

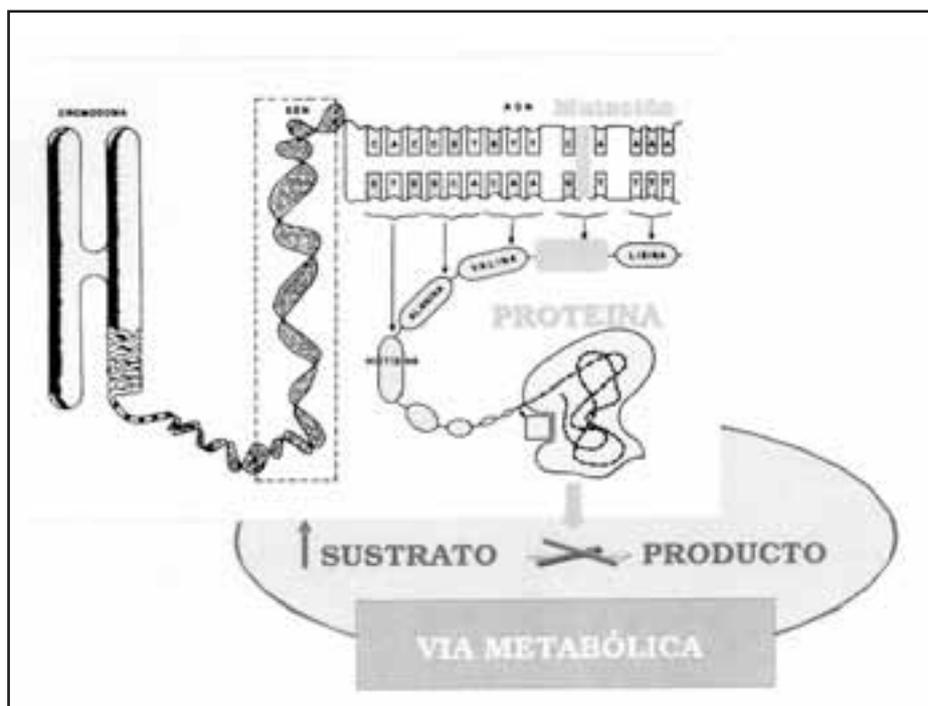
2.6 PREVENCIÓN DE ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO

Magdalena UGARTE
Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular
Directora del Centro de Diagnóstico
de Enfermedades Moleculares
Universidad Autónoma de MADRID

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son alteraciones bioquímicas de origen genético, debidas a un defecto específico en la estructura o función de las moléculas de proteínas.

El **origen** de los ECM es siempre una modificación en la estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codifica para la síntesis de una determinada molécula de proteína. Cuando la mutación incide sobre algunos aminoácidos que ocupan en la secuencia un lugar clave para una disposición estéricamente activa de la proteína, puede disminuirse, e incluso anularse, la capacidad funcional de la misma. Si la mutación o cualquier otro tipo de alteración de la molécula de DNA es de suficiente entidad como para desequilibrar el conjunto, se producirá una alteración del fenotipo metabólico y se manifestará entonces la enfermedad.

FIGURA 1: Origen genético de los Errores Congénitos del Metabolismo



La **severidad de la afección** es muy variable y dependerá de muchos factores, fundamentalmente del grado de alteración que se produzca en la proteína y de su incapacidad funcional, pero sobre todo de lo importante que sea la vía metabólica afectada para el mantenimiento de la homeostasis celular.

La **simptomatología clínica** de los ECM es muy diversa, como diversos son los procesos metabólicos afectados. Pueden manifestarse como síntomas aislados o diferentes combinaciones que impliquen a diferentes órganos. En la **TABLA 1** se intentan resumir las principales manifestaciones clínicas, acompañadas de algunos ejemplos representativos.

TABLA 1: Consecuencias clínicas de los errores congénitos del metabolismo

AFECCIONES SISTÉMICAS (acidemias orgánicas, defectos del ciclo de la urea y del metabolismo del glucógeno).

1. Manifestaciones de hipoglicemia, acidosis láctica, hiperamonemia.
2. Enfermedades neonatales graves.
3. Cuadros de presentación periódica.

SISTEMA NERVIOSO

1. Retraso psicomotor: la mayoría de los errores congénitos del metabolismo (Fenilcetonuria, p.e)
2. Manifestaciones neurológicas: convulsiones, ataxia, parálisis, alteraciones en tono muscular, letargo y coma (defectos metabólicos del piruvato, acidemias orgánicas, defectos purinas y pirimidinas).
3. Ojo: ceguera (Tay-Sachs), catarata (galactosemia), luxación del cristalino (homocistinuria), cristales en córnea (cistinosis), opacidad corneal (mucopolisacaridosis).
4. Neurona motora inferior (leucodistrofia metacromática, deficiencia de b-metilcrotonil-CoA carboxilasa).
5. Trastornos de la conducta (síndrome de Lesch-Nyhan, porfiria intermitente aguda).

SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO

1. Músculo (enfermedad de McArdle, miopatías mitocondriales).
2. Esqueleto (raquitismo hipofosfatémico, deformaciones óseas en homocistinuria y en mucopolisacaridosis).
3. Articulaciones (gota, alcaptonuria).

SANGRE Y APARATO CARDIOVASCULAR

1. Anemia (deficiencias en enzimas glicolíticas y de la vía de pentosas en eritrocito, sangrado por trastornos de coagulación).
2. Cardiomegalia, insuficiencia cardíaca (glucogenosis de Pompe).
3. Aterosclerosis y enfermedad coronaria (hipercolesterolemia familiar, homocistinurias).

PULMÓN: enfisema por deficiencia de alfa-1-antitripsina.

RIÑÓN

1. Litiasis (cistinuria, síndrome de Lesch-Nyhan).
2. Insuficiencia renal (enfermedad de Fabry, tirosinemia tipo I hepatorenal).
3. Tubulopatías (síndrome de Fanconi, enfermedad de Hartnup), Cistinosis.

APARATO DIGESTIVO

1. Dolor abdominal y síntomas gastrointestinales (porfiria intermitente aguda).
2. Vómitos que simulan estenosis pilórica (acidemias orgánicas).
3. Diarrea y malabsorción intestinal (deficiencia de disacaridasas, fibrosis cística).
4. Hepatopatía (tirosinemia tipo I, intolerancia a la fructosa, enfermedad de Wilson).
5. Visceromegalia (enfermedad de Gaucher, de Niemann-Pick).

PIEL Y ANEXOS: albinismo, fotosensibilidad en porfirias, alopecia en deficiencia congénita en biotinidasa, tricorrexis nudosa en argininsuccinuria, úlceras de la piel en xeroderma pigmentosa, tirosinemia tipo II.

RESPUESTA ANORMAL A FÁRMACOS (anemia hemolítica en deficiencia de glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa, parálisis muscular en deficiencia de pseudocolinesterasa sérica).

DISMORFIAS: Fascies tosca (mucopolisacaridosis), mamilas invertidas, retrognatia (defectos de glicosilación), sindactilia (defectos en la síntesis de colesterol, Smith-Lemitz-Opitz).

El **tipo de herencia** de los ECM es en la mayoría de los casos de la forma autosómica recesiva. Los heterocigotos, portadores del gen mutante, presentan un fenotipo normal. En este tipo de herencia, los padres de los individuos afectados tienen que ser, necesariamente, portadores ambos del gen mutante. En cada nuevo embarazo que se produzca entre dos portadores tendrán el 25% de probabilidades de tener un hijo afectado, un 25% de que sea absolutamente normal y un 50% de que sea portador, igual que los padres. En aquellos ECM en los que el modo de herencia sea recesivo ligado al cromosoma X, si la madre es portadora, cada hijo varón tendrá un riesgo del 50% de padecer la enfermedad y, como promedio, la mitad de las hijas serán portadoras. Por último, en aquellos que se heredan con carácter dominante, el 50% de los hijos de un sujeto enfermo padecen también la enfermedad.

La **frecuencia** de los ECM es, afortunadamente, baja por lo que entran dentro del grupo que se consideran como *enfermedades raras*. Según la definición de la Unión Europea, enfermedades raras son aquellas que tienen una frecuencia de 5 casos en 10000 habitantes. Sin embargo son muy numerosos, se conocen más 500 errores innatos del metabolismo definidos hasta el momento. En su conjunto estas enfermedades tienen un gran impacto sobre la salud en términos de seguridad reproductiva, morbilidad perinatal, infantil y de edad adulta. En la fig.2 se relata la frecuencia de algunos ECM en relación con el tipo de herencia.

FIGURA 2: Frecuencia de algunos ECM y tipo de herencia

Autosómica dominante	Hiporcolesterolemia familiar	1.500
	Huntington	11:5.000
	Síndrome de Marfan	1:20.000
	Fibrosis quística	1:2.500 (población caucasiana)
	Enfermedad de Tay-Sachs	1:3.000 (Judíos Ashkenazi)
	Deficiencia de acil-CoA	1:10.000 (población caucasiana)
	Des-hidrogenasa de cadena media	1:50.000 (población española)
Autosómica recesiva	Fenilcetonuria	1:12.000
	Enfermedad de Canavan	1:14.000 (Judíos Ashkenazi)
	Mucopolisacaridosis	1:25.000
	Jarabe de Arce	1:40.000 (población española)
		1:226.000 (población general)
	Acidemia Metilmalónica	1:48.000
	Glucogenosis (todos los tipos)	1:50.000
	Galactosemia	1:62.000
	Deficiencia en Biotinidasa	1:110.000
Ligados al X	Distrofia muscular de Duchenne	1:3.000
	Adrenoleucodistrofia	1:20.000
	Síndrome de Lesch-Nyhan	1:380.000 (población canadiense)
	Enfermedad de Hunter	1:111.000

1. DIAGNÓSTICO

Existen varios niveles en el diagnóstico de los ECM. La medida de los metabolitos que se acumulan en los fluidos biológicos (orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, sudor, etc.), como consecuencia del defecto enzimático, suele ser la forma más fácil de diagnóstico. En los programas de cribado neonatal se utiliza una gota de sangre impregnada en papel, concretamente extraída del talón, de ahí el nombre de “prueba del talón” con la que se conoce a este tipo de análisis (FIGURA 3).

FIGURA 3: Toma de muestra de sangre para la “prueba del talón”



En España existen 22 laboratorios (FIGURA 4) que realizan la prueba del talón para el diagnóstico a toda la población recién nacida de al menos dos enfermedades fenilcetonuria e hipotiroidismo congénito, aunque esta última no se considera un ECM, sí se incluye en los programas de detección masiva neonatal por las posibilidades de tratamiento y prevención del daño neurológico que ocasiona la falta de hormona tiroidea durante el desarrollo.

Hasta finales del año 2001 se han analizado mediante esta prueba a más de ocho millones de recién nacidos (8.310.324) y se han diagnosticado 812 casos de fenilcetonuria, lo que da una incidencia de 1:10.324, similar a la encontrada en Europa.

Los avances metodológicos de la última década han contribuido a aumentar de forma espectacular el número de ECM detectables con la muestra de sangre impregnada en papel usada en estos programas de cribado neonatal, de forma que ya son muchos los países que utilizan la *espectrometría de masas en tandem* para la detección precoz de más de 30 enfermedades metabólicas. La mayoría de estas enfermedades son tratables en el sentido de que el conocimiento precoz de la existencia de la enfermedad permite adoptar medidas que pueden mejorar el curso de su evolución favorablemente. Es verdad que en algunas de ellas no se tienen datos suficientes de la eficacia del tratamiento porque de la forma con la que se diagnostican ahora, en base a la aparición de los síntomas, es a veces demasiado tarde, ya se han producido daños neurológicos irreversibles y por tanto los resultados no son tan buenos como serían deseables. En España solo existe un centro de cribado que utilice este nuevo método para la detección de ECM, el centro del Hospital General de Galicia. Es previsible y deseable que en

FIGURA 4: Centros de cribado neonatal en España



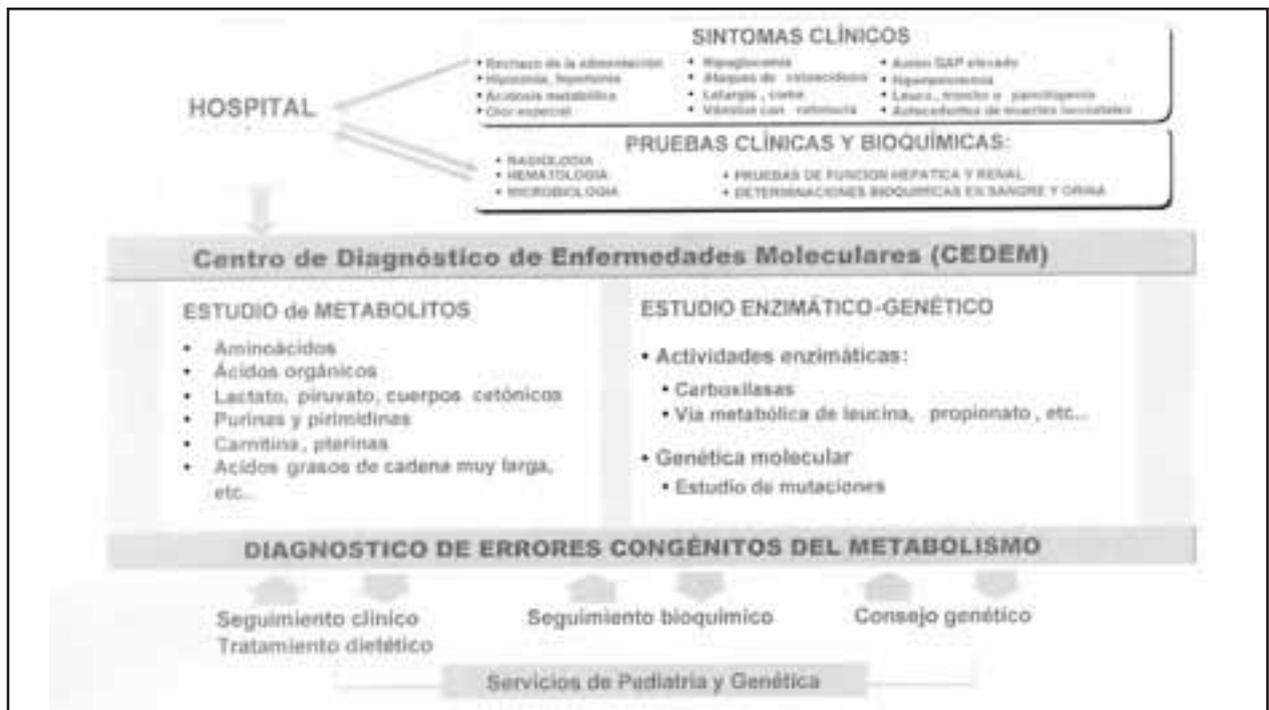
breve otros grupos españoles se unan a la iniciativa. Una sola de las enfermedades que detecta este nuevo método, un defecto de la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media, puede ocasionar la muerte súbita, y sin embargo el tratamiento es enormemente eficaz y fácil de aplicar.

El resto de los ECM se detecta a la aparición de los síntomas, y son los pediatras los que tienen que sospechar en base a la sintomatología clínica, antecedentes familiares y datos de laboratorio básico la posible existencia de un ECM. El diagnóstico bioquímico, en estos casos, se realiza en Centros especializados de referencia, en base a los niveles de metabolitos elevados en fluidos biológicos. En la FIGURA 5 se esquematizan los distintos niveles de estudio hasta llegar al diagnóstico y consecuente tratamiento por parte del pediatra y seguimiento tanto clínico como bioquímico de los pacientes.

Los estudios enzimáticos en linfocitos o fibroblastos humanos obtenidos por biopsia de piel o de otros tejidos, son de enorme interés para la caracterización de la proteína deficiente. Los estudios en hígado, músculo, cerebro, intestino, etc., han permitido el reconocimiento de la verdadera etiología de muchos ECM y han puesto de manifiesto la heterogeneidad que existe dentro de una misma enfermedad.

Los avances recientes en las técnicas de DNA recombinante y muy especialmente la posibilidad de poder amplificar el DNA humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han hecho posible el estudio de estas enfermedades a nivel molecular, y en estos momentos son más de cuatrocientas las enfermedades metabólicas en las que se puede saber qué tipo de mutación o mutaciones son las responsables del defecto. Esto es de gran importancia no solo para predecir la evolución de la enfermedad en base al genotipo sino para su aplicación tanto de diagnóstico genético directo pre y postnatal como para el reconocimiento de los familiares portadores de la misma.

FIGURA 5: Diagrama de un centro de referencia para el diagnóstico de ECM



En la actualidad es posible, a pesar de la heterogeneidad genética de estas enfermedades (más de 400 mutaciones diferentes descritas en fenilcetonuria, por ejemplo), conocer las mutaciones específicas que afectan a la población española para cualquier enfermedad en la que se conozca la secuencia del gen responsable, porque se puede determinar directamente, en una muestra de sangre impregnada en papel de filtro, el genotipo del individuo y al mismo tiempo saber si es o no portador del gen mutado. Las técnicas de amplificación del DNA a *tiempo real* están suponiendo un importante avance metodológico para estos fines.

El diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas es posible con métodos bioquímicos en todos aquellos ECM en los que el defecto enzimático se exprese en tejidos periféricos. En líneas generales, cuando un enzima o proteína se expresa en fibroblastos de piel, se puede presumir que va a ser posible la medida de su actividad en células de tejido coriónico y en células de líquido amniótico cultivadas. La muestra de biopsia de corion se puede hacer a la 9.^a-10.^a semana de embarazo, con lo que el diagnóstico se adelanta considerablemente. Cuando el sistema enzimático afectado no se expresa nada más que en órganos de difícil acceso, como es el caso de la fenilcetonuria, donde la PAH se expresa únicamente en hígado, el estudio genético directo (mutaciones o polimorfismos) es el único que permite el estudio prenatal en familias de alto riesgo.

A pesar de las muchas cuestiones que pueden surgir en relación con este tema, tanto técnicas como éticas, las posibilidades de conocer el grado de afectación de un individuo antes del nacimiento en las familias de alto riesgo, constituyen un avance importante en la investigación sobre genética humana.

2. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Las posibilidades terapéuticas de los errores congénitos del metabolismo aumentan a medida que se conocen mejor los mecanismos causantes de la patología y su etiología molecular.

Para muchos ECM existe ya una terapia efectiva, en especial para aquellos en los que se conoce la anomalía bioquímica que origina. A medida que se conocen mejor las causas de la mutación responsable de un defecto específico y las consecuencias que en el metabolismo tienen dichas mutaciones, mayores posibilidades existen de aplicar nuevas medidas terapéuticas. Existen dos niveles potenciales de tratamiento: el primero sería la modificación del genotipo alterado (terapia génica) y el segundo la modificación del entorno para disminuir y en lo posible eliminar el efecto dañino del genotipo sobre el fenotipo. Hasta el momento los tratamientos utilizados con éxito lo han sido en este segundo nivel, y en especial en aquellos ECM que afectan al metabolismo de aminoácidos por la mayor facilidad de eliminar la sustancia que al no poderse metabolizar, se acumula y origina a su vez metabolitos más o menos tóxicos.

En las aminoacidopatías, la mayoría de los tratamientos posibles por el momento están dirigidos a la modificación del fenotipo de defecto, tratando de corregir las deficiencias metabólicas para así mejorar el curso de la enfermedad. La restricción de los aminoácidos precursores de las vías metabólicas afectadas en el caso de los aminoácidos esenciales ha sido el procedimiento más usado en los últimos años y de los que se han obtenido resultados muy satisfactorios. También se ha intentado, aunque en menor medida, la eliminación del sustrato acumulado, facilitando su excreción o modulando su bio-

síntesis. La exanguinotransfusión se utiliza, asimismo, para la eliminación rápida de los productos tóxicos acumulados, al tiempo que puede servir como terapia de sustitución enzimática e aquellas alteraciones donde la actividad catalítica en el tejido sanguíneo sea suficiente para evitar la anomalía bioquímica. La suplementación con vitaminas o directamente con los coenzimas implicados en los sistemas enzimáticos deficientes está favoreciendo la respuesta clínica de muchas aminoacidopatías y acidemias orgánicas, a la vez que aporta datos importantes para el reconocimiento de nuevos defectos moleculares o variantes genéticas de las mismas.

2.1. RESTRICCIÓN DE AMINOÁCIDOS

La última revisión sobre tratamiento de fenilcetonuria indica que más de ocho mil niños han sido tratados precozmente mediante la aplicación de una dieta restringida en fenilalanina. Los resultados demuestran que se ha evitado la aparición del daño neurológico propio de la enfermedad y se han aportado interesantes datos sobre los efectos de estas dietas sobre el estado nutricional de los niños y su desarrollo estatural y ponderal. Uno de los aspectos aún no resueltos es la fecha de terminación de la dieta. Los últimos datos publicados por el estudio colaborativo americano indican la conveniencia de mantener el control de los niveles plasmáticos de fenilalanina entre los límites recomendados (4-6 mg%) como mínimo hasta que termine la mielinización; por tanto, no antes de los ocho o diez años. De esta manera se evita la interferencia de la fenilalanina y sus metabolitos sobre el metabolismo cerebral en desarrollo. Después o durante la adolescencia la restricción proteica menos estricta no parece tener efectos sobre el cociente de inteligencia (CI), aunque se siguen produciendo alteraciones leves de la neurotransmisión, que a veces derivan en problemas de comportamiento. La recomendación actual es, por tanto, la continuación de la dieta hipoproteica el mayor tiempo posible. Además, en el caso de las mujeres es de especial interés que no pierdan totalmente el contacto con estos hidrolizados porque, en caso de quedar embarazadas, necesita volver a una dieta mucho más restringida (niveles no superiores a 180 μ M) y estrictamente controlada para evitar los efectos teratógenos de la fenilalanina sobre el feto, lo que se conoce como hiperfenilalaninemia materna. En cualquier caso, la presentación comercial reciente de hidrolizados exentos de fenilalanina, con un sabor mucho más agradable, ayudan a solucionar estos pequeños inconvenientes.

Las nuevas técnicas de diagnóstico por imagen (MRI) se están utilizando para una mejor valoración de la actividad cerebral de los individuos PKU tratados y su relación con otros parámetros de interés, como los niveles de fenilalanina mantenidos durante el tratamiento, fenotipo PKU, edad de comienzo y terminación de la dieta, etc.

Nuestra experiencia en el diagnóstico y seguimiento bioquímico del tratamiento de los últimos años nos lleva a corroborar los efectos beneficiosos de la dieta restringida en fenilalanina (ver apartado Fenilcetonuria).

En los últimos veinte años se han descrito otras hiperfenilalaninemias causadas por defectos en el metabolismo de la bipterinas y que son igualmente, e incluso en mayor grado, el origen de daños neurológicos severos. Esta patología está relacionada con defectos en la biosíntesis de aminas neurotransmisoras que también utilizan bipterina como cofactor de la reacción de hidroxilación de la tirosina y triptófano, precursores de la dopamina, norepinefrina y serotonina, respectivamente. Al contrario de lo que ocurre en la fenilcetonuria clásica, el tratamiento con dieta baja en fenilalanina no evita

la aparición de las alteraciones neurológicas y es necesaria una terapia con precursores de neurotransmisores, específica y dependiente de si el defecto molecular está en la biosíntesis o en la reducción de las biopterinas.

Hasta diecinueve defectos enzimáticos se han descrito en el metabolismo degradativo de los aminoácidos ramificados *isoleucina*, *isoleucina* y *valina* y la mayoría de ellos originan acidemias orgánicas. De ellas, las más frecuentes, las acidemias propiónica y metilmalónica, han sido bien estudiadas en los últimos años. Sin embargo, algunos de los problemas derivados de su tratamiento están aún por resolver. Se basa en la restricción de los cuatro aminoácidos precursores del propionato y metilmalonato (además de los ramificados *valina* e *isoleucina*, la *metionina* y la *treonina*). Como en el caso de la *fenilalanina* en la *fenilcetonuria*, por ser aminoácidos esenciales, no se pueden eliminar absolutamente de la dieta puesto que son necesarios (“esenciales”) para la correcta síntesis de proteínas. El control de los niveles plasmáticos de aminoácidos da una idea del estado nutricional y la medida de los ácidos orgánicos es teóricamente un índice indirecto de la capacidad catalítica del enzima deficiente. En la práctica, a veces, resulta difícil relacionar el grado de tolerancia con los síntomas clínicos y la aparición neonatal o tardía de la enfermedad con la medida de la actividad enzimática en células del paciente.

La mayor dificultad está en conseguir para cada paciente el nivel óptimo en la ingestión de aminoácidos precursores en forma de proteínas naturales. Es decir, permitir el crecimiento manteniendo la acumulación de metabolitos tóxicos al nivel mínimo y conservar el balance calórico, para evitar en lo posible el catabolismo acelerado que desencadenaría una sobrecarga incontrolada de aminoácidos.

Considerando el importante papel regulador que tienen los aminoácidos ramificados en el mantenimiento de los niveles de glucosa mediante la producción de *alanina*, y por tanto, el intercambio de grupos carbonados entre músculo e hígado, el lógico que las alteraciones congénitas que afectan a la degradación de estos aminoácidos, y que hacen necesaria su restricción en la dieta, conlleve serios problemas en el mantenimiento de la homeostasis calórica del individuo.

La suplementación con *carnitina* constituye otra de las estrategias utilizadas recientemente con éxito en las enfermedades causadas por defectos en proteínas de expresión mitocondrial, para facilitar la excreción de acil-derivados acumulados en la mitocondria como consecuencia del defecto en cualquiera de los enzimas mitocondriales responsables de la acidemias orgánicas y los defectos en la β -oxidación de ácidos grasos. El mecanismo de transporte mitocondrial de la *carnitina* hace que por cada molécula de *carnitina* que entre a la mitocondria, pueda salir una de acil-*carnitina*, liberando al tiempo una molécula de coenzima A y restableciendo las concentraciones intramitocondriales de este cofactor que había quedado atrapado por el exceso de metabolitos. El restablecimiento de los niveles de *carnitina*, junto con la eliminación de las acil-*carnitinas* y la mejoría clínica apreciable con aumento de la tolerancia proteica, evidencian el efecto beneficioso de la *carnitina* al tiempo que sirven de marcadores que ayudan al diagnóstico de estas enfermedades.

2.2. SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICA

El conocimiento de ECM que responden a dosis suprafarmacológicas de vitamina se ha ampliado considerablemente en los últimos años. Por el momento hay más de veinte enfermedades en las que se ha comprobado una mejoría clínica y/o bioquímica con el tratamiento directo de coenzimas y

vitaminas. Se han revisado, recientemente, los resultados obtenidos en el tratamiento con tiamina en trastornos hereditarios como la enfermedad de jarabe de arce y la acidosis láctica.

Se ha comprobado que, en algunos casos de jarabe de arce, de los que podríamos llamar “intermedios”, porque la actividad residual del complejo enzimático deficitario es mayor del 5%, se producen una respuesta clara a la suplementación continuada con tiamina. Se ha podido demostrar que la saturación de la tiamina estabiliza al complejo que forma la proteína deformada, quizás facilitando su unión al coenzima, y la hace más resistente a la temperatura, retardando su degradación, lo que, a su vez, se traduce en una mayor actividad residual que facilita el tratamiento. Las cantidades usadas en estos casos oscilan entre los 20 y 2.400 mg por día, y aunque no son muy frecuentes estas variantes de las enfermedades, lo aconsejable es intentar en todos los casos la suplementación con dosis masivas y de forma continuada para conocer el efecto “in vivo” sobre el sistema enzimático deficiente. Igual podría decirse de las acidemias metilmalónicas que responden a cobalaminas en sus diferentes formas coenzimáticas o aquellas otras que responden a folatos.

La deficiencia múltiple en carboxilasas (MCD) constituye un buen ejemplo de este grupo de enfermedades que responden a la terapia con vitaminas o cofactores y que permiten, una vez conocidas, convertir una enfermedad letal o causante de grave alteración neurológica en un defecto genético sin consecuencias patológicas. Se conocen dos enfermedades clínicas y bioquímicamente distintas en lo que se había considerado con anterioridad como forma neonatal y tardía de la MCD y que constituyen dos alteraciones genéticas diferentes: deficiencia en holocarboxilasa sintetasa y en biotinidasa, respectivamente.

El reconocimiento de ambos defectos genéticos ha permitido la investigación del metabolismo de la biotina en seres superiores y se puede interpretar que la biotinidasa juega un papel clave en el reciclaje de la biotina endógena, quizás como respuesta evolutiva de los organismos eucarióticos ante la pérdida de su capacidad para sintetizar biotina. Por tanto, los pacientes con deficiencia en biotinidasa no son capaces de reciclar la biotina procedente de la degradación de carboxilasas y probablemente tampoco la que se ingiere en la dieta unida a proteínas, por lo que aumenta su dependencia de biotina libre exógena. Por otra parte, se desconoce si la acumulación de biotina es tóxica para estos individuos, aunque el hecho de que el tratamiento con dosis farmacológicas de biotina revierta los síntomas de la enfermedad sin ningún efecto secundario aparente, parece indicar su inocuidad.

3. LA FENILCETONURIA COMO EJEMPLO

Como ejemplo de los beneficios derivados de la aplicación de los avances científicos y tecnológicos al conocimiento de una enfermedad genética, la Fenilcetonuria es paradigmática. Según Charles Scriver, editor del libro más completo sobre enfermedades metabólicas hereditarias: “Los conocimientos adquiridos en el estudio de la Fenilcetonuria son un compendio de Ciencia y Medicina. Enseñan como la investigación en diferentes campos de la ciencia como la clínica, la bioquímica y la genética, *venciendo a la ignorancia*, han aportado conocimientos que benefician a individuos, familias y en definitiva a la Sociedad”.

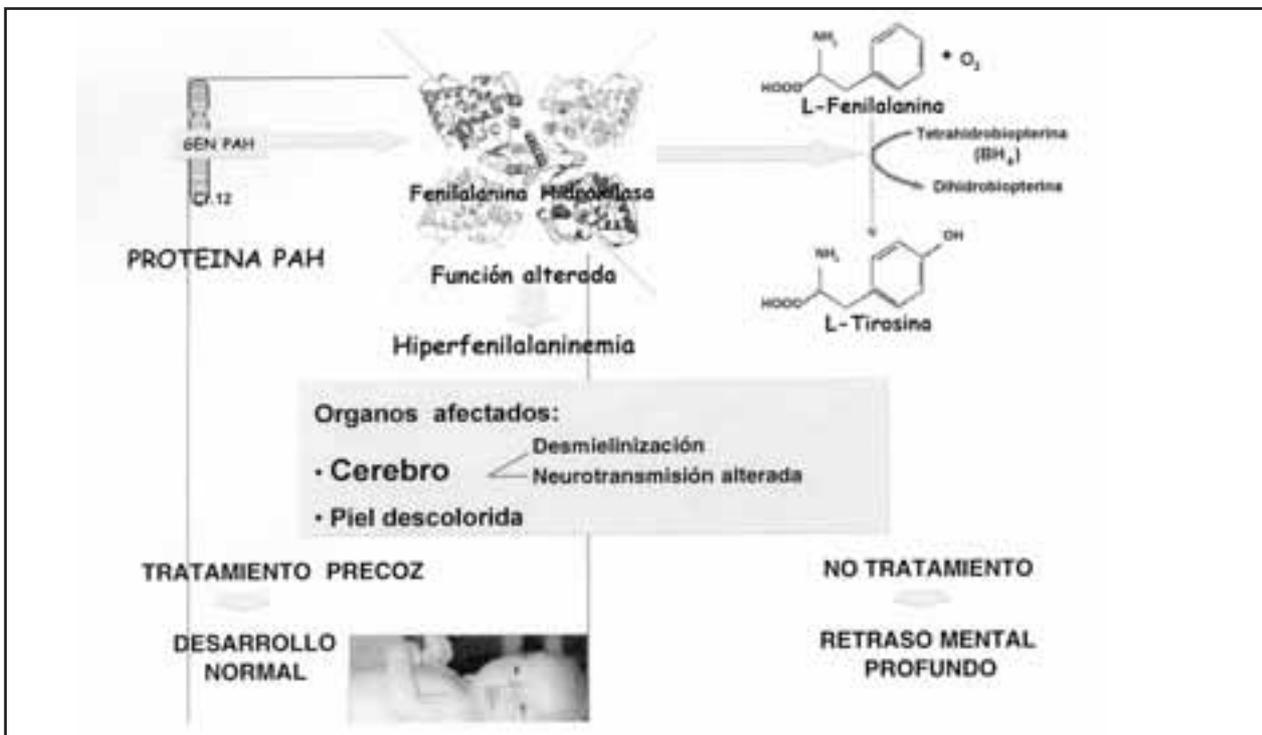
La historia científica de la fenilcetonuria (PKU) comienza en 1934 cuando Folling, médico y químico, puso de manifiesto la presencia de ácido fenilpirúvico en la orina de dos hermanos con profun-

do retraso mental. Relacionó ambos hallazgos y la denominó Idiocia Fenilpirúvica hereditaria. Pasaron dos décadas hasta que la metodología bioquímica permitiera la localización del defecto enzimático causante de la enfermedad, la proteína Fenilalanina Hidroxilasa (PAH), componente principal del sistema hidroxilante que convierte el aminoácido fenilalanina en tirosina en su vía degradativa para la producción de energía.

Las aportaciones de Bickel sobre la prevención del daño neurológico en la fenilcetonuria mediante la eliminación del aminoácido fenilalanina de la dieta, cuanto antes después del nacimiento hizo que el diagnóstico precoz de la PKU fuera el primer problema a resolver con vistas a la prevención. Los portadores obligados de la enfermedad, lo padres, no presentaban ninguna anomalía visible, ni siquiera a nivel bioquímico, puesto que aunque su capacidad para metabolizar la fenilalanina estaba disminuida al 50%, la cantidad de PAH que poseen tiene actividad enzimática suficiente para que sus niveles de fenilalanina plasmáticos se mantengan dentro de la normalidad.

Era necesario, por tanto, analizar a todos los recién nacidos para seleccionar aquellos con niveles plasmáticos elevados. Con este fin se organizaron, durante la década de los sesenta, programas de detección precoz masiva en los países más desarrollados. Hoy son millares los fenilcetonuricos que se han podido detectar y tratar precozmente, evitando el daño neurológico en la gran mayoría de ellos (FIGURA 6).

FIGURA 6: Causas y consecuencias patológicas de la fenilcetonuria



3.1. DETECCIÓN NEONATAL

El programa español para la detección precoz de fenilcetonuria y otras aminoacidopatías tratables se inició en Granada en 1968, por iniciativa y con el asesoramiento científico del Profesor Mayor Zaragoza y, posteriormente, como consecuencia de la aplicación del Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad, se fueron dotando los centros necesarios para la recogida de muestras y análisis de todos los recién nacidos del país. Con la creación del Estado de las Autonomías hace veinte años, la responsabilidad de estos programas recayó sobre las distintas consejerías de Salud que configuran en el mapa de centros de la FIGURA 4.

Nuestro grupo, iniciador en Granada de la detección neonatal masiva de fenilcetonuria, se traslada a la Universidad Autónoma de Madrid en 1973, creando el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM, <http://www2.cbm.uam.es/cedem>), y continuando con el programa neonatal, el diagnóstico selectivo, basado en la sospecha clínica de los pediatras (FIGURA 5) y la investigación sobre las bases moleculares de los ECM. En 1985 el programa neonatal fue transferido al Hospital Gregorio Marañón donde se realiza la prueba del talón desde entonces. También desde entonces, los casos seleccionados de hiperfenilalaninemia son estudiados en el CEDEM para su diagnóstico diferencial y confirmación antes de la instauración por los pediatras del tratamiento adecuado a cada caso.

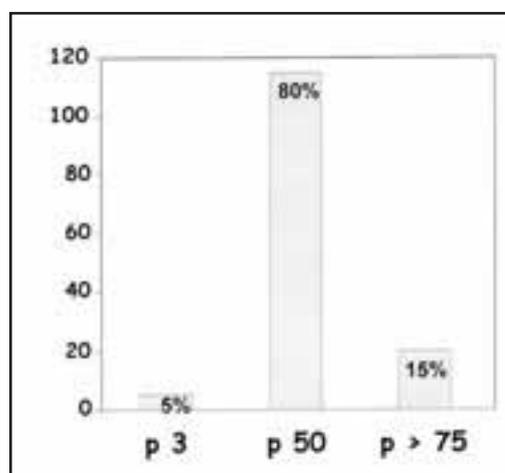
Hasta el momento se han diagnosticado bioquímicamente 119 casos de fenilcetonuria en la Comunidad de Madrid, 76 de ellos están en tratamiento con dieta restringida en fenilalanina y controles periódicos de sus niveles plasmáticos. Los 43 casos restantes pertenecen al fenotipo mas suave de la enfermedad, la hiperfenilalaninemia benigna, que no necesitan tratamiento dietético restringido puesto que toleran la fenilalanina contenida en una dieta normal, de forma que sus niveles son ligeramente elevados pero dentro de los considerados no causantes de patología neurológica. Otros cinco casos de hiperfenilalaninemia se diagnosticaron mediante estudios metabólicos complementarios como defectos del cofactor del sistema hidroxilante de la fenilalanina (BH₄) tres de ellos resultaron causados por deficiencia en la síntesis de BH₄ y dos por el sistema que lo reutiliza. El tratamiento de todos estos pacientes diagnosticados está dirigido por la Dra. Martínez-Pardo del Hospital Ramón y Cajal.

3.2. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DIETÉTICO

Los resultados del seguimiento bioquímico han permitido valorar numerosos parámetros indicativos del estado metabólico y nutricional de los pacientes durante el desarrollo.

El desarrollo estaturponderal en todos los pacientes PKU controlados en el Hospital Ramón y Cajal, coincide con la talla media familiar y en el 80 % de los casos el peso se corresponde con la talla, un 15 % presenta obesidad y un 5 % un peso en p3 para talla en p50 (FIGURA 7).

FIGURA 7: Percentiles de peso respecto a la talla en pacientes PKU

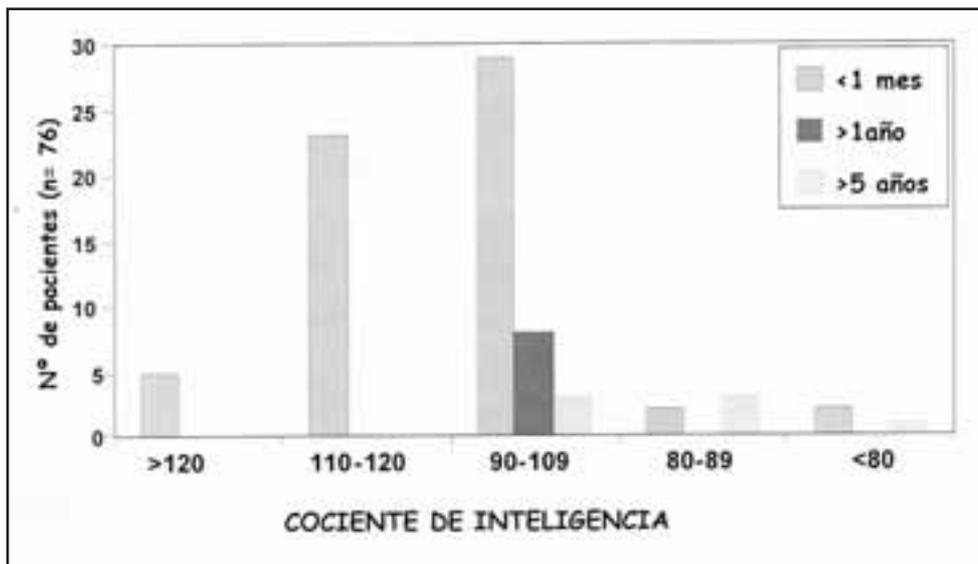


Con el fin de valorar la eficacia del tratamiento en cuanto a prevención de las alteraciones neurológicas propias de la enfermedad se han realizado estudios de potenciales evocados visuales y auditivos, EEG y RMN.

Asimismo, se ha realizado el estudio del cociente de inteligencia en 76 pacientes fenilcetonúricos y se han agrupado de acuerdo con la edad que tenían al diagnóstico. El 96 % de los pacientes que empezaron el tratamiento antes del mes de vida tienen un cociente intelectual normal o por encima de la normalidad, de hecho 28 pacientes (37 %) tienen un cociente de más de 110. Dos casos presentan un retraso mental con cocientes de 50 y 79. Ambos pacientes pertenecen al grupo fenotípico de PKU suave y todos sus controles, tanto clínicos como neurológicos y bioquímicos, han estado siempre dentro de los normales para su edad.

El cociente intelectual de los casos diagnosticados después del año y antes de los cinco años, está en el momento actual, dentro de la normalidad (89-100). Sorprendentemente, dentro de los casos diagnosticados después de los cinco años, en tres de ellos se ha alcanzado un cociente de inteligencia normal y en otros dos se ha pasado de un CI de 50 a 80 y de 52 a 80. Un solo caso diagnosticado a los 17 años presenta un CI de < 50. (FIGURA 8)

FIGURA 8: Evaluación del tratamiento dietético en Fenilcetonuria



3.3. FENOTIPOS

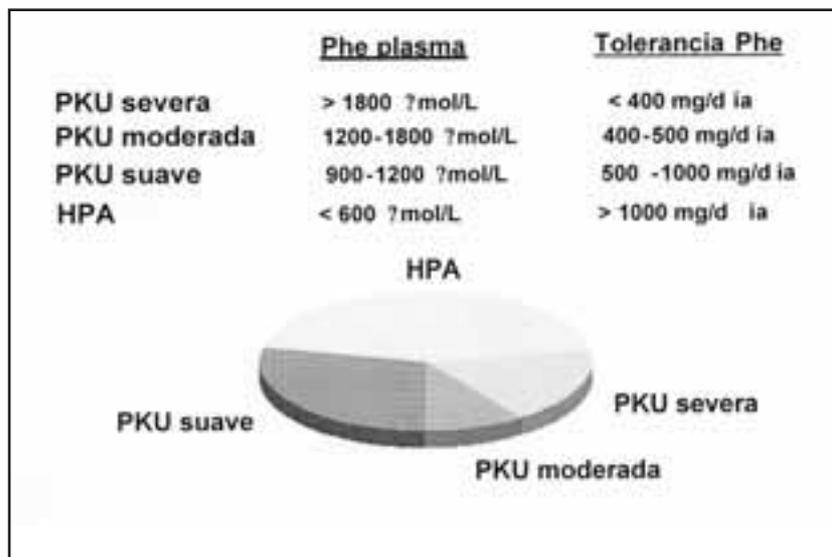
Existe una gran heterogeneidad entre pacientes fenilcetonúricos, como ocurre en otras enfermedades genéticas. Sin duda, depende del grado de disfuncionalidad de la proteína responsable del defecto, en este caso de la PAH.

El estudio de la distribución de fenotipos se ha realizado en 119 pacientes de la Comunidad de Madrid, para ello se han tenido en cuenta los niveles de fenilalanina plasmática al diagnóstico y la to-

tolerancia a la dieta. Denominamos tolerancia a la dieta a la cantidad de fenilalanina en la dieta capaz de mantener unos niveles de fenilalanina en sangre dentro de los recomendados para cada edad (<360 $\mu\text{mol/L}$ en menores de 6 años y < 600 $\mu\text{mol/L}$ en los demás).

El fenotipo más frecuente entre los pacientes estudiados, es la forma más benigna de la enfermedad (HPA, 44 %), seguida por la forma leve (PKU suave, 28 %) y en menor medida los fenotipos grave e intermedio (PKU severa y moderada) (FIGURA 9).

FIGURA 9: Distribución de fenotipos en pacientes PKU

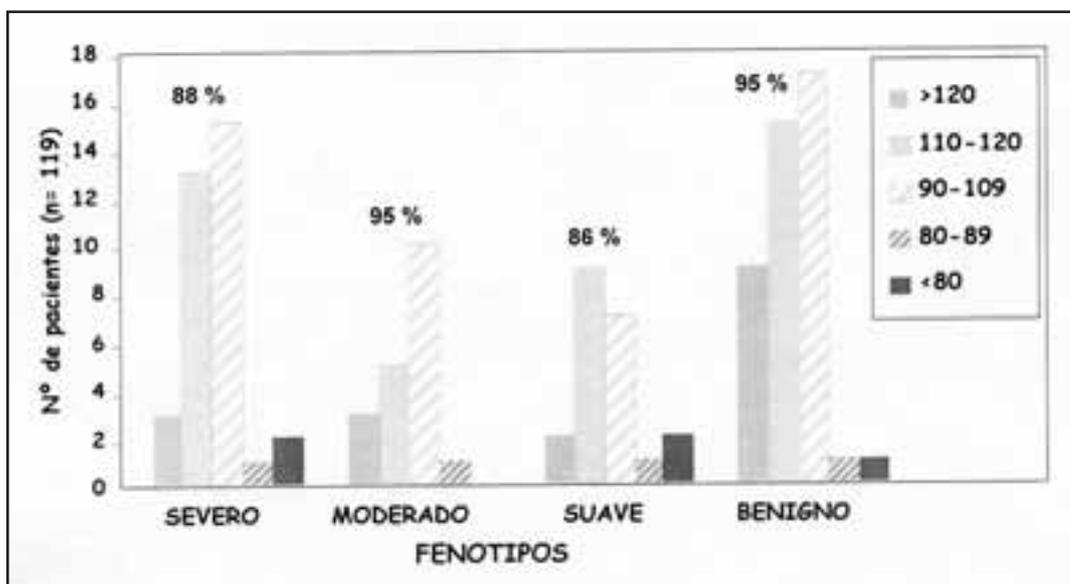


Se ha relacionado el cociente de inteligencia con el fenotipo que presentaba cada paciente y se observa que en todos los grupos, más del 85 % de los pacientes tienen un cociente de inteligencia normal o por encima de la normalidad, independientemente del fenotipo que presentaran. Dentro del fenotipo severo los dos pacientes con un cociente < 80 son dos pacientes de raza gitana que no se diagnosticaron al nacimiento. Sin embargo, los dos únicos pacientes con retraso mental fueron diagnosticados y tratados antes del mes de vida y su fenotipo es de la forma leve y además todos los controles bioquímicos y clínicos han estado dentro de la normalidad como se indicaba con anterioridad. Los exámenes radiológicos en estos pacientes descartan un cuadro neurológico típico de fenilcetonuria. Por último, existe un paciente dentro del fenotipo benigno con retraso mental debido a que nació con un quiste cerebral (FIGURA 10).

3.4. GENOTIPOS

El objetivo primero en el estudio molecular de las enfermedades genéticas, es conocer las mutaciones específicas de cada población por su interés en la aplicación al diagnóstico directo del genotipo.

FIGURA 10: Cociente de inteligencia en relación con el fenotipo en pacientes PKU

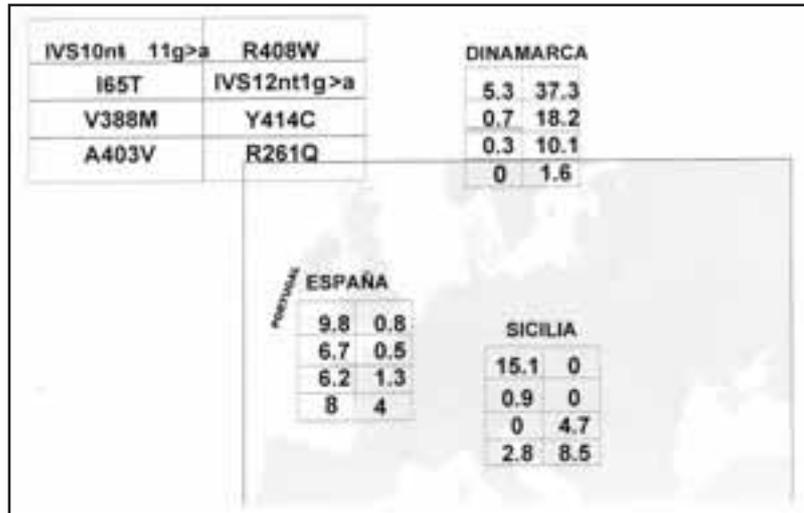


Para el estudio del espectro de mutaciones causantes de fenilcetonuria en la población española, se ha utilizado el sistema combinado de DGGE y posterior secuenciación cíclica directa de las regiones previamente seleccionadas. Este análisis realizado en 215 pacientes con la enfermedad, ha permitido la identificación de 67 mutaciones, 17 de las cuales se han descrito por primera vez en nuestra población. Mediante este estudio se ha caracterizado cerca del 90% de los cromosomas PKU analizados, siendo este porcentaje de detección ligeramente inferior al de otros países europeos dada la marcada heterogeneidad de nuestra población.

El perfil mutacional ha sido registrado en el consorcio internacional (<http://www.pahdb.mcgill.ca>) y presenta un elevado porcentaje de mutaciones puntuales que provocan cambios de un solo aminoácido, seguido de mutaciones que provocan procesamiento erróneo del RNA, deleciones e inserciones, y mutaciones que provocan aparición de un codón de parada prematuro. Se ha encontrado una mayor heterogeneidad que en otras poblaciones, ya que las cuatro mutaciones más frecuentes representan el 30% de los alelos PKU. La más frecuente es una mutación que afecta al procesamiento del mRNA, IVS10nt-11, y las tres restantes son mutaciones puntuales que cambian un aminoácido A403V, V388M e I65T. El resto de las mutaciones presentan frecuencias por debajo del 4% y algunas están representadas por un único alelo, de forma que el 70% de los cambios se corresponde con 63 mutaciones diferentes.

Comparando el espectro mutacional de nuestra población con otros países europeos se puede visualizar las diferencias entre el norte y el sur de Europa y entre los diferentes países que componen la cuenca del Mediterráneo. De esta forma, las dos mutaciones (IVS12nt1 y R408W) que más frecuentemente causan PKU en el norte y este de Europa están prácticamente ausentes en nuestra población y la más frecuente en España no existe o presenta una frecuencia muy baja en la mayor parte de Europa. Sin embargo, en Sicilia y en todos los países del Mediterráneo, la mutación IVS10nt-11 prevalente en nuestra población, es también la más frecuente en estos países, aunque no se ha detectado I65T, A403V y V388M como mayoritarias. (FIGURA 11)

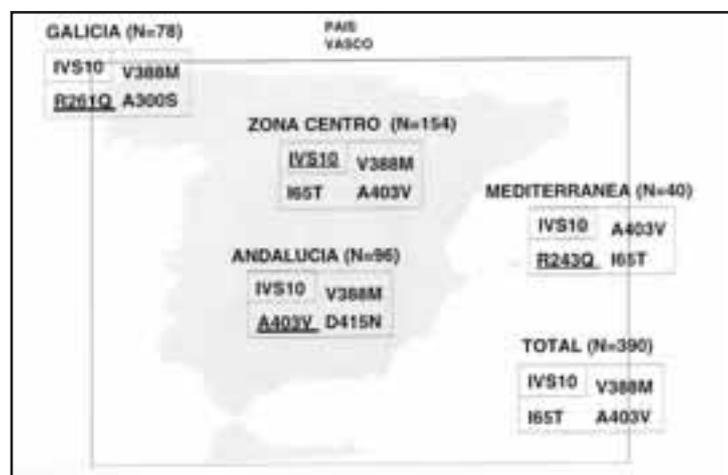
FIGURA 11: Frecuencia de mutaciones PKU en Europa



También se ha estudiado la distribución de mutaciones en diferentes regiones españolas. Aunque las diferencias a nivel genético tienden a desaparecer con la migración y la mezcla entre diferentes poblaciones, examinando las frecuencias relativas de las mutaciones en cuatro regiones españolas (Galicia, región mediterránea, Andalucía y zona centro) se observa una estratificación de las mismas, con excepción de la mutación IVS10nt-11 que es la más frecuente en todas ellas. En Galicia, se ha observado una distribución de mutaciones muy diferente al resto de España, probablemente debido a un fenómeno de deriva genética apareciendo mutaciones como R261Q y A300S prácticamente ausentes en el resto de la población. En el sur de España, tienen una mayor representación de A403V y D415N y en la región mediterránea se detecta A403V y R243Q con mayor frecuencia (FIGURA 12).

FIGURA 12: Distribución geográfica de las mutaciones PKU más frecuentes en cada subregión española. La mutación IVS10 encuadrada es la más frecuente en todas las regiones. En el recuadro de la parte inferior se destacan las cuatro mutaciones más frecuentes en el total de la población. Se han subrayado las mutaciones específicas de cada región. n= número de alelos estudiados.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE MUTACIONES PKU EN ESPAÑA



3.5. RELACIÓN FENOTIPO - GENOTIPO

Del estudio de la relación genotipo-fenotipo en base a los datos obtenidos de la expresión *in vitro*, así como a los fenotipos resultantes en pacientes homocigotos y funcionalmente hemicigotos, se ha podido establecer la severidad de 61 de las 67 mutaciones identificadas en España. En conjunto, 28 mutaciones son severas, es decir, tendrán una actividad residual prácticamente nula, 20 mutaciones son suaves, reteniendo cierto grado de actividad residual, y 13 mutaciones se pueden considerar como HPA, es decir, que siempre están asociadas al fenotipo más suave de la enfermedad.

De este modo se puede predecir el fenotipo de los pacientes según la combinación de mutaciones que tengan y estudiando en cada caso la base de datos que se ha establecido de pacientes ya caracterizados genotípica y fenotípicamente. Como norma general, la combinación de dos mutaciones graves resultan siempre en fenotipo clásico o moderado, dos mutaciones leves producen un fenotipo leve y la presencia de una mutación HPA resulta siempre en el fenotipo benigno. De este modo se puede distinguir con toda fiabilidad aquellos pacientes que van a requerir tratamiento dietético de los que no.

En conclusión, el diagnóstico precoz de la fenilcetonuria ha hecho posible la prevención del daño neurológico que ocasiona la enfermedad mediante el tratamiento dietético adaptado a cada caso. El conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad ha permitido no sólo el diagnóstico prenatal, no viable mediante estudios bioquímicos, sino lo que es más importante, establecer una base de datos que relacione los diferentes combinados genéticos con los fenotipos biológicos facilitando así la predicción de la severidad de la enfermedad de cada neonato con fenilcetonuria a partir del conocimiento de su genotipo y de esta forma establecer las pautas de tratamiento dietético más adecuada para cada individuo.

4. BIBLIOGRAFÍA RELACIONADA

- SCRIVER, BEAUDET, SLY & VALLE Eds (2001): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Octava Edición. Mac-Graw Hill Inc.
- McCABE & McCABE (2002): "Newborn screening as a model for population screening" *Molecular Genetics and Metabolism* 75,299-307.
- CHACE, KALAS & NAYLOR. (2002): "The application of Tandem Mass Spectrometry to Neonatal Screening for Inherited Disorders of Metabolism" *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:17-45.
- B. PÉREZ, LR. DESVIAT, M. MARTÍNEZ-PARDO, MJ. GARCIA Y M.UGARTE: *Fenilcetonuria: 30 años de investigación y prevención*. Premio Real Academia de Farmacia 1998. Anales de la Real Academia de Farmacia, (1999) 65:271-304.
- P. SANJURJO y A. BALDELLOU Eds.(2001): *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Ediciones Ergón.