonuria.

Article Type: Original

Keywords: Densitometría; Fenilcetonuria, Mineralización ósea; Nutrición; Osteopenia, Tetrahydrobiopterina

Densitometry; Phenylketonuria; Bone mineralitation; Nutrition; Osteopenia; Tetrahydrobiopterin

Corresponding Author: Dr.Med. María L Couce, PhD, MD

Corresponding Author's Institution: Hospital Clínico Universitario

First Author: Alicia Mirás, MD

Order of Authors: Alicia Mirás, MD; Antonio Freire Corbacho; Javier Rodriguez García; Rosaura Leis, PhD, MD; Luís Aldámiz-Echevarría, PhD, MD ; José María Fraga; María Luz Couce, PhD, MD

Abstract: RESUMEN

Fundamento y objetivo: La enfermedad mineral ósea (EMO) es más frecuente en pacientes con fenilcetonuria. Los objetivos del estudio son conocer la utilidad de los marcadores de remodelado óseo para identificar a pacientes fenilcetonúricos con EMO y conocer las alteraciones del remodelado óseo subyacentes.

Pacientes y método: Estudio observacional transversal de 43 pacientes fenilcetonúricos >7años (7,1-41 años). Se realizó encuesta nutricional, densitometría, determinación de fosfatasa alcalina ósea (FAO), péptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PNP-1), β -cross-laps y relación calcio-creatinina en orina. Se estratificó a los pacientes por edad y tipo de tratamiento.

Resultados: El 20,9% de los pacientes presentaron marcadores de remodelado óseo patológicos, el 90% de ellos eran adultos. La FAO estaba disminuida en el 70% de ellos y el β -cross-lap en el 42,8%. Los valores de FAO fueron patológicos con más frecuencia en diagnosticados de fenilcetonuria tardíamente (41,7% vs 10,7%, $p<0,05$) y en pacientes con EMO (60% vs 14,3%, $p<0,05$). Los valores de PNP-1 y Ca/Creatinina fueron similares entre todos los pacientes fenilcetonúricos independientemente de presentar enfermedad mineral ósea, diagnóstico tardío o tratamiento con tetrahydrobiopterina.

Los pacientes con disminución de FAO y β -cross-lap recibieron menor ingesta de proteínas naturales: FAO ($0,21\pm0,13$ gr/kg vs $0,65\pm0,65$ gr/kg $p<0,05$); β -cross-lap ($0,29\pm0,23$ gr/kg vs $0,65\pm0,66$ gr/kg, $p<0,05$). Ninguno de los tratados con tetrahydrobiopterina presentó valores alterados de marcadores óseos.

Conclusiones: Los pacientes adultos fenilcetonúricos con menor ingesta de proteínas naturales tienden a presentar valores disminuidos de FAO, marcador que puede resultar útil para identificar a los pacientes con riesgo de presentar EMO.

ABSTRACT

Background and objective: Mineral bone disease is more common in phenylketonuric patients. The objectives of this study were to determine the usefulness of biochemical bone markers to identify phenylketonuric patients with mineral bone disease and know the underlying bone remodeling alterations.

Patients and method: Cross-sectional study of 43 phenylketonuric patients > 7years (range: 7,1-41 years). Nutritional survey was performed and determination of bone alkaline phosphatase (BAP), procollagen type I N-terminal propeptide (PNP-1), β -cross-laps and ratio calcium/creatinine in urine. Results: 20.9% of patients had pathological biochemical bone markers, 90% of them were adults. BAP was decreased in 70% of them and β -cross-lap in 42.8%. BAP values were pathological more often in those phenylketonuric patients diagnosed late (41,7% vs 10,7%, $p<0,05$) and in patients with mineral bone disease (60% vs 14,3%, $p<0,05$). PNP-1 values and calcium/creatinine were similar among all phenylketonuric patients regardless of presenting mineral bone disease, late diagnosis or tetrahydrobiopterin treatment (enzyme cofactor). Patients with decreased β -cross-lap and BAP, had lower natural protein intake: BAP ($0,21 \pm 0,13$ gr/kg vs. $0,65 \pm 0,65$ gr/kg $p<0,05$), β -cross-lap ($0,29 \pm 0,23$ gr/kg vs. $0,65 \pm 0,66$ gr/kg, $p<0,05$). None of tetrahydrobiopterin treated showed altered values of BAP, PNP-1 or Ca/Creatinine.

Conclusions: Adult phenylketonuric patients with lower natural protein intake, tend to have lower values of BAP, marker that may be useful to identify patients at risk for mineral bone disease.

Response to Reviewers: Respuestas al Comité y a los revisores COMITÉ

1. Les sugerimos una modificación del título: Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral ósea en pacientes con fenilcetonuria.

Respuesta: se ha modificado el título como han sugerido.

2. Utilizar: Concentración, valores, en vez de niveles.

Respuesta: se ha modificado en todo el texto según indican.

3. Ref: Suprimir número de revista entre paréntesis (ver normas)

Respuesta: se suprimió el nº de revista entre paréntesis.

4. Emplear comas en vez de puntos para decimales.

Respuesta: se emplearon comas entre decimales.

5. En correo aparte le enviamos unas citas por si considera oportuno incluirlas en su artículo.

Respuesta: Las 2 citas indicadas se han introducido en el texto, son las citas 4 y 8.

REVISOR 4

1. Los principales problemas del estudio son el tamaño de la muestra y la heterogeneidad de los pacientes incluidos.

Respuesta: Tiene razón pero se trata de una enfermedad rara con una frecuencia de 1/10000 y representan los pacientes con fenilcetonuria de nuestro Centro (referencia para Galicia) que son mayores de 7 años, que han tenido niveles de fenilalanina > 600 μ mol/L al diagnóstico y que han aceptado ellos y/o sus padres participar.

2. Presenta importantes problemas metodológicos ligados al hecho de que los autores han considerado que los pacientes de más de 20 años han completado el crecimiento esquelético, cuando la adquisición del pico de masa ósea no se alcanza hasta los 35 años. Esto representa cambios importantes en la forma de analizar los resultados de la densitometría y los marcadores de remodelado que los autores deberían corregir.

Respuesta: Hemos decidido que el punto de corte sean los 20 años de edad, porque es a partir de ahí cuando se adquiere el 90% del pico de masa ósea y por lo tanto, es a partir de esta edad cuando se pueden aplicar los valores de referencia de DMO (densidad mineral ósea) de la OMS para adultos. En el artículo de Bachrach de 2011 (Bachrach LK, Sillls I N, and the section of endocrinology. Bone Densitometry in Children and Adolescents. Pediatrics. 2011;127;189-194) dice textualmente: que los t-

score (comparan la densidad mineral ósea del paciente con la densidad mineral ósea de un adulto joven sano) no deben ser utilizados por debajo de los 20 años, porque la persona puede no haber alcanzado por debajo de esa edad el pico de masa ósea.

Este punto de corte lo hemos mantenido en los 20 años también para los marcadores bioquímicos de remodelado óseo (MRO), ya que de las bases de datos consultadas (Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, Finkenstedt G, Högl W. Sex- and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92: 443-449), las curvas presentadas presentan aplanamiento ya a partir de los 18 años, con valores iguales a los referidos por nuestro laboratorio; por lo que nos ha parecido sensato mantener para los MRO el mismo punto de corte que para la DMO.

No obstante y de acuerdo a lo que indica hemos incluido en el método: la medición de propéptido aminoterminal del procólágeno tipo I y β -cross-laps se realizó en muestra de suero mediante inmunoensayo por electroquimioluminiscencia (Cobas e601 Roche) tomando como valores de referencia los aportados por el propio fabricante, teniendo en cuenta que a partir de los 20 años se ha alcanzado el 90% del pico de masa ósea, con valores de remodelado óseo estables

REVISOR 5

1. Sustituir EMO por enfermedad mineral ósea. Sustituir PKU por fenilcetonuria. Sustituir MRO por remodelado óseo. Sustituir FAO por fosfatasa alcalina.

Eliminar las siglas PNP-1, beta-CTx y Ca/Cr.

En el texto deben explicarse las siglas BH4.

Respuesta. Se ha hecho en todo el texto, en el abstract para ajustarse a las 250 palabras no se han podido eliminar todas pero si MRO, beta-CTx y Ca/cr.

Se explicaron las siglas BH4 en el texto:

En introducción, renglones 11-12: "Existe un grupo de pacientes fenilcetonúricos respondedores a la tetrahidrobiopterina (BH4), el cofactor del enzima)".

2. PAGINA 1. Eliminar las siglas anglosajonas MD (equivalente a licenciado en Medicina) y PhD (equivalente a doctor en Medicina). Simplemente con Dra. es suficiente

PAGINA 2. Eliminar siglas. Especificar que es el tratamiento con BH4

Respuesta: se eliminaron las siglas. Se especificó también en el abstract lo de BH4, similar a lo explicado en la respuesta 1.

3. PAGINA 3. Eliminar siglas y tipi. En patients and methods, después de patients > 7 years falta (range: 7,1 - 41 years).

Respuesta: en el abstract en inglés se eliminaron siglas de acuerdo al de español, se cambió tipi por type; se añadió el rango.

4. PAGINA 4. Eliminar siglas y el código OMIM. Eliminar las siglas Phe y Tyr en todo el artículo. Eliminar el paréntesis después de fenil alanina hidroxilasa.

Respuesta: se eliminaron

5. En la 4ª línea de la introducción sustituir toxico por patología y citar algunos rasgos clínicos de la enfermedad para una mayor comprensión del texto, como retraso mental, convulsiones, hiperactividad, microcefalia, defectos de la pigmentación, eccemas, olor a moho, etc. Sustituir reabsorción por resorción ósea tal como figura en todo el texto. En el último párrafo, la densitometría ósea no es un marcador de oro, de plata o de platino, sino una exploración complementaria para determinar la densidad mineral ósea.

Respuesta: Se hicieron todos los cambios sugeridos.

En introducción en los renglones 3-7: Esto ocasiona una elevación plasmática de fenilalanina, cuyo acúmulo causa patología especialmente a nivel del sistema nervioso central donde puede originar

secuelas profundas e irreversibles (retraso mental, convulsiones, hiperactividad, microcefalia) así como defectos de la pigmentación, eccemas, olor a moho, etc.

En introducción página 5 renglones 4-7: La densitometría, es una exploración complementaria para determinar la densidad mineral ósea, pero no informa sobre la situación del remodelado óseo, cuya alteración puede derivar en enfermedad mineral ósea.

6. PAGINA 5. Eliminar siglas. No es material y métodos, sino pacientes y métodos. Eliminar el paréntesis, ya figura el centro de referencia tras el título del artículo

PAGINA 6. Eliminar todas las siglas. Sustituir remodelación ósea por remodelado óseo. Método punto y aparte, no punto y seguido. radioinmunoanálisis, la r en minúscula.

PAGINA 7. Eliminar siglas. Ratio es un término inglés, debe sustituirse por relación. La abreviatura de gramos es gr. no g. En análisis estadístico se realizó empleando el test o la prueba del chi - cuadrado.

PAGINA 8. En resultado, sustituir varones por hombres. Añadir dentro del paréntesis (intervalo: 7,1 - 41 años). Son marcadores de resorción no de reabsorción

PAGINA 9. Eliminar siglas. Sustituir ratio por relación. En discusión eliminar el término consumada.

PAGINAS 10 y 11. Eliminar siglas

Respuesta: Se hicieron los cambios indicados, se eliminaron las siglas. Se cambiaron las palabras indicadas y las abreviaturas y puntos.

7. Bibliografía. Cambios

Respuesta: se fue revisando cada cita y ajustando

Santiago de Compostela, 11 de junio de 2013

Sr Editor:

Enviamos este artículo para ser publicado como original en Medicina Clínica.

Se basa en el estudio de marcadores bioquímicos de remodelado óseo (tanto de formación como de resorción ósea) en 43 pacientes con Fenilcetonuria. Consideramos que es de gran interés ya que se sabe que la enfermedad mineral ósea es más frecuente en estos pacientes pero no se conoce su causalidad.

Comprobamos que se afecta fundamentalmente la acreción ósea, siendo la fosfatasa alcalina ósea un marcador precoz para su detección, y que ello es debido en gran medida a la menor ingesta de proteínas naturales de la dieta, demostrando además por vez primera que los pacientes PKU a tratamiento con tetrahidrobiopterina no presentan alteraciones en ninguno de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

Fdo. María Luz Couce

Autor de Correspondencia

Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral
ósea en pacientes con fenilketonuria.

Utility of bone turnover markers in metabolic bone disease detection in patients with
Phenylketonuria.

Alicia Mirás¹, Antonio Freire Corbacho², Javier Rodríguez García², Rosaura Leis³, Luís
Aldámiz-Echevarría⁴, José M. Fraga¹, María L. Couce¹

¹Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas.
Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

²Servicio de Laboratorio Central. Hospital Clínico Universitario de Santiago de
Compostela.

³Unidad de Gastroenterología y Nutrición. Servicio de Pediatría. Hospital Clínico
Universitario de Santiago de Compostela.

⁴Unidad de Metabolismo. Departamento de Pediatría. Hospital de Cruces. Barakaldo,
Vizcaya.

Autor de Correspondencia:

Dra María Luz Couce

Unidad de Enfermedades Metabólicas Congénitas. Servicio de Pediatría

Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

A Choupana, s/nº

15706 Santiago de Compostela, España

Teléfono: 981950167

E-mail: maria.luz.couce.pico@sergas.es

RESUMEN

Fundamento y objetivo: La enfermedad mineral ósea (EMO) es más frecuente en pacientes con fenilcetonuria. Los objetivos del estudio son conocer la utilidad de los marcadores de remodelado óseo para identificar a pacientes fenilcetonúricos con EMO y conocer las alteraciones del remodelado óseo subyacentes.

Pacientes y método: Estudio observacional transversal de 43 pacientes fenilcetonúricos >7años (7,1-41 años). Se realizó encuesta nutricional, densitometría, determinación de fosfatasa alcalina ósea (FAO), propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PNP-1), β -cross-laps y relación calcio-creatinina en orina. Se estratificó a los pacientes por edad y tipo de tratamiento.

Resultados: El 20,9% de los pacientes presentaron marcadores de remodelado óseo patológicos, el 90% de ellos eran adultos. La FAO estaba disminuida en el 70% de ellos y el β -cross-lap en el 42,8%. Los valores de FAO fueron patológicos con más frecuencia en diagnosticados de fenilcetonuria tardíamente (41,7% vs 10,7%, $p<0,05$) y en pacientes con EMO (60% vs 14,3%, $p<0,05$). Los valores de PNP-1 y Ca/Creatinina fueron similares entre todos los pacientes fenilcetonúricos independientemente de presentar enfermedad mineral ósea, diagnóstico tardío o tratamiento con tetrahidrobiopterina.

Los pacientes con disminución de FAO y β -cross-lap recibieron menor ingesta de proteínas naturales: FAO ($0,21\pm 0,13$ gr/kg vs $0,65\pm 0,65$ gr/kg $p<0,05$); β -cross-lap ($0,29\pm 0,23$ gr/kg vs $0,65\pm 0,66$ gr/kg, $p<0,05$). Ninguno de los tratados con tetrahidrobiopterina presentó valores alterados de marcadores óseos.

Conclusiones: Los pacientes adultos fenilcetonúricos con menor ingesta de proteínas naturales tienden a presentar valores disminuidos de FAO, marcador que puede resultar útil para identificar a los pacientes con riesgo de presentar EMO.

ABSTRACT

Background and objective: Mineral bone disease is more common in phenylketonuric patients. The objectives of this study were to determine the usefulness of biochemical bone markers to identify phenylketonuric patients with mineral bone disease and know the underlying bone remodeling alterations.

Patients and method: Cross-sectional study of 43 phenylketonuric patients > 7years (range: 7,1-41 years). Nutritional survey was performed and determination of bone alkaline phosphatase (BAP), procollagen type I N-terminal propeptide (PNP-1), β -cross-laps and ratio calcium/creatinine in urine.

Results: 20.9% of patients had pathological biochemical bone markers, 90% of them were adults. BAP was decreased in 70% of them and β -cross-lap in 42.8%. BAP values were pathological more often in those phenylketonuric patients diagnosed late (41,7% vs 10,7%, $p<0,05$) and in patients with mineral bone disease (60% vs 14,3%, $p<0,05$). PNP-1 values and calcium/creatinine were similar among all phenylketonuric patients regardless of presenting mineral bone disease, late diagnosis or tetrahydrobiopterin treatment (enzyme cofactor). Patients with decreased β -cross-lap and BAP, had lower natural protein intake: BAP ($0,21 \pm 0,13$ gr/kg vs. $0,65 \pm 0,65$ gr/kg $p<0,05$), β -cross-lap ($0,29 \pm 0,23$ gr/kg vs. $0,65 \pm 0,66$ gr/kg, $p<0,05$). None of tetrahydrobiopterin treated showed altered values of BAP, PNP-1 or Ca/Creatinine.

Conclusions: Adult phenylketonuric patients with lower natural protein intake, tend to have lower values of BAP, marker that may be useful to identify patients at risk for mineral bone disease.

PALABRAS CLAVE

Fenilcetonuria, Osteopenia, Tetrahidrobiopterina, Densitometría, Nutrición, Mineralización ósea.

INTRODUCCIÓN:

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica congénita, en la que se produce una alteración de la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina, debido a un déficit de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Esto ocasiona una elevación plasmática de fenilalanina, cuyo acúmulo causa patología especialmente a nivel del sistema nervioso central donde puede originar secuelas profundas e irreversibles (retraso mental, convulsiones, hiperactividad, microcefalia) así como defectos de la pigmentación, eccemas, olor a moho, etc. El tratamiento de la fenilcetonuria consiste en la restricción de fenilalanina y por tanto de proteínas naturales de la dieta, combinada con el aporte diario de una fórmula especial libre de fenilalanina y que contiene los demás aminoácidos, así como vitaminas y oligoelementos¹⁻⁴. Existe un grupo de pacientes fenilcetonúricos respondedores a la tetrahidrobiopterina (BH4), el cofactor del enzima⁵⁻⁷, lo que les permite tolerar mayores cantidades de fenilalanina y así liberalizar en diferente grado la dieta. La detección de la fenilcetonuria en el periodo neonatal mediante cribado metabólico universal^{8,9} permite el diagnóstico y tratamiento precoz de esta entidad, lo que ha logrado mejorar su pronóstico y prevenir el retraso mental y otras manifestaciones típicas de la enfermedad, pero se conoce menos de la repercusión de otros aspectos con impacto en la calidad de vida de los pacientes, como la enfermedad mineral ósea, descrita en los últimos años por varios autores^{7,10-11,14}.

La enfermedad mineral ósea (osteopenia-osteoporosis) se caracteriza por un descenso de

la densidad mineral ósea, que disminuye la resistencia del hueso y predispone a un mayor riesgo de fracturas¹⁵. En su fisiopatología intervienen el descenso de la masa ósea (influido por el sedentarismo, corticoides, dieta pobre en calcio, carga genética, etc^{16,17}) y el deterioro de la microarquitectura ósea (la resorción ósea supera a la formación). La densitometría, es una exploración complementaria para determinar la densidad mineral ósea, pero no informa sobre la situación del remodelado óseo, cuya alteración puede derivar en enfermedad mineral ósea. El remodelado óseo se puede valorar a través de marcadores bioquímicos, tanto de formación (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, osteoprotegerina, propéptido aminoterminal del procolágeno 1 y propéptido carboxi terminal del procolágeno 1), como de resorción (relación calcio/creatinina en orina, fosfatasa alcalina ácida tartrato resistente, hidroxiprolina, deoxipiridinolina, telopéptido carboxi-terminal del colágeno tipo I (β -cross-laps) , etc)¹⁸⁻²⁰. Su determinación es más habitual en adultos, existiendo escasos estudios sobre los valores de referencia en la infancia²¹⁻²³.

El objetivo de este estudio es valorar el remodelado óseo en pacientes con fenilketonuria a través de la determinación de marcadores bioquímicos, con el fin de conocer las alteraciones subyacentes en la formación y/o resorción ósea, que expliquen la mayor tendencia a presentar enfermedad mineral ósea de estos pacientes. Además, evaluar si dichos marcadores pueden ser de utilidad clínica para identificar a los pacientes en riesgo de desarrollar enfermedad mineral ósea.

PACIENTES Y MÉTODOS:

Diseño del estudio y población

Estudio observacional transversal realizado desde octubre de 2010 a diciembre de 2011 en nuestro centro de referencia en Galicia para Enfermedades Metabólicas Congénitas.

Se incluyeron a los pacientes mayores de 7 años, diagnosticados de fenilcetonuria, tanto los diagnosticados precozmente mediante cribado neonatal, como los diagnosticados tardíamente a través de la sintomatología clínica o por estudio familiar. Se excluyeron las hiperfenilalaninemias moderadas (fenilalanina $<600\mu\text{mol/L}$ al diagnóstico), y aquellos casos en los que el consentimiento informado no fuese firmado por los padres y/o pacientes.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de nuestro Hospital. Todos los pacientes o sus padres (en los menores de 16 años) fueron debidamente informados y firmaron un consentimiento informado para entrar en el estudio.

Recogida de datos

Se recogieron de cada paciente datos de: edad, sexo, fenotipo bioquímico de fenilcetonuria, tipo de diagnóstico (precoz o tardío), encuesta nutricional mediante recogida de ingesta durante una semana, tratamiento o no con BH4, valores séricos de calcio, fósforo, 25-hidroxivitamina D, paratohormona (PTH), calcitriol, fosfatasa alcalina ósea, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I, β -cross-laps, relación Ca/Creatinina en orina y densitometría ósea.

El fenotipo de fenilcetonuria se estableció en función de los valores plasmáticos de fenilalanina al diagnóstico: fenilcetonuria clásica si valores de fenilalanina $>1200\mu\text{mol/L}$; fenilcetonuria moderada si fenilalanina entre $900-1200\mu\text{mol/L}$ y fenilcetonuria leve si fenilalanina entre $600-900\mu\text{mol/L}$.

Se estableció un grupo control con 39 personas sanas de similares características en edad y sexo para los pacientes de menos de 20 años ($N=23$), a fin de comparar marcadores de remodelado óseo. Los valores de los pacientes adultos ($N=20$) se compararon con los valores de referencia del Laboratorio de nuestro Centro.

Método

1 Las extracciones sanguíneas se realizaron entre las 08-10 horas a.m., tras permanecer el
2 paciente 12 horas en ayunas. Calcio y fósforo fueron determinados por procedimientos
3 standard con el analizador Advia 2400 (Siemens, Erlangen, Alemania). La PTH fue
4 determinada con Cobas e601 (Roche Diagnostics, Lucerna, Suiza), 25-hidroxivitamina
5 D por inmunoanálisis, (DiaSorin, Saluggia, Italia) y calcitriol mediante
6 radioinmunoanálisis.
7

8 La medición de fosfatasa alcalina ósea se realizó mediante ELISA (Ostease® BAP,
9 Immundiagnostic Systems Ltd, Boldon, UK), tomándose como valores normales para
10 adultos: 15-40 UI/L en mujeres y 19-52 UI/L en hombres. La medición de propéptido
11 aminoterminal del procolágeno tipo I y β -cross-laps se realizó en muestra de suero
12 mediante inmunoensayo por electroquimioluminiscencia (Cobas e601 Roche) tomando
13 como valores de referencia los aportados por el propio fabricante, teniendo en cuenta
14 que a partir de los 20 años se ha alcanzado el 90% del pico de masa ósea, con valores de
15 remodelado óseo estables: 12,7-42,9 ng/mL para propéptido aminoterminal del
16 procolágeno tipo I y 0,16-0,44 ng/mL para β -cross-laps. La determinación de
17 Ca/Creatinina en orina se llevó a cabo tras recogida de orina de 24 horas,
18 considerándose normales valores menores o iguales a 0,22 para todos los pacientes.
19

20 En los menores de 20 años, los valores de fosfatasa alcalina ósea, propéptido
21 aminoterminal del procolágeno tipo I, β -cross-laps y relación Ca/Creatinina fueron
22 comparados con el grupo control sin objetivarse diferencias significativas: fosfatasa
23 alcalina ósea ($96,1 \pm 36$ vs 99 ± 36 ng/mL); propéptido aminoterminal del procolágeno
24 tipo I ($614,5 \pm 156$ vs 560 ± 193 ng/mL); β -cross-laps ($1,11 \pm 0,33$ vs $1,25 \pm 0,35$ ng/mL);
25 relación Ca/Creatinina ($0,12 \pm 0,06$ vs $0,16 \pm 0,07$).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Los cálculos nutricionales se realizaron a través de un software propio: www.odimet.es. Se calculó para cada paciente la relación del aporte de proteínas naturales (gr)/ peso del paciente (kg), y la ingesta de calcio y de fósforo (mg/día). Se compararon los resultados obtenidos con los datos de la densitometría ósea (densidad ósea de columna lumbar (L2, L3 and L4) y fémur proximal por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA LUNAR DPX, General Electric) recogidos en el mismo período de estudio y que fueron publicados recientemente²⁴.

Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico informático SPSS® en su versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos). Los resultados del análisis descriptivo se expresaron tanto en valores absolutos como en porcentaje. Cuando corresponde, los datos se expresaron como media ($\pm$ desviación estándar). Se consideró significativa una $p < 0,05$. La comparación de variables cualitativas y cuantitativas discretas se realizó empleando la prueba de Chi-cuadrado y el Test exacto de Fisher. Se determinó el ajuste de variables a la normalidad. La comparación de medias de variables cuantitativas se hizo mediante el test T-Student si seguían distribución normal y mediante la prueba de U de Mann-Whitney si no la seguían.

RESULTADOS

Durante el período de estudio se valoraron 43 pacientes fenilcetonúricos: 18 hombres y 25 mujeres, con una media de edad de 17,56 años (intervalo: 7,1-41 años), de ellos 23 son menores de 20 años; 29 fueron de diagnóstico precoz y 14 de tardío. Tenían fenotipo de fenilcetonuria clásica 27 pacientes, 9 de fenilcetonuria moderada y 5 de fenilcetonuria leve. Recibieron 12 de ellos tratamiento con BH4.

Diez (20,9%) de los 43 pacientes a estudio presentaron algunos de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo patológicos (fosfatasa alcalina ósea, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I, β -cross-laps en sangre y/o relación Ca/Creatinina en orina) (Tabla 1). Todos los pacientes excepto uno tenían más de 20 años de edad (edad media: $28,7 \pm 11,3$ años).

Marcadores de formación: El marcador más frecuentemente alterado en estos pacientes fue la fosfatasa alcalina ósea, que estaba disminuida en el 70%; de éstos, estos valores de fosfatasa alcalina fueron patológicos con más frecuencia en los pacientes que habían sido diagnosticados de fenilcetonuria tardíamente (41,7% vs 10,7%, $p < 0,05$) y en el grupo de pacientes con enfermedad mineral ósea (60% vs 14,3%, $p < 0,05$).

Todos los pacientes menores de 20 años presentaron valores de fosfatasa alcalina ósea para la edad similares a los del grupo control, salvo uno que presentó cifras elevadas. Los valores de propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I fueron similares entre todos los pacientes fenilcetonúricos, independientemente de presentar enfermedad mineral ósea, diagnóstico tardío o tratamiento con BH4.

Marcadores de resorción: El 42,8% de los pacientes con valores bajos de fosfatasa alcalina ósea (3/7 pacientes) también presentaban disminución de β -cross-laps.

Con respecto a los valores de Ca/Creatinina, no se objetivaron diferencias entre todos los pacientes con fenilcetonuria del estudio.

Marcadores óseos y dieta: Los pacientes con valores disminuidos tanto de fosfatasa alcalina ósea como de β -cross-laps recibieron menor ingesta de proteínas naturales por kg de peso, que los pacientes con valores normales (fosfatasa alcalina ósea ($0,21 \pm 0,13$ gr/kg vs $0,65 \pm 0,65$ gr/kg $p < 0,05$); β -cross-laps ($0,29 \pm 0,23$ gr/kg vs $0,65 \pm 0,66$ gr/kg, $p < 0,05$); en cambio, los valores de calcitriol fueron más elevados, aunque sin

diferencias significativas y no se hallaron diferencias en cuanto a los valores de PTH, ni de 25-hidroxivitamina D.

La ingesta de calcio fue significativamente mayor en los pacientes con fosfatasa alcalina ósea y β -cross-laps bajas, y en los que presentaban índices de Ca/Creatinina en orina elevados. La ingesta de fósforo sólo fue mayor en los pacientes con valores bajos de β -cross-laps (Tabla 2).

Marcadores óseos y terapia con BH4: Ninguno de los pacientes tratados con BH4, con una mayor relación de ingesta de proteínas naturales ($1,03 \pm 0,89$ gr/kg vs $0,37 \pm 0,31$ gr/kg, $p < 0,05$), presentó valores alterados de fosfatasa alcalina ósea, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I, β -cross-laps ni de la relación Ca/Creatinina (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La enfermedad mineral ósea es más frecuente en los pacientes con fenilcetonuria^{10-13,25-28} que en población normal. No conocemos las alteraciones en el remodelado óseo que explican esta mayor incidencia. Sería además interesante conocer si existen marcadores bioquímicos de remodelado óseo que se alteren en estos casos, permitiendo de una forma poco invasiva detectar a los pacientes fenilcetonúricos con riesgo de presentar enfermedad mineral ósea, con el objetivo de anticiparnos a la pérdida de densidad mineral ósea objetivable por densitometría.

Observamos en nuestro estudio, al igual que en el de Millet y cols²⁵ valores de fosfatasa alcalina ósea disminuidos en el 53,8% del grupo de pacientes mayores de 20 años, reflejando una menor formación ósea en la edad adulta, lo que podría justificar per se, la mayor predisposición a enfermedad mineral ósea en estos pacientes. Sin embargo, los valores son normales en menores de 20 años (salvo en un paciente en el que se

1 encontraba elevado) en contraposición con otros estudios^{11,28} que objetivan también
2 disminución de marcadores de formación ósea (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina,
3 osteoprotegerina) tanto en niños como adultos. Desconocemos el motivo por el que, en
4 nuestro caso, ninguno de los pacientes menores de 20 años presentase los marcadores de
5 formación ósea disminuidos. De todas formas, la heterogeneidad de las poblaciones a
6 estudio, en cuanto a la precocidad del tratamiento de la fenilcetonuria, el control de la
7 dieta o el tratamiento con la BH4, podrían justificar estas diferencias entre estudios.
8

9 Los valores de propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I, no estaban alterados en
10 ninguno de los pacientes que desarrollaron enfermedad mineral ósea; por lo que parecen
11 poco útiles para valorar el remodelado óseo en estos pacientes; en la literatura no existe
12 referencia a la utilidad de este marcador en el estudio de la enfermedad mineral ósea en
13 los pacientes con fenilcetonuria.
14

15 Con respecto a los marcadores de resorción, β -cross-laps y relación Ca/Creatinina en
16 orina, no estaban elevados en ningún grupo de edad, siendo incluso más bajos en los
17 menores de 20 años fenilcetonúricos comparados con el grupo control, aunque sin
18 alcanzar significación estadística. Esto coincide con lo publicado por Hillman et al¹¹,
19 que analiza el Ca/Creatinina y la fosfatasa alcalina ácida tartrato resistente en niños
20 fenilcetonúricos y con Ambroszkiewicz et al²⁸ que encuentra concentraciones de β -
21 cross-laps más bajas en los pacientes con fenilcetonuria. Esta disminución en la
22 resorción ósea, sumada a la disminución en la formación, refleja una disminución en el
23 recambio óseo global, que puede justificar el desarrollo de enfermedad mineral ósea en
24 estos pacientes. Contrariamente, De Groot et al²⁷ sostiene que la resorción ósea puede
25 ser un mecanismo clave en el desarrollo de la enfermedad mineral ósea en los
26 fenilcetonúricos, al comprobar mayores concentraciones de fósforo y fosfatasa alcalina
27 en los niños fenilcetonúricos con valores menores de densidad mineral ósea, aunque
28

ambos marcadores son en realidad muy poco específicos para determinar la resorción ósea.

Por otro lado, en los pacientes con cifras bajas de fosfatasa ósea, la ingesta de proteínas naturales por kg de peso fue inferior ($p=0,002$) y se sabe que una ingesta proteica adecuada es fundamental para la formación ósea^{29,30}. El tratamiento con BH4 permite una mayor ingesta de proteínas naturales³¹, y en nuestro estudio, ninguno de los que recibieron dicho tratamiento presentó descenso en la densidad mineral ósea en la densitometría, ni disminución en la formación ósea cuantificada por descenso en la fosfatasa alcalina ósea; lo que refuerza la importancia de la ingesta proteica en el desarrollo de la enfermedad mineral ósea.

El calcitriol participa en la formación ósea al facilitar la absorción de calcio y fósforo de la dieta. En nuestro estudio encontramos concentraciones significativamente mayores de calcitriol en los pacientes con valores menores de fosfatasa ósea, aunque las concentraciones de 25- OHD y PTH fueron similares a los demás pacientes fenilcetonúricos; siendo también similar la ingesta de fósforo y significativamente superior la de calcio; habiendo sido observada también en estudios previos la independencia de desarrollo de enfermedad mineral ósea de la ingesta de calcio en la fenilcetonuria^{9,12,32}. De todo ello podemos concluir que el estudio de la vitamina D no sería un buen parámetro para valorar el riesgo de desarrollo de enfermedad mineral ósea en los pacientes con fenilcetonuria.

La mayor predisposición de los pacientes fenilcetonúricos a desarrollar enfermedad mineral ósea es una realidad. Nos faltan todavía por conocer cuáles son los mecanismos fisiopatológicos que la desencadenan; pero sabemos que factores como el aporte de calcio y vitamina D no parecen ser causales en la enfermedad mineral ósea de la fenilcetonuria. A la vista de nuestros resultados consideramos que la determinación de

1 β -cross-laps, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I y relación Ca/Creatinina,
2 no son de utilidad para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad
3 mineral ósea, pero sí la fosfatasa alcalina ósea ya que valores bajos de este marcador,
4 pueden alertar sobre una menor formación de hueso, lo que sucede con más frecuencia
5 en la fenilcetonuria.
6
7
8
9

10
11 Por todo ello concluimos que la menor densidad mineral ósea en los pacientes con
12 fenilcetonuria parece no estar condicionada por una alteración en la mineralización
13 ósea, sino por una alteración en la matriz orgánica del hueso, debida probablemente a la
14 menor ingesta de proteínas naturales en estos pacientes. Los valores de fosfatasa
15 alcalina ósea bajos pueden ser útiles para identificar a estos pacientes.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 **BIBLIOGRAFÍA**

- 27
28
29 1. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria.
30 Recomendations on the dietary management of phenylketonuria. Arch Dis Child 1993;
31 68: 426--27.
32
33
34
35
- 36 2. Huemer M, Huemer C, Möslinger D, Huter D, Stöckler-Ipsiroglu S. Growth and body
37 composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review
38 of the literature. J Inherit Metab Dis 2007; 30:694-99
39
40
41
42
- 43 3. Acosta PB, Yannicelli S, Marriage B, Mantia C, Gaffield B, Porterfield M, et al.
44 Nutrient intake and growth of infants with phenylketonuria undergoing therapy. J
45 Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27(3): 287-91.
46
47
48
49
50
- 51 4. Campistol J, González MJ, Gutiérrez AP, Vilaseca MA; Grupo Colaborativo de
52 Unidades de Seguimiento Españolas. Tratamiento y control de los pacientes con
53 fenilcetonuria: resultados del Grupo Colaborativo de Unidades de Seguimiento en
54 España. Med Clin (Barc) 2012;138:185-91.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2 5. Spaapen LJ, Rubio-Gozalbo ME. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine
3 hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab*. 2003; 78(2): 93-99.
4
- 5
6 6. Lambruschini N, Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Artuch R, Gassió R, et al.
7 Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin
8 monotherapy. *Mol Genet Metab* 2005;86 :S54-60.
9
- 10
11 7. Bóveda MD, Couce ML, Castiñeiras DE, Cocho JA, Perez B, Ugarte M, et al. The
12 tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation
13 of response and subsequent treatment. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:812.
14
- 15
16 8. Juan-Fita MJ, Egea-Mellado JM, González-Gallego I, Moya-Quiles MR, Fernández-
17 Sánchez A. Cribado neonatal ampliado en la Región de Murcia. Experiencia de tres
18 años. *Med Clin (Barc)* 2012 1;139:566-71.
19
- 20
21 9. Couce ML, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Baña A, Cocho JA, Iglesias AJ, Colón C,
22 Alonso-Fernández JR, Fraga JM. Evaluation and long-term follow-up of infants with
23 inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Mol Genet*
24 *Metab* 2011;104:470-5.
25
- 26
27 10. Pérez Dueñas B, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho
28 JA. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 2002;
29 91:899-904
30
- 31
32 11. Hillman L, Schlotzhauer C, Lee D, Grasela J, Witter S, Allen S, et al. Decreased
33 bone mineralization in children with phenylketonuria under treatment. *Eur J Paediatr*
34 1996; 155 (Suppl 1):148–52
35
- 36
37 12. Al-Qadreh A, Schulpis KH, Athanasopoulou H, Mengreli C, Skarpalezou A,
38 Voskaki I. Bone mineral status in children with phenylketonuria under treatment. *Acta*
39 *Pædiatr* 1998; 87: 1162–6
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

13. Zeman J, Bayer M, Stepan J. Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Pædiatr* 1999; 88: 1348–51
14. Mendes AB, Martins FF, Cruz WM, da Silva LE, Abadesso CB, Boaventura GT, Bone development in children and adolescents with PKU. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35 : 425–30.
15. NIH Consensus Development Panel. Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA* 2001; 285:785-95
16. Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol* 2003; 177: 147-96
17. Zmuda JM, Sheu YT, Moffett SP. Genetic epidemiology of osteoporosis: past, present and future. *Curr Osteoporos Rep* 2005; 3: 111-15
18. Cons MF. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. *RevMetabol Os Min* 2003; 1: 91–98.
19. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover. Part II: Clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006; 27: 123-38.
20. Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012; 32:105-12.
21. Manjón Llorente G, Fernández Espuelas C. Normal values of bone turnover markers in childhood. *An Pediatr (Barc)* 2004; 60: 330-36.
22. Crofton PM, Evans N, Taylor MR, Holland CV. Serum CrossLaps: pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002; 48:671–73.
23. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex and Age-Specific Reference Curves for Serum Markers of Bone Turnover in Healthy Children from 2 Months to 18 Years. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 443-49.

24. Mirás A, Bóveda MD, Leis MR, Mera A, Aldámiz-Echevarría L, Fernández-Lorenzo JR, et al. Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab* 2013; 108:149-54.
25. Millet P, Vilaseca MA, Valls C, Pérez Dueñas B, Artuch R, Gómez L, et al. Is deoxypyridinoline a good resorption marker to detect osteopenia in phenylketonuria?. *Clin Biochem* 2005;38: 1127-32.
26. Koura HM, Abdallah Ismail N, Kamel AF, Ahmed AM, Saad Hussein A, Effat LK. A long-term study of bone mineral density in patients with phenylketonuria under diet therapy. *Arch Med Sci* 2011; 7: 493–500.
27. de Groot MJ, Hoeksma M, van Rijn M, Slart RH, van Spronsen FJ. Relationship between lumbar bone mineral density and biochemical parameters in phenylketonuria patients, *Mol Genet Metab* 2012; 105: 566–70.
28. Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Chelchowska M, Ołtarzewski M, Laskowska-Klita T, Nowacka M, et al. Concentration of osteoprotegerin, bone formation and resorption markers in patients with phenylketonuria. *Pol Merkur Lekarski* 2008; 25:57-60.
29. Teegarden D, Lyle RM, McGabe GP, McGabe LD, Proulx WR, Michon K, et al. Dietary calcium, protein and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:749-58
30. Hannam MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2504-12
31. Hennermann JB, Buhrer C, Blau N, Vetter B, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2005; 86:S86-S90.

32. Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R, et al. Peak
bone mass in patients with phenylketonuria, J Inherit Metab Dis 2007; 30: 202–8.

PACIENTE	EDAD	SEXO	FENOTIPO	DIAGNÓSTICO TARDÍO	EMO	BH4	FAO	PNP-1	B-CTX	Ca/Cr
5	37	V	Clásica	Sí	No	No	25,5	55,8**	0,5**	0,2
13	30	V	Moderada	Sí	Sí	No	15,2*	37,9	0,1*	0,2
16	26	M	Clásica	Sí	Sí	No	22,1	42,9	0,3	0,3**
21	23	M	Clásica	No	No	No	12,5*	42,4	0,4	0,1
29	23	M	Clásica	No	No	No	7*	31,6	0,2	0,1
30	8	V	Clásica	No	Sí	No	140**	632,4	0,7	-
33	41	V	Clásica	Sí	Sí	No	16,4*	36,7	0,3	0,2
34	38	M	Clásica	Sí	No	No	11,7*	23,1	0,2	0,3**
37	36	M	Moderada	Sí	No	No	14,5*	35,9	0,1*	0,2
38	36	M	Clásica	Sí	No	No	11,7*	10,4*	0,1*	-

TABLA 1. Pacientes fenilcetonúricos con marcadores bioquímicos de remodelado óseo alterados
Edad (años). Sexo: V (varón), M (Mujer). EMO: enfermedad mineral ósea. BH4 (Tratados con BH4). FAO: fosfatasa alcalina ósea (mcg/L); β -cross-laps (ng/mL), PNP-1: propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (ng/mL), Ca/Cr (mg/mg). *: niveles por debajo de lo normal. **: niveles por encima de lo normal.

	Pacientes con FAO ↓	Pacientes con FAO normal	Pacientes con β- CTx ↓	Pacientes con β- CTx normal	Ca/Cr ↑	Ca/Cr normal
25-OH D (ng/mL)	31,66±12,22	27,23±9,74	29,5±0,70	29,25±11,74	21,00±3,07	29,27±10,22
Calcitriol(pg/ mL)	79,57±31,66*	56,36±17,23*	86,33±38,37*	59,17±19,07*	57,00±17,02	63,41±23,06
PTH (pg/mL)	31,57±10,13	30,67±9,07	33,00±9,16	32,11±10,42	32,00±1,04	31,41±8,73
Ingesta de Ca (mg/día)	1416,00±780,71*	1015,94±309,66*	2101,50±125,51*	1015,84±300,64*	1256,50±20,50*	1068,22±453,10*
Ingesta de P (mg/día)	1511,50±757,385	1179,94±270,107	2200,50±118,2*	1167,65±275,95*	1334,50±99,70	1242,91±423,29

TABLA 2. Comparación de los niveles sanguíneos de 25-OH D, Calcitriol, PTH e ingesta de calcio y fósforo entre los pacientes con niveles normales de FAO, β-CTx y Ca/Cr y los pacientes con niveles alterados
Datos expresados como media ± SD
*P<0,05

Paciente	Edad (años)	Sexo	Fenotipo	Dosis media de BH4 mg/kg/día	Tolerancia a la Phe Post-BH4 mg/día	FAO μg/L	PNP-1 ng/mL	β-CTx ng/mL	Ca/Cr	Ratio ingesta Prot (g)/ peso (Kg)
2	14	M	Leve	8.9	Dieta libre monitorizada	79,6	356,3	0,6	-	0,40
7	20	M	Moderada	9.3	750	28	29,8	0,4	0,2	0,33
10	8	V	Leve	10	Dieta libre monitorizada	85	654,7	1,3	0,1	1,00
14	12	V	Clásica	12.5	513	85	472,3	0,9	0,2	0,34
17	15	M	Moderada	9.5	739	80,1	494,0	1,9	0,1	0,50
22	12	M	Leve	9.4	Dieta libre monitorizada	88	892,4	1,4	0,1	1,40
26	14	V	Leve	10	Dieta libre monitorizada	90	535,8	1,1	0,1	1,60
27	18	M	Leve	10	Dieta libre monitorizada	16,8	71,9	0,5	0,1	0,71
39	7	M	Moderada	11.6	830	79	527,5	0,9	0,2	0,86
40	7	M	Moderada	10	Dieta libre monitorizada	74,1	506,1	0,8	0,1	0,82
41	23	V	Moderada	9.7	Dieta libre monitorizada	-	-	-	-	-
43	22	M	Leve	9.1	Dieta libre monitorizada	36,6	68,8	0,3	-	0,75

TABLA 3. Pacientes tratados con BH4: niveles de marcadores de remodelado óseo y ratio de ingesta de proteínas naturales por kg de peso. V (varón), M (Mujer). FAO: fosfatasa alcalina ósea; β-cross-laps (ng/mL), PNP-1: propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I; Ca/Cr: Calcio/creatinina en orina