



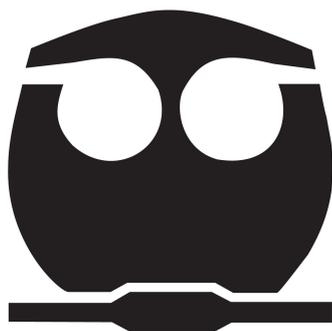
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“TIROSINEMIA TIPO I: ANÁLISIS CLÍNICO Y
BIOQUÍMICO DE UNA COHORTE DE PACIENTES
MEXICANOS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
MABEL RUÍZ GÓMEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Homero Hernandez Montes

VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Profesor: Cynthia Fernández Lainez

1er. SUPLENTE: Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia

2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

LABORATORIO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO Y TAMIZ

ASESOR DEL TEMA: CYNTHIA FERNANDEZ LAINEZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): MABEL RUÍZ GÓMEZ

(nombre (s) y firma (s))

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes: Q.F.B Cynthia Fernández Lainez, a la Mtra. Isabel Ibarra y a la Dra Vela Amieva del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo del Instituto Nacional de Pediatría por su apoyo brindado durante mi estancia.

Este trabajo esta enteramente dedicada a mi amada Universidad porque es tan solo una pequeña parte que le puedo dar a cambio de haberme permitido ser parte de ella y haberme formado no solo profesionalmente sino también como persona. La otra parte es desarrollarme profesionalmente siempre dejando en alto su nombre.

Quiero agradecerle a Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida y haber logrado alcanzar esta meta. Y dado la oportunidad de conocer cosas nuevas, nuevas experiencias, nuevas personas que definitivamente se quedaran mí vida y recuerdos que se quedaran en mi memoria.

A mis padres quiero agradecerles por su apoyo y confianza en mí, por ser mi ejemplo y mi guía, siempre alentándome a seguir adelante. A mi madre porque siempre ha estado en todo momento conmigo y apoyarme en los momentos más difíciles. Este trabajo es también dedicado para ustedes dos, los quiero mucho.

A toda mi familia, a mi hermano y a mi Kaly por estar siempre conmigo y ser un pequeño motorcito que me impulse a salir adelante y continuar siempre de frente.

A mi asesora: Cynthia por todo su apoyo, paciencia y por compartir y enseñar sus conocimientos con todo aquel que este dispuesto aprender. Porque además de haber sido una excelente asesora también ha sido una gran amiga. Y me siento muy agradecida y orgullosa de haber sido su primer asesorado. Muchas gracias por todo.

A mi Facultad y a mis profesores que siempre se preocupan por que el alumno aprenda, por todas sus enseñanzas y experiencia que nos brindan para tener las herramientas que nos ayuden a ser mejores profesionistas y emprender nuevos retos.

A todos mis amigos y compañeros por haber emprendido este camino juntos, por su amistad, apoyo y compañía. Todos y cada uno tienen un lugar especial en mi corazón, no se cómo agradecerles haberlos conocido y haber compartido grandes momentos al lado de ustedes.

INDICE

RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	
1. Errores Innatos del Metabolismo	8
1.1. Clasificación de los EIM	8
1.2. Presentación clínica	9
1.3. Diagnóstico	9
1.4. Tratamiento	11
2. Aminoacidopatías	12
3. Tirosina	15
3.1. Metabolismo de la tirosina	15
3.2. Catabolismo	16
3.3. Desórdenes del Metabolismo de la Tirosina	17
4. Tirosinemia Tipo I	19
4.1. Fisiopatología	19
4.2. Otras formas de Hipertirosinemia (HT)	22
4.3. Genética y Genómica de la FAH	22
4.4. Proteómica de la FAH	24
4.5. Diagnóstico	25
4.6. Tratamiento	34
DISEÑO EXPERIMENTAL	
1. Objetivo General	37
2. Objetivos Particulares	37
3. Material y Método	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4. Resultados	42
5. Discusión	54
CONCLUSIONES	61
GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	69

La Tirosinemia Tipo I (HTI) es una enfermedad hereditaria del metabolismo de la tirosina (Tyr) debido a la actividad nula o deficiente de la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) que causa daño hepático severo y progresivo, falla renal, crisis neurológicas y una alta mortalidad en los primeros meses de vida.

En los países desarrollados, la detección temprana de la HTI mediante el tamiz neonatal (TN) y la terapia farmacológica con 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexadiona (NTBC) han cambiado la historia natural de la enfermedad y los pacientes son detectados y tratados antes de que aparezcan los síntomas.

Sin embargo, en países como México donde no se realiza el TN público para esta enfermedad, ni hay acceso a medicamentos huérfanos como el NTBC el pronóstico de los pacientes es sombrío.

Objetivo: Describir las características clínicas y bioquímicas de una cohorte de pacientes mexicanos con HTI.

Metodología: Estudio descriptivo, observacional y transversal en el que se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico confirmado de HTI del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz del Instituto Nacional de Pediatría de 1992 al 2010.

Resultados: Se encontraron 15 pacientes (7 masculinos/8 femeninos) que fueron diagnosticados por presentar historia clínica característica de HTI, el análisis de aminoácidos plasmáticos mediante cromatografía de alta resolución mostró elevación de tirosina en todos los pacientes. El perfil de ácidos orgánicos urinarios fue positivo para succinilacetona en el 100% de los pacientes.

La edad promedio al momento del diagnóstico fue de 1 año 6 meses. La hepato-esplenomegalia y la cirrosis fueron los síntomas más frecuentes. La mortalidad de la cohorte fue del 73%. Los sobrevivientes se encuentran bajo tratamiento nutricional y dos de ellos están en espera de trasplante hepático.

Conclusiones: La devastadora historia natural de la Tirosinemia Tipo I aún se observa en los pacientes mexicanos debido a que aún no es diagnosticada a tiempo y tratada de manera adecuada. Es necesario establecer en México programas públicos de Tamiz Neonatal para la detección de HTI de manera presintomática, así como tener la disponibilidad del tratamiento farmacológico con el fin de aumentar la sobrevida y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son trastornos genéticos causados por mutaciones que resultan en la actividad nula o deficiente de una enzima o transportador lo que causa un bloqueo en la ruta metabólica implicada. En su mayoría el modo de herencia es autosómico recesivo, es decir, ambos progenitores son portadores del gen mutado.¹

1.1. Clasificación de los EIM²

Desde el punto de vista terapéutico y para su abordaje diagnóstico, los EIM se pueden clasificar en tres grupos:

- **Grupo 1:** Involucra a los errores innatos del metabolismo intermedio que dan origen a intoxicación por acumulación de moléculas pequeñas, dentro de este grupo se encuentran las aminoacidopatías y las acidemias orgánicas. se caracterizan por presentar una sintomatología aguda y progresiva que va desde el vómito y fallo hepático hasta las convulsiones y coma, el debut de estos EIM se relaciona a factores desencadenantes como infecciones, ayuno, intervenciones quirúrgicas u otras situaciones estresantes.
- **Grupo 2:** Se incluyen los EIM que afectan los procesos energéticos tanto citoplasmáticos como mitocondriales, afectan rutas metabólicas como la glucólisis, gluconeogénesis, glucogenolisis, oxidación de los ácidos grasos y la cadena respiratoria mitocondrial. Los pacientes suelen presentar hipoglucemia, afectación multiorgánica en forma de crisis con hipotonía, miopatía, fallo cardíaco y hepático.
- **Grupo 3:** Comprende a los EIM por defecto en la síntesis o el catabolismo de moléculas complejas en organelos celulares. Se caracterizan por presentar una clínica progresiva y permanente, incluye a los padecimientos por almacenamiento lisosomal, peroxisomal, defectos de la glicosilación y síntesis de colesterol.

1.2. Presentación Clínica

Los síntomas clínicos que presentan los pacientes con algún EIM pueden ser explicados por la acumulación de sustrato a nivel plasmático o intracelular, deficiencia de producto, alteraciones en la concentración de metabolitos de vías colaterales a la del bloqueo o por una combinación de todos ellos. Las manifestaciones clínicas en los pacientes con EIM son poco específicas³. En la **Tabla 1** se enlistan las más comunes.

RESPIRATORIAS	NEUROLÓGICAS	GASTROINTESTINALES	ORGANO-MEGALÍA
Apnea	Hipo/hipertonía	Vómito	Hígado
Dificultad respiratoria	Irritabilidad	Rechazo de alimentos	Bazo
Taquicardia, hiperpnea	Succión débil	Diarrea	Corazón
	Letargo hasta coma	Ictericia	
	Convulsiones	Colestasis	

1.3. Diagnóstico

En las últimas décadas, gracias a los avances tecnológicos, un número importante de EIM pertenecientes a los grupos 1 y 3 se pueden detectar de manera presintomática en los primeros días de vida mediante Tamiz Neonatal Ampliado (TNA)⁴. Esta última estrategia ha logrado modificar su historia natural, de manera tal que ahora en muchos países desarrollados los afectados casi nunca rebasan el horizonte clínico y se mantienen metabólicamente controlados, gracias a la aplicación oportuna y permanente del tratamiento específico. El estándar de oro para la detección oportuna de estas enfermedades es el TNA por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS),

que mide de manera precisa y simultánea los aminoácidos y acilcarnitinas en muestras de sangre seca colectada en papel filtro obteniéndose una gran cantidad de información en un corto periodo de tiempo (2 min) lo que nos permite estudiar el estado metabólico del neonato⁵.

Sin embargo, el TNA no es una prueba diagnóstica, los resultados que muestran que el neonato es sospecho para algún EIM deben ser confirmados por métodos enzimáticos o cuantificación de los biomarcadores de la enfermedad en líquidos biológicos⁶.

En aquellos pacientes que no fueron detectados en el periodo asintomático de la enfermedad, después de una aproximación por la historia clínica que presentan, se pueden establecer tres niveles para el diagnóstico:

- **Bioquímico.** A través del estudio de los metabolitos que se acumulan en los fluidos biológicos como consecuencia del fallo enzimático. Para ello se realiza la cuantificación de los biomarcadores de la enfermedad en sangre orina y/o líquido cefalorraquídeo.
- **Producto génico.** Aunque el estudio de metabolitos proporciona, en algunos casos, un diagnóstico bastante preciso, éste se debe verificar o completar mediante las determinaciones enzimáticas del producto genético alterado, en linfocitos o fibroblastos de piel.
- **Molecular.** Sin ser el punto de partida, el diagnóstico genético es conveniente tanto para la catalogación precisa del enfermo como para el diagnóstico prenatal para la prevención de nuevos casos en la familia. Las técnicas de amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y la secuenciación directa, permiten detectar las mutaciones o polimorfismos, las distintas formas de expresión y su epidemiología.

1.4. Tratamiento^{7,8}

El tratamiento de los EIM depende de la enfermedad, de la forma de presentación de la misma y del grado de afectación a la salud del paciente. Debe realizarse por un equipo multidisciplinarios de especialistas. En un plano teórico y basado en la fisiopatogenia podemos plantear cuatro niveles de actuación:

1.- Tratamiento dietético a nivel de metabolitos. Se utiliza en toda enfermedad metabólica en la que se produce acumulo de un sustrato y es susceptible de ser tratada dietéticamente, minimizando la expresión fenotípica del defecto.

2.- A nivel de la proteína disfuncional mediante tres posibilidades:

- Sustitución enzimática. Esta terapia es ampliamente utilizada en la actualidad para los desórdenes metabólicos por almacenamiento lisosomal.
- Suplemento de dosis farmacológicas de vitaminas y coenzimas que actúan como cofactores, produciendo una inducción del sistema enzimático.
- Trasplantes. El de hígado y médula ósea constituyen una posibilidad más definitiva de aportar al organismo células con un código genético no afectado, capaces de sintetizar enzimas funcionales.

3.- Tratamiento sintomático. El tratamiento sintomático a nivel del fenotipo clínico ayuda a la situación que el paciente este presentando en el momento.

4.- Terapia genética somática: Consiste en administrar una copia normal del gen defectuoso mediante un vector. El vector viral es el más experimentado, en las células somáticas recuperaría la función genética deficiente. Esta técnica, avanzada en su fase experimental, aún no está disponible para el tratamiento de los pacientes.

2. AMINOACIDOPATÍAS

Los aminoácidos presentes en los fluidos biológicos son producto de un sistema de transporte y metabolismo de las proteínas. Los niveles de aminoácidos libres representan el balance entre la utilización de aminoácidos por los tejidos y el catabolismo tanto de las proteínas de la dieta como de las proteínas corporales, así como el producto de la biosíntesis de otros intermediarios, dichos niveles presentan poca variación de día a día, entre persona y persona, cuando se trata de individuos sin problemas de nutrición, por lo tanto los cambios del perfil de aminoácidos son indicadores importantes de una gran variedad de condiciones fisiológicas y patológicas⁹.

Los EIM que alteran las vías metabólicas de los aminoácidos causan un grupo de desórdenes conocidos como aminoacidopatías, en las que existe alteración en la concentración fisiológica de estas moléculas, la aparición de síntomas clínicos es muy variada debido a la bioquímica de los diferentes aminoácidos.¹⁰

El diagnóstico y seguimiento de los trastornos del metabolismo de los aminoácidos está basado en la detección y cuantificación simultánea de estos biomarcadores en los diferentes líquidos biológicos. Existen diversos métodos para la cuantificación de aminoácidos que van desde los menos específicos como la cromatografía en placa fina hasta los más sensibles y específicos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*) y la MS/MS¹⁰.

La técnica de HPLC resulta ser de gran utilidad debido a que brinda los parámetros de precisión, exactitud, alta sensibilidad y especificidad necesarios para llevar a cabo el análisis utilizando pequeñas cantidades de muestra (microlitros)¹¹, siendo el sistema de detección por fluorescencia el más sensible y recomendable.¹²

Para la cuantificación de los aminoácidos mediante HPLC se emplea un sistema de separación en fase reversa acoplado a un sistema de detección por fluorescencia¹³.

La técnica se basa en la extracción de los aminoácidos libres en plasma, purificación de la muestra mediante filtración y formación de los derivados fluorescentes de los aminoácidos haciéndolos reaccionar con o-ftaldialdehído (OPA)¹⁴. La reacción química que se lleva a cabo se muestra en la **Figura 1**.

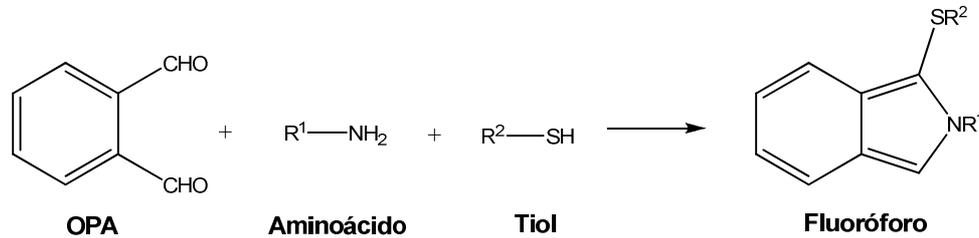


Figura 1. Formación de 1-alkiltiol-2-alkil-isoindol por reacción del OPA con aminas primarias¹⁵

La MS/MS es una técnica analítica que permite la identificación, separación y cuantificación de iones derivados de moléculas, basada en su relación masa/carga (m/z) en diferentes matrices.^{16,17} La palabra tándem viene del inglés tándem, cuyo significado inicial es “bicicleta de dos asientos” también tiene la aceptación de “conjunto de dos elementos que se complementan” o “reunión de personas que colaboran en algo”.¹⁸ A estos equipos se les ha dado esta denominación debido a que están constituidos de dos analizadores de masas unidos uno tras de otro (en tándem). Existen diferentes acoplamientos del tipo de analizadores de masas los cuales se diseñan de acuerdo a la naturaleza de las moléculas de interés.

La MS/MS permite analizar de manera simultánea compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas presentes en matrices biológicas complejas, como la sangre completa.¹⁹ El acoplamiento que se utiliza para la cuantificación de aminoácidos es el de tipo triple cuadrupolo (dos analizadores de masas unidos por una celda de colisión, acoplados a una fuente de ionización suave (ESI por sus siglas en inglés *electrospray*)).¹⁷

Una vez que la muestra de sangre ha sido introducida al equipo de MS/MS, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa por el primer analizador de masas (MS_1) en donde los componentes de la muestra se separan de acuerdo a su m/z , los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un

gas inerte; los fragmentos generados pasan por el segundo analizador de masas(MS_2) los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS_1 . Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas²⁰.

Las aminoacidopatías son muy variables en sus fundamentos bioquímicos, en sus manifestaciones, en la severidad de sus cuadros y sus tratamientos. El presente trabajo aborda, la Tirosinemia Tipo I (HTI).

3. TIROSINA

Desde el punto de vista químico la tirosina pertenece al grupo de los aminoácidos aromáticos por el anillo bencénico que contiene en su cadena lateral (**Figura 2**), su peso molecular es de 181.2, es uno de los aminoácidos menos solubles en agua y forma cristales característicos en altas concentraciones. En el presente trabajo nos referiremos a L-Tyr la cual es la única forma metabólicamente activa presente en los mamíferos²¹.

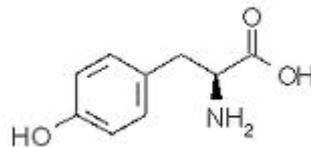


Figura 2. Estructura química de la tirosina²²

3.1. Metabolismo de la tirosina

La Tyr se es un aminoácido no esencial, ya que su síntesis se produce a partir de la hidroxilación de la fenilalanina proveniente de los alimentos.²³

La tirosina es el punto de partida de la síntesis de las catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrenalina (de ahí su importancia para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central), melanina y de la tiroxina, lo que influye en su síntesis debido a que la producción de tirosina está regulada por la demanda de dichas moléculas, sin embargo, la mayor parte de la Tyr es destinada a incorporación a proteínas o degradación, las reacciones catabólicas son citoplasmáticas y ocurren predominantemente en los hepatocitos (**Figura 3**).²¹

La Tyr es gluconeogénica y cetogénica. Esta representa una de las pocas fuentes de cuerpos cetónicos independiente de la vía del 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA.²¹

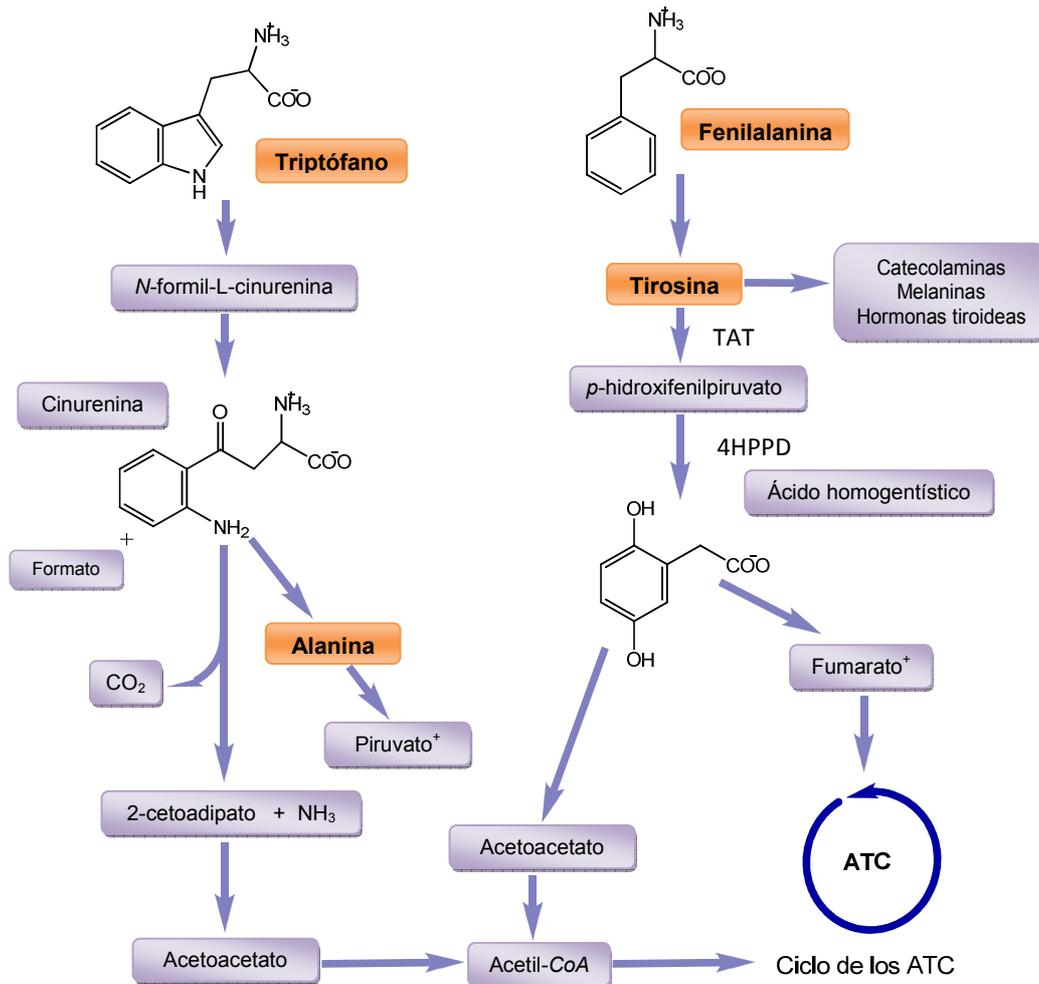


Figura 3. Ruta catabólica de los aminoácidos aromáticos. Esta figura resume el catabolismo de los aminoácidos aromáticos, ilustrando las vías que dan lugar a precursores cetogénicos y glucogénicos derivados de la tirosina y el triptófano. *El piruvato y el fumarato enlazan con la síntesis neta de glucosa. Constituyen las porciones gluconeogénicas del metabolismo de estos aminoácidos. Una pequeña fracción de Tyr se convierte en ácido nicotínico.²⁴

3.2. Catabolismo²⁵

Los productos finales de la degradación de la tirosina son el fumarato y acetoacetato (**Figura 4**). La ruta metabólica tiene las siguientes etapas:

1. Transaminación de la tirosina a *p*-hidroxifenilpiruvato mediante la acción de la enzima *tirosina aminotransferasa* (TAT), la cual se expresa en hígado y cuya concentración se regula hormonalmente.
2. Producción de ácido homogentísico a partir del *p*-hidroxifenilpiruvato por la *p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa* (4HPPD), una enzima poco habitual que contiene hierro, la cual cataliza una hidroxilación del anillo

- bencénico, una descarboxilación y migración de la cadena lateral carbonada, utilizando como cofactor el ascorbato.
3. El ácido homogentísico se oxida por acción catalítica de la *ácido homogentísico dioxigenasa*, ésta rompe el anillo para dar un compuesto de ocho carbonos de cadena lineal; el maleilacetoacetato.
 4. El maleilacetoacetato se isomeriza de la forma *cis* a la forma *trans* mediante una reacción catalizada por la *maleilacetoacetato isomerasa (MAI)*, que da lugar al fumarilacetoacetato (FAA).
 5. El fumarilacetoacetato se rompe finalmente para producir fumarato y acetoacetato por acción catalítica de la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH).

El fumarato puede ser utilizado para producir energía en el ciclo de Krebs, o bien, para la gluconeogénesis. El acetoacetato puede ser utilizado para la síntesis lipídica o para la producción de energía en forma de acetil CoA.

3.3. Desórdenes del Metabolismo de la Tirosina

Los defectos genéticos que afectan la ruta del metabolismo de la tirosina causan 6 desórdenes metabólicos: deficiencia de TAT (Tirosinemia Tipo II), dos deficiencias por actividad nula o deficiente de la 4HPPD (Tirosinemia Tipo III y Hawkinsinuria), deficiencia de homogentísico dioxigenasa, tirosinemia transitoria del recién nacido y deficiencia de FAH (Tirosinemia Tipo I).

Deficiencia de TAT

La Tirosinemia Tipo II, también conocida como tirosinemia oculocutánea se caracteriza por hiperqueratosis palmoplantar, erosiones corneales, y retraso mental variable, sin embargo, la función hepática y renal se mantiene intacta²⁶.

Deficiencia primaria de 4HPPD

En esta enfermedad también conocida como Tirosinemia Tipo III las presentaciones varían desde formas asintomáticas hasta la presentación con signos neurológicos y retraso mental, aunque se han reportado pocos casos²⁷.

El fenotipo bioquímico muestra hipertirosinemia con una elevada excreción urinaria de derivados 4-hidroxifenil²¹.

Hawkinsinuria

Es una condición cuyo modo de herencia es autosómica dominante. Como resultado se presenta acidosis metabólica y deficiencia en el crecimiento, con hipertirosinemia mínima o ausente. La presencia en orina de hawkinsina, aminoácido azufrado derivado del ácido 4-hidroxifenil pirúvico, es diagnóstica de la enfermedad²¹.

Tirosinemia transitoria del recién nacido.

Esta condición se considera el resultado de una falta de madurez hepática, causando una deficiencia transitoria de la enzima 4HPPD. Esto se encuentra frecuentemente en recién nacidos prematuros, quienes reciben grandes cantidades de proteína (leche materna) o quienes tienen deficiencia de vitamina C, el cofactor de la 4HPPD. La mayoría de los pacientes que la presentan permanecen asintomáticos y con desarrollo normal.²⁸

Deficiencia de homogentísico dioxigenasa

También conocida como alcaptonuria, es una enfermedad en la que el ácido homogentísico no puede ser metabolizado, lo que causa su acumulación en las articulaciones, como consecuencia se desarrolla artritis, ocronosis y la excreción de ácido homogentísico en orina.²¹

4. TIROSINEMIA TIPO I

También conocida como Tirosinemia Hepatorenal (OMIM 276700) es un error congénito del metabolismo de la tirosina, causado por deficiencia de la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH, [EC] 3.7.1.2) que transforma el fumarilcetoacetato en fumarato y acetoacetato en el paso final de la vía metabólica de degradación de la tirosina (**Figura 4**).

La historia natural de la HTI se caracteriza por un periodo asintomático que puede durar desde horas hasta los primeros meses de vida dependiendo de la mutación que causa la enfermedad, este desorden metabólico afecta hígado, riñón, hueso y nervios periféricos en forma progresiva; en casos muy severos causa la muerte por falla hepática en etapas tempranas de la vida.³⁰

Este defecto genético condiciona la acumulación de maleil y fumarilacetoacetato, los cuales causan toxicidad renal y hepática²⁹ también causan acumulación de succinilacetona (SA) y succinilacetoacetato, estos últimos poseen efectos sistémicos y locales, como la inhibición de la δ -aminolevulinato deshidratasa y de la metionina adenosiltransferasa.

El primer reporte del cuadro clínico y bioquímico típico de Tirosinemia Tipo I fue descrito como un caso "atípico" por Sakai y colaboradores en 1957. La observación de porfiria con crisis neurológicas permitió el descubrimiento del aumento en la excreción de ácido δ -aminolevulínico (ALA) en pacientes.

El sitio del bloqueo metabólico primario en la HTI fue elucidado por Lindbland y colaboradores en 1977, el cual posteriormente fue confirmado por varios investigadores.²¹

4.1. Fisiopatología

El mecanismo de los síntomas hepáticos y renales de la THI aún no está muy claro, sin embargo, la mayoría de las evidencias apuntan a la consideración de que el efecto tóxico se debe a los compuestos finales alternos que se generan antes de la reacción de la FAH, el fumarilacetoacetato y sus derivados, así como el succinilacetoacetato y el succinilacetato. El maleilacetoacetato es de estructura química similar al ácido maleico, una toxina conocida que puede provocar el síndrome de Fanconi; los cambios histológicos del síndrome de

Fanconi inducido por el ácido maleico mimetizan las manifestaciones renales de la tirosinemia. Se ha propuesto que causa una vasoconstricción de las arteriolas aferentes por el incremento local de los niveles de adenosina y AMPc, induciendo el incremento de renina, que resulta en el daño isquémico crónico de la nefrona.²⁸

El maleilacetoacetato y el FAA son compuestos inestables. El FAA puede formar aductos de glutatión y se ha encontrado que una parte de la concentración libre de glutatión es reducida en muestras de hígado tirosinémico. Por otro lado, se ha reportado que el fumarilacetoacetato es un mutágeno, sin embargo, el mecanismo que explica el desarrollo del carcinoma hepatocelular en esta enfermedad aún no está determinado.³⁰

El mecanismo fisiopatológico mejor elucidado es el papel de la succinilacetona en las crisis neurológicas. La succinilacetona es un potente inhibidor de la enzima porfobilinógeno sintetasa (PBG-S) o 4- δ -aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD), enzima que cataliza la síntesis del porfobilinógeno a partir del ácido δ – aminolevulínico en la ruta de biosíntesis del grupo hemo, provocando la marcada acumulación del ácido δ -aminolevulínico en niños con tirosinemia.³⁰ Se ha demostrado que el ácido δ -aminolevulínico está asociado a neurotoxicidad en la porfiria aguda intermitente, en la deficiencia hereditaria de la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa y en la intoxicación por plomo. La evidencia clínica, bioquímica y patológica disponible, sugiere que las crisis neurológicas en la HTI, resultan de la toxicidad por acumulación del ácido δ -aminolevulínico.³¹

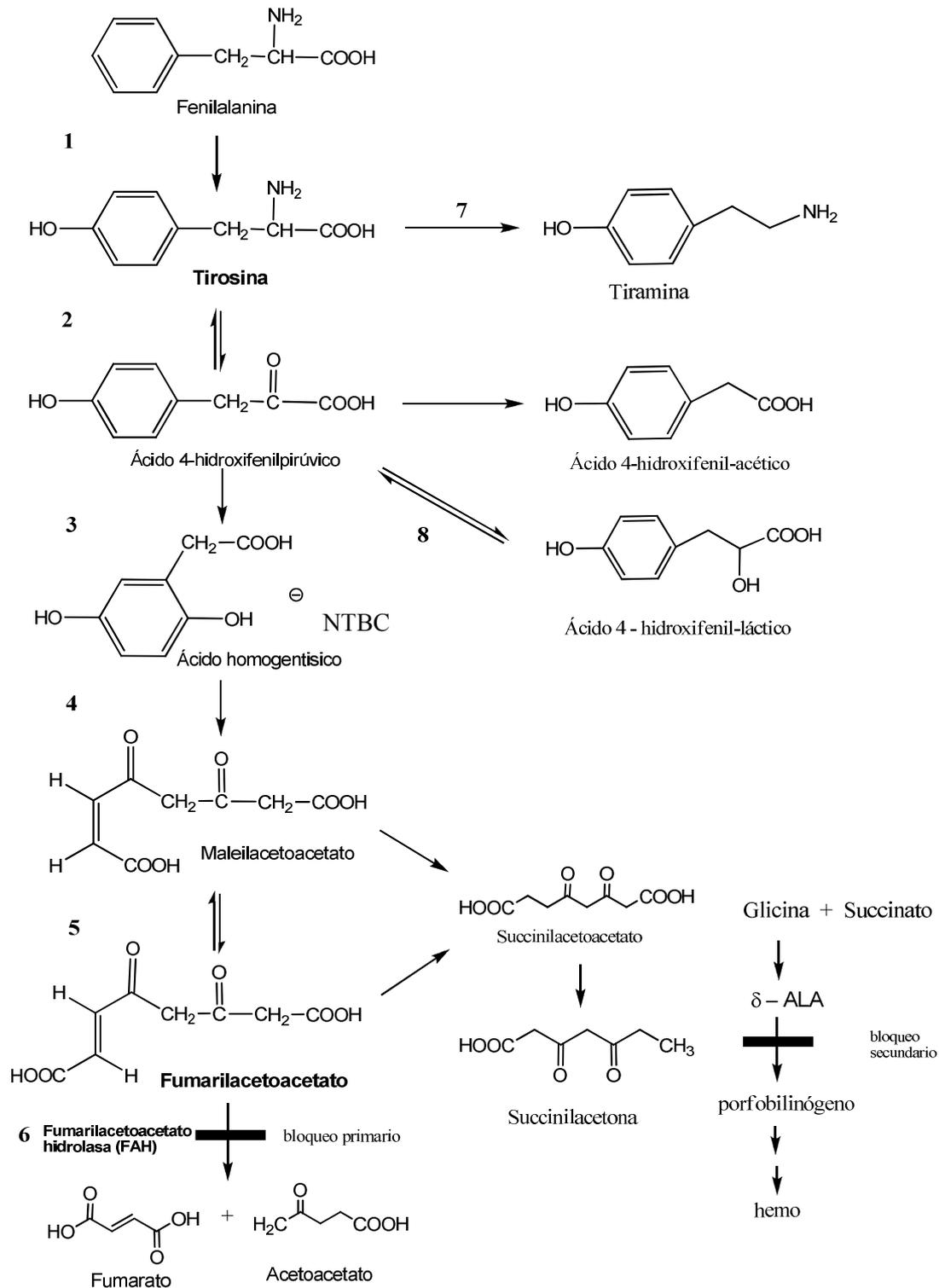


Figura 4. Interrelación del catabolismo de la tirosina en Tirosinemia Tipo I y de la biosíntesis del grupo hemo. La succinilacetona se deriva de los intermediarios que se acumulan por el bloqueo de la fumarilacetoacetato hidrolasa. Esto inhibe la síntesis de porfobilinógeno desde el ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), como resultado este se acumula causando los signos clínicos en las crisis neurológicas. Las enzimas numeradas son (1) fenilalanina hidroxilasa, (2) tirosina aminotransferasa, (3) ácido 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa, (4) ácido homogentísico oxidasa, (5) ácido maleilacetoacético isomerasa y (6) fumarilacetoacetato hidrolasa^{21, 28}

4.2. Otras formas de Hipertirosinemia (HT)

Existen otras condiciones fisiológicas que causan hipertirosinemia (HT) (elevación de tirosina en sangre). Las causas más frecuentes de HT son las hepatopatías, ya sea de carácter infeccioso o algunas otras enfermedades metabólicas que cursan con daño hepático, como algunos defectos del metabolismo de los carbohidratos por ejemplo, la galactosemia y las glucogenosis.³⁰

4.3. Genética y Genómica de la FAH

El gen que codifica para la FAH se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 (23q- 25q). La forma de herencia de la THI es autosómica recesiva;³⁰ esto es, que los padres portadores de un alelo mutado tienen el 25% de probabilidad de tener un hijo afectado, el 50% de probabilidad de tener un hijo portador de un alelo mutado y un 25% de probabilidad de tener un hijo con los dos alelos normales.

Se han registrado numerosos casos de HTI en Europa septentrional, especialmente en los países escandinavos, y en la región de Saguenay Lac St Jean, en la provincia de Québec, Canadá. La incidencia de la enfermedad en esta zona es de 1/1 800 recién nacidos, mientras que en el resto de la población mundial se estima una frecuencia de 1/100 000 a 1/200 000.²⁸

De acuerdo al *Human Data Base* se han reportado 43 mutaciones del gen FAH en pacientes con tirosinemia (**Tabla 2**). La mutación IVS12+5ga contribuye con alrededor del 90% en las mutaciones del alelo FAH en el área Saguenay-Lac St-Jean de Quebec³². Las mutaciones IVS12+5ga y IVS6-1gt son frecuentes en pacientes con origen étnico diverso³³.

La mutación W262X es prevalente en población finlandesa³⁴ y la Q64H (192GT) en pakistaníes³⁵. La mutación R341W causa deficiencia parcial.³⁰

Tabla 2. Mutaciones reportadas en el gen FAH

MUTACIONES PUNTUALES DE SENTIDO ERRÓNEO / SIN SENTIDO			
Cambio de codón	Cambio de aminoácido	Número de codón	Referencia
cATG -GTG	Met – Val	1	Arranz (2005) Hum Genet 118, 537
AAC - ATC	Asn – Ile	16	Phaneuf (1992) J Clin Invest 90, 1185
TTC - TGC	Phe – Cys	62	Awata (1994) Biochim Biophys Acta 1226, 168
TGG - TAG	Trp – Term	78	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180
GCT - GAT	Ala – Asp	134	Labelle (1993) Hum Mol Genet 2, 941
GGC - GAC	Gly – Asp	158	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19
GTC - GGC	Val – Gly	166	Rootwelt (1996) Hum Mutat 7, 239
cCGA -TGA	Arg – Term	174	Timmers (1996) Hum Mutat 7, 367
cTGC -CGC	Cys – Arg	193	Ploos van Amstel (1996) Hum Genet 97, 51
GGC - GAC	Gly – Asp	207	Timmers (1996) Hum Mutat 7, 367
GAC - GTC	Asp – Val	233	Rootwelt (1994) Am J Hum Genet 55, 653
cTGG -GGG	Trp – Gly	234	Hahn (1995) Hum Mutat 6, 66
aCGA -TGA	Arg – Term	237	Ploos van Amstel (1996) Hum Genet 97, 51
gCCA- ACA	Pro – Thr	249	Timmers (1996) Hum Mutat 7, 367
CCG - CTG	Pro – Leu	261	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19
TGGg -TGA	Trp – Term	262	StLouis (1994) Hum Mol Genet 3, 69
cACA -CCA	Thr – Pro	294	Timmers (1996) Hum Mutat 7, 367
gCAG- TAG	Gln – Term	328	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180
cGGC-AGC	Gly – Ser	337	Rootwelt (1994) Hum Genet 94, 235
gCGG-TGG	Arg – Trp	341	Rootwelt (1994) Am J Hum Genet 55, 1122
CCG - CTG	Pro – Leu	342	Rootwelt (1994) Hum Genet 93, 615
gGGG-TGG	Gly – Trp	343	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180
aGAA -TAA	Glu – Term	357	Grompe (1993) Hum Mutat 2, 85
gGAA -TAA	Glu – Term	364	Grompe (1993) Hum Mutat 2, 85
GGA - GTA	Gly – Val	369	Ploos van Amstel (1996) Hum Genet 97, 51
cAGG-GGG	Arg – Gly	381	StLouis (1995) Hum Mol Genet 4, 319

MUTACIONES DE SPLICING				
Cambio de codón	Donador/ Aceptor	Número de codón	Referencia	Comentarios
2	Ds	-1	Rootwelt (1994) Am J Hum Genet 55, 653	CAG>CAT, Q64
2	Ds	+1	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19	
6	Ds	+5	Timmers (1996) Hum Mutat 7, 367	
6	As	-1	Rootwelt (1996) Hum Mutat 7, 239	
6	As	-1	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19	
7	As	-1	Ploos van Amstel (1996) Hum Genet 97, 51	
8	Ds	-11	Ploos van Amstel (1996) Hum Genet 97, 51	N232N/sile
8	As	-1	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19	
8	as	-1	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180	
9	ds	-2	Dreumont (2001) BMC Genet 2, 9	Q279R
10	as	-2	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180	

12	ds	-2	Bliksrud (2005) J Mol Med 83, 406	Suppresses I Fenotipo modificado
12	ds	+5	Grompe (1993) Hum Mutat 2, 85	

MUTACIONES POR DELECCIONES CORTAS		
Delección	Codon (^)	Referencia
AGGCG^GCTACcATATGCAAGT	312	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180
TTGGAA^CTGTcgtGGAAGGGAAC	365	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19

MUTACIONES POR PEQUEÑAS INSERCCIONES/DELECCIONES (INDELS)			
Delección	Inserción	Codon (^)	Referencia
CCGCATC^GGCttTGGCCAGTGT	ca	404	Bergman (1998) Hum Mutat 12, 19

MUTACION POR DELECCIÓN	
Descripción	Referencia
26 bp E6I6 -6 to +20 (descritos a nivel de DNA genómico)	Arranz (2002) Hum Mutat 20, 180

Poudrier y colaboradores encontraron que dos hermanos con la misma mutación presentaron diferentes formas de la enfermedad (curso agudo y curso crónico), por lo que concluyeron que los fenotipos clínicos de una misma mutación pueden ser modificados por otros factores que aún no están identificados³⁶.

4.4. Proteómica de la FAH

La FAH es un homodímero citosólico con 419 aminoácidos, incluye 4 moléculas de acetato, 2 iones calcio y uno de níquel, se expresa en hígado³⁷ y en menor cantidad en el riñón, linfocitos, eritrocitos, fibroblastos y vellosidades coriónicas.²⁸

Su estructura cuaternaria fue elucidada en 1999 por Timm and cols³⁸ en donde reportaron que la FAH es la primer hidrolasa que actúa específicamente sobre los enlaces carbono-carbono. También se definió como una nueva clase de metaloenzima caracterizada por un único plegamiento α/β (**Figura 5**).

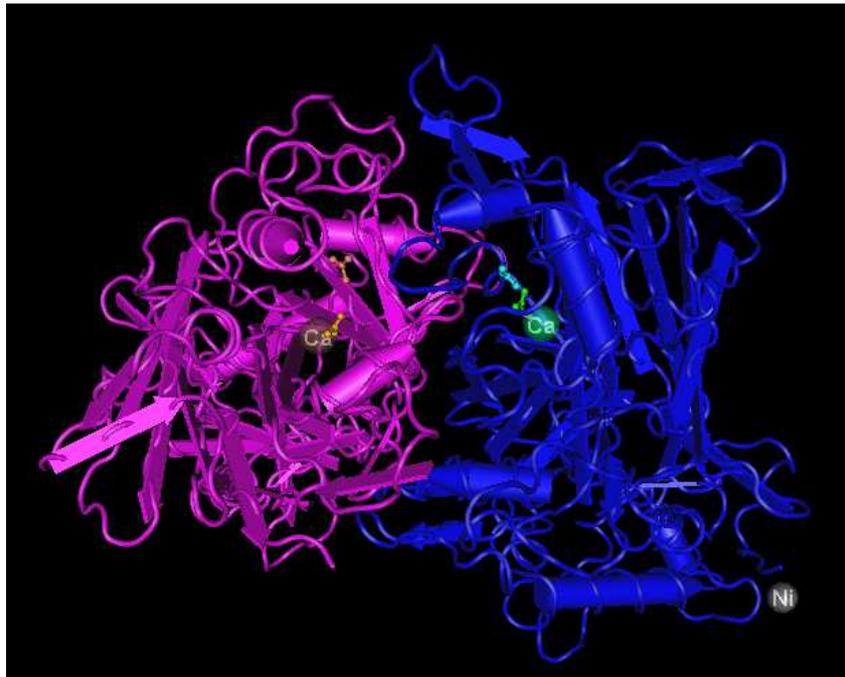


Figura 5. Organización estructural y ligandos de la FAH.

La estructura cristalina revela la unión del fumarato y acetoacetato cerca del sitio activo, en donde el ion calcio se encuentra coordinado octaédricamente y localizado cerca de una diada de Glu – His. Los autores sugieren una triada catalítica compuesta por Glu – His y agua, la cual está implicada a nivel estructural, en la conservación de la secuencia y en el análisis mutacional. Ya que se ha descrito la sustitución del ligando Glu201 por un residuo de glicina que provoca un fenotipo de HTI en ratones.³⁹ La FAH que contiene esta mutación se ha expresado y carece de actividad catalítica.⁴⁰ A su vez el mecanismo del Ca^{2+} propuesto, consiste en la catálisis directa de la FAH, en la unión del sustrato, la activación de una molécula de agua nucleofílica y en la estabilización de un carbanión.

4.5. Diagnóstico

El diagnóstico presintomático se puede realizar a través del Tamiz Neonatal Ampliado mediante la cuantificación de tirosina y SA por MS/MS en muestras de sangre depositada en papel filtro.

El diagnóstico sintomático de la HTI incluye la evaluación clínica, determinación de metabolitos, el ensayo de la actividad enzimática de la FAH y el análisis molecular mediante determinación de la presencia de los alelos mutados.

4.5.1. Cuadro clínico

Los principales síntomas que presentan los pacientes con HTI se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Hallazgos clínicos y bioquímicos en la HTI ⁴¹	
SÍNTOMAS	
Vómito	Hepatomegalia
Falla en el crecimiento	Ictericia
Irritabilidad	Ascitis
Letargia	Tendencia a hemorragias
	Nefromegalia
ALTERACIONES BIOQUÍMICAS	
Plasma	Orina
Hipertirosinemia	Tirosiluria
Aumento de succinilacetona	Aumento de succinilacetona
Factores de coagulación alterados	Hiperaminoaciduria
Hipermetioninemia	Aumento de ácido δ-aminolevulínico
Hiperfenilalaninemia	Síndrome de Fanconi
Transaminasas elevadas	Fosfaturia
Hipoglucemia	
Hipoprotobinemia	
Hiperbilirubinemia	
Hipofosforemia	
Aumento de α-fetoproteína	
PATOLOGÍA	
Raquitismo	Cirrosis
Síndrome de porfiria	Carcinoma hepático
Crisis neurológicas	

Manifestaciones hepáticas

Las manifestaciones hepáticas se presentan antes de los 2 años de edad y decrecen en frecuencia y severidad a partir de la instauración del tratamiento. Las alteraciones microscópicas observadas incluyen colapso lobular y fibrosis con proliferación ductular, colestasis y esteatosis, transformación de células gigantes. Históricamente, alrededor del 80% de todos los pacientes con tirosinemia, mueren antes de los dos años de edad.³⁰

A pesar de la implementación temprana de dietas especiales, muchos pacientes sufren episodios repetitivos de descompensación hepática en la infancia, conocidos como *crisis hepáticas*, caracterizadas por hepatomegalia y coagulopatía.²⁸ Los factores de coagulación se encuentran disminuidos; los tiempos de protrombina y de tromboplastina parcial están aumentados y las transaminasas elevadas. Es interesante saber que el nivel del factor V es utilizado con frecuencia como marcador de la función hepática de síntesis en otras enfermedades del hígado, sin embargo, los infantes tirosinémicos pueden estar cercanos al intervalo normal en el comienzo de una crisis. En contraste, los factores XI y XII, así como la vitamina K dependiente de los factores II, VII, IX y X pueden estar excesivamente bajos (<15%), con niveles normales del factor VIII.³⁰

La alfa-fetoproteína (AFP) sérica puede estar extremadamente alta (arriba de 400,000 ng/mL) y disminuir en semanas o meses después de las crisis.³⁰

Función hepática crónica

La función hepática crónica se caracteriza por cirrosis. La cirrosis es generalmente un tipo mixto micro y macronodular, con un grado variable de esteatosis (**Figura.6**).²⁸

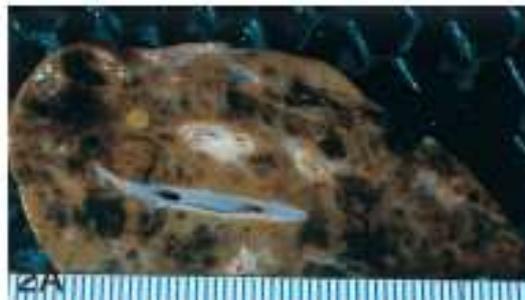


Figura 6. Autopsia hepática de un niño de 3 meses de edad con HTI que murió de enfermedad crónica hepática.²⁸

Las alteraciones morfológicas del hígado, en etapas tempranas, son variables, sin embargo, el examen histológico generalmente revela cirrosis micronodular y a menudo marcada proliferación de ductos biliares dentro de los espacios porta y septo fibrosos que son compartidos por una gran variedad de hepatopatías infantiles. En el estado crónico; el hígado se caracteriza por tener nódulos

gruesos y con frecuencia alargados, como un resultado de la cirrosis mixta micro y macronodular.

Riesgo de Hepatocarcinoma

El riesgo elevado de cáncer está reflejado en la frecuencia relativamente alta de displasia, aneuploidia, la variabilidad del gen y la expresión de proteínas encontradas⁴², probablemente como resultado de un ambiente inestable y altamente mutagénico. La dificultad en la estimación de la incidencia se ve agravada por la arbitrariedad de la distinción histológica entre la displasia de células hepáticas y carcinoma⁴³. En pacientes con HTI el desarrollo de hepatocarcinoma se presenta entre los 15 y 25 meses de edad.⁴⁴ La presencia de nódulos hepáticos en la tomografía computacional o en la ecografía puede sugerir la existencia de carcinoma hepatocelular (CHC). La variación en la ecogenicidad y la densidad del tejido en los escaneos limitan la evaluación de los estudios de imagen en la detección de nódulos carcinomatosos.³⁰

En HTI, la AFP es un marcador tanto para el desarrollo de CHC como de los trastornos metabólicos propios de HTI. Un aumento de AFP debe ser tomado como sugerente de la presencia de CHC, debido a que hasta ahora no se ha reportado ningún paciente con hepatocarcinoma y niveles de AFP normales⁴⁵.

Manifestaciones Neurológicas

Las crisis neurológicas tienen dos fases: la primera, es un periodo activo de parestesias dolorosas, signos autonómicos como hipertensión,³¹ taquicardia y en algunas ocasiones, parálisis progresiva; la segunda fase, es un periodo de recuperación, visto en crisis con debilidad o parálisis. Las crisis dolorosas son más frecuentes, durante el pródromo -que a menudo se produce después de una infección de poca importancia- y son a menudo en las piernas; el paciente se encuentra irritable y menos activo de lo usual. La recuperación de las crisis paralíticas es posible, aunque los pacientes con crisis repetidas severas pueden tener debilidad crónica.²⁸

Es importante notar que el desarrollo mental del paciente con HTI es normal y durante las crisis neurológicas sus niveles de conciencia no se ven disminuidos. La fase activa de las crisis suele durar de 1 a 7 días.²⁸

Las crisis neurológicas no están asociadas con el deterioro de las pruebas de función hepática. Las transaminasas plasmáticas, los tiempos de protrombina y bilirrubina están sin cambios con respecto a los periodos entre las crisis. En algunos casos, la excreción de catecolaminas se ve incrementada.³¹

Los cambios neuropatológicos no son específicos, aunque en las biopsias los nervios periféricos revelan degeneración axonal y desmielinización.

La vacuolización de la materia blanca ha sido el hallazgo más consistente en la autopsia, probablemente el resultado de la terminal de anomalías electrolíticas en el paciente es una inteligencia normal.²⁸

Esto es un riesgo significativo de muerte, particularmente en las crisis paralíticas. Se ha reportado que en una serie de 20 pacientes quienes experimentaron al menos una crisis, 11 de 14 murieron debido a complicaciones de insuficiencia respiratoria⁴⁶.

Es importante resaltar que todos los pacientes con HTI deben estar en observación principalmente por la insuficiencia respiratoria, ya que esto puede complicarse rápidamente, por lo tanto, los pacientes con signos sugestivos de una crisis próxima deberían ser hospitalizados inmediatamente.³⁰

Manifestaciones renales

El daño renal está casi siempre presente en pacientes con HTI y es tan variable como el daño hepático. La Disfunción Tubular Renal se caracteriza por síndrome de Fanconi y complicaciones como el raquitismo hipofosfatémico, que es la manifestación clínica principal de la HTI. La severidad de la disfunción tubular renal es variable, en cierta medida con el estado clínico del paciente, ya que aumenta durante los periodos de descompensación, algunas veces se ha observado aminoaciduria generalizada y glucosuria. El raquitismo ocupa un lugar destacado en las descripciones clínicas iniciales que pueden ocurrir a pesar del tratamiento y ha sido reportado en la mayoría de las manifestaciones clínicas en pacientes adultos⁴⁷. En niños pequeños, la nefromegalia simétrica y calcificación, principalmente en la medula ósea son frecuentes y constituyen una importante característica radiológica.⁴⁸

4.5.2. Metabolitos.

Se ha encontrado que los niveles de tirosina en plasma están elevados inicialmente en la mayoría de los pacientes sintomáticos, sin embargo, pacientes adultos con un curso crónico y pacientes tratados con una dieta baja en proteína no muestran hipertirosinemia.³⁰

Por otro lado, aunque la tirosina elevada en sangre no es indicativa de HTI, es importante conocer sus niveles en los pacientes previamente diagnosticados para llevar a cabo el seguimiento de su tratamiento dietético.

La demostración de SA incrementada en fluidos biológicos es patognomónica para HTI.²¹

Diagnóstico pre sintomático mediante TN

Un resultado de TN con elevación de tirosina es sugestivo de HTI, la presencia de la enfermedad debe confirmarse o descartarse realizando la identificación de SA en orina y la determinación de la actividad enzimática.²¹

Diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

Se realiza en niños que son referidos a los centros especializados por presentar sintomatología compatible con HTI como falla hepática y renal. Se debe realizar la determinación de succinilacetona en orina, la cuantificación de aminoácidos plasmáticos y la determinación de la actividad enzimática de la FAH.

Métodos de cuantificación de tirosina

Los niveles de tirosina plasmática se pueden cuantificar por diferentes métodos, pruebas poco específicas como la de nitrosonaftol en la que se detecta tirosina, 4-hidroxifenil-lactato, y 4-hidroxifenilacetato²¹; ensayos bacteriológicos (prueba de Guthrie); métodos espectrofotométricos; técnicas modernas, sensibles y específicas como las cromatográficas (HPLC o cromatografía de intercambio iónico)^{11,12} y MS/MS.

Determinación de succinilacetona

El diagnóstico bioquímico de HTI es posible por la cuantificación de succinilacetona en plasma, sangre depositada en papel filtro, orina y líquido amniótico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS por sus siglas en inglés *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) o mediante MS/MS⁴⁹. Tradicionalmente, la orina fue la matriz preferente para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de los casos de HTI.

La SA puede ser detectada en orina debido a que su naturaleza hidrofílica le permite tener un aclaramiento renal relativamente alto cuando las concentraciones son aproximadamente 3 veces mayores en la orina que en el plasma.⁵⁰ La determinación de la SA urinaria por electroforesis capilar también se ha reportado, sin embargo, este método carece de un estándar interno, lo que disminuye su especificidad.⁵¹

La técnica de GC/MS se basa en la extracción de los ácidos orgánicos de la orina utilizando el método de extracción por disolventes, formación de sus derivados oximados por una reacción con hidroxilamina⁵² (**Figura 7**) y la formación de sus derivados volátiles por una reacción con trimetilsilil-trifluoroacetamida + trimetilsilano.⁵³

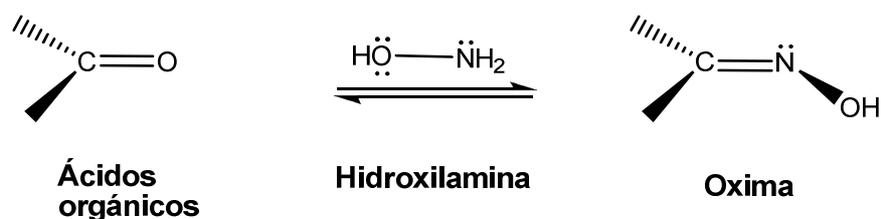


Figura 7. Formación de la oxima de un ácido orgánico⁵³

Al determinar los ácidos orgánicos en orina para medir excreción de SA, se han encontrado niveles elevados de 4-hidroxifenilpiruvato, 4-hidroxifenil-lactato y 4-hidroxifenilacetato, sin embargo, éstos no son específicos ya que se han encontrado en otras enfermedades hepáticas⁵⁴.

La importancia de los nuevos métodos analíticos como la MS/MS radica en su capacidad de análisis de múltiples compuestos de manera simultánea, con un alto grado de sensibilidad. Existen diferentes métodos para cuantificar SA como

la determinación cuantitativa de los derivados propiónicos de isoxazol para SA en muestras de sangre seca mediante MS/MS, utilizando SA marcada isotópicamente (D2-SA) como estándar interno. Otro método similar fue publicado recientemente para la determinación de SA en orina, se utiliza SA marcada con ácido 5 (3)-metil-3 (5)- ácido propiónico isoxazol como patrón interno.⁵⁵ Este método permite detectar la SA en bajas concentraciones en pacientes con sospecha de HTI y en pacientes previamente diagnosticados permite llevar a cabo el seguimiento del tratamiento.

4.5.3. Biopsia hepática

Otro método para el apoyo en el diagnóstico, es la biopsia hepática la cual permite conocer el tipo y extensión de las alteraciones histopatológicas. También ha sido utilizada para conocer la evolución del daño, establecer el pronóstico y conocer la respuesta al tratamiento.⁵⁶

Las principales indicaciones de la biopsia hepática en niños se muestran en la **Tabla 4.**

Tabla 4. Indicaciones de la biopsia hepática en los niños⁵⁷

- 1.- Síndrome colestásico
- 2.- Hipertensión portal
- 3.- Hepatomegalia no explicada
- 4.- Sospecha de error congénito del metabolismo
- 5.- Fiebre de origen desconocido
- 6.- Extensión y grado de hepatitis crónica
- 7.- Evaluación de trasplante hepático
- 8.- Masas ocupativas
- 9.- Evaluación de la eficacia del tratamiento de hepatopatías específicas
- 10.- Evaluación del tipo y extensión de daño hepático por drogas

Las principales contraindicaciones para realizar una biopsia hepática se muestran en la **Tabla 5.**

Tabla 5. Contraindicaciones de la biopsia hepática⁵⁷

- Coagulopatías
- Plaquetas menores de 80,000
- Tiempo de Protrombina < 50%
- Tiempo de sangrado mayor de 5 minutos
- Paciente que no cuente con valoración por ultrasonido
- Ingestión reciente de analgésicos no esteroideos (7 a 10 días previos)
- Colangitis
- Hemangiomas
- Ascitis

Para realizar el procedimiento se requiere el consentimiento informado firmado por el padre o tutor del paciente; que sea practicado por personal con experiencia. Todos los pacientes deben contar con un ultrasonido y gammagrama de captación hepática previos a la biopsia.⁵⁷

4.5.4. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la FAH puede ser determinada en linfocitos, eritrocitos o en biopsia de hígado.²¹

Kvittingen y cols. comprobaron que el defecto de la HTI se encuentra a nivel de la FAH.⁵⁸ mediante la evaluación de la actividad enzimática de la FAH en muestras de tejido hepático de una paciente con HTI, utilizando el fumarilacetoacetato como sustrato, sintetizado a partir del ácido homogentísico, los productos se identificaron por GC/MS. Encontrando que la actividad enzimática de la paciente con respecto a los controles fue menor al 2%. La relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de reacción fue obtenida a partir de una curva enzimática. La K_m resultante fue de 1.3 $\mu\text{mol/l}$ a un pH de 7.5 y midiendo la hidrólisis de la FAH a una absorbancia de 330 nm. La inhibición se observó usando el ZnCl_2 , CuCl_2 y el ácido *p* – cloromeruribenzoico a bajas concentraciones (0.001 $\mu\text{mol/l}$) necesitando un corto periodo de pre-incubación de la enzima con el inhibidor.

4.5.5. Biología molecular²¹

La demostración de que un paciente tiene dos alelos mutados en el gen que codifica para la FAH confirma el diagnóstico de HTI.

La metodología utilizada por Arranz y cols. para el análisis mutacional, en especial para identificación de mutaciones de empalme, fue llevada a cabo en muestras de ARN proveniente de pacientes. Estas alteraciones fueron caracterizadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT – PCR) y posteriormente se secuenciaron los productos de cDNA resultantes.

Las mutaciones del sitio de empalme fueron identificadas en las regiones genómicas de interés, las cuales se amplificaron por PCR utilizando ADN genómico obtenidos a partir de leucocitos, muestras de tejido hepático y fibroblastos, las secuencias de nucleótidos amplificadas fueron visualizadas por electroforesis, posteriormente fueron purificadas y secuenciados directamente utilizando el método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger, finalmente se realizó el análisis automatizado de secuenciación del ADN.

El diagnóstico molecular se brinda a aquellas familias con uno o varios miembros afectados y en caso de que el paciente haya fallecido con sospecha de HTI con el fin de dar asesoramiento genético a los padres.

4.6 Tratamiento.

Se ha reportado que el 90% de los pacientes que solo tienen tratamiento dietético muere antes de los 12 años de edad⁵⁹. A lo largo de la década de los 80, la base del tratamiento fue el trasplante de hígado, reportes en Quebec, demuestran que más del 92% sobreviven²⁸. En los años recientes ha mejorado de forma importante el conocimiento de las bases moleculares, la fisiopatología y especialmente el tratamiento de esta enfermedad. La terapia con el uso de 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexadiona (NTBC), un potente inhibidor de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa que impide la formación de metabolitos tóxicos (**Figura 4**), ha cambiado de manera radical la historia natural de la HTI⁶⁰.

El tratamiento con NTBC puede prevenir el desarrollo de la enfermedad hepática a largo plazo y reducir significativamente el riesgo de desarrollar CHC⁶¹ en comparación con el tratamiento dietético, ya que se ha descrito que a pesar de una intervención dietética temprana, la mayoría de los niños no tratados con NTBC eventualmente desarrollan cirrosis, aunque en tiempo variable.⁶²

Después de una fase aguda, la ingesta de fenilalanina y tirosina se valoran de acuerdo al crecimiento del paciente y a sus niveles de tirosina en plasma. Como una aproximación, un mínimo de alrededor de 90mg/kg/d de fenilalanina más tirosina es suficiente para el crecimiento normal en infantes.

Ligeramente más de la mitad de esta cantidad es proporcionada como fenilalanina. El tratamiento se individualiza de acuerdo al estado metabólico del paciente y se lleva un control particular de los requerimientos de tirosina y fenilalanina para el mantenimiento de tirosina plasmática dentro del intervalo de referencia con lo que se garantiza el crecimiento adecuado.³⁰

Terapia dietética en pacientes no tratados con NTBC

El efecto de la restricción dietética de fenilalanina y tirosina sobre los resultados a largo plazo no ha sido formalmente documentado, debido a la variabilidad en la evolución clínica y la falta de un marcador bioquímico confiable del control metabólico. La evidencia disponible sugiere que la terapia dietética mejora la función tubular renal en algunos casos y de manera lenta, sin embargo, no previene el progreso de las manifestaciones hepáticas.

Además de la restricción dietética de tirosina y fenilalanina, la otra variable principal en el control de la degradación de tirosina es el estado metabólico. Bajo estrés catabólico -como en los casos de infecciones, ayuno, cirugías, o quemaduras- los músculos y órganos pueden liberar grandes cantidades de aminoácidos, esta descarga de fenilalanina y tirosina endógena puede afectar la capacidad metabólica del cuerpo. La principal meta en la terapia de HTI es evitar el catabolismo tisular proporcionando suficientes calorías para la reparación tisular durante estados catabólicos y tratando la subyacente condición aguda.

Los niveles de metionina se normalizan con otras funciones hepáticas en los días y semanas siguientes al diagnóstico y terapia. La restricción en la ingesta de metionina no se especifica, pero algunos investigadores la han restringido cuando observan que la hipermetioninemia se prolonga.³⁰

En los pacientes no tratados con NTBC, la tirosina en sangre y succinilacetona son indicadores imprescindibles del estatus en el metabolismo intracelular de la tirosina y las decisiones acerca de la dieta se basan en gran parte en la evaluación clínica del paciente.

Trasplante hepático

El trasplante de hígado es un tratamiento efectivo para HTI resultando en una mejoría clínica y bioquímica. Las indicaciones actuales para llevar a cabo el trasplante son en aquellos pacientes que no responden a la terapia con NTBC, el riesgo de malignidad y la mala calidad de vida relacionada con la restricción dietética y la frecuencia de muestreo de sangre⁶³. Algunos grupos han abogado por el trasplante hepático temprano para todos los pacientes con HTI como curativos de la enfermedad y de prevención de las complicaciones de las crisis neurológicas y evitar el daño hepático así como el CHC. Sin embargo a nivel renal, la disfunción tubular y glomerular no es corregida por trasplante hepático,⁶⁴ los hallazgos en la excreción urinaria residual de succinilacetona han sugerido que puede contribuir a la disfunción progresiva tubular.^{65,66} En vista de la persistente excreción urinaria de SA y los efectos nefrotóxicos por el uso de inmunosupresores como tratamiento para prevenir el rechazo al trasplante, se ha recomendado el seguimiento periódico de la función renal y la reducción de la terapia inmunosupresora post- trasplante.⁶³

Aquellos pacientes con cirrosis micronodular son evaluados periódicamente mediante técnicas de imagen para detección del desarrollo de distintos nódulos. Una vez que los nódulos son detectados y se haya descartado metástasis, los niños son rápidamente puestos en la lista de espera para trasplante. En algunos casos en los que el nódulo es accesible, la biopsia puede ser una opción. La falta de displasia o carcinoma en un nódulo examinado mediante biopsia puede reducir la urgencia del trasplante aunque no necesariamente. Se conoce que la displasia es una condición premaligna⁶⁷.

1. OBJETIVO GENERAL

Describir las características clínicas y bioquímicas de una cohorte de pacientes mexicanos con Tirosinemia Tipo I

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar los aminoácidos plasmáticos de muestras de plasma de pacientes con sospecha de padecer HTI mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Determinar el perfil de ácidos orgánicos urinarios mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS) en muestras de pacientes con sospecha de padecer HTI.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudio descriptivo, observacional y transversal.

Población de Estudio.

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico confirmado de HTI del archivo histórico del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz de 1995 hasta el año 2010.

Procedimiento

Se registraron los siguientes parámetros: tipo de prueba metabólica aplicada que llevo al diagnóstico: TNA (detección presintomática o temprana) o tamiz metabólico (detección sintomática), así como las principales características clínicas y bioquímicas a través de la cuantificación del perfil de aminoácidos mediante HPLC y determinación de ácidos orgánicos y succinilacetona por GC/MS.

3.2. Descripción de las Metodologías Analíticas

3.2.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS MEDIANTE HPLC

Reactivos:

- Solución de p-fluorofenilalanina 20 μ M grado reactivo en metanol (estándar interno).
- Metanol grado HPLC.
- Solución sobresaturada de ácido bórico pH=9.
- o-ftaldialdehído (OPA) 0.146mM en metanol: etanetiol; 98:2 (solución derivatizante).
- Tetrahidrofurano grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Fosfato monobásico de sodio monohidratado, grado reactivo.
- Fosfato dibásico de sodio anhidro, grado reactivo.
- Filtros de nylon con poro de 0.05 μ m.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, EUA) excepto el metanol, el tetrahidrofurano y el acetonitrilo que fueron obtenidos de Caledon, Ont. Canadá y los filtros de nylon (Titán, TN, EUA).

Equipo:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters modelo 2690.
- Detector de fluorescencia marca Waters modelo 474
- Fase estacionaria: Columna Phenomenex Kingsorb C18 de 150 x 4.6mm con un diámetro interno de 3 μm .
- La detección de los aminoácidos se realizó a una longitud de onda de excitación de 338nm y una longitud de onda de emisión de 425nm.

Procesamiento de la muestra:

A una alícuota de 50 μL de plasma se le adicionó 1 mL de solución del estándar interno para precipitar las proteínas, se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm (o 5376.0 g m/s^2) a 4°C , se filtró utilizando filtros de nylon con poro de $0.05\mu\text{m}$, posteriormente se tomaron 100 μL del filtrado y se les agregaron 20 μL de la solución amortiguadora de boratos y 20 μL de la solución derivatizante. Para el análisis cromatográfico se utilizaron 10 μL de volumen de inyección.

Condiciones cromatográficas:

- Fase Móvil.

Disolvente A

Amortiguador de fosfatos 0.02mM (pH 7.0): tetrahidrofurano: agua; 91: 5: 4.

Disolvente B

Amortiguador de fosfatos 0.02mM (pH 7.0): acetonitrilo: agua; 40: 5: 55.

Condiciones del Gradiente:

TIEMPO (min)	FLUJO (mL/min)	% A	% B
Inicial	1.3	78	22
30	1.3	50	50
38	1.3	37	63
39	1.3	0	100
46	1.3	0	100
48	1.3	78	22

Temperatura de la columna: 45⁰C

Temperatura de la muestra: 4⁰C

3.2.2. DETECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS URINARIOS Y SUCCINILACETONA URINARIA MEDIANTE GC/MS

Reactivos:

- Ácido dodecanedióico 2mM (98% de pureza) en metanol grado HPLC (estándar interno)
- Hidrocloruro de o-(2,3,4,5,6 – pentafluorobencil) – hidroxilamina grado reactivo
- Solución de hidróxido de sodio 3N grado reactivo
- Ácido clorhídrico concentrado (37%) grado reactivo
- Solución sobresaturada de cloruro de sodio grado reactivo
- Acetato de etilo grado HPLC
- Solución de hidróxido de sodio 0.05M en metanol grado HPLC
- Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA + TMS) grado reactivo

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, EUA), excepto el ácido clorhídrico (J.T.Baker, Edo. Mex. Mex), el acetato de etilo (Caledon, Ont. Canadá) y BSTFA + TMS (Regis, IL, USA).

Equipo:

- Cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890N
- Espectrómetro de masas marca Agilent modelo 5973.
- Fase estacionaria: Columna capilar J & W modelo 1225532 DB – 5MS, de (5% fenil) – metilpolisiloxano de 30m x 0.250mm de diámetro x 0.25 μm de espesor de película.
- Fase móvil: Gas Helio de ultra alta pureza.

Procesamiento de la muestra:

Debido a que los valores de la concentración de ácidos orgánicos urinarios se reportan, por convención internacional, en mmol/mol de creatinina, previo a su extracción, debe determinarse la concentración de creatinina en orina⁶⁸.

La determinación de creatinina se realizó mediante el método de Jaffe⁶⁹. La orina se hace reaccionar con picrato de sodio para obtener un compuesto que da coloración amarilla, cuya absorbancia se lee a 520 nm en un espectrofotómetro. Para obtener la concentración de creatinina urinaria, se relaciona la absorbancia de una dilución de creatinina de concentración conocida, con la absorbancia de la orina.

Para llevar a cabo la determinación de los ácidos orgánicos urinarios mediante GC/MS es necesario que las muestras de orina tengan una concentración de metabolitos homogénea⁶¹, para ello se toma como metabolito de referencia a la creatinina. Se toma el volumen necesario de orina que contenga una concentración de creatinina de 0.06 mg/mL de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\mu\text{L de orina que tienen una concentración de creatinina } 0.06\text{mg/mL} = [0.06 \text{ mg creatinina} / \text{concentración de creatinina (mg/mL)}] * (1000\mu\text{L}/1\text{mL})$$

A la orina se le adicionaron 20 μL de solución de estándar interno 2 mM + 5 mg de hidrocloreuro de o- (2,3,4,5,6 – pentafluorobencil) – hidroxilamina para obtener un compuesto derivado oximado de los ácidos orgánicos, posteriormente estos derivados oximados se extrajeron por duplicado utilizando acetato de etilo.

El disolvente se eliminó por evaporación en una campana de extracción por 12 horas. Se llevó a cabo la reacción de formación de los derivados volátiles de los ácidos orgánicos mediante la adición de 100 μ L de BSTFA + TMS a las muestras secas. Al final de las 12h se realizó una dilución 1:4 y se inyectó 1 μ L de esa dilución en el cromatógrafo de gases para su análisis.

Condiciones cromatográficas:

- Programa de temperatura: La temperatura inicial de la columna fue de 40°C por 5 min, la temperatura final de 280°C por 2 min, velocidad de calentamiento 10°C por min.
- Temperatura del inyector: 250°C
- Temperatura de la línea de Transferencia: 280°C
- Temperatura de la fuente de ionización: 150°C
- Tipo de inyección: Total (Splitless)
- Se realiza un monitoreo total de iones ("scan") en el intervalo m/z de 45 a 650.

4. RESULTADOS

Se encontró un total de quince pacientes con Tirosinemia Tipo I, 7 masculinos (47%) y 8 femeninos (53%) en 15 familias los cuales fueron diagnosticados y/o manejados en el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, se documentó consanguinidad en dos de las 15 familias (13%). Dentro de los datos de la historia familiar se encontró que 4 de los 15 pacientes (27%) tuvieron algún hermano fallecido por problema hepático inespecífico.

Tres de los 15 pacientes no tuvieron determinación de aminoácidos plasmáticos al momento del diagnóstico y de un caso no se cuenta con el expediente clínico.

Todos los pacientes fueron diagnosticados por presentar historia clínica que hizo sospechar al médico de la presencia de un Error Innato del Metabolismo.

Datos geográficos

Se documentó que de 13 de los 15 pacientes (77%) provenía de algún estado de la República Mexicana, mientras que el resto fue originario de la Ciudad de México o de la zona conurbada. **(Tabla 6).**

Tabla 6. Procedencia de pacientes con HTI.

Procedencia	Num. de pacientes	Porcentaje
Colima	1	8
Distrito Federal (DF)	3	23
Edo. Mex	4	31
Guanajuato	1	8
Guerrero	1	8
Morelos	1	8
Tabasco	1	8
Veracruz	1	8

Diagnóstico bioquímico

La presencia de HTI se sospechó en base al cuadro clínico que presentaron los pacientes, con el fin de confirmar o descartar la enfermedad se realizó la determinación del perfil de ácidos orgánicos urinarios mediante GC/MS y la cuantificación de aminoácidos por HPLC.

Análisis de los ácidos orgánicos y la succinilacetona por GC/MS

La separación de los ácidos orgánicos urinarios se realizó mediante la cromatografía de gases en donde se observó una importante elevación de los metabolitos de la tirosina: ácidos 4- hidroxifenil-acético, 4-hidroxifenil-láctico, 4 hidroxifenil-pirúvico y succinilacetona, los cuales fueron eluidos en un tiempo de retención de 19.7 min, 22.5 min, 24.0 min y 27.9 minutos respectivamente. En la **Figura 8** se compara el perfil urinario característico de un paciente con HTI (en color negro) con el de un individuo sano (en color verde).

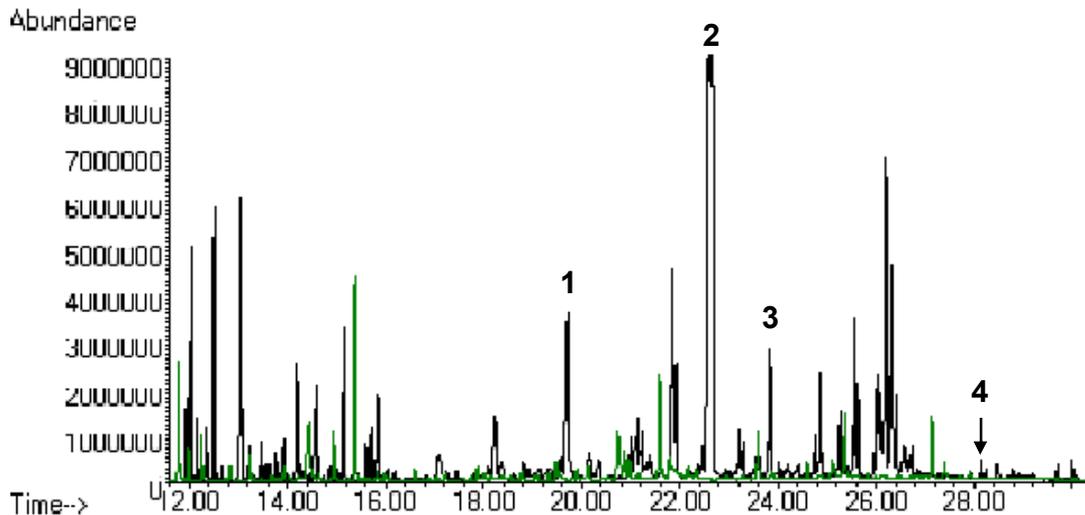


Figura 8. Cromatograma de un paciente con HTI comparado con un individuo sano. Los picos señalados corresponden a 1. Ácido 4-Hidroxifenil-acético 2. Ácido 4-Hidroxifenil-lactico 3. Ácido 4-Hidroxifenil-piruvico 4. Succinilacetona.

Posterior al paso cromatográfico se realizó la identificación de los metabolitos antes mencionados mediante el espectrómetro de masas, el cual cuenta con una fuente de ionización fuerte. Ésta técnica genera fragmentos específicos para cada compuesto analizado, lo que permite su identificación.

La **Figura 9** ilustra el espectro de masas de la SA en su forma derivatizada dioximada y con 3 moléculas de TMS (tri-TMS) obtenida por GC/MS. El patrón de fragmentación se caracteriza por el ion molecular con una m/z de 620. Los iones 181 y 73 corresponden a fragmentos de BSTFA y TMS respectivamente.

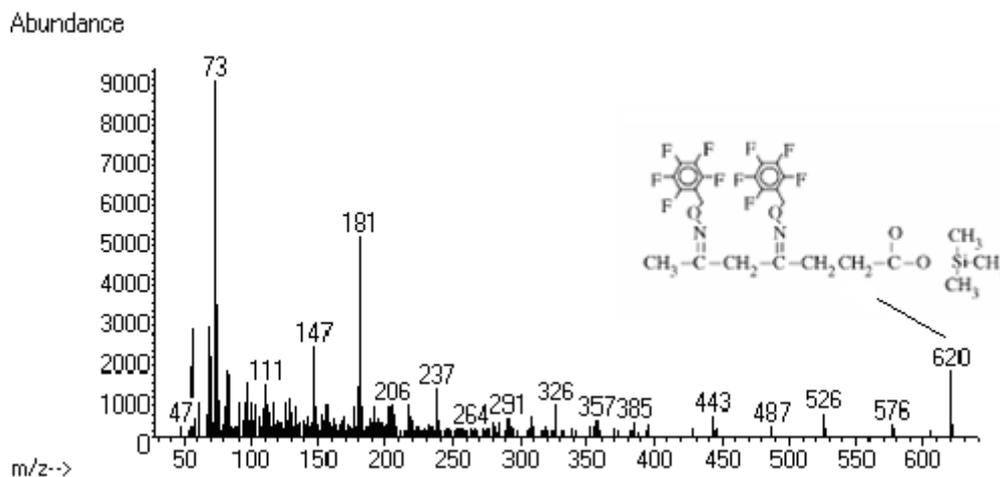


Figura 9. Espectro de masa de la Succinilacetona TMS – dioxima.

Análisis de los aminoácidos por HPLC

Se realizó la cuantificación de aminoácidos plasmáticos a 12 de los 15 pacientes.

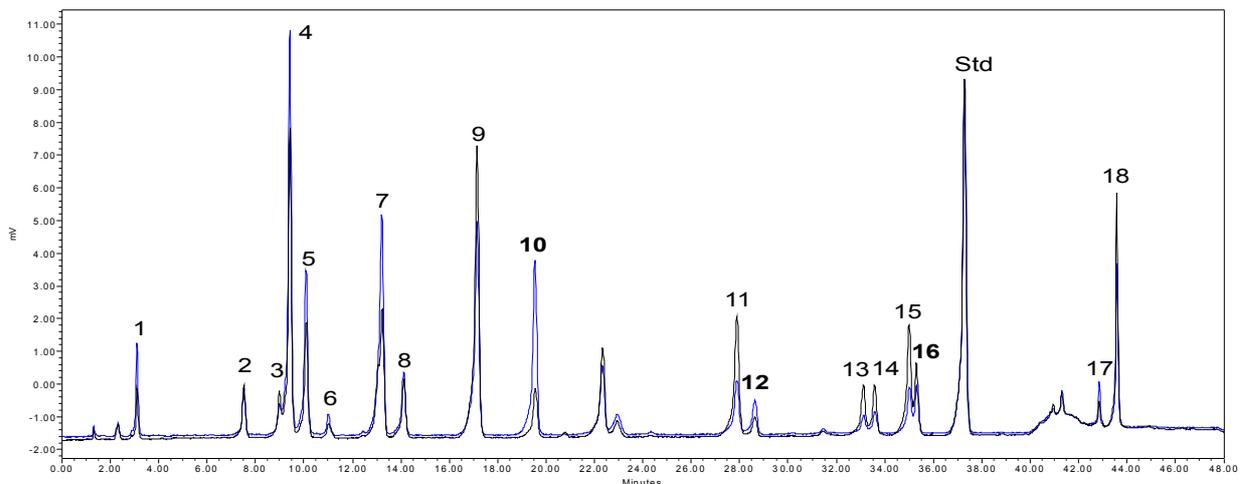


Figura 10. Cromatograma de aminoácidos plasmáticos de un paciente con HTI (color azul) comparado con un individuo sano (color negro).

En la **Figura 10** se muestra el cromatograma característico de un paciente con HTI en el que se compara el perfil de aminoácidos de un individuo sano con el de un paciente con HTI en donde se observa la elevación de tirosina. Los valores de referencia utilizados se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos⁷⁰

	Aminoácido	Intervalo normal (μM)
1	Acido Glutámico	10 – 133
2	Asparagina	21 – 95
3	Histidina	41 – 101
4	Glutamina	246 – 1182
5	Citrulina	3 -35
6	Arginina	12-133
7	Glicina	81-436
8	Treonina	33 – 128
9	Alanina	143 - 439
10	Tirosina	22 – 108
11	Valina	64 - 294
12	Metionina	9 – 42
13	Isoleucina	31 – 86
14	Triptofano	23 – 71
15	Leucina	47 – 155
16	Fenilalanina	31 – 75
17	Ornitina	22 – 103
18	Lisina	52 – 196

Los aminoácidos que se encontraron elevados al momento del diagnóstico fueron: tirosina, fenilalanina y metionina (**Figura 11**).

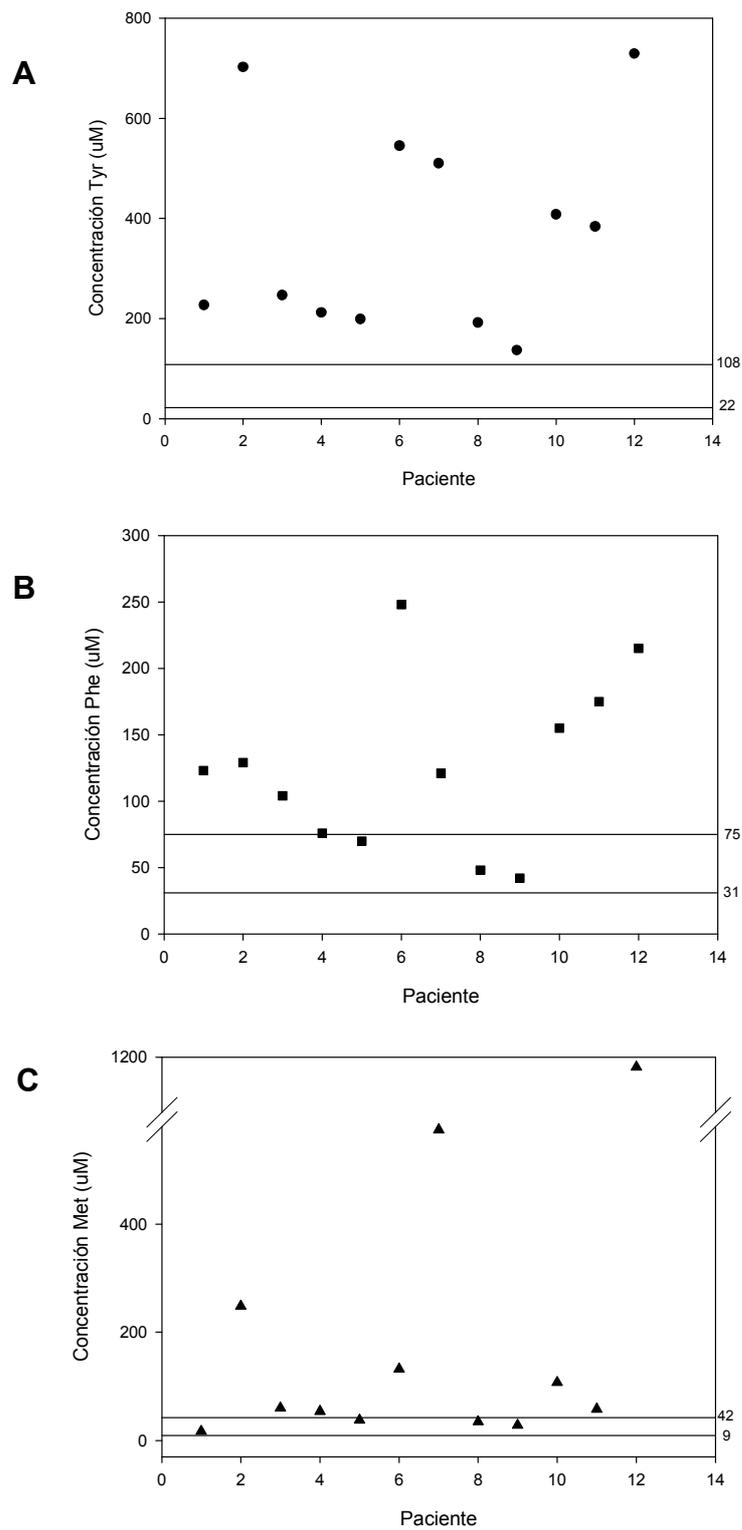


Figura 11. Concentración de aminoácidos plasmáticos de importancia clínica en HTI de 12 pacientes al momento del diagnóstico. **(A)** Tirosina (promedio= 380uM), **(B)** Fenilalanina (promedio = 124uM) y **(C)** Metionina (promedio= 211uM). Las líneas horizontales representan el intervalo de referencia para cada aminoácido.

Edad de inicio de los síntomas y diagnóstico

La edad en la que los pacientes presentaron los primeros síntomas varió de los 9 días a los 15 meses con un promedio de 10 meses.

De los 15 pacientes estudiados solamente uno fue diagnosticado en la etapa neonatal (primeros 30 días de vida); 12/15 fueron diagnosticados entre el mes y los 2 años de vida (etapa lactante) y 2/15 fueron diagnosticados en la etapa pre-escolar (mayores a dos años y menores a 6 años). El promedio de edad al diagnóstico fue de 20 meses (1 meses- 5 años).

En promedio transcurrieron 10 meses entre el inicio de los síntomas y el momento del diagnóstico (**Figura 12**).

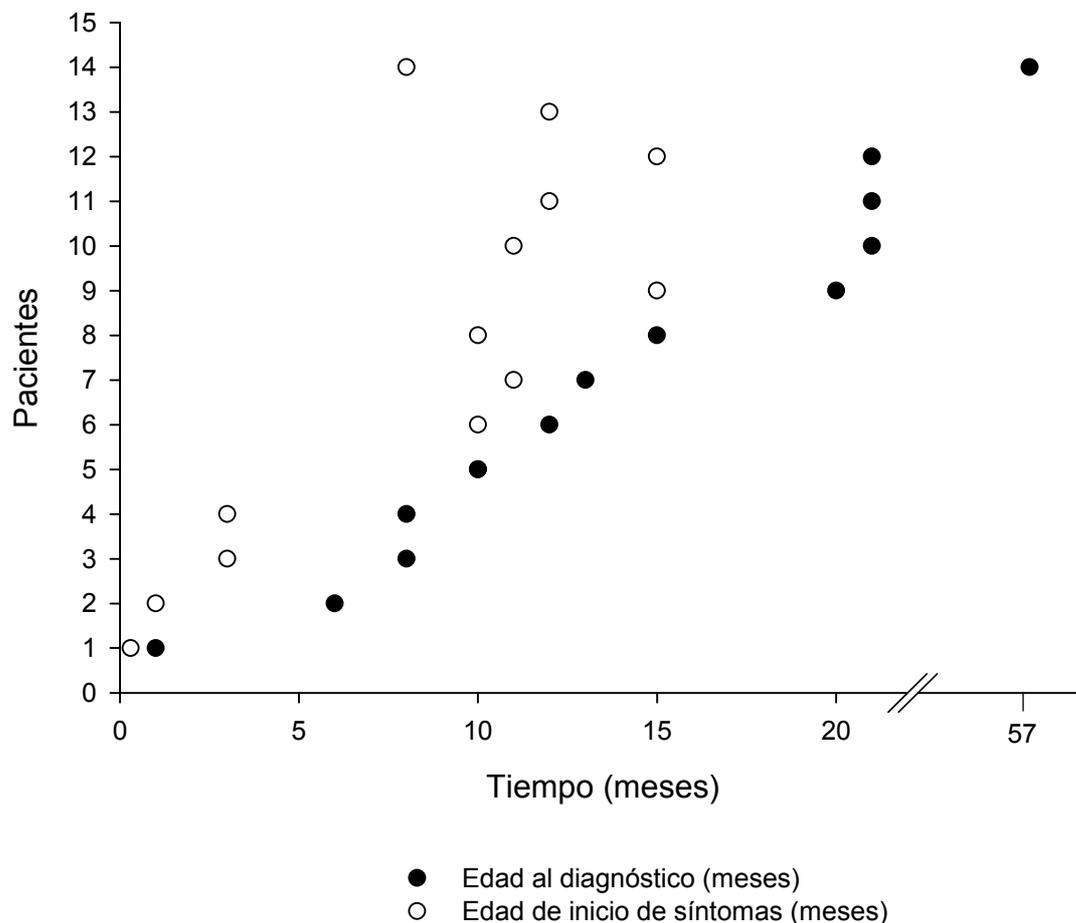


Figura 12. Comparación de la edad de inicio del padecimiento con la edad al momento del diagnóstico para cada uno de los pacientes con HTI.

Tipo de síntomas presentados al momento del diagnóstico

El 100% de los pacientes presentó alguna anomalía hepática y bioquímica, seguido de las manifestaciones generales como falla para crecer (60%), el 87% de los pacientes presentaron anomalías renales (13/15) y siete pacientes (47%) presentaron alguna manifestación neurológica (**Figura 13**).

El órgano que se vio más afectado fue el hígado, siendo la hepatomegalia el signo más frecuente seguida de cirrosis. A 6/15 pacientes se les realizó por lo menos una de las siguientes pruebas de función hepática: cuantificación de bilirrubina directa (4/15), tiempos de coagulación (6/15), transaminasas hepáticas (5/15), concentración de fosfatasa alcalina (6/15) y α -fetoproteína (3/15) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Pruebas de función hepática realizadas a los pacientes con HTI.

Estudio	Promedio	Valor de referencia
Bilirrubina directa	3	< 0.25mg/dL
Tiempo de protrombina	46	13-17seg
Tiempo parcial de tromboplastina	76	30-43seg
Alanina amino transferasa (ALT)	202	18 U/L
Aspartato amino transferasa (AST)	513	16 U/L
Fosfatasa alcalina	1144	<400 U/L
a-fetoproteína	107562	< 40 ug/L

Los biomarcadores de daño renal encontrados en los pacientes fueron aminoaciduria generalizada (9/15), presencia de azúcares reductores en la orina (4/15) y riñones hipertróficos (2/15).

Las manifestaciones neurológicas que se presentaron con mayor frecuencia entre los pacientes estudiados corresponden a las crisis convulsivas; dentro de las anormalidades de laboratorio la mayoría de los pacientes tuvo anemia y la mitad de ellos presentó hipoglucemia (**Figura 13**).

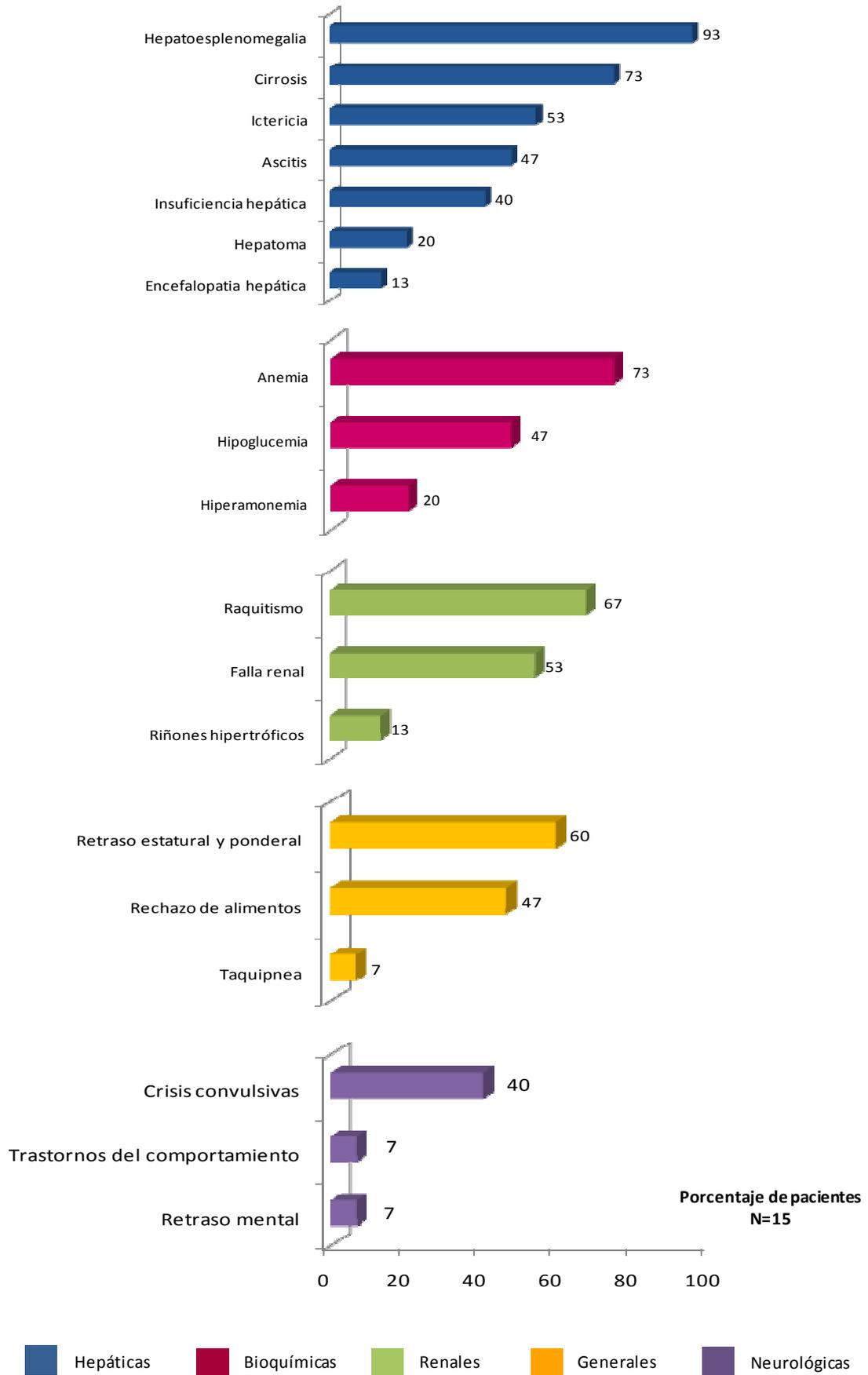


Figura 13. Cuadro clínico de pacientes con HTI al momento del diagnóstico.

Biopsia Hepática.

A 10/15 pacientes se les realizó biopsia hepática (67%), el 80% de ellos presentaron cirrosis hepática y en el 50% de los casos se presentó esteatosis. Cabe destacar que ninguno presentó carcinoma hepatocelular al momento de dicha biopsia.

Tabla 9. Resultados de las biopsias hepáticas de los pacientes con HTI.

Paciente	Biopsia
2	Dx. Compatible con hemocromatosis. En el lobulillo los hepatocitos estan distendidos, muestran transformación gigantomitótica y colestasis intracitoplasmática e intracanalicular.
4	Cirrosis hepática con actividad moderada secundaria a enfermedad metabólica.
5	Dx. Cirrosis hepática macronodular con cambios regenerativos acentuados compatibles con Tirosinemia. Hay nódulos de regeneración gruesa bandas de fibrosis, atrapamiento de hepatocitos entre fibrosis
7	Dx. Cirrosis metabólica. Los cortes muestran distorsión de la arquitectura lobulillar por presencia de nódulos de hepatocitos de tamaño variable que están separados por tabiques delgados de tejido conjuntivo. Algunos nódulos muestran esteatosis macrovesicular acentuado, otros no presentan esteatosis. Hepatocitos con pérdida de relación núcleo-citoplasma.
8	Cirrosis micronodular activa, esteatosis macrovesicular.
9	Cirrosis hepática secundaria a enfermedad metabólica consistente con tirosinosis con displasia leve, focal. Estudio de ecogenicidad: Daño hepático crónico multinodular, hipertensión portal y nefromegalia.
10	Cirrosis hepática micro y macronodular con degeneración vacuolar de los hepatocitos y esteatosis.
12	Dx. Cirrosis micronodular. La estructura lobulillar esta alterada, se observa un nódulo de regeneración y gruesas bandas de fibrosis, hepatocitos con esteatosis degeneración vacuolar del citoplasma.
13	Hepatitis neonatal de células gigantes con colestasis acentuada, proliferación de conductos (universal), fibrosis portal severa y siderosis
15	Cirrosis de nódulos irregulares con actividad moderada, esteatosis predominantemente macrovesicular grado III.

Tratamiento

El 93% de los pacientes recibieron tratamiento nutricional con dietas restringidas en proteína, de los cuales el 50% recibió una dieta con suplementación de aminoácidos esenciales mediante fórmula libre de fenilalanina y tirosina, personalizada y calculada por un experto en nutrición metabólica.

Ninguno de los pacientes recibió tratamiento farmacológico con NTBC.

El 20% de los pacientes (3/15) fueron tratados mediante trasplante hepático. El primero de ellos desarrolló una enfermedad linfoproliferativa post-trasplante y el segundo de ellos fue una niña a la cual se le realizó un trasplante ortotópico, proveniente de un donante cadavérico a la edad de dos años 8 meses, previo al trasplante, la paciente presentaba cirrosis y posterior al mismo presentó hepatocarcinoma con metástasis a la edad de tres años. El tercer paciente trasplantado no regresó a sus consultas de seguimiento y no se tiene información de su evolución.

Mortalidad

La cohorte estudiada presentó una mortalidad del 73%, de los 15 pacientes 11 fallecieron (**Figura 14**). El promedio de edad al fallecimiento fue de 2 años 9 meses con una probabilidad de supervivencia posterior al diagnóstico de 23 meses en promedio.

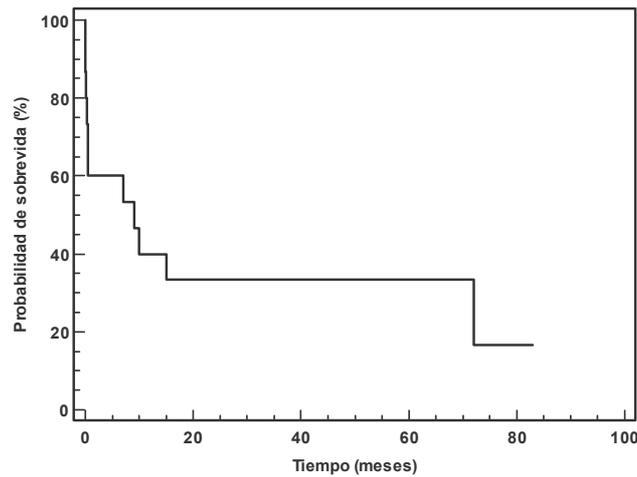


Figura 14. Curva de supervivencia de los pacientes con HTI.

La causa de muerte se identificó en 6/11 pacientes (**Tabla 10**), de los 5 pacientes restantes no se cuenta con el acta de defunción. Entre las causas de la muerte se encontraron choque hemorrágico (3/6), falla orgánica múltiple (1/6), enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (1/6) y choque séptico post-trasplante (1/6).

Tabla 10. Causas de fallecimiento de pacientes con HTI.

Paciente	Causa
21	Coagulación intravascular diseminada, choque hemorrágico, Hemacromatosis. Con acidosis metabólica compensada
4	Choque hipovolémico. Con Síndrome de Fanconi, Enfermedad diarreica aguda, cirrosis hepática, raquitismo hipofosfatémico, acidosis tubular renal, choque séptico, hipoglucemia, plaquetopenia, neutropenia, hipokalemia, hipocalcemia
6	Sepsis, falla orgánica múltiple y carcinoma hepatocelular
10	Hemorragia Pulmonar, Sepsis, Cirrosis Hepática, Tirosinemia, Sx. Colestásico
11	Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante
12	Choque séptico, Síndrome hemolítico. Posterior a Trasplante hepático

Los sobrevivientes actualmente tienen 1a 4m, 3a 5m, 5a9m, 6a2m de edad y dos de ellos se encuentran en lista de espera para trasplante hepático.

5. DISCUSIÓN.

La devastadora historia natural de la Tirosinemia Tipo I aún se observa en los pacientes mexicanos, si no es detectada y tratada a tiempo, los pacientes que la padecen mueren antes de los dos años de edad a causa del daño hepático progresivo.³⁰

La HTI forma parte del grupo de las enfermedades “raras” (incidencia igual o menor de 5 casos por cada 10,000 habitantes),⁷¹ tiene una prevalencia mundial de 1:100,000 recién nacidos, aunque existen regiones específicas como Saguenay-Lac en Quebec Canadá que presentan una frecuencia de portadores del gen mutado de 1:20 habitantes como consecuencia de la endogamia y la presencia de un complejo efecto fundador.⁷² En México no existen estudios poblacionales que permitan conocer la prevalencia de la HTI.

En el presente trabajo, el 23% de los pacientes estudiados fueron originarios del DF y el área conurbada (**Tabla 6**), este pequeño número de pacientes analizados, no nos permite hacer inferencias epidemiológicas; sin embargo, estos resultados sí podrían explicarse por la cercanía de los lugares de residencia de los pacientes al centro de referencia, el cual se encuentra centralizado.

El metabolito patognomónico para la confirmación de HTI es la succinilacetona en la orina.²¹ Todos los pacientes que conforman la cohorte estudiada presentaron cantidades elevadas de SA urinaria al momento del diagnóstico. Es importante notar que la adecuada recolección y manejo de las muestras para la búsqueda de succinilacetona es de crítica importancia debido a que es un metabolito sumamente volátil, lo que puede generar resultados falsos negativos si las muestras no se congelan de inmediato después de su recolección.

El promedio de la edad al inicio de los síntomas fue de 10 meses, sin embargo, los pacientes fueron diagnosticados a los 20 meses de edad en promedio (**Fig.12**). Este retraso evidencia la dificultad diagnóstica de la enfermedad debido a que el cuadro clínico de tipo hepático es poco específico de la enfermedad³⁰ y debido a la baja frecuencia de la enfermedad los médicos no la consideran en el diagnóstico diferencial, por otro lado, la determinación de

succinilacetona es una prueba que implica tanto personal como infraestructura especializados y solo se realiza en 2 centros de referencia en México.^{73,74}

Cuadro clínico

Todos los pacientes estudiados presentaron concentraciones plasmáticas elevadas de tirosina, metionina y fenilalanina al momento del diagnóstico (**Fig.11**), se encuentra reportado en la literatura que estas elevaciones son atribuibles a la disfunción hepática generalizada.⁷⁵ Es importante destacar que la elevación aislada de la tirosina en la sangre no es indicativa de HTI. Existen varias condiciones que pueden causar hipertirosinemia, ya sean adquiridas, como las dietas con alto aporte proteico,^{76,77} el escorbuto, la Tirosinemia transitoria del recién nacido,²¹ o heredadas, como las Tirosinemias Tipos II y III, Hipertiroidismo, Enfermedad de Wilson y Galactosemia.⁷⁸

Los principales signos encontrados en los pacientes estudiados fueron de tipo hepático progresivos (**Tabla 8 y Fig.13**), la hepato-esplenomegalia fue el signo más frecuente seguida de cirrosis, estos hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura.²⁸ Una posible explicación al daño hepático es el mecanismo de protección que surge debido a la agresión directa de los metabolitos tóxicos próximos al bloqueo metabólico provocando que el hígado acumule colágeno, fenómeno conocido como fibrosis, lo que da lugar a una importante interrupción del flujo sanguíneo y a un deterioro de la difusión de solutos entre los hepatocitos y el plasma. A medida que la fibrosis progresa, el hígado se subdivide en nódulos de hepatocitos en regeneración rodeados por tejido cicatrizal, lo que se conoce como cirrosis.⁷⁹ La esplenomegalia se observó en combinación con el daño hepático, una posible explicación a este hallazgo puede ser por la existencia de hipertensión portal secundaria a la cirrosis, cuando el tejido hepático se encuentra deteriorado, el flujo sanguíneo se ve desviado hacia el bazo y por consecuencia hay un aumento en el tamaño de éste órgano.⁷⁹

El 13% de los pacientes desarrolló carcinoma hepatocelular. Existen varias hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de hepato-toxicidad⁸⁰ las cuales están enfocadas en el fumarilacetoacetato, debido a que poseen grupos carbonilo α , β -insaturados que les confieren propiedades hidrofílicas y una potencial actividad biológica como la alquilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la disrupción del sistema antioxidante del glutatión. Jorquera y colaboradores realizaron experimentos tanto en cultivos de células hepáticas humanas como en los de ratones y encontraron que el fumarilacetoacetato induce apoptosis y mutagénesis, también encontraron que estos efectos son dosis-dependientes y se exacerban con la depleción de glutatión.²⁹

Por otro lado, es importante destacar que el cuadro clínico hepático puede ser confundido o sub-diagnosticado con otras patologías por lo que es importante que el médico realice el diagnóstico diferencial de la enfermedad.⁸¹

El daño renal encontrado en nuestros pacientes coincide con otras series reportadas.^{48,59} Este hallazgo puede explicarse por la acción del maleilacetoacetato, el cual es un derivado del ácido maleico. Este compuesto ha sido utilizado experimentalmente para la generación de un modelo animal de Síndrome de Fanconi desde los años 60 y se sabe que causa vasoconstricción arteriolar aferente mediante el aumento de los niveles locales de adenosina y AMP cíclico, lo que induce la liberación de renina causando un daño isquémico crónico en la nefrona.²⁸

Con respecto a las anomalías neurológicas, las crisis convulsivas fueron el signo más frecuente en la cohorte estudiada (**Fig.13**) este hallazgo no coincide con la literatura,⁸² sin embargo, Mitchell y colaboradores reportan que las crisis convulsivas a menudo pueden ser confundidas con hipertensión durante la cual los pacientes permanecen conscientes.²¹ En ninguno de los pacientes se documentó dolor o crisis neurológicas en comparación con otros autores, quienes encontraron la ocurrencia de estos episodios en un 42% de sus pacientes con HTI.⁴⁶

En cuanto a las anomalías generales se encontró que el 60% de los pacientes presentó retraso estatural y ponderal posiblemente esto se deba al defecto generalizado en la función tubular renal que puede asociarse en la reducción en el transporte de los aminoácidos, la glucosa y el fosfato y de como resultado lo que se conoce como el Síndrome de Fanconi, los niños con este síndrome suelen presentar falla en el crecimiento, raquitismo y síntomas relacionados con la hipopotasemia.⁸³

Biopsia hepática

Al ser el hígado el órgano más comprometido en la HTI, la biopsia hepática resulta una herramienta útil tanto en el apoyo diagnóstico como para evaluar el grado de afectación hepática. El hígado de los pacientes con HTI va teniendo todo un espectro de cambios tanto a nivel macro como microscópico a medida que la enfermedad progresa.^{21,28} La cirrosis fue el hallazgo más frecuente en la biopsia de los pacientes estudiados seguida de esteatosis. Estos resultados coinciden con la arquitectura del hígado que reportan otros autores²⁸ como evidencia del grave e irreversible daño hepático que provoca la enfermedad.

Todo este espectro de signos y síntomas progresivos que presentaron los pacientes refleja la necesidad de implementar en México programas eficientes de detección presintomática. En México son pocas las instituciones del sector público y privado que incluyen a la Tirosinemia Tipo I en su programa de Tamiz Neonatal el cual es muy costoso y solamente una pequeña proporción de la población puede tener acceso.⁸⁴ Este hecho impacta de manera importante en la salud de los pacientes debido a que todos ellos presentaron signos de daño hepático irreversible al momento del diagnóstico. Joshi y colaboradores afirman que el diagnóstico temprano retrasa la historia natural de la enfermedad debido a que permite la instauración del tratamiento de manera oportuna.⁸⁵

Tratamiento

Terapia Nutricional

Todos los pacientes tuvieron tratamientos nutricionales muy diversos, el 50% fueron tratados con dietas totalmente restringidas en proteína por largos

periodos de tiempo y sin suplementación de aminoácidos esenciales con alguna de las fórmulas especiales libres de tirosina y fenilalanina; dichas dietas no fueron calculadas por nutriólogos metabólicos especializados, como consecuencia, todos ellos presentaron datos de desnutrición como retraso estatural y ponderal además de anemia (**Fig. 13**). Se sabe que una ingesta inadecuada de proteínas puede resultar en falla para crecer, pérdida de peso y disminución de la tolerancia a la tirosina y fenilalanina.⁸⁶

Otro aspecto importante de la terapia dietética es que ésta no previene el desarrollo de falla hepática y el carcinoma hepatocelular.^{87,30} Además, se ha reportado que 90% de los pacientes que son tratados únicamente con terapia nutricional mueren antes de los 12 años de edad.²⁸

Trasplante hepático

El trasplante hepático está considerado como una opción terapéutica para los pacientes con HTI debido a que ha demostrado ser efectivo en muchos casos con un 85% de supervivencia a largo plazo, normaliza el metabolismo hepático y previene el desarrollo de carcinoma hepatocelular.⁸⁸ Este tratamiento está indicado en los pacientes con HTI cuando se presenta falla hepática aguda o crónica, enfermedad hepática progresiva, crisis neurológicas, falla renal progresiva y riesgo de desarrollar células malignas.⁶³

Una pequeña proporción de los pacientes estudiados (3/15) tuvo acceso a este tratamiento por presentar falla hepática, sin embargo, dos de ellos fallecieron, uno de ellos por metástasis generalizada secundaria a carcinoma hepatocelular y otro por enfermedad linfoproliferativa post trasplante. Existen reportes de pacientes que han fallecido por recurrencia de cáncer a pesar del trasplante.⁴⁷ Es importante destacar que para llevar a cabo exitosamente este tipo de tratamiento se debe considerar que la institución en donde se llevará a cabo cuenta con el personal y la infraestructura especializados en trasplante hepático pediátrico, este aspecto es crucial para lograr una mejoría real en la calidad de vida del paciente.⁸⁹

Terapia farmacológica con NTBC

En 1992 se descubrió que el NTBC es capaz de inhibir la ruta de degradación de la tirosina evitando la formación de productos hepatotóxicos y nefrotóxicos⁹⁰. Desde entonces, se ha convertido en el tratamiento de primera elección, más de 300 pacientes en todo el mundo han sido tratados con éste fármaco y la mayoría muestra signos de mejoramiento en la función hepática,⁵⁹ aunque algunos pacientes han desarrollado carcinoma hepatocelular a pesar del tratamiento⁸⁸, lo que sugiere que el NTBC sólo retrasa la progresión de la enfermedad, no la previene.

En países que disponen del tratamiento farmacológico con NTBC, el trasplante hepático ha dejado de ser la primer opción terapéutica y solamente está indicado en pacientes que no responden al NTBC, en aquellos que presentan alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular y en quienes tienen una pobre calidad de vida en relación a la restricción dietética, al número de visitas al hospital y a la frecuencia de extracción de sangre.⁶³

Las únicas opciones terapéuticas en México son la terapia nutricional y el trasplante hepático. Una de las posibles explicaciones a la indisponibilidad del NTBC está considerado dentro del grupo de las “drogas huérfanas”. Esta denominación se les atribuye a los fármacos que benefician a los pacientes con enfermedades raras y por lo tanto la inversión para su desarrollo, fabricación, venta y distribución no representan una ganancia significativa para las compañías farmacéuticas.⁹¹ Los organismos legislativos de los países que han logrado que drogas huérfanas como el NTBC sean una opción terapéutica disponible para los pacientes ha sido a través de incentivos como la extensión de la exclusividad de venta por más años y exención de pago de algunos impuestos a las compañías farmacéuticas que hagan investigación para el desarrollo de estos medicamentos.⁹²

Mortalidad y sobrevida

Nuestros resultados muestran una elevada mortalidad (73%) en los primeros años de vida; una vez diagnosticados, los pacientes fallecieron dos años después con una probabilidad de sobrevida del 25% (**Fig.14**). Haciendo una comparación con otras series reportadas encontramos que la mortalidad

encontrada coincide con estudios de la década de los 90^{21,28} lo que quiere decir que en México tenemos un retraso de 20 años en el diagnóstico y tratamiento de la HTI. En la actualidad existen estudios que reportan de 80 a 90% de sobrevivencia con tratamiento mediante trasplante hepático y tratamiento farmacológico con NTBC o la combinación de ambos.⁸⁶

Dentro de las causas de muerte se encontró el choque hemorrágico, el cual pudo deberse a una deficiencia en la cascada de la coagulación secundaria a la grave afectación hepática, así como la falla orgánica múltiple donde dos o más órganos vitales pierden su capacidad para realizar sus funciones, se sabe que la sepsis es la principal causa de la falla orgánica y como factores predisponentes se encuentran la edad, la desnutrición, los estados de inmunodepresión y tener una enfermedad crónica⁹³. La enfermedad linfoproliferativa post-trasplante es debida a una complicación del tratamiento inmunosupresor asociado al virus de Epstein – Barr que infecta de manera latente los linfocitos B que proliferan hasta desarrollar un linfoma.⁹⁴ Estas causas de muerte encontradas ya han sido reportadas previamente.⁶³

Dos de los tres pacientes trasplantados fallecieron (67%). Esta mortalidad encontrada es mucho mayor a lo publicado por Mitchell y colaboradores quienes reportan que aún en las condiciones óptimas, el trasplante hepático está asociado a una mortalidad del 10 al 15%.²¹ Esto evidencia la complejidad en el manejo del paciente con una enfermedad metabólica post-trasplantado.

En cuanto a los sobrevivientes, la literatura revela que los pacientes tratados únicamente con terapia nutricional o farmacológica tienen un marcado incremento en el riesgo de presentar carcinoma hepatocelular.⁹⁵ Actualmente dos de los 4 sobrevivientes de la cohorte estudiada se encuentran en lista de espera de trasplante, se encuentra documentado que en los casos donde es posible realizarlo la sobrevida puede aumentar⁶³ sin embargo, este se debe de realizar tomando las precauciones necesarias para que sea un tratamiento exitoso, evite el deterioro de la salud del paciente y mejore su calidad de vida.

CONCLUSIONES

La devastadora historia natural de la Tirosinemia Tipo I aún se observa en los pacientes mexicanos debido a que aún no es diagnosticada a tiempo y tratada de manera adecuada. Nuestros resultados son consistentes con la literatura, todos los pacientes presentaron daño hepático progresivo asociado a una alta mortalidad. Es evidente la necesidad de contar con programas de tamiz neonatal para la detección temprana de la enfermedad en combinación con un tratamiento oportuno, disponibilidad de drogas huérfanas como el NTBC, adecuado seguimiento, asesoramiento genético y guías de práctica clínica para los médicos que son el primer contacto con el paciente, con el fin de que puedan sospechar la enfermedad, retrasar su progresión y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

- 4HPPD:** p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- AFP:** Alfa-fetoproteína
- ALA:** Ácido δ -aminolevulínico
- BSTFA:** bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
- CHC:** Carcinoma Hepatocelular
- cDNA:** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- EIM:** Errores Innatos del Metabolismo
- ESI:** Electrospray
- FAA:** Fumarilacetoacetato
- FAH:** Fumarilacetoacetato Hidrolasa
- GC/MS:** Gas Chromatography/Mass Spectrometry
- Glu:** Ácido Glutámico
- His:** Histidina
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography
- HT:** Hipertirosinemia
- HTI:** Tirosinemia Tipo I
- Km:*** Constante de Michaelis-Menten
- LCR:** Líquido Cefalorraquídeo
- MAI:** Maleilacetoacetato Isomerasa
- MS/MS:** Espectrometría de Masas en Tándem
- NTBC:** 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexadiona
- OPA:** o-ftaldialdehído
- PAH:** Fenilalanina Hidroxilasa
- PBG-S:** Porfobilinógeno Sintetasa
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PHE:** Fenilalanina
- SA:** Succinilacetona
- RT – PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa
- TAT:** Tirosina Aminotransferasa
- TMS:** Trimetilclorosilano
- TN:** Tamiz Neonatal
- TNA:** Tamiz Neonatal Ampliado
- TYR:** Tirosina

-
- ¹ Jiménez SG, Childs B, et al. The effect of mendelian disease on human health. En *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, eds. McGraw – Hill Inc. 8a. Ed, New York, EUA, **2001**, 167 – 174.
- ² Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *J Inherit Metab Dis*. **2006**, *29*, 261-274.
- ³ Gómez GM, Danglot-Banck C. et al. Pautas para el diagnóstico temprano de los errores innatos del metabolismo. *Revista mexicana de pediatría*. **2006**, *73*, 139-147
- ⁴ Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: Clinical and laboratory aspects. *Clin Biochem*. **2006**, *39*, 315-332.
- ⁵ Zytkevich TH, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England newborn screening program. *Clin Chem*. **2001**, *47*, 1945-1955.
- ⁶ Chuang DT, et al. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr*. **2006**, *136*, 243S-249S.
- ⁷ Méndez SC, Zaldivar MC, et al. Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. *Rev Cubana Pediatra*. **2002**, *74*, 68-76.
- ⁸ Fernández J, Saudubray JM. Diagnostic procedures: function test and postmortem protocols. En: *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and treatment*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, 2a.ed, **1995**, 41-46.
- ⁹ Ibarra GI. Extracción y cuantificación por cromatografía de líquidos de aminoácidos en muestras de sangre total colectada en papel filtro. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **1995**.
- ¹⁰ Piraud M, Vianey-Saban C, et al. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionization mode. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2003**, *17*, 1298-1311.
- ¹¹ Schwarz EL, Roberts WL, Pasquali M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clin Chim Acta* **2005**;354:83 – 90.
- ¹² Veledo MT, de Frutos M, et al. On capillary derivatization and analysis of amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with laser – induced fluorescence detection: Application to diagnosis of aminoacidopathies. *Electrophoresis*. **2006**, *27*, 3101 – 3107.
- ¹³ Velázquez A, Vela M, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism. *Arch Med Res* **2000**, *31*, 145 – 150
- ¹⁴ Concha V, Torres J, et al. A comparative study of the performance of acetonitrile and methanol in the multi – linear gradient separation of proteic primary amino acids. *Anal Chim Acta*. **2007**, *23*, 250 -258.

-
- ¹⁵ Seiler N. Fluorescent derivatives. En Handbook of derivatives of chromatography. Blau, K.; et al. John Wiley & Sons Inc., 2ª ed, Londres, Reino Unido, **1993**, 176-213.
- ¹⁶ Chance DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Chem.* **2005**, *38*, 296-309.
- ¹⁷ Matern D, Magera MJ. Mass spectrometry methods for metabolic and health assessment. *J Nutr.* **2001**, *131*, 1615-20.
- ¹⁸ Neufeldt V, Guralnik DB. Webster's new Word college dictionary. 3rd ed. New York: Macmillan; **1997**.
- ¹⁹ Fernández LC, Vela AM, Ibarra GI. Espectrometría de masas en tándem: una herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex.* **2009**, *30*, 258-63.
- ²⁰ Chance DH, Kalas TA, et al. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem.* **2003**, *49*, 1797 – 81.
- ²¹ Mitchell GA, Grompe M, et al. Hypertyrosinemia. En: The metabolic and Molecular basis of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw – Hill Inc., 8a ed. New York, EUA, **2001**, 1777- 1797.
- ²² Sigma Aldrich.com. <http://www.sigmaaldrich.com> (acceso Mayo 15, 2010).
- ²³ Voet D, Voet JG. *Fundamentos de Bioquímica*. 2ª Ed.; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina, **2007**, 714.
- ²⁴ Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica médica*, 2ª ed.; Elsevier: España, Madrid, **2005**, 261.
- ²⁵ Mathews CK, Van Holde KF, et al. *Bioquímica*, 3th ed.; Person Education, S.A., Madrid, **2002**, 859-864.
- ²⁶ Huhn R, Stoermer H, et al. Novel and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tirosinemia type II. *Hum Genet.* **1998**, 305 – 313.
- ²⁷ Lynn BJ. *Genética Médica*, 3ª ed.; Elsevier: España, **2004**, 136-144.
- ²⁸ Russo PA, Mitchell GA, et al. Tyrosinemia: a review. *Pediatr Dev Pathol.* **2001**; *4*(3): 212-221.
- ²⁹ Jorquera R, Tanguay RM. The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**, *232*, 42-47.
- ³⁰ Mitchell GA.; Russo, P.; et al. Tyrosinemia In: Suchy FJ, ed. *Liver Disease in Children*, 2nd edition, St. Louis: Mosby-Year Book, **2001**, 667–686.
- ³¹ Kappas A, Sassa S, et al. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., Eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, **2001**, 1305-66.

-
- ³² Poudrier J, St-Louis M, et al. Frequency of the IVS12+5G-A splice mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in carriers of hereditary tyrosinaemia in the French – Canadian population of Saguenay – Lac – St – Jean. *Prenat. Diagn.* **1996**, *16*, 59-64.
- ³³ Ploos van Amstel JK, Bergman AJ, et al. Hereditary tyrosinemia type I: novel missense, nonsense and splice consensus mutations in the human fumarylacetoacetate hydrolase gene; variability of the genotype-phenotype relationship. *Hum Genet.* **1996**, *97*, 51-9.
- ³⁴ Rootwelt H, Hoie K, et al. Fumarylacetoacetate mutations in tyrosinaemia type I. *Hum Mutat.* **1996**, *7*, 239-43.
- ³⁵ Rootwelt H, Berger R, et al. Novel splice, missense, and nonsense mutations in the fumarylacetoacetase gene causing tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet.* **1994**, *55*, 653-8.
- ³⁶ Poudrier J, Lettre F, et al. Different clinical forms of hereditary tyrosinemia (Type I) in patients with identical genotypes. *Mol Genet Metab.* **1998**, *64*, 119-125.
- ³⁷ Phaneuf D, Labelle Y, et al. Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia: assignment of the gene to chromosome 15. *Am J Hum Genet.* **1991**, *48*, 525-35.
- ³⁸ Timm DE, Mueller HA, et al. Crystal structure and mechanism of a carbon-carbon bond hydrolase. *Structure Fold.* **1999**, *7*, 1023-1033.
- ³⁹ Aponte JL, Segal GA, et al. Point mutations in the murine Fah gene: Animal models for the human genetic disorder hereditary tyrosinemia type 1. *Proc Natl Acad Sci.* **1999**, In press.
- ⁴⁰ St-Louis M, Tanguay RM. Mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing hereditary tyrosinemia type I: overview. *Hum. Mutat.* **1997**, *9*, 291-299.
- ⁴¹ Pérez DT, et al. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de Tirosinemia tipo I o Hepatorenal. *Ann Esp Pediatr.* **2000**, *53*, 10-15.
- ⁴² Haber BA, Chuang E, et al. Variable gene expression within human tyrosinemia type 1 liver may reflect region-specific dysplasia. *Hepatology.* **1996**, *24*, 65–71.
- ⁴³ Jaffe R. Liver transplant pathology in pediatric metabolic disorders. *Pediatr Dev Pathol.* **1998**, *1*, 102–117.
- ⁴⁴ Dionisi VC, Boglino C, et al. Tyrosinemia type I with early metastatic hepatocellular carcinoma: combined treatment with NTBC, chemotherapy and surgical mass removal. *J Inherit Metab Dis.* **1997**, *20*[1]: 3.
- ⁴⁵ Koelink CJ, Van Hasselt P, et al. Tyrosinemia type I treatment by NTBC: How does AFP predict liver cancer?. *Mol Genet Metab.* **2006**, *89* [4]: 310-5.
- ⁴⁶ Mitchell GA, Larochelle J, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med.* **1990**, *322*, 432-7.

-
- ⁴⁷ Kvittingen EA, Talseth T, et al. A. Renal failure in adult patients with hereditary tyrosinaemia type I. *J Inherit Metab Dis.* **1991**, 14, 53–62.
- ⁴⁸ Forget S, Patriquin HB, et al. The kidney in children with tyrosinemia: sonographic, CT and biochemical findings. *Pediatr Radiol.* **1999**, 29, 104–108.
- ⁴⁹ Allard P, Grenier A, et al. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem.* **2004**, 37, 1010-5.
- ⁵⁰ Al-Dirbashi OY, Jacob M, et al. Quantification of succinylacetone in urine of hepatorenal tyrosinemia patients by HPLC with fluorescence detection. *Clin Chim Acta.* **2006**, 1, 243-8.
- ⁵¹ Casever MS, Erim FB. Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J Chromatogr B.* **2005**, 818, 309– 11.
- ⁵² Kovac P. Alkilation. En: Handbook of derivatives of chromatography. Blau, K.; Halket, J.; Eds. John Wiley & Sons Inc., 2^a ed, Londres, Reino Unido, **1993**, 109-129.
- ⁵³ Ibarra GI. Estudio de la excreción urinaria de ácidos orgánicos en niños con desnutrición energético-proteínica. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, **1998**.
- ⁵⁴ Kumps A, Duez P, et al. Metabolic, nutritional, iatrogenic and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin. Chem*, **2002**, 48, 708-17.
- ⁵⁵ Rashed MS, et al., Tandem mass spectrometric assay of succinylacetone in urine for the diagnosis of hepatorenal tyrosinemia, *Anal. Biochem.* **2005**, 2, 310–317.
- ⁵⁶ Ghany M, Hoofnagle JH. Estudio del paciente con enfermedad hepática. En: Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Eds. Principios de Medicina Interna. Mc Graw – Hill. **2009**, 2, 1921 - 1922.
- ⁵⁷ Ridaura SC. La biopsia hepática. *Acta Pediatr Mex.* **2008**, 29[4]: 216-26.
- ⁵⁸ Kvittingen EA, Jellum E, Stokke O. Assay of fumarylacetoacetate fumarylhydrolase in human liver — deficient activity in a case of hereditary tyrosinemia. *Clinica Chimica Acta*, **1981**, 15, 311-319.
- ⁵⁹ Holme E, Lindstedt S. Tyrosinaemia type I and NTBC (2-(2- nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). *J Inherit Metab Dis.* **1998**, 21, 507–517.
- ⁶⁰ McKiernan PJ. Nitisinone in the treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. *Drugs.* **2006**, 66, 743-50.
- ⁶¹ Santra S, Baumann U. Experience of nitisinone for the pharmacological treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. *Expert Opin Pharmacother.* **2008**, 9, 1229 – 1236.
- ⁶² Paradis K, Weber A, et al. Liver transplantation for hereditary tyrosinemia: the Quebec experience. *Am J Hum Genet.* **1990**, 47, 338–342.

-
- ⁶³ Mohan N, McKiernan P, et al. Indications and outcome of liver transplantation in tyrosinaemia type I. *Eur J Pediatr.* **1999**, *158*, S49 – S54.
- ⁶⁴ Schlump JU, Mayatepek E, et al. Significant increase of succinylacetone within the first 12 h of life in hereditary tyrosinemia type I. *Eur J Pediatr.* **2010**, *169*, 569 -572.
- ⁶⁵ Herzog D, Martin S. Normal glomerular filtration rate in long-term follow-up of children after orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* **2006**, *81*, 672-7.
- ⁶⁶ Pierik LJ, van Spronsen FJ, et al. Renal function in tyrosinaemia type I after liver transplantation: a long-term follow-up. *J Inherit Metab Dis.* **2005**, *28*, 871-6.
- ⁶⁷ Paradis K. Tyrosinemia: the Quebec experience. *Clin Invest Med.* **1996**. *19*, 311 – 6.
- ⁶⁸ Sweetman L. Organic acid analysis. En: Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual. Hommers, A; Eds. Wiley-Liss, New York, EUA, **1991**, 143-176.
- ⁶⁹ O' Brien D, Ibbott F, et al. Laboratory manual of pediatric micro-biochemical techniques. Hoeber Medical Division 4^{ed}. New York, EUA, **1986**, 114-116.
- ⁷⁰ Shapira E, et al. Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. Oxford University Press, **1989**, 108.
- ⁷¹ <http://www.eurordis.org/>
- ⁷² Arranz JA, Piñol F, et al. Splicing mutations, mainly IVS6-1(G>T), account for 70% of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene alterations, including 7 novel mutations, in a survey of 29 tyrosinemia type I patients. *Hum Mutat.* **2002**, *20*(3):180-8.
- ⁷³ Torres-Sepúlveda Mdel R, Martínez-de Villarreal LE, et al. Expand newborn screening using tandem mass spectrometry: two years' experience in Nuevo León, Mexico. *Salud Publica Mex.* **2008**, *50*, 200-6.
- ⁷⁴ Velázquez A, Vela AM, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism. *Arch Med Res.* **2000**, *31*, 145-50.
- ⁷⁵ Scott CR. The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **2006**, *15*;142C(2):121-6.
- ⁷⁶ Menkes JH. The history of hypertyrosinemia caused by high protein diets. *J Pediatr.* **2006**, *148*(2), 283-4.
- ⁷⁷ Techakittiroj C, Cunningham A, et al. High protein diet mimics hypertyrosinemia in newborn infants. *J Pediatr.* **2005**, *146*(2), 281-2.
- ⁷⁸ Odievre M. Clinical presentation of metabolic liver disease. *J Inherit Metab Dis.* **1991**, *14*(4), 526-30.

-
- ⁷⁹ Robbins SL, Cotran LS. Patología estructural y funcional. Mc Graw-Hill, Interamericana de España, **2000**, 841.
- ⁸⁰Tanguay RM, Jorquera R, et al. Tyrosine and its catabolites: from disease to cancer. *Acta Biochim Pol.* **1996**, 43(1), 209-16.
- ⁸¹ James VL. Tyrosinemia an other Disorders of Tyrosine Degradation. En: Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism. Sarafoglou K, Hoffman R, Roth KS. Mc Graw Hill., 5a ed. New York, EUA, **2009**, 177-185.
- ⁸² Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, et al. NTBC treatment in tyrosinaemia type I: long-term outcome in French patients. *J Inherit Metab Dis.* **2008**, 31(1), 81-7.
- ⁸³ Kelley WN. Medicina Interna Ed. Médica Panamerica, **1993**. 797-798.
- ⁸⁴ Vela AM, Belmont ML, et al. Variabilidad interinstitucional del tamiz neonatal en México. *Bol Med Hosp Infant Mex.* **2009**, 66, 431-40.
- ⁸⁵ Joshi SN, Venugopalan P. Experience with NTBC therapy in hereditary tyrosinaemia type I: an alternative to liver transplantation. *Ann Trop Paediatr.* **2004**, 24(3), 259-65.
- ⁸⁶ Acosta PB, Yannicelli S. Tyrosinemia type I. En Nutrition support protocols. Acosta PB, Yannicelli S (Eds.) Abott laboratories, 4a Ed. Ohio, EUA, **2001**, 49-62.
- ⁸⁷ Van Spronsen FJ, Bijleveld CM, et al. Hepatocellular carcinoma in hereditary tyrosinemia type I despite 2-(2 nitro-4-3 trifluoro- methylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **2005**,40(1), 90-3.
- ⁸⁸Riudor E, Ribes A, et al. Liver transplantation in two children with tyrosinaemia type I: biochemical aspects. *J Inherit Metab Dis.* **1991**, 14(3), 281-4.
- ⁸⁹Whittington PF, Balistreri WF. Liver transplantation in pediatrics: indications, contraindications, and pretransplant management. *J Pediatr.* **1991**,118(2), 169-77.
- ⁹⁰ Lindstedt S, Holme E, et al. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet.* **1992**, 340, 813-7.
- ⁹¹ Wästfelt M, Fadeel B, Henter JI. A journey of hope: lessons learned from studies on rare diseases and orphan drugs. *J Intern Med.* **2006**, 260(1):1-10.
- ⁹²Tambuyzer E. Rare diseases, orphan drugs and their regulation: questions and misconceptions. *Nat Rev Drug Discov.* **2010**.
- ⁹³ Khadarro RG, Marshall JC. ARDS and the multiple organ dysfunction syndrome. Common mechanisms of a common systemic process. *Crit Care Clin* **2002**; 18: 127 - 41.
- ⁹⁴ Thompson MP, Kurzrock R: Epstein – Barr virus and cáncer. *Clin Cancer Res*, **2004**, 10: 803 -821,
- ⁹⁵ Croffre JM, Gupta SK, Chong SKF, et al. Tyrosinemia Type I Should be suspected in infants with severe coagulopathy even in the absence of other signs of liver failure. *Pediatrics.* **1999**, 10: 675 – 678.

ANEXO 1

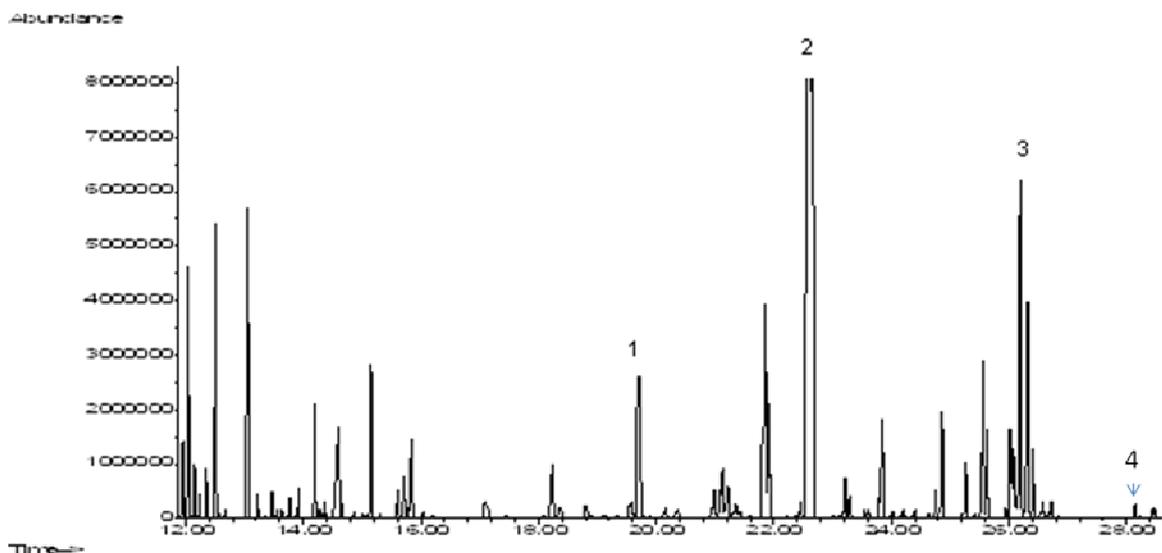
Concentración de los aminoácidos elevados al momento del diagnóstico

Paciente	TYR (22 – 108µM)	PHE (31 – 75µM)	MET (9 – 42µM)
1	227	123	17
2	702	129	248
3	247	104	60
4	212	76	54
5	199	70	38
6	545	248	132
8	510	121	574
9	192	48	35
10	137	42	28
11	408	155	107
12	384	175	58
13	729	215	1182
Promedio	374.3	211.1	125.5

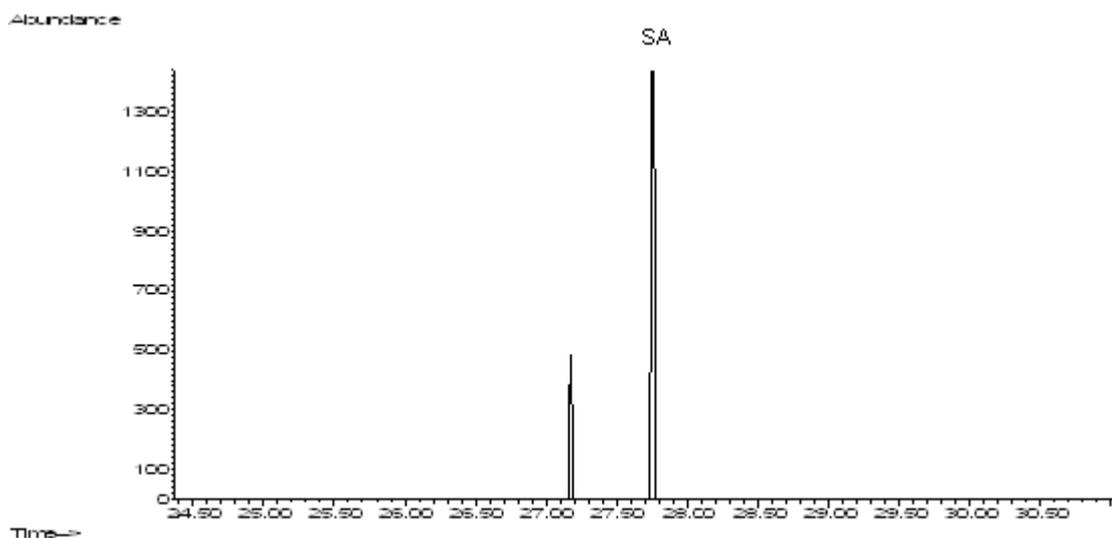
ANEXO II

Cromatogramas gases de los pacientes diagnosticados durante la realización de la tesis.

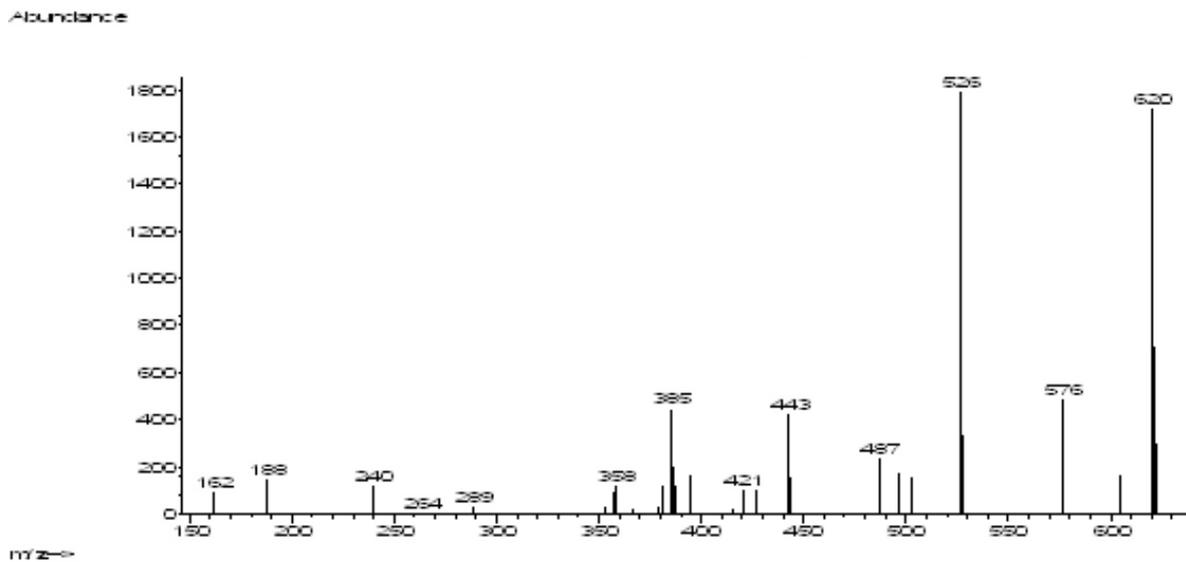
- Paciente 2



Perfil urinario del paciente 2. Los picos señalados corresponden al 1. Ácido 4-Hidroxifenil-acético 2. Ácido 4-Hidroxifenil-lactico 3. Ácido 4-Hidroxifenil-piruvico.4 El pico con un tiempo al rededor de 28.0 min corresponde al de la succinilacetona.

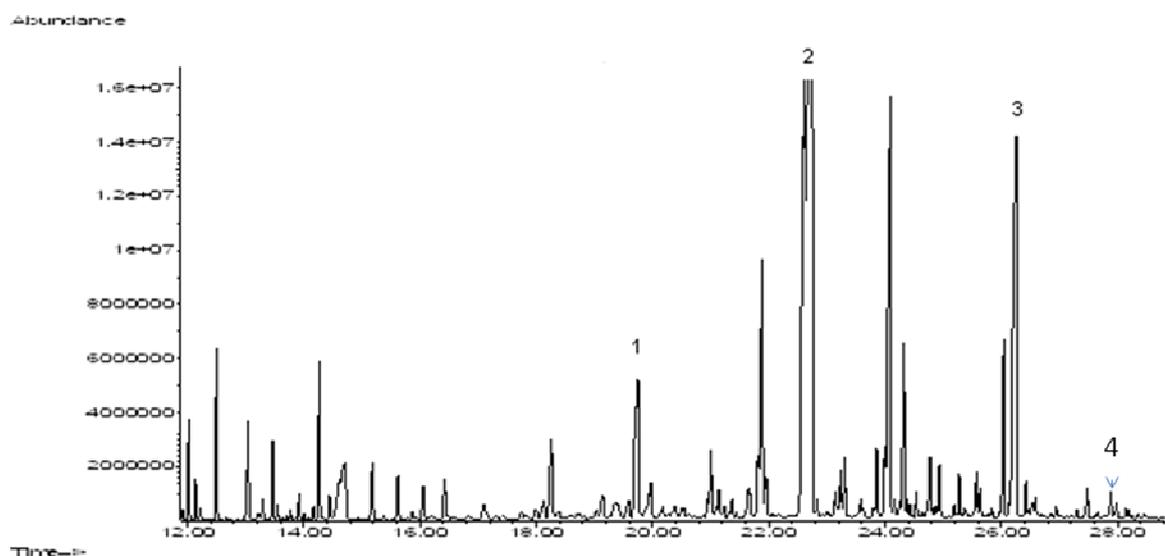


Cromatograma de gases del paciente 2 extrayendo el ion molecular 620 de la succinilacetona

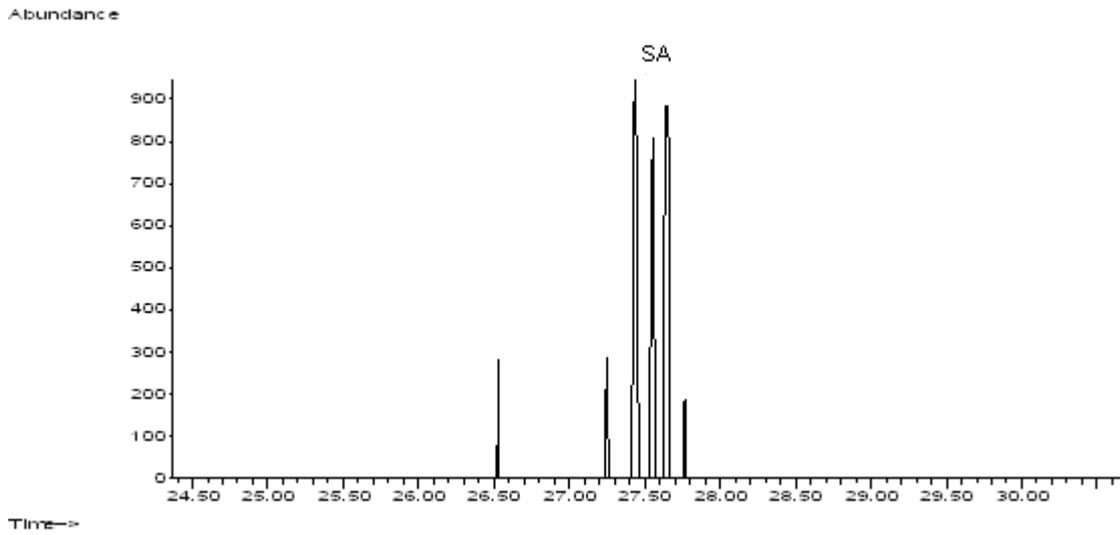


Espectro de masas de la succinilacetona del paciente 2.

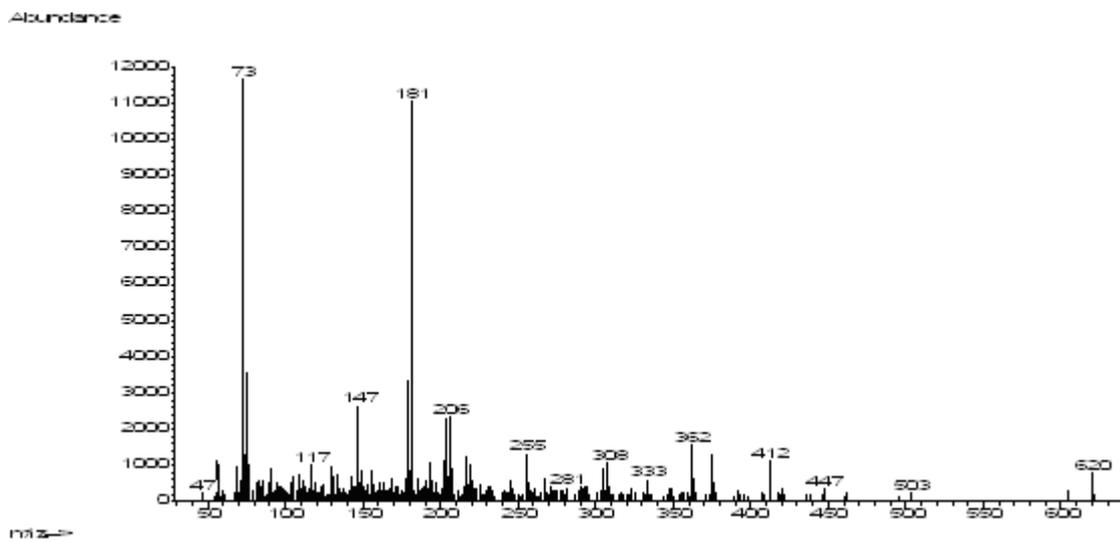
- Paciente 3



Perfil urinario del paciente 3. Los picos señalados corresponden al 1. Ácido 4-Hidroxifenil-acético 2. Ácido 4-Hidroxifenil-lactico 3. Ácido 4-Hidroxifenil-piruvico.4 El pico con un tiempo al rededor de 28.0 min corresponde al de la succinilacetona.



Cromatograma de gases del paciente 3 extrayendo el ion molecular 620 de la succinilacetona el cual muestra 3 ismeros.



Espectro de masas del la succinilacetona del paciente 3, el ion molecular 620 corresponde al de la SA.