



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y HAPLOTIPOS EN EL GEN *PAH* EN  
UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON HIPERFENILALANINEMIA  
(FENILCETONURIA)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MELANIA ABREU GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM  
DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**TUTORA INVITADA: MED. ESP. MARCELA BEATRIZ VELA AMIEVA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y HAPLOTIPOS EN EL GEN *PAH* EN  
UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON HIPERFENILALANINEMIA  
(FENILCETONURIA)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MELANIA ABREU GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM  
DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**TUTORA INVITADA: MED. ESP. MARCELA BEATRIZ VELA AMIEVA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ABREU GONZÁLEZ MELANIA** con número de cuenta **508218882**, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y HAPLOTIPOS EN EL GEN PAH EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON HIPERFENILALANINEMIA (FENILCETONURIA)**", realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**:

Presidente: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI  
Vocal: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN  
Secretario: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
Suplente: DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ  
Suplente: DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, D.F., a 05 de junio de 2014**

  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos por la beca CONACYT y  
Por parte de Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría de las  
convocatorias 2013 y 2014 en la Modalidad A: Registro de Proyecto INP 30/2010.

Al tutor principal de este proyecto:

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza  
Jefe del Laboratorio de Biología Molecular  
Instituto Nacional de Pediatría

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos  
Investigador Titular C.T.C.  
Programa de Genómica Evolutiva  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal  
Programa de Inmunología Molecular Microbiana  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Medicina, UNAM

A la tutora invitada:

Dra. Marcela Beatriz Vela Amieva  
Jefa del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz  
Instituto Nacional de Pediatría

## **Agradecimientos a título personal**

*A Carlos*

Por el amor, apoyo incondicional y complicidad, en este y todos mis sueños.

*A mi papá y a mis abuelitos*

Sólo por su ejemplo, cariño y comprensión he logrado seguir en el camino.

*A mi mamá*

Por todo lo que me enseñaste y porque sé que me cuidas, donde quiera que estés.

*Al Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza*

Gracias por su tiempo, enseñanzas, orientación y apoyo durante la realización de este proyecto.

*A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular*

Gracias por abrirme las puertas, compartirme su experiencia y conocimientos, pero sobre todo gracias por su amistad y sonrisas.

*A la Dra. Marcela Vela Amieva y al Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz*

Gracias por compartir conmigo el amor por los Errores Innatos del Metabolismo y la convicción de trabajar por ellos.

*A Rehot, Susy y Sara, por ser grandes maestras y permitirme formarme a través de ustedes.*

*Gracias al Instituto Nacional de Pediatría, en especial al Departamento de Genética y sus Residentes.*

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
I.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	5
I.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS HPA	6
I.3 ENZIMA PAH E HIDROXILACIÓN DE LA PHE	7
I.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
I.5 DIAGNÓSTICO	10
I.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	11
I.7 FISIOPATOLOGÍA DE LAS HPA PRIMARIAS	13
I.8 TRATAMIENTO	14
I.9 PRONÓSTICO	18
I.10 GEN <i>PAH</i>	18
I.11 MUTACIONES EN EL GEN <i>PAH</i>	19
I.12 SITIOS POLIMÓRFICOS Y HAPLOTIPS EN EL GEN <i>PAH</i>	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS	35
V. METODOLOGÍA	37
VI. RESULTADOS	50
VII. DISCUSIÓN	77
VIII. CONCLUSIONES	92
IX. ANEXOS	94
X. BIBLIOGRAFÍA	102



## LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
I.1	CLASIFICACIÓN Y PERFIL BIOQUÍMICO DE LAS HPA, TANTO PRIMARIA COMO SECUNDARIAS.	12
I.2	LOCALIZACIÓN, SITIO DE CORTE Y TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS EN PARES DE BASES DE ACUERDO A LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN PARA GENERAR LOS HAPLOTIPOS PKU	23
I.3	NÚMERO, TAMAÑO Y NÚMERO DE COPIAS DE LOS VNTR DEL HAPLOTIPO PKU	26
I.4	HAPLOTIPOS PKU	30
V.1	OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS 13 EXONES DEL GEN <i>PAH</i>	45
VI.1	PACIENTES CON HPA Y GENOTIPO CONFIRMADO	55
VI.2	ALELOS <i>PAH</i> IDENTIFICADOS EN 48 PACIENTES CON HPA PRIMARIA	57
VI.3	GENOTIPOS DE LOS CASOS EN LOS QUE SE ASIGNO CON CERTEZA EL HAPLOTIPO DEL GEN <i>PAH</i>	66
VI.4	ORIGEN DE LOS PADRES Y HAPLOTIPO DE LOS PACIENTES CON EL ALELO c.60+5G>T	68
VI.5	CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	72
VI.6	PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL COFACTOR BH4 DE ACUERDO AL GENOTIPO CARACTERIZADO	75

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
I.1	VÍA METABÓLICA DE LA PHE	9
I.2	POLIMORFISMO TIPO FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA O RFLP	25
I.3	SITIOS POLIMÓRFICOS MÁS REPRESENTATIVOS DEL GEN <i>PAH</i>	28
VI.1A	ÁRBOL GENEALÓGICO Y ENSAYO PCR-RESTRICCIÓN PKU8	59
VI.1B	ÁRBOL GENEALÓGICO Y ENSAYO PCR-RESTRICCIÓN PKU98	60
VI.2	PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> DE LAS MUTACIONES c.60+5G>T Y c.1066-10G>A QUE AFECTAN EL SPLICING	62
VI.3	COMPARACIÓN Y PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> DE LAS MUTACIONES IVS9+6T>A Y LA MUTACIÓN NUEVA IVS9+6T>C	64
VI.4	IMAGEN DEL HAPLOVIEW 4.2	70

GRÁFICO	NOMBRE	PÁGINA
V.1	ALGORITMO METODOLÓGICO	42
VI.1	CLASIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PACIENTES CON HPA	51
VI.2	LUGAR DE PROCEDENCIA DE PACIENTES MEXICANOS CON HPA	53
VI.3	TIPOS DE MUTACIONES POR TIPO DE CAMBIO A NIVEL NUCLEOTÍDICO IDENTIFICADAS EN 96 ALELOS DEL PRESENTE ESTUDIO	56

## RESUMEN EN ESPAÑOL

**ANTECEDENTES:** Las hiperfenilalaninemias primarias (HPA) son un grupo de enfermedades autosómicas recesivas, causadas por una alteración en la hidroxilación de la fenilalanina (Phe). Las HPA son condiciones con gran variabilidad fenotípica y se clasifican de acuerdo a la concentración de Phe y a la tolerancia de ésta en la dieta, en HPA leve, moderada y en fenilcetonuria clásica (PKU); ésta última, es la presentación clínica más grave y con importantes repercusiones neurológicas sin la instauración del tratamiento nutricional oportuno. Las HPA a nivel mundial tienen una incidencia aproximada de 1: 10,000 recién nacidos. En nuestro país se desconoce su frecuencia, sin embargo estudios piloto reportaron una distribución geográfica preferencial con una aparente mayor prevalencia en la región de “Los Altos” del estado de Jalisco. La PKU clásica condiciona en los pacientes sin tratamiento una incapacidad intelectual progresiva, convulsiones, deterioro del comportamiento e hiperactividad, eczema, hipopigmentación cutánea y capilar. La excreción de Phe y sus metabolitos generan el olor corporal característico. El diagnóstico temprano a través del tamiz metabólico neonatal ha permitido proporcionar a los pacientes intervenciones dietéticas y terapéuticas para prevenir las complicaciones neurológicas.

La HPA/PKU es un error innato del metabolismo causada por mutaciones en el gen que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa (*PAH*) que convierte la Phe en tirosina a través de una reacción facilitada por el cofactor tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ). A la fecha, se han descrito alrededor de 790 mutaciones en el gen *PAH* responsables de HPA, las cuales pueden clasificarse de acuerdo a la actividad enzimática resultante en severas, moderadas o leves. Aproximadamente el 75% de los pacientes son heterocigotos compuestos, lo que dificulta la predicción del fenotipo metabólico, aunque ciertas mutaciones del gen *PAH* predicen la respuesta al tratamiento con cofactores enzimáticos ( $BH_4$  y sapropterina).

En el gen *PAH* se han caracterizado siete polimorfismos bialélicos generados por fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y dos regiones con polimorfismos multialélicos (VNTR y STR), los cuales forman 87 haplotipos diferentes, cuyo estudio ha permitido establecer un desequilibrio de ligamiento con mutaciones particulares causantes de enfermedad y con ello inferir el origen étnico de ciertos alelos PKU. A la fecha, no existen reportes representativos en la literatura que describa el espectro mutacional, ni los haplotipos en el gen *PAH* en los pacientes con HPA en población mexicana.

**OBJETIVO:** Caracterizar el espectro mutacional y los haplotipos del gen *PAH* en una muestra de pacientes mexicanos con HPA (PKU) diagnosticados y/o atendidos en el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz del Instituto Nacional de Pediatría.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo. El tamaño de la muestra fue a conveniencia dada la frecuencia del

padecimiento, aunque se calculó contar con al menos 30 familias no relacionadas. Se obtuvo DNA genómico de los pacientes con elevación de Phe sérica  $>120\mu\text{M/L}$  y de sus familiares en primer grado. En los pacientes se realizó secuenciación directa del gen *PAH* y se determinaron los haplotipos. La integración de haplotipos para las mutaciones más frecuentes en los casos se realizó con los genotipos de los padres cuando fue posible. El análisis estadístico se realizó a partir del historial obtenido en las hojas de captación de datos, de tipo paramétrico para las variables cuantitativas; la frecuencia de mutaciones y haplotipos se reportó en porcentajes.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Se caracterizó el genotipo en 48 pacientes con 41 genotipos diagnósticos de HPA. De acuerdo a su actividad enzimática residual teórica encontramos 63/96 alelos con actividad residual muy baja, 12/96 moderada, 12/96 alta y 9 sin clasificar, lo cual correlaciona con la alta frecuencia de PKU clásica en esta muestra (33/48). Se identificaron 34 distintas mutaciones, dos de ellas no descritas: p.Met1Leu y c.969+6T>C. El 45% de las mutaciones encontradas alteran el splicing (45 alelos), lo que difiere de lo reportado a nivel mundial (10%). Este tipo de mutaciones están relacionadas a un fenotipo más grave, lo que coincide con lo observado en esta muestra. La mutación más frecuente fue la c.60+5G>T, identificada en 20/96 de los alelos *PAH* (21%) y de estos, 14 se observaron en 22 alelos de pacientes de Jalisco (63%). De los 11 pacientes de Jalisco, 10 presentan la mutación c.60+5G>T y en 9 de ellos se ligó con el haplotipo H4.3. Este ligamiento está descrito en pacientes españoles, alemanes y daneses con la mutación c.60+5G>T. Estos datos apoyan el efecto de fundador en Jalisco para la mutación c.60+5G>T y no para la c.1066-11G>A como se había sugerido en dos estudios previos. Encontramos una correlación fenotipo-genotipo del 64.5%, la cual es una cifra menor a la descrita en otras poblaciones, quizá atribuible a la presencia de alelos inconsistentes asociados a diversos fenotipos. Teóricamente con base al genotipo documentado, el 45.8% de los pacientes no serían candidatos a la terapia con el cofactor  $\text{BH}_4$ , debido a que presentan dos alelos catalogados como no respondedores.

**CONCLUSIONES:** La mutación c.60+5G>T que a nivel mundial ocurre en  $<0.35\%$  fue la más frecuente en la población estudiada (20.8%); ésta se considera como una mutación grave condicionante de PKU clásica y sin respuesta a tratamiento farmacológico. La mutación c.60+5G>T al encontrarse en el 63% de los alelos del estado de Jalisco, sugiere que es el alelo PKU con efecto de fundador inicialmente postulado para pacientes provenientes de esta región geográfica. En nuestros pacientes, la respuesta teórica al  $\text{BH}_4$  es del 37.5%, ello debido a la alta proporción de mutaciones severas de splicing, por lo que el análisis molecular podría ser una herramienta útil para la selección racional de candidatos a la prueba terapéutica del fármaco, cuyo costo en nuestro medio es aún elevado.

## RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)

### MUTATIONAL SPECTRUM AND HAPLOTYPES IN THE *PAH* GENE IN A SAMPLE OF MEXICAN PATIENTS WITH HYPERPHENYLALANINEMIA (Phenylketonuria).

**BACKGROUND:** **BACKGROUND:** The primary hyperphenilalaninemias (HPA) are a group of autosomal recessive diseases caused by defects in the hydroxylation of phenylalanine (Phe). The HPA are conditions with a great phenotypic variability classified according to the Phe concentration and the dietary tolerance in mild HPA, moderate HPA and classical phenylketonuria (PKU); the former have the most severe clinical presentation with a neurological impairment if no strictly and opportune dietary treatment is instituted. The prevalence of PKU worldwide is estimated to be 1 affected case per 10,000 live births. In Mexico, the PKU prevalence is unknown, but some small studies have reported a differential geographical distribution, with a predominance of cases occurring in “Los Altos” region of Jalisco state. Classical PKU patients without dietary treatment show severe intellectual disability, epilepsy, behavior problems, hyperactivity, eczema, decrease skin and hair pigmentation. The excretion of excessive Phe and its metabolites lead to the characteristic “musty” body odor. Early diagnosis through newborn metabolic screening has allowed providing to patients the dietary and therapeutic interventions to prevent neurological complications.

The HPA/PKU are caused by mutations in the *PAH* gene that encodes phenylalanine hydroxylase (PAH) enzyme which hydroxylates Phe to tyrosine by the tetrahydrobiopterin cofactor (BH<sub>4</sub>). More than 790 mutations have been described in the *PAH* gene causing HPA, that can be classified according to the residual enzymatic activity in severe, moderate and mild. Approximately 75% of patients are compound heterozygotes which difficult the prediction of metabolic phenotype, although certain mutations of *PAH* gene predict response to treatment with enzyme cofactors (BH<sub>4</sub> and sapropterin).

In the *PAH* gene have been characterized seven biallelic polymorphisms generated by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and two regions with multiallelic polymorphisms (VNTR and STR), which formed 87 different haplotypes; their study establishes linkage disequilibrium with particular disease-causing mutations and thereby allow to infer the ethnicity of certain PKU alleles. To date, there are no representative reports in the Mexican population describing the mutational spectrum and haplotypes in the *PAH* gene.

**OBJETIVE:** To characterize the mutational spectrum and haplotypes of *PAH* gene in a sample of Mexican patients with HPA (PKU) diagnosed and/or treated at the Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz of the National Institute of Pediatrics.

**METHODS:** Observational, descriptive, cross-sectional and prospective study. The sample size was a calculated by convenience given the frequency of the condition, but was estimated to have at least 30 unrelated families. Genomic DNA was

obtained from HPA patients diagnosed based on enzymatic deficiency of PAH with elevated serum phenylalanine  $>120\mu\text{M/L}$ , as well as from their first-degree relatives. Direct sequencing and haplotype of the *PAH* gene was performed. Integration of haplotypes helped by the analysis of the parental genotypes, when available, was done for the most frequent mutations found in affected cases. Statistical analysis was carried out from the data collection sheets, for parametric and quantitative variables and the frequency of mutations and haplotypes were reported in percentages.

**RESULTS AND DISCUSSION:** Sequencing of the *PAH* gene was performed in 48 patients and 41 different diagnostic genotypes were identified. According to their theoretical residual enzymatic activity, we found 63/96 alleles with very low activity, 12/96 with moderate activity, 12/96 with high activity and 9 could not be classified, which correlates with the high frequency of classical PKU in this sample (33/48). The mutational spectrum included 34 mutations, two of them were novel mutations: p.Met1Leu (c.1A>T) and c.969+6T>C. The 45% of the mutations found alter splicing (45 alleles), which differs from that reported worldwide (10%). Such mutations are related to a more severe phenotype, which is consistent with that observed in this sample. The most frequent mutation was c.60+5G>T, identified in 20/96 PAH alleles (21%) and of these, 14 were observed in 22 patients that came from the Jalisco state (63%). Of the 11 patients of Jalisco, 10 have the mutation c.60+5G>T and in 9 of them, this mutation was linked to the H4.3 haplotype, as previously has been described in Spanish, German and Danish patients. These data support a founder effect for the mutation c.60+5G>T in Jalisco state and not for the c.1066-11G>A as suggested in two previous studies. We found a phenotype-genotype correlation of 64.5%, which is less than those reported in other populations, and this may be related to the presence of inconsistent alleles associated with different phenotypes. Theoretically based on genotype, 45.8% of patients would not be candidates for therapy with the cofactor BH<sub>4</sub>, because they have two alleles classified as non-responders.

**CONCLUSION:** The c.60+5G>T mutation that occurs worldwide in  $<0.35\%$  was the most frequent in the study population (20.8%); should be regarded as a severe mutation conditioning classical PKU and unresponsive to drug therapy. The preponderance of this mutation in the current study population is most likely attributable to a founder effect initially postulated to patients from Jalisco state. In our patients, the low theoretical response to BH<sub>4</sub> of 37.5% may be due to the high proportion of severe splicing mutations, so the molecular analysis could be a useful tool for the rational selection of candidate to the therapeutic trial of the drug, since the cost of BH<sub>4</sub> in our country is still high.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1934 Asbjorn Folling describió este trastorno metabólico en dos hermanos con retraso mental quienes además presentaban un “olor peculiar” y logró aislar ácido fenilpirúvico en la orina, padecimiento al cual denominó *imbecilidad fenilpirúvica*; desde entonces el Dr Folling había postulado que las cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico eran resultado de la incapacidad para metabolizar la fenilalanina (Phe). Un año más tarde Lionel Penrose le cambió el nombre a este padecimiento a fenilcetonuria (PKU) y por primera vez se dio una explicación bioquímica para el retraso mental [Donlon J., et al 2010].

Folling continuó sus investigaciones sobre PKU y en conjunto con Karl Closs, identificó la acumulación urinaria de los ácidos fenilpirúvico y fenilacético con la elevación sanguínea de Phe; en esta época se descubrió que el responsable del olor “mohoso” o a “ratón mojado” era ocasionado por el ácido fenilacético [Vela-Amieva M., et al 2011].

En 1937 Jervis y colaboradores encontraron que la causa de PKU era la deficiencia en la actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH), pues es la responsable de la conversión de Phe en tirosina (Tyr). En la década de los años 60, la PKU fue la primera enfermedad identificable a través de un tamizaje neonatal que permite la implementación de una terapia nutricional, descrita por Bickel en 1953 y la cual previene las manifestaciones neurológicas graves e irreversibles [Berry SA., et al 2013].

Posteriormente en los años 80’s el cDNA codificante de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) fue clonado [Woo S., et al 1983] y mapeado en el cromosoma 12q22-24 [Lidsky., et al 1985a]. En esta época se identificaron diversos polimorfismos que conforman el haplotipo del gen PAH [Woo S., et al 1983, Kidd KK., 2011]. En los

años 90 se iniciaron las detecciones de mutaciones como una herramienta diagnóstica en esta enfermedad y la cristalografía de la enzima permitió el modelaje *in silico* de los efectos patogénicos de las mutaciones sobre la proteína [Erlandsen., et al 1999]. También se evidenció que la hidroxilación de la Phe *in vivo* depende también de otras enzimas codificadas por otros loci distintos a los de PAH y a la presencia de cofactores enzimáticos.

## **I.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS HPA**

La prevalencia de las HPA en conjunto está calculada de 1:10,000 recién nacidos vivos con una frecuencia de portadores de 1:50. Mayores incidencias son observadas en los países árabes debido a la consanguinidad. Existen lugares donde la incidencia es de 1:4,000 individuos como Turquía y en el norte de Irlanda [Dobrowolski SF., et al 2011] y existen otras regiones con incidencia muy baja, como en Finlandia donde es de aproximadamente 1:100,000. En Asia es de 1:15,000 a 1:100,500, en Estados Unidos la incidencia es de 1:15,000 y en América Latina varía de entre 1:25,000 hasta 1:50,000 [Blau N., et al 2010].

En México se desconoce con precisión la incidencia de las HPA, ya que se tiene una cobertura poblacional por tamiz neonatal de menos del 40%. Sin embargo se han reportado diversas frecuencias de acuerdo a la población analizada a través de programas piloto de tamiz neonatal estatales; como es lo descrito en Jalisco donde su incidencia es de 1:5,379 [Velázquez A., et al 1996], en Nuevo León de 1:42,000 [Torres-Sepúlveda MR., et al 2008], o en el Distrito Federal de 1:60,000 [Velázquez A., et al 1994]. El Instituto Mexicano del Seguro Social reporta una incidencia muy baja de menos de 1:160,000 [Borrajo G, 2012].

Debido a la frecuencia aparentemente incrementada de HPA en el estado de Jalisco y a que el 42% de los casos con HPA que son referidos en el Instituto Nacional de Pediatría provienen de la región de Los Altos de Jalisco, se ha postulado un probable efecto de fundador introducido por los pobladores europeos

que llegaron a esta región, principalmente provenientes del sur de España [Velázquez A., et al 1996] donde se ha descrito una frecuencia de HPA de 1:12,000 [Bueno MA., et al 2013].

Aproximadamente el 2% de las HPA son debidas a un bloqueo en el metabolismo de la síntesis y reciclaje del cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), cuya deficiencia ha sido reportada más frecuentemente en Turquía y Arabia Saudita [Blau N., et al 2011]. Estas entidades siempre deben considerarse en el diagnóstico diferencial de las HPA. Las deficiencias del cofactor BH<sub>4</sub> son más graves que la PKU clásica y la implementación farmacológica del BH<sub>4</sub> sintético (dihidrocloruro de sapropterina) es crucial para su tratamiento. Existen cinco entidades que se heredan de forma autosómica recesiva y afectan la síntesis o regeneración del BH<sub>4</sub>: deficiencia de GTP ciclohidrolasa I (MIM 233910; 600225), 6-piruvil tetrahidropterin sintetasa (MIM 261640), sepiapterina reductasa (MIM 182125), dihidropteridina reductasa (MIM 261630) y pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina deshidratasa (MIM 264070;126090) [Longo N 2009]. El diagnóstico se realiza a través de la medición urinaria de neopterina y biopterina, así como con la medición de la actividad de la enzima dihidropterina reductasa en sangre seca en papel filtro.

### **1.3 ENZIMA PAH E HIDROXILACIÓN DE LA PHE**

La expresión de PAH se limita a hígado y riñón como un monómero de 452 aminoácidos con dominios regulador, catalítico y de tetramerización; dicho monómero se ensamblan en formas dimérica y tetramérica funcionales de la enzima.

La enzima PAH cataliza a nivel de citosol la conversión de L-Phe a L-Tyr por la hidroxilación de la cadena aromática. En los mamíferos esta reacción es un proceso limitante para la degradación de la Phe proveniente de la ingesta de proteínas y para la formación de L-Tyr que es precursor de neurotransmisores [Flydal y Martínez., 2013]. La enzima PAH en el hígado remueve el exceso de L-



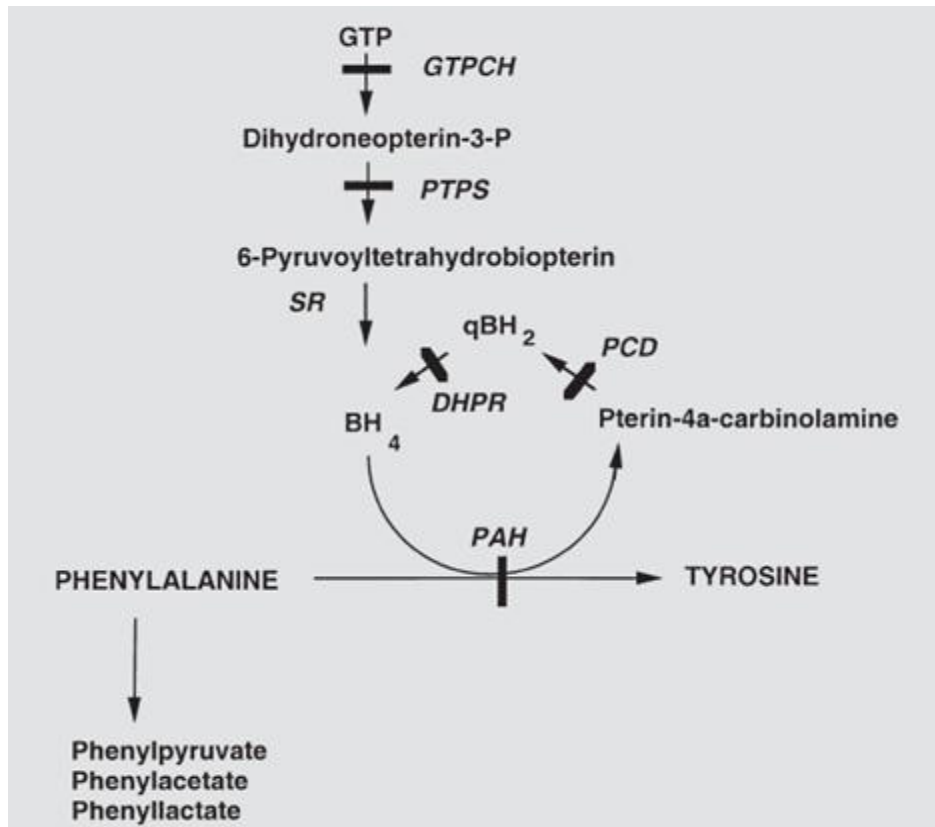
Phe y previene la neurotoxicidad de un estado de HPA. Sin embargo la L-Phe es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas, así que no debe ser completamente catabolizado, por lo tanto el sistema de hidroxilación de la Phe tiene una regulación alostérica [Jaffe EK., et al 2013].

El equilibrio entre tetrámeros activos y dímeros de la PAH es debido a la presencia de Phe y del BH<sub>4</sub>. Los cambios conformacionales de la enzima PAH dependen de la unión de Phe. El BH<sub>4</sub> actúa como un regulador negativo pues en ausencia de Phe se forma un complejo inactivo PAH-BH<sub>4</sub>, mientras que en su presencia existe un cambio conformacional de activación de la enzima PAH [Heinz C., et al 2013]. El donador de electrones para la PAH es el BH<sub>4</sub>, quien transfiere electrones al oxígeno molecular para formar tirosina y dihidrobiopterina (QH<sub>2</sub>). El BH<sub>4</sub> es regenerado de QH<sub>2</sub> a través de la enzima DHPR y es sintetizado *de novo* a partir de guanosina trifosfato en varios pasos (FIGURA I.1). El BH<sub>4</sub> también favorece la hidroxilación de la Tyr y el triptófano (Trp) [Brady ST., et al 2012].

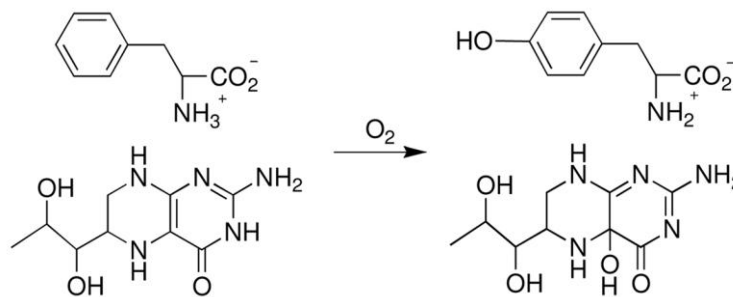
El BH<sub>4</sub> se une a diversos residuos de aminoácidos de la enzima PAH, en las regiones de unión al cofactor o CBR. El CBR1 se encuentra entre los residuos 246 a 266, el CBR2 entre el 280 a 283, el CBR3 entre el 322 a 326 y el CBR4 en el 377 al 379. Mutaciones que cambian la conformación de la proteína en estos sitios de unión no responden a la terapia con el BH<sub>4</sub> [Heinz C., et al 2013]. El bloqueo enzimático de la PAH atribuible a mutaciones obliga a que la L-Phe no utilizada en la síntesis proteica se acumule en los fluidos corporales o utilice vías metabólicas alternas como es la transaminación de la L-Phe que después se transforma en fenilpiruvato.

**FIGURA I.1. VÍA METABÓLICA DE LA PHE.**

1A



1B



I.1A: Vía metabólica: La Phe es convertida a tirosina por la enzima PAH (Fenilalanina hidroxilasa). Se observa la vía de reciclaje de la tetrahydrobiopterina BH<sub>4</sub> (DHPR: dihidropteridina reductasa, GTPCH: GTP ciclohidrolasa I, PTPS: 6-piruvil tetrahydropterina sintetasa, SR: sepiapterina reductasa y PCD: pterin-4α-carbinolamina deshidratasa.

I.1B. Esquema de la hidroxilación de la Phe y su conversión a Tyr. [Brady ST., et al 2012].

## 1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La HPA es una condición altamente heterogénea con gran variabilidad fenotípica. El término “fenilcetonuria” se reserva a la forma más severa de la enfermedad. La presentación clásica es con encefalopatía progresiva en niños aparentemente sanos durante los primeros meses de vida. Otros síntomas incluyen convulsiones con registros electroencefalográficos anormales, deterioro del comportamiento e hiperactividad, datos de autismo o de esquizofrenia, eczema, hipopigmentación cutánea y capilar, así como olor corporal que semeja al almizcle (“ratón mojado”). Los factores que pudieran explicar la variación fenotípica son las diferencias en la absorción entérica de Phe, su recaptura hepática e incorporación a proteínas, así como su transporte a través de la barrera hemato-encefálica [Lara Dos Santos L., et al 2006].

A pesar de la instauración de un tratamiento oportuno, las HPA se encuentran asociadas a una disminución en la inteligencia con alteraciones en áreas específicas de la cognición. Particularmente los individuos con PKU presentan dificultades con las habilidades mentales superiores como la planeación, organización, memoria de trabajo y el control inhibitorio. Estas alteraciones se engloban en la función ejecutiva, la cual se define como la capacidad que facilita la modificación flexible del pensamiento y comportamiento en respuesta a las demandas cognitivas o ambientales [Christ SE, et al 2010].

## 1.5 DIAGNÓSTICO

Idealmente las HPA deben de ser identificadas a través de los programas nacionales de tamizaje neonatal (TN). La primera prueba utilizada para el TN fue desarrollada por Robert Guthrie, la cual se basa en la inhibición bacteriana de *Bacillus subtilis*, la cual requiere Phe para su crecimiento. A partir del desarrollo de las técnicas de detección se empezó a diagnosticar la enfermedad de forma oportuna.

La espectrometría de masas en tándem es un método rápido que permite la cuantificación de aminoácidos en pequeños volúmenes de sangre o plasma, con menores tasas de falsos positivos, ya que mide tanto la Phe como la Tyr, con lo que se obtiene el cociente Phe/Tyr. Además otros errores innatos del metabolismo pueden ser diagnosticados simultáneamente en el mismo ensayo [Blau N., et al 2011].

En el 2010 en nuestro país se publicó el Lineamiento Técnico para la Detección, Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento de los Errores Innatos del Metabolismo. [Secretaría de Salud., 2010] donde se indica que a partir de ese año todos los recién nacidos mexicanos deben ser tamizados para HPA en los primeros días de vida, para evitar las complicaciones neurológicas de la elevación de la Phe. Usualmente el tamiz se realiza entre el día 2 al 7 de vida, el punto de corte para el diagnóstico es  $>120$   $\mu\text{mol/L}$  con un cociente Phe/Tyr mayor a 2, parámetros que son válidos inclusive si se tamiza de forma muy temprana (24-48 hrs de vida). El nivel de Phe al diagnóstico se utiliza como un parámetro para la clasificación bioquímica de las HPA, sin embargo pueden existir discrepancias entre el nivel de Phe inicial y la evolución clínica del paciente.

Algunas de las causas que pueden condicionar un falso positivo es la prematurez, debido a que los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de aminoácidos aún no está completamente desarrollado, lo que genera una elevación transitoria de la Phe. De igual forma los neonatos que se encuentran con nutrición parenteral o bajo transfusiones de hemoderivados deberán tomarse un segundo tamiz 48 horas después.

## **1.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico diferencial reside en la medición de pterinas urinarias (neopterina y biopterina) (Tabla I.1) y la actividad enzimática en eritrocitos de la DHPR para abordar los defectos de BH4 [Blau N., et al 2009].

TABLA I.1 CLASIFICACIÓN Y PERFIL BIOQUÍMICO DE LAS HPA, TANTO PRIMARIA COMO SECUNDARIAS [Longo N., 2007].

CLASIFICACIÓN	PERFIL BIOQUÍMICO
Deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (PAH)	[Phe] 2->16.6 mg/dl (120->1000 µM). Neopterinas: 0.1- 5 mmol/mol creatinina. Biopterinas: 0.4-2.5 mmol/mol creatinina % biopterinas 20-80%.
Deficiencia de Dihidropterina reductasa (DHPR) (leve)	[Phe] 4.6-10 mg/dl (280-600 µM). Neopterinas: 5 - 23.2 mmol/mol creatinina. Biopterinas: 3.8-25.6 mmol/mol creatinina % biopterinas >80%.
Deficiencia de Dihidropterina reductasa (DHPR) (severa)	[Phe] 3-41.6 mg/dl (180-2500 µM). Neopterinas: 5 - 23.2 mmol/mol creatinina. Biopterinas: 3.8-25.6 mmol/mol creatinina. % biopterinas > al 80%.
Deficiencia de sepiapterina reductasa (SR)	Concentraciones nulas de Phe en sangre y tampoco presentan neopterinas ni biopterinas en orina.
Deficiencia de carbinolamina deshidratasa (PCD)	[Phe] 3-20 mg/dl (180-1200 µM). Neopterinas: 4.1-22.5 mmol/mol creatinina. Biopterinas: 0.7-1.5 mmol/mol creatinina. % biopterinas < al 50%.
Deficiencia de Guanosina trifosfato ciclohidrolasa I(GTPCH)	[Phe] 2-20 mg/dl (120-1200 µM). Neopterinina: < 0.2 mmol/mol creatinina. Biopterina: < 0.2 mmol/mol creatinina. % biopterinas 50%.
Deficiencia de 6-piruvoil-tetrahydropterin sintasa (PTPS) (leve)	[Phe] 4-36.6 mg/dl (240-2200 µM). Neopterinas: 5-51.2 mmol/mol creatinina. Biopterinas: < 0.5 mmol/mol creatinina. % biopterinas < al 5%.
Deficiencia de 6-piruvoil-tetrahydropterin sintasa (PTPS) (severa)	[Phe] 4.1-41.6 mg/dl (250-2500 µM). Neopterinas: 5-51.2 mmol/mol creatinina. Biopterinas: <0.5 mmol/mol creatinina. % biopterinas < al 5%.

### 1.7 FISIOPATOLOGÍA DE LAS HPA PRIMARIAS

La Phe es un metabolito de la Tyr, precursor de la dopamina y otros neurotransmisores. En los pacientes con HPA el bloqueo en el metabolismo de estos aminoácidos aromáticos, conlleva a elevadas concentraciones de Phe y una deficiencia tanto en Tyr, como en otros neurotransmisores que derivan este último [Christ SE., et al 2010].

Una de las principales teorías sobre la patogénesis de las HPA radica en el efecto competitivo de la Phe sobre la Tyr y el Trp disponible (precursor de la serotonina), sobre el transportador de aminoácidos largos neutros (LAT1) a nivel de la barrera hematoencefálica. El LAT1 es saturado por las altas concentraciones de Phe, lo que produce una disminución en la concentración a nivel cerebral del resto de los aminoácidos (Leucina, Valina, Isoleucina, Triptofano) utilizados tanto para la síntesis de neurotransmisores, como para el metabolismo celular.

También se postulan otros mecanismos fisiopatológicos para explicar las manifestaciones neurológicas de las HPA que incluyen: la reducción en la enzima piruvato cinasa, la alteración en la neurotransmisión glutamérgica, la reducción de la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y la disminución de los niveles de la enzima MAO en las terminales sinápticas del estriado [Embury JE., et al 2007].

Recientemente se ha descubierto que la HPA afecta la sustancia blanca cerebral de forma difusa en las regiones corticales y subcorticales que tienen maduración postnatal, lo cual indica que los oligodendrocitos son vulnerables a las elevaciones de Phe, lo cual afecta el desarrollo de la mielinización [Anderson., et al 2010].

## 1.8 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento para las HPA se enfoca en mantener los niveles sanguíneos de la Phe en límites seguros (120-360umol/L y previo y durante el embarazo en 120-240umol/L) para evitar el daño neurológico y asegurar un adecuado crecimiento. La efectividad del tratamiento se incrementa al iniciarlo durante las primeras semanas de vida, por eso la importancia de un diagnóstico temprano a través del tamiz neonatal.

Existen diversas estrategias para el tratamiento de estos pacientes:

### a) Dieta

La dieta es la base del tratamiento en los pacientes con HPA para evitar las elevaciones agudas o crónicas de Phe, por lo que la cantidad de este aminoácido se limita durante toda la vida entre 250-500 mg/día y el requerimiento dependerá de la severidad de la enfermedad, genotipo, edad, sexo, tasa de crecimiento, ingestión proteica y estado de salud [Guillen-López S., 2012] y deberá ajustarse de forma individualizada a través del seguimiento bioquímico y clínico.

La dieta excluye todos los alimentos de origen animal por su alto contenido de Phe, puesto que pequeñas cantidad cubren casi la totalidad diaria recomendada. Los cereales, frutas y verduras deben ser cuidadosamente controlados calculando el aporte total. Para lograr un adecuado aporte nutrimental se debe incluir un sustituto lácteo especial, al cual se le ha extraído parte o la totalidad de la Phe y esta suplementado con tirosina [Colombo M., 2010].

Es importante mencionar que si se elimina por completo la ingesta de Phe las consecuencias son devastadoras, inclusive pueden producir la muerte del paciente, ya que la Phe es necesaria para la síntesis de proteínas estructurales. Las manifestaciones clínicas de la eliminación de la Phe en la dieta son: detención

del crecimiento, erupciones en la piel, aminoaciduria, disminución de proteínas séricas, anemia, cambios óseos, desnutrición y retraso mental [Camp KM., et al 2012].

El apego al manejo nutricional suele ser adecuado durante la infancia, donde los padres son responsables de la alimentación de los niños, sin embargo en la adolescencia y adultez aproximadamente el 65% de los casos no siguen las recomendaciones nutricionales [Colombo M., 2010].

#### b) Glicomacropéptido (GMP)

El GMP es un derivado del suero del queso que es rico en aminoácidos esenciales pero libre de aromáticos (Phe, Tyr y Trp) por lo tanto puede ser una fuente alternativa de proteína segura para los pacientes con HPA. Se ha demostrado que el GMP puede ser utilizado como alternativa de las fórmulas lácteas especiales, siempre que se administre con suplementos de Tyr y Trp. Además es más palatable que las leches especiales y otorgan mayor saciedad [Giovanni M., et al 2012].

#### c) Aminoácidos neutros largos (LNAA)

Otra estrategia terapéutica es la suplementación con LNAA que incluyen Tyr, Trp, treonina, metionina, valina, isoleucina, leucina e histidina, todos ellos esenciales para los pacientes con PKU. Desde los años 50, se ha formulado diferentes combinaciones de estos LNAA para la reducción de los niveles sanguíneos y cerebrales de Phe e incrementar la concentración de neurotransmisores. Inclusive existe un ensayo clínico donde la sola administración de LNAA disminuyó en promedio 39% las concentraciones basales de Phe [Matalon R., et al 2007] por lo que suele utilizarse como terapia combinada junto con la dieta para el manejo de las HPA.



#### d) Fenilalanina amonio liasa (PAL)

La PAL es una enzima autocatalítica detectada en diversas plantas (*Dunaliella marina*), hongos (basidiomicetos), organismos procariontes (*Streptomyces*) y algunas cianobacterias (*Nectria cinnabarina*) [Cui JD., et al 2013] que degradan Phe, sin sintetizar Tyr, de forma estable y no requieren cofactor. La enzima PAL convierte la Phe en concentraciones insignificantes de amonio y ácido transcinámico, un metabolito inocuo que posteriormente se transforma en hipurato y es excretado por la orina [Sarkissian CN., et al 1999].

Investigaciones realizadas en ratones demostraron que a largo plazo la administración subcutánea de la PAL era neutralizada por el sistema inmune, debido a esto se modificó con polietilenglicol (PEG) lo cual disminuyó la inmunogenicidad y prolongó la vida media de la enzima [Sarkissian CN., et al 2008]. Actualmente se sabe que la PEG-PAL disminuye la concentración sanguínea de Phe, por lo tanto se llevan a cabo ensayos clínicos para la aprobación de esta terapia en su formulación vía oral, así en un futuro este pueda ser un adyuvante en la dieta de los pacientes con HPA independientemente de su genotipo.

#### e) Repoblación Hepática

La repoblación terapéutica del hígado se basa en el potencial regenerativo de éste órgano, donde se reemplaza un fragmento del hígado dañado con hepatocitos sanos. El éxito de esta terapéutica radica en que las células tengan un estímulo para su regeneración (daño) y una ventaja selectiva de crecimiento de las células donadas sobre las alteradas. Esta terapia se ha aplicado en diversos errores innatos del metabolismo puesto que la mayoría de estas enzimas tienen expresión hepática, con buenos resultados para la enfermedad de Wilson, citrulinemia, entre otros [Lanconi E., et al 2002]. Desafortunadamente para PKU todavía no ha sido

posible desarrollar una ventaja selectiva de los hepatocitos PAH+ sobre los PAH-, sin embargo existen varias líneas de investigación para implementarla en un futuro como tratamiento [Harding C., et al 2009].

#### f) Tratamiento Farmacológico: Administración del Cofactor BH<sub>4</sub>

Los mecanismos por los cuales la enzima PAH presenta una respuesta al cofactor BH<sub>4</sub> son multifactoriales. De manera general el mecanismo más aceptado es que funciona como una chaperona farmacológica que promueve el adecuado plegamiento de la enzima lo que reduce su degradación e inactivación.

En 1999, Kure et al, reportaron 4 pacientes con HPA con mutaciones en *PAH* con una alta actividad residual, que respondieron a una prueba con 10mg de BH<sub>4</sub>/kg, a partir de donde se observó que es un tratamiento efectivo y seguro para un tratamiento a largo plazo de los pacientes con HPA. Se reconoció entonces que el BH<sub>4</sub> incrementa la oxidación de Phe a Tyr y que existen alelos específicos *PAH* con actividad residual que son esenciales para la respuesta a la terapia con el cofactor.

Esta observación fue confirmada en numerosos estudios subsecuentes, desde entonces se han implementaron las pruebas terapéuticas para determinar la respuesta y uso como adyuvante en el manejo nutricional de los pacientes con HPA. La definición de la respuesta de los pacientes con HPA al BH<sub>4</sub> varía de acuerdo a la dosis y al tiempo de administración que va desde 8 horas hasta 22 semanas [Elsas., et al 2011], pero en general se considera una respuesta positiva a BH<sub>4</sub> como la disminución al menos del 30% de la concentración basal de Phe en 24 horas [Blau N., et al 2010] [van Spronsen FJ., et al 2010].

Se han propuesto diversos protocolos para evaluar la respuesta al cofactor. El utilizado frecuentemente en Europa cuantifica los niveles de Phe sólo con 48 horas de administración de 20mg/kg/día de BH<sub>4</sub>, con mediciones de la

concentración de la Phe en sangre a las 8, 16 y 24 horas posterior a su administración. En cambio en diversos centros de Estados Unidos, la prueba se extiende hasta un mes, con mediciones de Phe al inicio, 8 y 24 horas y en los días 7, 14, 21 y 28. En México existe un reporte de 6 pacientes sometidos a la prueba terapéutica extendida, con respuesta favorable en 4 de ellos [Monroy-Santoyo S., et al 2012]. En pacientes con respuesta positiva a la administración de BH4 en forma de dihidrocloruro de sapropterina es posible aumentar la ingestión de proteína intacta, situación que puede mejorar la tolerancia a la Phe, el estado nutricional y la calidad de vida.

## **1.9 PRONÓSTICO**

El pronóstico de los pacientes dependerá de la edad del diagnóstico y de la introducción oportuna del tratamiento dietético, además del genotipo del paciente. Existe evidencia que si bien el tratamiento permite una inteligencia normal, cuando se comparan con sus hermanos sanos o controles de la misma edad, tienen un IQ más elevado, particularmente en las funciones ejecutivas. Además que la interrupción del tratamiento en la adolescencia o adultez afecta a las funciones neuropsicológicas y genera lesiones en la sustancia blanca por lo que el tratamiento debe continuarse de por vida [van Sprosen F., et al 2010 ],

## **1.10 GEN PAH**

El gen de la enzima PAH se encuentra en el cromosoma 12q23.2. La secuencia genómica de *PAH* y las regiones que lo flanquean abarcan 171,266 pares de bases y el transcrito tiene 4,122 nucleótidos [Montgomery K., et al 2007] [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_008690.1?from=5001&to=84277&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008690.1?from=5001&to=84277&report=genbank)].

Los 13 exones de *PAH* comprenden ~2.88% de la secuencia genómica que se encuentra entre el codón de inicio y el tracto poli(A). El exón 9 es el más pequeño (57 bp) y el más grande es el exón 13 (892 bp). La secuencia de *PAH* tiene 40.7%

de nucleótidos GC; las secuencias de DNA repetitivo son abundantes y son causa de deleciones y duplicaciones grandes [Kozak L., et al 2006]. El gen *PAH* carece de caja TATA proximal pero tiene otros elementos que incluyen cuatro dominios ricos en CG como sitios putativos para unión de Sp1 y una secuencia CCAAT (blanco para factores de regulación para la eficiencia de la transcripción). El gen *PAH* contiene islas CpG que son sitios potenciales para mutaciones recurrentes.

### **I.11 MUTACIONES EN EL GEN *PAH***

A la fecha, se han descrito más de 790 mutaciones en *PAH*, las cuales se presentan a lo largo de los 13 exones y las secuencias que los flanquean. La frecuencia de las distintas mutaciones varía entre poblaciones.

Al tratarse de una enfermedad recesiva la combinación de mutaciones encontradas en los pacientes se relacionará con el fenotipo. Las mutaciones que eliminan completamente la función del gen *PAH* (amorfas) abolerán la actividad enzimática de la proteína, por lo tanto no tendrán actividad enzimática residual y condicionarán un fenotipo severo. En este grupo se incluyen principalmente los cambios que generan un codón de paro prematuro (sin sentido) o afectan a los sitios donador o aceptor de empalme ('splicing') ubicados en los intrones. En cambio las mutaciones puntuales que cambian el aminoácido (sentido erróneo) solo disminuyen parcialmente la función del gen, las cuales se asocian a fenotipos clásicos hasta benignos de HPA,

Debido al gran número de mutaciones, el 75% de los pacientes con HPA son heterocigotos compuestos, lo que explica en parte, la gran variabilidad fenotípica observada en el padecimiento. La determinación del genotipo en cada paciente puede ayudar a predecir la severidad de la enfermedad y su posible respuesta a la administración de cofactor.

Cerca del 94% de las variaciones a nivel de secuencia reportadas en la base de datos internacional [[www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)] son mutaciones y el resto son polimorfismos. Las mutaciones causantes de HPA (desde PKU hasta HPA leve) se engloban en 5 categorías: mutaciones de sentido erróneo (63%), deleciones pequeñas de menos de 22 bp (13%), mutaciones que afectan splicing (11%), mutaciones silentes (7%) mutaciones sin sentido (5%) y pequeñas inserciones (1%) [Scriver CR., 2007]; las deleciones grandes, previamente consideradas raras en este gen, en algunas poblaciones como en República Checa, Italia y Polonia representan del 2-3% de las mutaciones causantes de PKU [Groselj U., et al 2012].

La mayoría de las mutaciones de sentido erróneo deterioran la actividad enzimática al causar inestabilidad y agregación en la proteína. Por lo menos 12 mutaciones causantes de PKU clásica afectan los dominios catalítico (residuos 143-410) y de tetramerización de PAH (residuos 411-452). La mutación más prevalente en todas las poblaciones, p.Arg408Trp, afecta la posición de arginina altamente conservada situada en la articulación de bisagra que conecta el brazo de tetramerización con el centro del monómero. La Arg408 forma un puente de hidrógeno con los residuos Leu308, Ala309 y Leu311 los cuales, al presentar mutaciones también condicionan PKU clásica.

La segunda mutación más común reportada en la base de datos de PAH [[www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)] es la c.1066-11G>A y se asocia con el fenotipo más severo. La mutación crea un nuevo sitio aceptor en el intrón 10 que condicionan la inserción de 9 nucleótidos intrónicos en el transcrito a nivel de la unión del exón 10 y del exón 11; esto genera a una proteína con 3 aminoácidos extra (Gly-Leu-Gln) insertados entre los residuos Q355 y Y356 [Pey Al., et al 2003]

Los perfiles mutacionales Europeos difieren fuertemente de los observados en población oriental: China, Japón y Corea donde los alelos más prevalentes son c.611A>G, p.Arg111\* (9%) y c.441-1G>A y están prácticamente ausentes en la

población Europea. En cambio en América Latina los perfiles mutacionales son muy similares a los Europeos Mediterráneos, donde la c.1066-11G>A se encuentra en el 21.1% de los alelos en Chile y en el 32.1% en Argentina [Perez B., et al 1993], la p.Val388Met en el 21% del Este de Brasil [Lara dos Santos L., et al 2006] y la p.Ile65Tre en el 19% del sur de Brasil [Santana da Silva LC., et al 2003]. Las frecuencias y mutaciones no han sido establecidas en población mexicana, sin embargo, los patrones de migración europea y mestizajes reconocibles durante los últimos 5 siglos, correlacionan con la distribución de los alelos de *PAH* en algunos países de América [Salle-Alonso M., et al 2009]. Factores como la endogamia o la consanguinidad, podrían incrementar la prevalencia de ciertos alelos en algunas regiones y comunidades, como en Turquía donde aproximadamente el 46% de los pacientes con PKU provienen de uniones consanguíneas, lo cual correlaciona con el porcentaje de homocigocidad del ~48%, además de tener alelos PKU con mutaciones en *cis*, que usualmente son la p.Arg155His con la p.Ala300Ser [Dobrowolski S., et al 2011].

## **I.12 SITIOS POLIMÓRFICOS Y HAPLOTIPOS DEL GEN *PAH***

Un haplotipo es la combinación de dos o más alelos localizados en un mismo segmento cromosómico, los cuales tienden a transmitirse como una unidad durante la meiosis debido a una baja tasa de recombinación existente entre estos sitios [Brown TA., 2002].

El análisis molecular del gen *PAH* en afectados de HPA en varias poblaciones permitió la identificación de haplotipos, algunos de ellos preferentemente ligados con mutaciones particulares causantes de la enfermedad, lo cual contribuyó al reconocimiento de éstos como una herramienta para comprender la genética poblacional y mutacional de la fenilcetonuria [Lidsky AS., et al 1985a].

Para el estudio de los haplotipos PKU se utilizan 3 tipos de marcadores polimórficos presentes en la secuencia del gen *PAH* [Scriver C., et al 2010]:

1. **Polimorfismos del tipo fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP):** secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas por una endonucleasa, las cuales catalizan la ruptura de DNA de doble cadena e inicialmente fueron detectados por Southern Blot. Un alelo que presenta la secuencia correcta para el sitio de restricción es cortada al someterse al tratamiento con la enzima, mientras que si la secuencia no es apropiada para la restricción, el sitio no es reconocido [Brown TA., et al 2002], tal y como se ejemplifica en la FIGURA I.2.

La metodología para su caracterización puede realizarse a través de PCR para amplificar la secuencia que contiene el sitio de restricción, se incuba con la enzima de restricción apropiada y se corre en un gel de electroforesis para determinar si existe o no el sitio de corte, por ende los RFLP únicamente tienen dos posibles alelos. En el gen *PAH* se han utilizado principalmente las enzimas *BglII*, *PvuII*, *EcoRI*, *MspI* y *XmnI*. La enzima *PvuII* forma dos sitios independientes *PvuIIa* y *PvuIIb*, en el intrón 2 y 3 respectivamente [Goltsov AA., et al 1992]. A través de estas enzimas es posible integrar alrededor de 70 haplotipos PKU distintos. Para determinar los haplotipos PKU se utilizan los polimorfismos tipo RFLP y de un solo nucleótido señalados en la TABLA I.2.

TABLA I.2 LOCALIZACIÓN, SITIO DE CORTE Y TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS EN PARES DE BASES DE ACUERDO A LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN PARA GENERAR LOS HAPLOTIPOS PKU.

<b>Enzima</b>	<b>Sitio de Corte</b>	<b>Polimorfismo de nucleótido único (SNP) de referencia*</b>	<b>Localización</b>	<b>Tamaño del amplicón y de los fragmentos resultantes de la restricción.</b>
<b><i>Bgl</i></b>	A/GATCT	rs1522296	Intron 1 g. 5594 C>T c. 60+62 C>T	290 pb: Alelo C 210/80: Alelo T
<b><i>Pvu</i></b>	CAG/CTG	rs4646986	Intrón 2 g. 10972 C>T c. 168+1160	374 pb: Alelo T 225/149: Alelo C
<b><i>Pvu</i></b>	CAG/CTG	rs4646987	Intrón 3 g. 29314 T>C c. 352+1446	489 pb: Alelo T 259/230: Alelo C
<b><i>Eco</i></b>	G/AATTC	rs4646988	Intrón 5 g. 63224 C>T c. 510-4047 C>T	485 pb: Alelo T 412/45: Alelo C
<b><i>Msp</i></b>	C/CGG	rs1722383	Intrón 7 g. 70579 T>C c. 843-268 T>C	422 pb: Alelo T 298/124: Alelo C
<b><i>Xmn</i></b>	GAANN/NNTTC	rs869916	Intrón 8 g. 72368 C>A c. 912 +1452 C>A	205 pb: Alelo A 110/95: Alelo C

\*[<http://alfred.med.yale.edu>] [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>]



La enzima *EcoRV* también reconoce un sitio de restricción polimórfico en el gen *PAH*, que fue utilizada para la formación de los haplotipos centrales PKU, sin embargo está localizada dentro de un elemento *Alu* a 10.5 kb corriente abajo del extremo 3´ del gen *PAH* por lo que no ha sido posible diseñar un ensayo de PCR para su caracterización y la cual sólo puede realizarse a través del estudio de Southern Blot [Scriver C., et al 2010].

2. **Polimorfismos de tipo multialélicos:** Son secuencias de DNA repetidas dispersas a lo largo del genoma, que varían en tamaño dependiendo del número de repetidos. Estos marcadores polimórficos son multialélicos. Existen dos tipos de polimorfismos multialélicos, ambos presentes en el gen *PAH*:

a) Repetidos en tándem de número variable (VNTR): Son secuencias repetitivas, donde la unidad de repetición típica es de 5 a 64 pb. A 3 Kb corriente abajo en el exón 13 del gen *PAH*, se encuentra una región rica en AT (70%) que normalmente forman 8 unidades de VNTR, cuya unidad repetitiva básica consta de 30 pares de bases [Lidsky AS., et al 1985b] (5´-CACATATATGTATATGCATATGTACGTATG-3´). Este VNTR presenta al menos 6 diferentes alelos de acuerdo al número de repeticiones. En la TABLA I.3 se muestran los diversos haplotipos estructurados a partir de los VNTR. Los haplotipos centrales se clasificaron de acuerdo al número de copias de la unidad de repetición descritos inicialmente a través de RFLP con Southern blot y la enzima *HindIII* [Lidsky AS., et al 1985a] [Goltsov AA., et al 1992].

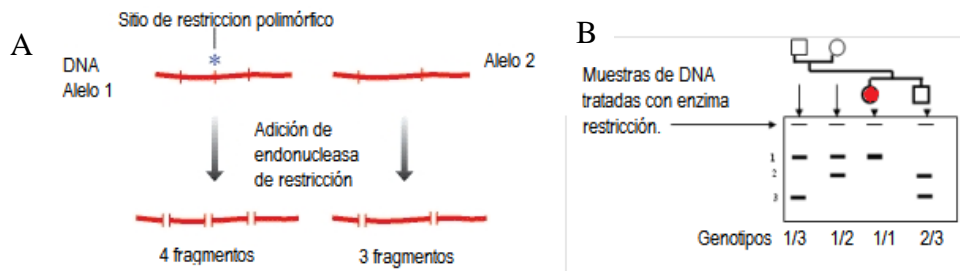


FIGURA 1.2. POLIMORFISMO TIPO FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA O RFLP. A) Se muestra que la molécula de DNA presenta el sitio de restricción polimórfico señalado con un asterico (\*), Después del tratamiento con la enzima de restricción se observa corte del DNA en 4 fragmentos, mientras que la del lado derecho que no presenta el sitio de restricción es cortado en tres fragmentos. B) Se muestra como a través de una genealogía y la utilización de las enzimas de restricción se puede obtener la caracterización de genotipos, donde el genotipo 1/1 se cosegrega con la enfermedad. Modificada de Genomes 2<sup>a</sup> edición [Brown TA., et al 2002].

TABLA I.3. NUMERO, TAMAÑO Y NÚMERO DE COPIAS DE LOS VNTR DEL HAPLOTIPO PKU.

<b>VNTR</b>	<b>Tamaño en pb</b>	<b>Número de Copias del Repetido</b>
<b>1</b>	380	3
<b>2</b>	470	6
<b>3</b>	500	7
<b>4</b>	530	8
<b>5</b>	560	9
<b>6</b>	650	12

b) Repetidos cortos en tándem (STR): son secuencias con unidades de repetición de 2-4 pb. En el tercer intrón del gen *PAH* se localiza una región de repetidos cortos en tandem de tetranucleótidos (TCTA<sub>n</sub>) cuyo número puede formar al menos 9 diferentes alelos [Giannattasio S., et al 1997].

Los alelos provenientes de los STR se nombran de acuerdo a las pares de bases que comprenden el fragmento de PCR: 226, 230, 234, 238, 242, 246, 250, 254 y 258.

3. **Polimorfismos de un solo nucleótido**: Son variaciones de un solo nucleótido los cuales en teoría pueden tener 4 versiones distintas por los 4 nucleótidos, pero la gran mayoría son bialélicos. En el gen *PAH* existen 1,374 SNPs, algunos de los cuales son muy frecuentes en la población general como el cambio de c.696A>G en el codón 232 (p.Glu232Glu), el cual muestra una frecuencia alélica de hasta el 0.60 en diferentes poblaciones [Scriver C., et al 2010].

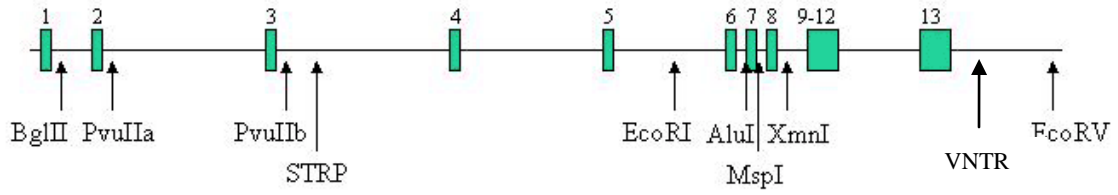


FIGURA I.3. SITIOS POLIMORFICOS MÁS REPRESENTATIVOS DEL GEN *PAH*.

Donde los cuadros ejemplifican los exones, las líneas los intrones y las flechas indican los sitios de corte aproximados de las principales enzimas de restricción. Esquema modificado de [Scriver C., 2010]

Como se muestra en la FIGURA 1.3, las combinaciones de los 7 polimorfismos bialélicos RFLPs y los de tipo multialélicos presentes en la secuencia del gen *PAH*, genera los haplotipos centrales de este locus. Los subtipos se establecen de acuerdo al tipo de alelos STR y VNTR presente.

Teóricamente existen 256 posibles combinaciones [Kidd JR., et al 2000] de los haplotipos, sin embargo hasta el momento sólo se han descrito 87 diferentes. El análisis del haplotipo central PKU permite realizar un seguimiento de la segregación de los alelos *PAH* en una genealogía. El determinar su frecuencia en la población puede a su vez informar sobre el posible origen étnico de las mutaciones. En la TABLA I.4 se describen los 87 haplotipos descritos.

TABLA I.4. HAPLOTIPOS PKU. Generados por RFLP, VNTR y STR, donde la (+) indica corte y la (-) ausencia de corte con la enzima de restricción. Los VNTR\* incrementan el número de haplotipos según el número de repetidos y el nombre del haplotipo se establece de acuerdo a ellos.

Modificada de [www.pahdb.mcgill.ca.com](http://www.pahdb.mcgill.ca.com).

Haplotipo	<i>Bgl</i> II	<i>Pvu</i> IIa	<i>Pvu</i> IIb	<i>Eco</i> RI	<i>Msp</i> I	<i>Xmn</i> I	VNTR*	<i>Eco</i> RV	STR Asociados
1	-	+	-	-	+	-	6, 7, 8, 9	-	230, 234, 238, 242, 246, 250.
2.3	-	+	-	-	+	-	3	+	230, 234, 238, 242, 246.
3.8	-	+	-	+	-	+	8	-	230, 238.
4.3	-	+	-	+	-	+	3	+	230, 234, 238, 242.
5	+	-	+	+	+	-	7, 8, 9	+	238, 242, 246, 250, 254.
6	+	-	+	+	+	-	7, 8, 9	-	
7	+	-	-	+	-	+	7, 8, 9	-	226, 230, 234, 238.
8.9	-	+	-	+	+	-	9	+	238, 242, 246, 250.
9.8	+	+	-	+	+	-	8	+	242.
10	-	+	-	+	+	-	7, 8, 9	-	238.
11	+	-	-	+	+	-	7, 8, 9	+	238, 242, 254.
12.12	-	+	-	-	+	-	12	+	230, 234, 238, 242, 246.
13	-	+	+	-	+	-	=	+	
14.8	-	-	-	+	+	-	8	-	
15.8	-	-	-	+	+	-	8	+	
15.9	-	-	-	+	+	-	9	+	
16.3	-	+	-	+	-	-	3	+	234, 238, 242.
17.8	-	+	-	+	-	-	8	-	
18.3	+	-	+	+	-	+	3	+	234.
19.8	-	+	-	+	-	+	8	+	230, 234, 238, 242.
20.7	-	-	+	+	+	-	7	-	
20.8	-	-	+	+	+	-	8	-	
21	+	-	+	+	+	-	=	+	238, 242, 246, 250, 254.
22.12	-	+	-	+	+	-	12	+	
23.8	+	-	+	+	-	+	8	-	
24.3	-	+	-	-	+	-	3	-	230, 234, 238, 242, 246, 250.

Haplotipo	BgII	PvuIIa	PvuIIb	EcoRI	MspI	XmnI	VNTR*	EcoRV	STR Asociados
26.8	+	+	-	-	+	-	8	-	
27	-	+	-	-	+	-	8, 9	+	230, 234, 238, 242, 246.
28.3	-	+	-	-	-	+	3	+	230, 234, 238, 242.
29	+	-	-	-	-	-	-	-	
30.8	+	+	-	-	-	+	8	-	226.
31.3	-	+	-	+	-	+	3	-	
32.8	+	-	-	-	+	-	8	-	226, 246.
33	+	-	-	-	+	-	-	+	
34	+	-	-	+	+	-	-	-	238.
35	+	-	-	+	+	+	-	+	
36.8	+	-	+	-	+	-	8	-	238, 242.
37	-	-	-	-	+	-	-	-	
38.12	+	-	+	-	+	-	12	-	
39.8	-	+	+	+	+	-	8	-	
40.8	+	-	-	-	-	+	8	-	226, 230.
41.3	-	+	-	+	+	-	3	+	238, 242, 246, 250.
42.8	+	-	-	+	-	-	8	-	
43.8	-	+	-	-	+	+	8	-	
44.3	+	-	-	+	-	+	3	+	
45	+	-	-	+	-	+	+	-	
46	+	+	-	-	-	+	+	+	
47.8	-	+	-	-	-	+	8, 9	-	
48.8	+	+	-	+	+	-	8	-	
49	+	+	-	+	-	+	+	+	236.
50	-	+	-	+	+	+	+	+	
51	+	+	-	-	+	-	+	+	
52	-	-	-	+	-	+	-	-	
53	+	-	+	+	+	-	+	-	
54	+	-	-	-	-	-	=	-	
55	+	+	-	+	-	-	-	+	
56	-	+	-	-	+	+	+	+	
57/63	+	+	-	-	+	-	-	+	
58	-	-	-	+	+	-	=	-	



Haplotipo	<i>Bgl</i> II	<i>Pvu</i> IIa	<i>Pvu</i> IIb	<i>Eco</i> RI	<i>Msp</i> I	<i>Xmn</i> I	VNTR*	<i>Eco</i> RV	STR Asociados
59	+	-	-	+	+	-	=	-	
60	-	+	+	-	+	-	-	-	
61	+	-	-	+	-	+	-	+	
62	-	+	-	+	-	+	=	-	
64	-	-	+	-	+	-	-	+	
65	+	-	+	+	+	+	-	+	
66	-	+	-	-	-	-	-	-	
67	-	+	-	+	+	+	+	-	
68	+	-	-	+	-	-	+	+	
69	+	-	-	+	+	-	+	+	238, 242, 254.
70	+	+	-	+	+	-	=	-	
71	+	+	-	+	-	+	-	-	
72	+	-	+	-	+	-	12	+	234.
73.3	+	-	+	-	+	-	3	+	246, 250.
74.3	+	-	-	ND	+	-	3	-	250.
75.3	ND	-	+	+	-	-	3	ND	234.
76	+	-	+	-	+	-	-	+	
77	+	+	+	-	+	-	-	-	
78	-	+	-	+	+	+	-	-	
79	-	+	-	-	-	+	+	-	
80	-	-	-	-	+	-	-	+	
81	+	-	-	-	+	-	+	+	
82	+	-	+	+	+	-	+	+	
83	-	+	-	+	-	-	+	-	
84	-	-	+	-	+	-	-	-	
85	-	-	-	-	+	-	+	-	
86	-	-	-	1b	-	-	-	-	
87.8	-	+	-	-	+	-	8	+	248.

Más del 90% de los portadores de mutaciones en el gen *PAH* son heterocigotos en uno o más sitios de restricción, por lo que anteriormente los RFLPs fueron muy útiles en la detección de portadores y diagnóstico prenatal [Okano Y., et al 1990], ya que los alelos y mutaciones se encuentran en desequilibrio de ligamiento con haplotipos PKU específicos [Eisensmith RC., et al 1992].

La amplia diversidad de las mutaciones patogénicas *PAH* es un reflejo de la historia de las poblaciones, las oleadas migratorias y la subsecuente expansión demográfica. A través del análisis de haplotipos se ha comprobado que mismas mutaciones tienen orígenes independientes, como por ejemplo la p.Arg408Trp que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el haplotipo 2 en Europa del Este y con el haplotipo 1 en el noreste de Europa.

Aunque no hay una sola mutación prevalente en todas las poblaciones europeas, se ha observado que algunas de ellas se encuentran en desequilibrio de ligamiento con haplotipos específicos como la c.1315+1G>A en el norte del continente está asociada al haplotipo 3; la p.Tyr414Cys en la península Escandinava con el haplotipo 4; la c.1066-11G>A en Asia menor con el haplotipo 34 mientras que en el sur de Europa, incluida la península Ibérica, esta misma mutación está asociada al haplotipo 6 y la p.Ile65Tre en la península Ibérica e Irlanda, se encuentra ligada al haplotipo 9 [Zschocke J., 2003] [Guldborg P., et al 1996] [[www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)].

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento se desconoce la frecuencia y tipo de mutaciones en el gen de *PAH* en población mexicana y si los genotipos de estos pacientes son predictores potenciales de respuesta a la terapia con el cofactor enzimático BH<sub>4</sub> (sapropterina). Tampoco se ha determinado la distribución y frecuencia de los haplotipos, ni el origen ancestral de los alelos de *PAH* en población mexicana.

## III. JUSTIFICACIÓN

Las HPA constituyen una de las pocas entidades genéticas en las que el retraso mental puede prevenirse, por lo que el diagnóstico y tratamiento deben instaurarse tempranamente. El manejo consiste en una dieta con restricción en la ingesta de Phe que debe llevarse de por vida, lo que le confiere dificultad y poco apego en la mayoría de los pacientes. En la última década se implementó la administración del cofactor BH<sub>4</sub> como estrategia terapéutica, debido a que ha demostrado ser efectivo en algunos pacientes con HPA aunque, actualmente se sabe que la respuesta depende en gran medida del genotipo del paciente. Por lo tanto para la administración de este nuevo fármaco es necesario determinar las características clínicas y bioquímicas de la HPA en pacientes mexicanos, así como el caracterizar las mutaciones del paciente para predecir la respuesta al tratamiento.

El identificar las mutaciones del gen *PAH* que condicionan PKU en población mexicana permitirá realizar una clasificación diagnóstica más precisa de los pacientes y delinear tratamientos individualizados. El estudio de los genotipos y su prevalencia, podría dar evidencias para eventualmente incluir la genotipificación dentro del tamiz neonatal ampliado y se podría prevenir la recurrencia de la enfermedad al determinar estado de portador en otros miembros de la familia. La correlación fenotipo-genotipo y la predicción de la respuesta al cofactor determinarán que pacientes son candidatos a recibir tratamiento farmacológico con el BH<sub>4</sub>.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterización del espectro mutacional y haplotipos del gen *PAH* en pacientes mexicanos con HPA (fenilcetonuria).

### IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el espectro mutacional del gen *PAH* en pacientes con diagnóstico de HPA.
2. Caracterizar los haplotipos presentes en los pacientes con genotipo identificado.
3. Determinar la distribución y asociación de mutaciones en el gen *PAH* con los haplotipos identificados.
4. Describir el fenotipo bioquímico y su correlación con el genotipo.
5. Predecir de acuerdo a lo reportado en la literatura la respuesta a la prueba terapéutica a partir del genotipo.

### IV.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

### IV.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes de cualquier sexo y grupo de edad, mexicanos (nacidos en México y de padres mexicanos) con HPA primaria confirmada, diagnosticados y/o atendidos en el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz.

#### IV. 5 POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes con diagnóstico confirmado de HPA por presentar niveles séricos de Phe mayores a 2 mg/dl (120  $\mu$ M) y que tengan un cociente Phe/Tyr > de 2 determinado por el método de HPLC.

#### IV.6 POBLACIÓN ELEGIBLE

Casos registrados en el censo de pacientes del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz con diagnóstico confirmado de HPA primaria realizado de 1990 a la fecha, dado que en dicho servicio se tienen registros de pacientes con HPA a partir de ese año.

## **V. METODOLOGÍA**

### **V.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- a) Pacientes con diagnóstico confirmado de HPA primaria por deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (PAH) referidos por el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, INP.
- b) De cualquier género.
- c) De cualquier edad.
- d) Familiares en primer grado (padres y hermanos) de pacientes con diagnóstico confirmado de HPA primaria.
- e) Casos índice y familiares que autoricen su inclusión al estudio mediante firma de carta de autorización (Anexo 1 y 1.1).

### **V.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- a) Evidencia clínica/bioquímica de HPA por deficiencia en la síntesis o regeneración del cofactor BH<sub>4</sub>.
- b) Pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses (se excluirán de manera temporal).
- c) Padres o hermanos no biológicos de los casos índice.
- d) Pacientes de los cuales no se cuente con DNA suficiente para los ensayos y nos sea posible contactarlos para una nueva toma de muestra.

### **V.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA**

El tamaño de la muestra se calculó por conveniencia, ya que la HPA se presenta en aproximadamente 1/10,000 recién nacidos vivos, lo cual la hace un padecimiento de baja prevalencia. Se calculó contar con al menos 30 familias no relacionadas.

#### V.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES (ANEXO 2)

VARIABLE	TIPO	MEDICIÓN
Sexo	Categorica Nominal Dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Femenino</li> <li>Masculino</li> </ul>
Edad actual	Cuantitativa Numérica Discreta	Edad en días o meses al momento de la captura de estas variables.
Edad al diagnóstico	Cuantitativa Numérica Discreta	Edad en días o meses cuando se realizó el diagnóstico de hiperfenilalaninemia.
Lugar de Origen	Categorica Nominal	32 estados de la República Mexicana.
Manifestaciones clínicas por aparatos y sistemas	Cualitativa Categorica Nominal Dicotómica	1) Si=Presente. 2) No=Ausente.
Fenotipo bioquímico antes del tratamiento. Niveles séricos de Phe mayores a 2 mg/dl (120 µM) y que tengan un cociente Phe/Tyr > de 2 determinado por el método de HPLC.	Categorica Ordinal	Clasificación del fenotipo en las siguientes categorías: <ul style="list-style-type: none"> <li>Fenilcetonuria clásica (16.6 mg/dl o &gt;1000 µM).</li> <li>PKU moderada (10-16.6 mg/dl o 600-1000 µM).</li> <li>PKU leve (4-6 mg/dl o 600-1000 µM).</li> <li>HPA benigna. (2-4 mg/dl o 120-240 µM)</li> </ul>

Mutaciones	Categorica Nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deleciones: pérdida de nucleótidos en la secuencia de un gen o cromosoma.</li> <li>• Inserciones: ganancia de nucleótidos en la secuencia de un gen o cromosoma.</li> <li>• Sentido erróneo: las cuales sustituyen un aminoácido con otro.</li> <li>• Sin sentido: reemplazan un aminoácido por un codón de terminación.</li> <li>• Mutaciones de sitio de empalme: crean o destruyen señales para empalme de exón-intrón.</li> <li>• Mutaciones silentes: existe cambio de nucleótido pero no cambia el aminoácido resultante.</li> </ul>
Haplotipos	Numérica Discreta	Clasificados de acuerdo a los obtenidos por PCR-RFLP y PCR-electroforesis.



## MANIFESTACIONES CLÍNICAS POR APARATOS Y SISTEMAS

### I. PIEL Y FANERAS:

- Hipopigmentación del cabello: disminución de la cantidad de melanina en el cabello. Se determinará si el paciente tiene cabello más claro o menos claro que los padres.
- Hipopigmentación cutánea: disminución de la cantidad de melanina epidérmica. Se determinará si el paciente tiene piel más clara o menos clara que los padres.
- Eczema malar: Inflamación y enrojecimiento de la piel en el área más externa de la cara, formada por el pómulo y la región inferior de la órbita.

### II. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:

- Crisis convulsivas: contracciones involuntarias y repentinas de un grupo de músculos acompañado de pérdida de la conciencia y alteraciones del comportamiento que son resultado de la actividad eléctrica cerebral anormal.
- Temblor: movimientos musculares rítmicos e involuntarios que involucran una o más partes del cuerpo, usualmente en manos, brazos, cabeza, cuello, cuerdas vocales, tronco y piernas.
- Irritabilidad: respuesta excesiva a los estímulos.

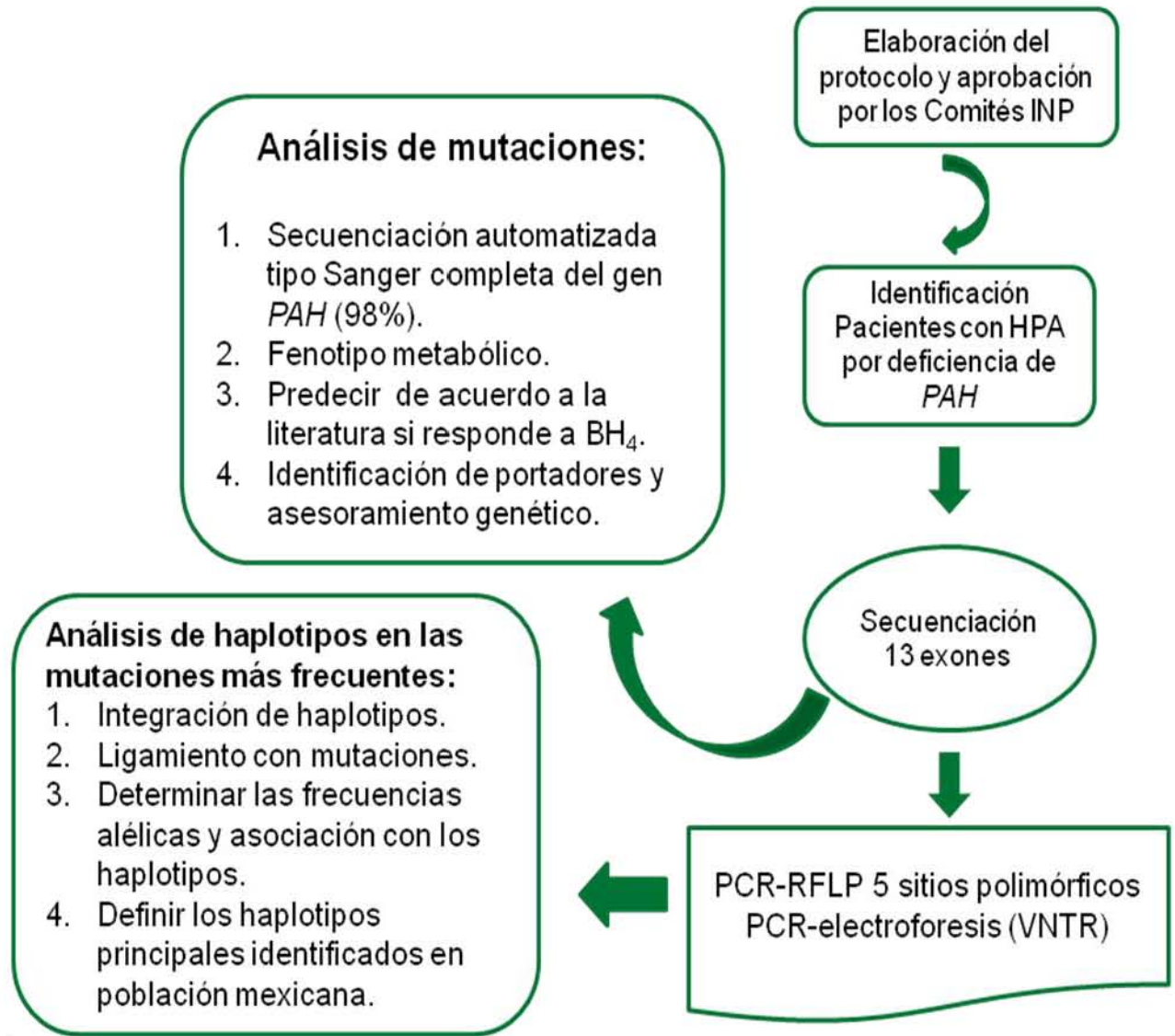
### III. GASTROINTESTINAL:

- Rechazo al alimento: reacción de oposición al alimento o de rechazo a las circunstancias en las que es ofrecida la comida.
- Vómito: expulsión forzada del contenido del estómago por la boca.

## V.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Los pacientes se captaron a través de los servicios de consulta externa o de hospitalización y se contactaron vía telefónica a aquellos diagnosticados en el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz en años anteriores para que participaran en el estudio. Fueron evaluados por personal del Laboratorio de Errores del Metabolismo y Tamiz, quienes realizaron historia clínica completa, árbol genealógico y clasificaron a los pacientes con HPA por deficiencia de PAH en PKU clásica, PKU moderada, PKU leve o HPA benigna. (GRAFICO V.1 ALGORITMO METODOLÓGICO)

GRAFICO V.1 ALGORITMO METODOLÓGICO



## V.6 EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo el DNA genómico mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante (3-5 mL), muestras de tamiz neonatal en tarjetas de Guthrie o de células de descamación de mucosa oral, tanto del caso índice como de sus familiares en primer grado (padres y hermanos). El DNA genómico obtenido se cuantificó y se valoró su pureza e integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de DNA se conservaron a 4°C hasta su análisis.

## V.7 ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS TRECE EXONES DEL GEN PAH.

Se amplificaron los exones 13 del gen de manera independiente por PCR. La mezcla para llevar a cabo la amplificación contendrá 0.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μMol/L de dNTPs, 100 ng de DNA genómico y 60 ng de cada primer. La reacción se llevo al cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720. Las condiciones de PCR se establecieron de acuerdo a las características de cada exón a amplificar. Los oligonucleótidos de cada secuencia, así como la temperatura de alineación se enlistan en la TABLA V.1. Las mutaciones presentes en el gen se identificaron mediante secuenciación directa de cada exón de ambas hebras (*forward* y *reverse*).

## V.8 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS MUTACIONES NUEVAS GEN PAH.

La secuencia obtenida se comparó con la secuencia del gen de la base de datos de GeneBank (NG-008690). Para identificar si el cambio está descrito previamente como mutación o polimorfismo [[www.pahdb.com](http://www.pahdb.com), [www.biopku.com](http://www.biopku.com), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>]. Para los cambios no descritos se realizó un análisis *in silico* para predecir si su efecto a nivel de la proteína es

patológico o no, , para ello se utilizó el software Pmut [Ferrer-Costa C., et al 2005. Para las mutaciones que afectan el splicing se utilizó el programa ESEfinder 3.0 [<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tolos/ESE3/esefinder.cgi>].

TABLA V.1. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS 13 EXONES DEL GEN *PAH*. [www.pahdb.mcgill.ca][De Lucca M., et al 2009].

EXON	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTISENTIDO	°C	Tamaño esperado del amplicón (pb)
1	5'-TCTCTTCTCCTCCCTAGTGCGA-3'	5'-CATCATCTTCCAACGAATTCAG-3'	60	300
2	5'-AGAGTTCATGCTTGCTTTGT-3'	5'-CTGTTCCAGATCCTGTGTTC-3'	58	299
3	5'-GCCTGCGTTAGTTCCAGTGAC-3'	5'-CTTATGTTGCAAAATTCCTC-3'	55	267
4	5'-GGGATCCCCACTTCTGATCT'-3	5'-TAAGAGGAAGGGAGGGGAGT-3'	56	150
5	5'-GCACTGTCATGGCTTGAGAG-3'	5'CATGCTGGTATTTTCCATCC 3'	60	266
6	5'-GATGGCAGCTCACAGGTTCTG-3'	5' TCCCTCTCCTCTGCCTCAATC 3'	60	369
7	5'-AGGTCTCCTAGTGCCTCTGA-3'	5'ACTACCAGCAAACAGTCTAGACAAC 3'	60	331
8	5'-TGGCTTGGCTTAAACCTCCTC-3'	5'ACCTGGTTTCCGCTCTTGC 3'	58	235
9	5'-GGCTGTTCTGAAGGCATCTG-3'	5'TTTCCCAGATAACCTGGCTTCCA 3'	60	273
10	5'-TGCTCTCAGATTGACTTTCC-3'	5' ATCACTGGAGAATGAGTTCC 5'	58	257
11	5'-TGGGCTGTGATGTAGAAGGAAT-3'	5'GAACATGGGAGAGAACTGTC 3'	60	396
12	5'-ACCTTTCTCCAAATGGTGCCC-3'	5'CTATGGCGATGGTAGGGAAAGA 3'	60	241
13	5'-CAAGAAGCCCCTTATC-3'	5'CTCCATCAACAGATTCACA 3'	58	191

## V.9 ENSAYOS PCR-RESTRICCIÓN PARA LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES

Para el diagnóstico rápido de las mutaciones más frecuentes en los familiares y/o nuevos pacientes, se diseñaron ensayos de PCR-restricción a través del programa en línea RebSites [<http://tools.neb.com/REBSites/index.php>]. La mutación c.60+5G>T crea un sitio de restricción para la enzima *Mbol* en el amplicón del exón-intrón 1 del gen *PAH* (174+55pb). La mutación c.1066-11G>A también crea un sitio de restricción para la enzima *Ddel* en el amplicón del intrón 10/exón 11/intrón 11 del gen *PAH* (285+111pb).

## V.10 IDENTIFICACIÓN DE PORTADORES EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO

Para los familiares en primer grado se analizó de manera dirigida los exones del gen *PAH* donde se ubica la mutación identificada en el caso índice mediante secuenciación o por PCR-restricción.

## V.11 HAPLOTIPOS PKU POR ANÁLISIS DE RFLP Y VNTR

A través de las muestras de DNA genómico obtenidas por la técnica de precipitación salina en el caso índice se amplificaron de manera independiente las secuencias que contienen los RFLP y VNTR, que conforman los haplotipos centrales PKU. Se analizaron los haplotipos de los familiares de primer grado de los pacientes que presentaron las mutaciones más frecuentes para la asignación de haplotipos.

Se amplificaron 5 RFLP [Eisensmith RC., et al 1994] del gen de manera independiente por PCR. La mezcla para llevar a cabo la amplificación contuvo 0.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μMol/L de dNTPs, 100 ng de DNA genómico y 60 ng de cada primer. La secuencia del gen *PAH* se obtuvo del Genbank (NG-008690) y los oligonucleótidos de Allele Frequency

Database [Kidd KK, 2011 ALFRED <http://alfred.med.yale.edu>]. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720 y las condiciones de PCR se establecieron de acuerdo a las características de cada fragmento a amplificar.

Los productos de la PCR fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción específica (*Bgl*II, *Pvu*II, *Msp*I y *Xmn*I) para cada RFLP de acuerdo a las instrucciones del fabricante y sus fragmentos fueron separados a través de electroforesis en geles de agarosa al 4%. La interpretación de los genotipos se realizó de acuerdo al patrón de restricción señalado en la TABLA I.4.

Para el análisis de los VNTR se amplificó el extremo 3' del gen *PAH* donde se encuentra la región del VNTR a través de PCR. La mezcla para llevar a cabo la amplificación contuvo 0.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µMol/L de dNTPs, 100 ng de DNA genómico y 60 ng de cada primer. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron 5'-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3' y 5'-GGAAACTTAAGAATCCCATC-3'. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 2720, las condiciones de PCR se establecieron de acuerdo a las características de la región a amplificar.

Los alelos VNTR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3-4% comparando el tamaño de los fragmentos. En este ensayo electroforético se pretendió resolver los fragmentos de 380, 470, 500, 530, 560 y 650 pares de bases, los cuales corresponden a la presencia de 3, 6, 7, 8, 9 y 12 copias del VNTR respectivamente.

El haplotipo se integró de acuerdo a lo descrito previamente [Woo S., et al 1985], por la presencia o ausencia del sitio de corte para cada enzima de restricción utilizada y de acuerdo al número de repetidos de los fragmentos del VNTR. Los genotipos para los sitios de corte de los RFLPs se asignaron si eran homocigotos



para la presencia (+/+) o ausencia (-/-) del sitio de corte, aquellos que fueron heterocigotos se establecieron como (+/-). En los heterocigotos para algún marcador RFLP se utilizó el genotipo de los padres (en aquellos con padres disponibles y cuyos genotipos fueran informativos) para poder determinar la fase del haplotipo,

Los genotipos de los familiares en primer grado de los pacientes con alguna de las mutaciones más frecuentes se analizaron a través del programa HAPLOVIEW, por el cual se obtuvieron los alelos que conforman el haplotipo que dentro de la muestra son sobretransmitidos.

#### V.12 CORRELACIÓN GENOTIPO Y BH<sub>4</sub>

A partir de la predicción de la respuesta al cofactor BH<sub>4</sub> en los pacientes con HPA de acuerdo a su genotipo, se compararon los resultados del fenotipo observado contra el esperado para obtener la correlación genotipo-fenotipo. También se catalogó la probable respuesta al tratamiento de acuerdo al genotipo y a lo reportado en la base de datos BIOPKU.

#### V.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando la base de datos generada a partir de las hojas de captación de datos. Los resultados se presentan por promedio y la frecuencia de las mutaciones y predicción de la respuesta al BH<sub>4</sub> se reporta en porcentajes.

#### V.14 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitó el consentimiento informado (Anexo 1 y 1.1) de los padres de los casos índice que cumplieron con los criterios de inclusión y se obtuvieron 5 mL (de sangre venosa periférica, raspado de mucosa oral o sangre en papel filtro (tarjetas

de Gûthrie) para el análisis de aminoácidos por HPLC y la extracción de DNA y su posterior análisis.

La información personal, de identidad y del genotipo es manejada en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés “Ethical, Legal and Social Issues”). Además de acuerdo al comentario sobre la Pauta 14 de las “Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos” (Preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud Ginebra (2002), se justifica la participación de niños en investigación biomédica ya que es indispensable para la comprensión de enfermedades y la búsqueda de nuevos fármacos en este grupo de edad.

El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos, el cual consta de la entrega de información acerca de las características de las afecciones genéticas, los riesgos de ocurrencia y de recurrencia y los impactos familiares que ellas producen (clínica, financiera, social y emocional). El tratamiento médico convencional será otorgado por el personal del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz y de acuerdo a los resultados del análisis molecular.

## **VI. RESULTADOS**

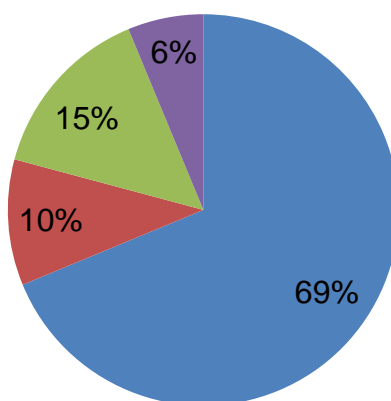
### **VI.1 DATOS GENERALES Y FENOTIPO BIOQUÍMICO**

Se captaron un total de 48 pacientes no relacionados con diagnóstico bioquímico confirmatorio de HPA. De estos, 25 son del sexo masculino (52%) y 23 del sexo femenino (48%), con un intervalo de edad entre un mes de vida y 38 años. El nivel de Phe al diagnóstico se encontró entre 240  $\mu\text{M/L}$  hasta 3,591  $\mu\text{M/L}$ . En el GRÁFICO VI.1 se muestra el total de los pacientes de acuerdo a su clasificación bioquímica por Phe al diagnóstico. Únicamente 26 pacientes (54%) de nuestra muestra obtuvieron diagnóstico y referencia temprana por estudio de tamiz neonatal, la cual se considera ideal antes de los 30 días de vida.

GRÁFICO VI.1. CLASIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PACIENTES CON HPA.

### Clasificación Bioquímica

- PKU Clásica n=33 (>1000 $\mu$ M/L)
- PKU Moderada n=5 (600-1000 $\mu$ M/L)
- PKU leve n=7 (360-600 $\mu$ M/L)
- HPA Benigna n=3 (120-240 $\mu$ M/L)



Dentro de las familias captadas, existen 6 con más de un hijo afectado, todos con fenotipos bioquímicos concordantes, 5 de las cuales cuentan con dos hijos afectados con PKU clásica de diagnóstico tardío y una familia con HPA benigna con tres afectados, dos de ellos diagnosticados tardíamente.

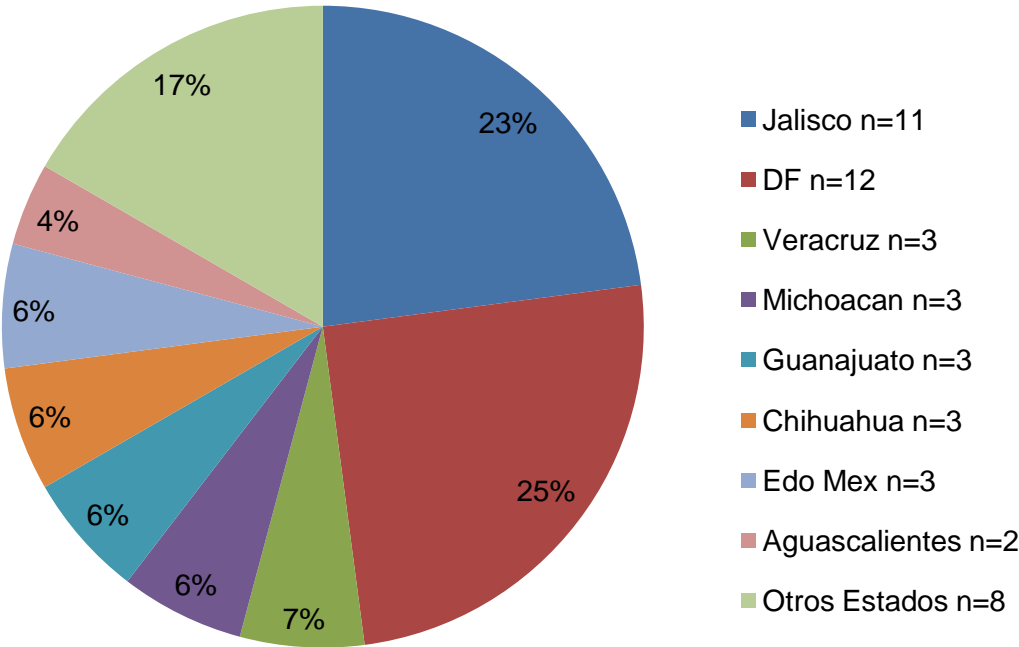
Existen 3 familias con antecedente de consanguinidad, con matrimonios entre tío-sobrina (PKU8, segundo grado) (FIGURA VI.1A) y dos parejas de primos hermanos (PKU9 y PKU106, tercer grado). Una familia además cuenta con el diagnóstico adicional de rasgo talasémico  $\beta$  (PKU111) y una de nuestras pacientes adultas (PKU83) presentó un embarazo complicado por embriopatía por HPA materna, que resultó en una pérdida fetal al octavo mes de gestación.

## VI.2 LUGAR DE ORIGEN

En cuanto al origen de procedencia de los 48 pacientes, ésta se señala en el GRÁFICO VI.2. Los pacientes captados provienen de 16 estados de la República Mexicana.

GRÁFICO VI.2. LUGAR DE PROCEDENCIA DE PACIENTES MEXICANOS CON HPA.

### Lugar de Origen



### VI.3 ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN PAH

En total se identificaron 48 pacientes con 41 genotipos diagnósticos de HPA. (TABLA VI.1). Las mutaciones identificadas por el tipo de cambio a nivel nucleotídico se describen en el GRAFICO VI.3. Se completó el estudio de portadores en los familiares de primer grado disponibles para el estudio. Se dispuso de 34/48 (70%) familias con al menos ambos padres, 9/48 (19%) familias con solo la madre y 5/48 (11%) únicamente con el caso índice. En todos los casos hubo concordancia en el genotipo de los padres como portadores obligados. El estudio incluyó el análisis de 13 hermanos, de los cuales 9 fueron portadores y 4 resultaron con genotipo homocigoto normal (no portadores).

Se caracterizó un total de 96 alelos PKU, de los cuales se encontraron 34 mutaciones distintas. De acuerdo a la clasificación por actividad enzimática residual, 63/96 tiene actividad enzimática residual muy baja (<10%), 12/96 moderada (entre 10-30%), 12/96 alta (actividad >30%) y 9/96 sin clasificar [Guldberg P., et al 1998] (TABLA VI.2).

TABLA VI.1 PACIENTES CON HPA Y CON GENOTIPO CONFIRMADO.

Registro de pacientes	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo Observado
PKU8, PKU35, PKU52, PKU65 (n=4)	c.60+5G>T	c.60+5G>T	4 PKU Clásica
PKU66, PKU78, PKU81, PKU138 (n=4)	c.60+5G>T	p.Val388Met	2 PKU Clásica; 2 PKU Moderada
PKU48, PKU90 (n=2)	c.60+5G>T	c.441+5G>T	2 PKU Clásica
PKU16	c.60+5G>T	c.1066-11G>A	PKU Clásica
PKU84	c.60+5G>T	p.Glu280Lys	PKU Clásica
PKU140	c.60+5G>T	p.Arg252Trp	PKU Clásica
PKU128	c.60+5G>T	c.1315+1G>A	PKU Clásica
PKU120	c.60+5G>T	p.His170Asp	HPA Benigna
PKU13	c.60+5G>T	p.Arg243*	PKU Clásica
PKU126	p.Val388Met	c.1066-11G>A	PKU Clásica
PKU40	p.Val388Met	c.1315+1G>A	PKU Clásica
PKU27	p.Val388Met	c.969+6T>A	HPA Benigna
PKU114	p.Val388Met	c.1315+2T>C	PKU Clásica
PKU163	c.1066-11G>A	p.Arg270Lys	PKU Clásica
PKU93	c.1066-11G>A	c.969+6T>C	PKU Moderada
PKU38	c.1066-11G>A	p.Arg261*	PKU Clásica
PKU98	c.1066-11G>A	p.Arg176*	PKU Clásica
PKU33	c.1066-11G>A	p.Asn376Ilefs*24	PKU Clásica
PKU55	c.1066-11G>A	p.Ser349Pro	PKU Clásica
PKU168	c.441+5G>T	c.441+5G>T	PKU Clásica
PKU135	c.441+5G>T	p.Ser349Pro	PKU Moderada
PKU21	c.441+5G>T	c.842+1G>A	PKU Clásica
PKU171	c.441+5G>T	p.Pro55Leufs*6	PKU Clásica
PKU95	p.Ser349Pro	p.Glu390Gly	PKU Leve
PKU61	p.Ser349Pro	p.Arg158Trp	PKU Clásica
PKU23	p.Ser349Pro	p.Pro147Ser	PKU Clásica
PKU76	p.Glu390Gly	p.Glu390Gly	PKU Leve
PKU45	p.His170Asp	c.842+1G>A	PKU Moderada
PKU155	p.His170Asp	c.1315+1G>A	PKU Leve
PKU107	p.Pro314His	p.Arg270Lys	PKU Leve
PKU132	p.Tyr386Cys	p.Arg252Trp	PKU Clásica
PKU146	p.Ser303Ala	p.Pro225Tre	HPA Benigna
PKU10	p.Gln304Gln	p.Gln304Gln	PKU Clásica
PKU106	p.Glu280Lys	p.Glu280Lys	PKU Clásica
PKU83	p.Arg261Gln	p.Arg261*	PKU Clásica
PKU101	p.Arg261Gln	p.Pro147Ser	PKU Clásica
PKU70	p.Arg261Gln	p.Arg68Ser	PKU Leve
PKU29	p.Arg243Gln	p.Arg241His	PKU Leve
PKU117	p.Leu348Val	p.Ile65Tre	PKU Clásica
PKU111	p.Met1Leu	p.Met1Leu	PKU Clásica
PKU159	p.Met1Leu	p.Arg241His	PKU Leve



GRÁFICO VI.3. TIPOS DE MUTACIONES POR TIPO DE CAMBIO A NIVEL NUCLEOTÍDICO IDENTIFICADAS EN 96 ALELOS DEL PRESENTE ESTUDIO.

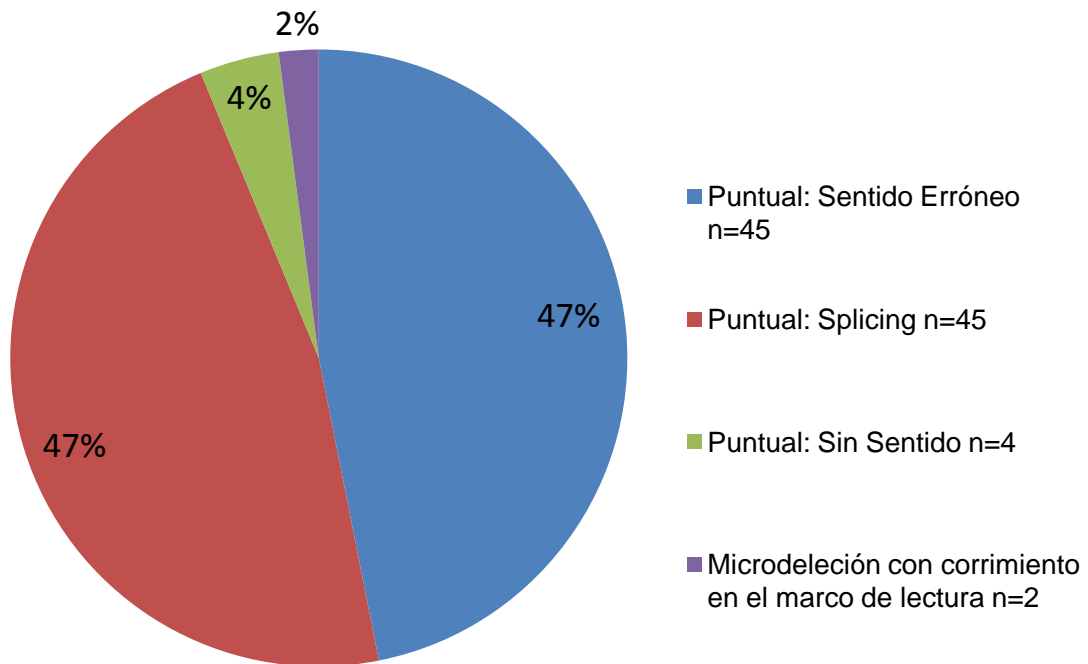


TABLA VI.2. ALELOS PAH IDENTIFICADOS EN 48 PACIENTES CON HPA PRIMARIA.

Mutación PAH	Variación en secuencia	Localización	Tipo de Mutación	Actividad enzimática (%) <sup>c</sup>	Alelos (n)
c.60+5G>T	c.60+5G>T	In.1	Splicing	Nula	20
c.1066-11G>A	c.1066-11G>A	In.10	Splicing	Nula	8
p.Val388Met	c.1162G>A	Ex.11	Sentido erróneo	15-43	8
c.441+5G>T	c.441+5G>T	In.4	Splicing	Nula	7
p.Ser349Pro	c.1045T>C	Ex.10	Sentido erróneo	0-1	5
p.His170Asp	c.608C>G	Ex.5	Sentido erróneo	43	3
p.Arg261Gln	c.782G>A	Ex.7	Sentido erróneo	27-100	3
p.Glu280Lys	c.838G>A	Ex.7	Sentido erróneo	0-3	3
p.Glu390Gly	c.1169A>G	Ex.11	Sentido erróneo	70-85	3
c.1315+1G>A	c.1315+1G>A	In.12	Splicing	Nula	3
p.Met1Leu	c.1A>T	Ex.1	Sentido erróneo	?	3
c.842+1G>A	c.842+1G>A	In.7	Splicing	Nula	2
p.Pro147Ser	c.439C>T	Ex.4	Sentido erróneo	NR	2
p.Arg241His	c.722G>A	Ex.7	Sentido erróneo	23-25	2
p.Arg261*	c.781C>T	Ex.7	Sin sentido	Nula	2
p.Arg270Lys	c.809G>A	Ex.7	Sentido erróneo	0	2
p.Arg252Trp	c.754C>T	Ex.7	Sentido erróneo	0.5-1	2
p.Gln304Gln	c.912G>A	Ex.8	Splicing <sup>a</sup>	Nula	2
p.Arg243*	c.727C>T	Ex.7	Sin sentido	Nula	1
c.969+6T>A	c.969+6T>A	In.9	Splicing	Nula <sup>b</sup>	1
p.Arg243Gln	c.728G>A	Ex.7	Sentido erróneo	10-18	1
p.Asn376Ilefs*24	c.1127delA	Ex.11	Corrimiento marco	Nula	1
p.Arg158Trp	c.472C>T	Ex.5	Sentido erróneo	10	1
p.Arg68Ser	c.204A>T	Ex.3	Sentido erróneo	18-98	1
c.969+6T>C	c.969+6T>C	In.9	Splicing	Nula	1
p.Arg176*	c.526C>T	Ex.6	Sin sentido	Nula	1
p.Pro314His	c.809G>A	Ex.9	Sentido erróneo	NR	1
c.1315+2T>C	c.1315+2T>C	In.12	Splicing	Nula	1
p.Ile65Tre	c.194>C	Ex.3	Sentido erróneo	21-60	1
p.Leu348Val	c.1042C>G	Ex.10	Sentido erróneo	25-44	1
p.Tyr386Cys	c.1157A>G	Ex.11	Sentido erróneo	NR	1
p.Pro225Tre	c.673C>A	Ex.6	Sentido erróneo	NR	1
p.Ser303Ala	c.907T>G	Ex.8	Sentido erróneo	NR	1
p.Pro55Leufs*6	c.165delT	Ex.2	Corrimiento marco	Nula	1

NR: Actividad enzimática no reportada. Ex: Exon. In: Intron. <sup>a</sup>: A pesar de ser un cambio sinónimo afecta el splicing exón del 8 [Couce C., et al 2013]. <sup>b</sup>: Se considero como nula, dado que es una mutación que afecta el splicing, sin embargo el efecto observado clínicamente es moderado, como se discutirá más adelante. <sup>c</sup>: De acuerdo a *Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase* <http://www.pahdb.mcgill.ca>

Como se observa en la TABLA VI.2, la c.60+5G>T (20.8%), p.Val388Met (8.3%) y la c.1066-11G>A (8.3%) comprendieron las mutaciones más frecuentes identificadas en los pacientes, las cuales representan el 37% del total de los alelos PKU documentados en nuestra muestra.

Para el diagnóstico rápido de estas mutaciones en los familiares y/o nuevos pacientes, se diseñaron ensayos de PCR-restricción a través del programa en línea RebSites [<http://tools.neb.com/REBSites/index.php>]. La mutación c.60+5G>T crea un sitio de restricción para la enzima *Mbol* en el amplicón del exón-intrón 1 del gen *PAH* (FIGURA VI.1A). La mutación c.1066-11G>A también crea un sitio de restricción para la enzima *Ddel* en el amplicón del intrón 10/exón 11/intrón 11 del gen *PAH* (FIGURA VI.1B). También se estandarizó un ensayo de restricción para la mutación p.Val388Met, sin embargo ésta por el momento no fue aplicada en el presente estudio.

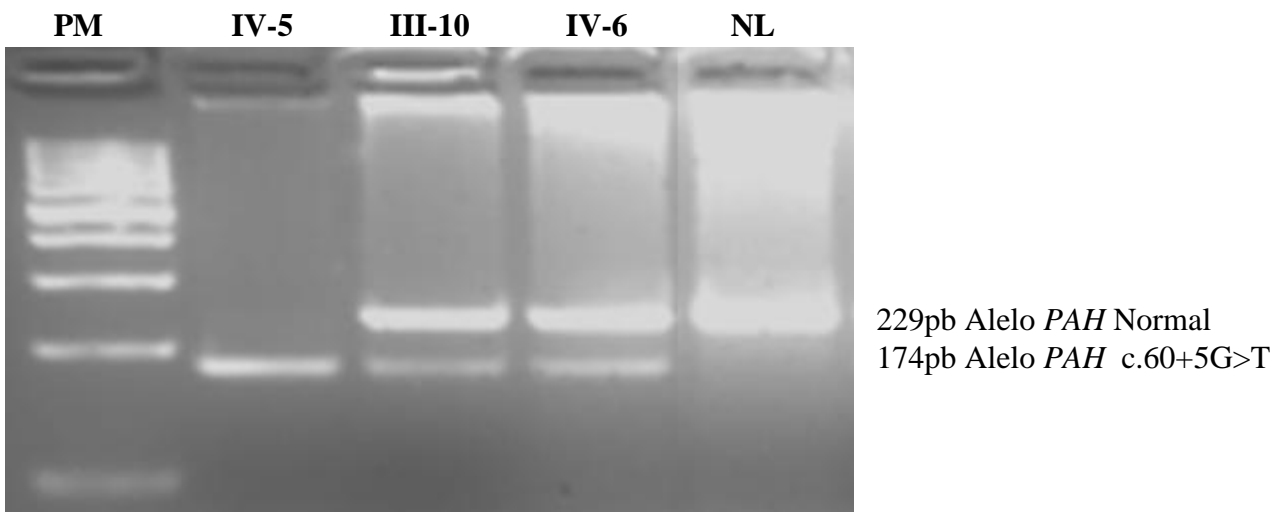
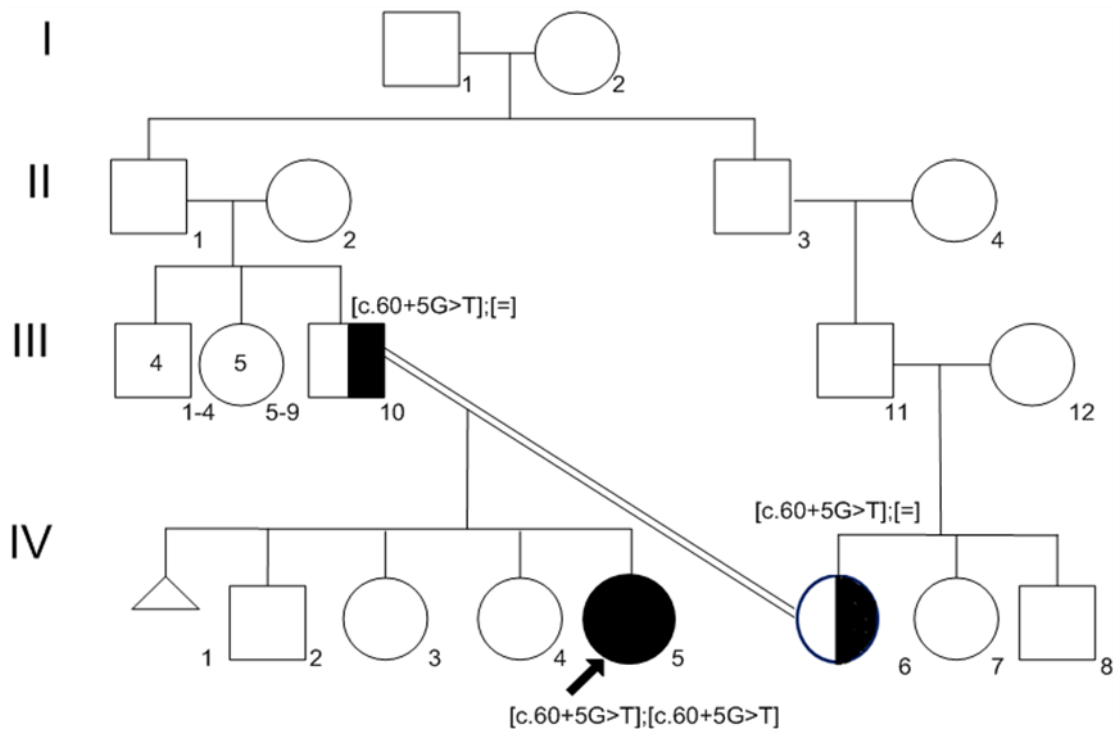


FIGURA VI.1A. Árbol genealógico de PKU8, donde se observa consanguinidad en ambos padres (familiares de segundo grado). Ensayo de PCR-Restricción con la enzima *Mbol* del amplicón del exón 1 y parte del extremo 5' del intrón 1 (229 pb). La mutación c.60+5G>T genera un sitio de restricción en el amplicón (174+55 pb).

Nótese el genotipo heterocigoto obligado para la mutación c.60+5G>T en ambos padres (III-10 y IV-6) del caso índice homocigoto afectado; carril NL: paciente sin la mutación c.60+5G>T. Carril PM= Marcador de Peso Molecular de 100pb.

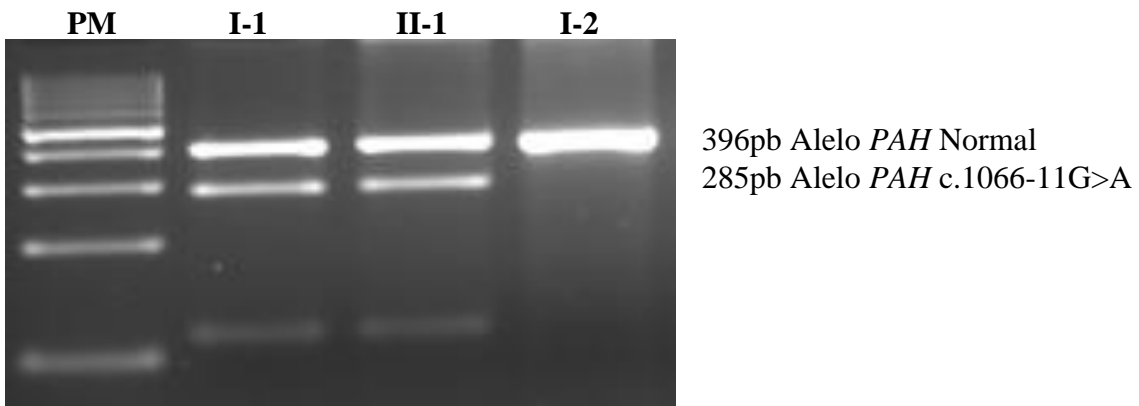
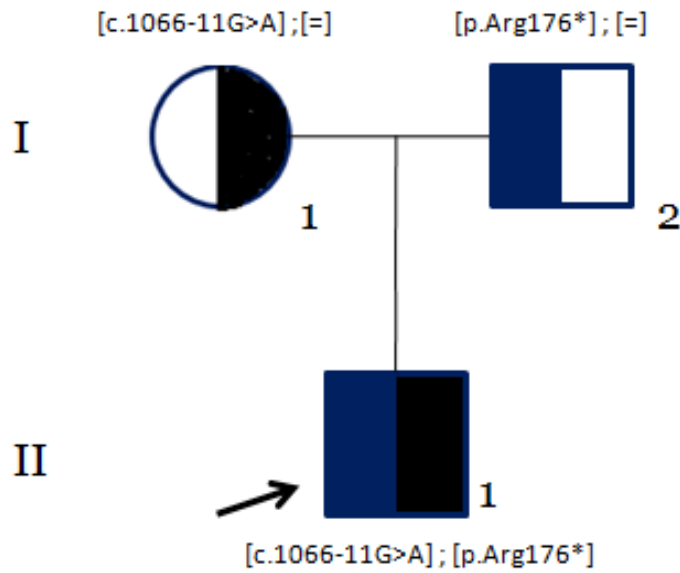


FIGURA VI.1B. Árbol genealógico de PKU98. Ensayo de PCR-Restricción con la enzima *Ddel* del amplicón de una porción 3' del intrón 10, exón 11 y parte del extremo 5' del intrón 11 del gen *PAH* (396 pb). La mutación c.1066-11G>A genera un sitio de restricción en el amplicón (285+111 pb). El análisis asigna el genotipo de heterocigoto o portador para la mutación c.1066-11G>A en la madre del caso índice con genotipo heterocigoto compuesto [c.1066-11G>A];[p.Arg176\*]. Carril PM= Marcador de Peso Molecular de 100pb.

Tanto la c.60+5G>T como la c.1066-11G>A son mutaciones que afectan el splicing, por lo tanto se realizó un análisis preliminar *in silico* por medio el programa ESE FINDER 3.0, el cual para la c.60+5G>T no predijo una alteración evidente en la selección de los sitios de splicing naturales, únicamente el cambio G>T aparenta disminuir la afinidad de un sitio tipo aumentador exónico de splicing (“exonic splicing enhancer”, ESE) circundante al sitio donador de splicing natural del intrón 1 (FIGURA VI.2A y VI.2B). En cambio para la c.1066-11G>A, se observa un desplazamiento de un ESE aledaño al sitio natural aceptor de splicing del intrón 10, efecto que está acorde con lo descrito [Guldberg P., et al 1998] (FIGURA VI.2C y VI.2D).

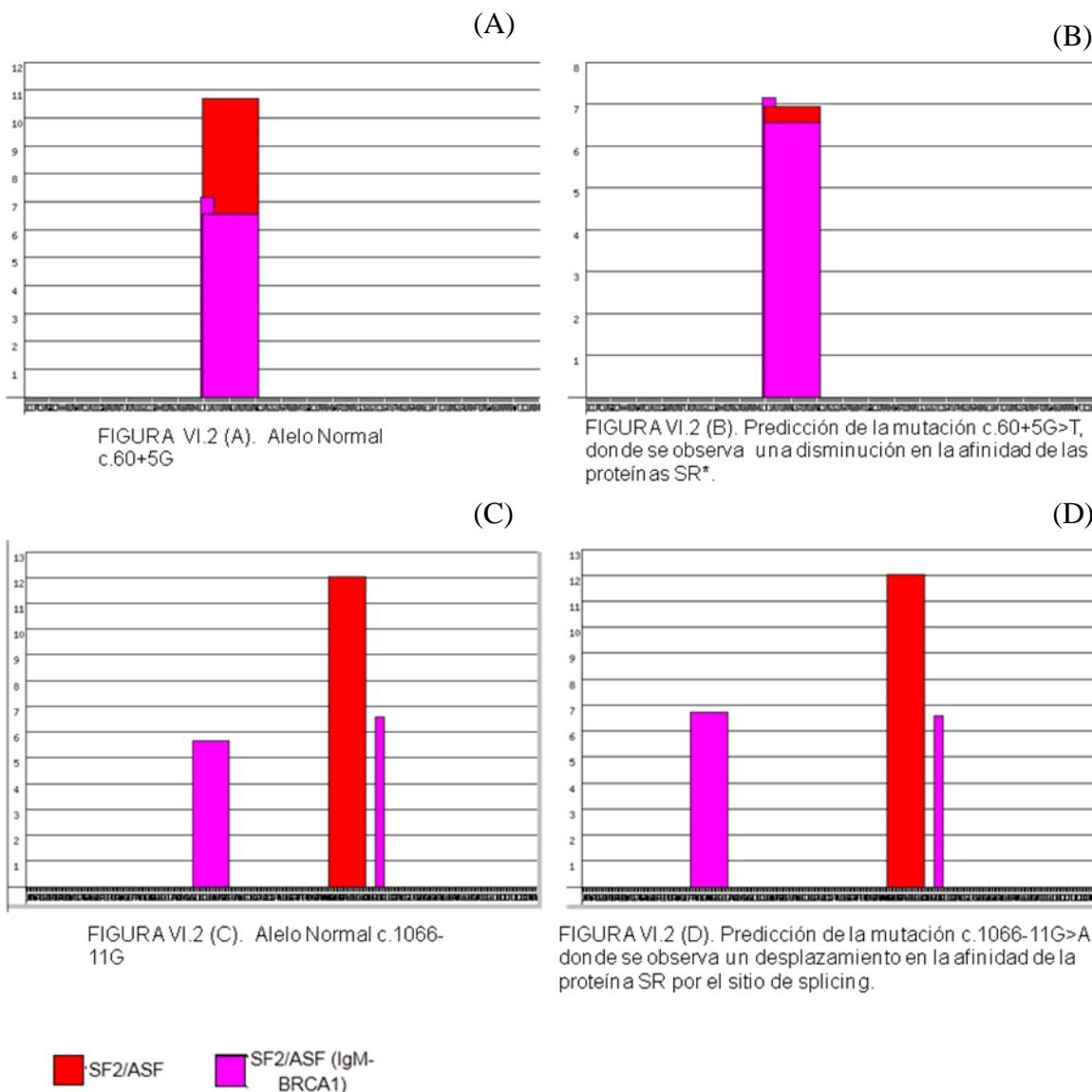


FIGURA VI.2. PREDICCIÓN *IN SILICO* DE LAS MUTACIONES c.60+5G>T y c.1066-10G>A QUE AFECTAN EL SPLICING (HERRAMIENTA ESE FINDER 3.0).

\*Proteínas SR: son una familia altamente conservada de factores de splicing caracterizados por uno o dos motivos de reconocimiento de RNA (sustrato específico) y un dominio C-terminal altamente enriquecido por dipéptidos de Serina y Arginina (permitiendo la formación de interacciones proteína-proteína). Las proteínas SR se unen a los sitios ESE, facilitan el reconocimiento exónico y reclutan a la maquinaria de splicing [Cartegni L., et al 2002].

### VI.3.1 MUTACIONES NUEVAS

Se identificaron 2 mutaciones no descritas en la literatura. La primera de ellas, la p.Met1Leu, fue identificada en dos casos índices originarios de Veracruz (PKU111 y PKU159), uno de estos pacientes es homocigoto para este cambio y además tiene rasgo de  $\beta$  Talasemia (PKU111). La p.Met1Leu es una mutación que afecta al codón de inicio y por el fenotipo del paciente homocigoto podemos asumir que se trata de una mutación severa. Esta mutación ya se ingresó a la base de datos *Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase* <http://www.pahdb.mcgill.ca>. La segunda mutación nueva es la c.969+6T>C, la cual estuvo presente en estado heterocigoto en un paciente de Chiapas (PKU93). La localización c.969+6 ya ha sido descrita como un sitio donde puede ocurrir cambio de T>A, como es el caso de PKU27, sin embargo el cambio de T>C no ha sido reportado. El análisis comparativo preliminar *in silico* por medio el programa ESE FINDER 3.0 para ambas mutaciones localizadas en IVS9+6, no predice la creación de un sitio alternativo que cambie el sitio natural de splicing, únicamente ambos cambios aparentan disminuir la afinidad de un sitio tipo aumentador exónico de splicing (ESE) (FIGURA VI.3).



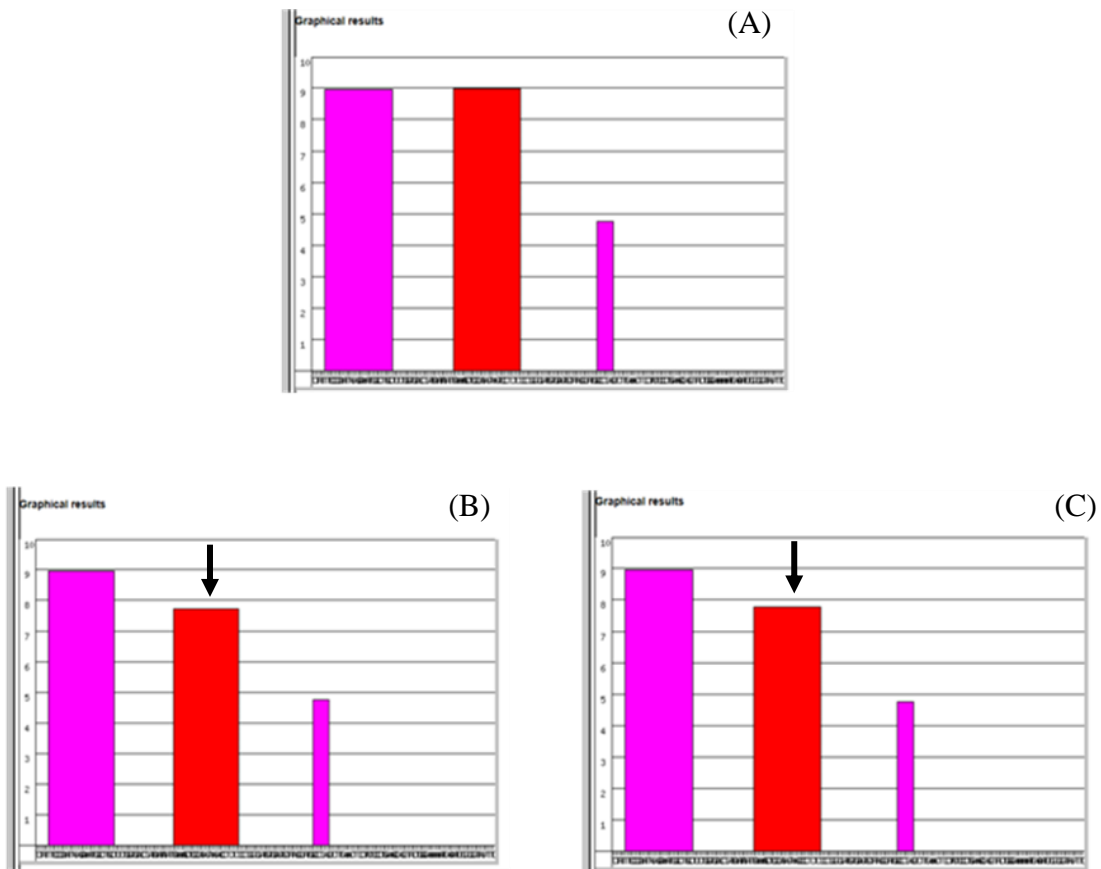


FIGURA VI.3 COMPARACIÓN Y PREDICCIÓN *IN SILICO* DE LAS MUTACIONES IVS9+6T>A Y LA MUTACIÓN NUEVA IVS9+6T>C. (A). Alelo Normal IVS9+6T>C. (B) y (C). Predicción de la mutación IVS9+6T>A (B) y IVS9+6T>C (C), en ambas se observa una disminución similar en el valor de afinidad de la proteína SR por el sitio de splicing 5´.

#### VI.4 CARACTERIZACIÓN DE HAPLOTIPOS DEL GEN PAH.

Se caracterizaron los genotipos para 5 sitios polimórficos generados con las enzimas *BglII*, *PvuII*, *MspI* y *XmnI* y para el sitio tipo VNTR en 42 pacientes de los cuales se contaba con DNA de adecuada calidad y cantidad para este análisis. Cabe mencionar que los genotipos identificados en los 5 sitios tipo RFLP, fueron lo suficientemente informativos para la integración de los haplotipos, por lo que no fue necesario el análisis del sitio polimórfico tipo STR. Se les dio prioridad a los casos homocigotos para las mutaciones más frecuentes y a aquellos que presentaron las dos mutaciones nuevas. En la TABLA VI.3 se ejemplifican los casos en los que se pudo asignar el haplotipo de manera inequívoca [Perez B., et al 1997].

TABLA VI.3. GENOTIPOS DE LOS CASOS EN LOS QUE SE ASIGNÓ CON CERTEZA EL HAPLOTIPO DEL GEN PAH.

POLIMORFISMOS								
		intrón 1	intrón 2	intrón 3	intrón 7	intrón 8		
		g. 5594C>T	g.10972C>T	g.29314 T>C	g.70579T>C	g.72368C>A		
Genotipo PAH	Reg Interno	<i>BglII</i>	<i>PvuIIa</i>	<i>PvuIIb</i>	<i>MspI</i>	<i>XmnI</i>	VNTR	Haplotipo <sup>1</sup>
[c.60+5G>T];[c.60+5G>T]	PKU8	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.441+5G>T];[c.842+1G>A]	PKU21	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	8	1.8
[c.439C>T];[c.1045T>C]	PKU23	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.722G>A];[c.728G>A]	PKU29	T/T	T/T	C/C	C/C	A/A	9	5/6
[c.1066-11G>A];[c.1127delA]	PKU33	T/T	T/T	T/T	C/C	A/A	7/9	11
[c.60+5G>T];[c.60+5G>T]	PKU35	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.60+5G>T];[c.60+5G>T]	PKU52	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.60+5G>T];[c.60+5G>T]	PKU65	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.60+5G>T];[c.1162G>A]	PKU66	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.204A>T];[c.782G>A]	PKU70	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	7	1.7
[c.1169A>G];[c.1169A>G]	PKU76	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.60+5G>T];[c.1162G>A]	PKU81	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.1066-11G>A];[c.969+6T>C]	PKU93	T/T	T/T	C/C	C/C	A/A	7/9	5/6
[c.1169A>G];[c.1045T>C]	PKU95	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	3	4.3
[c.838G>A];[c.838G>A]	PKU106	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	9	1.9
[c.1A>T];[c.1A>T]	PKU111	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	7	1.7
[c.60+5G>T];[c.508C>G]	PKU120	C/C	C/C	T/T	T/T	A/A	3	4.3
[c.673C>A];[c.907T>G]	PKU146	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	7/9	1.7
[c.441+5G>T];[c.441+5G>T]	PKU168	C/C	C/C	T/T	C/C	A/A	8/8	1.8

<sup>1</sup>: Genotipo homocigoto para el haplotipo indicado.

En 19 de los 42 pacientes en los que se integró de manera inequívoca al haplotipo PKU (H), 10 presentaron el H4.3, 6 el H1 con diversos VNTR, 2 con el H5 ó H6 y se identificó un sólo caso con el H11. Es interesante señalar que los cuatro pacientes con genotipo homocigoto para la mutación c.60+5G>T (PKU8, PKU35, PKU52 y PKU58) que son originarios de Jalisco; la mutación se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el H4.3.

La c.60+5G>T fue identificada en 16 pacientes que presentan al menos un alelo con dicha mutación. Al analizar el origen geográfico de ambos padres de estos pacientes encontramos que 24 de los 32 alelos (75%) son provenientes de los estados que engloban la región central de México, conocida como El Bajío, la cual incluye los estados de Querétaro, Aguascalientes, Michoacán, Jalisco y Guanajuato y la mitad de los casos son de la región de los Altos de Jalisco, como se muestra en la TABLA VI.4.

TABLA VI.4 ORIGEN DE LOS PADRES Y HAPLOTIPO DE LOS PACIENTES CON EL ALELO c.60+5G>T (Alelo 1).

Fenotipo	Origen Alelo 1 c.60+5G>T	Haplotipo	Origen Alelo 2	Alelo 2	Haplotipo
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3	Bajío <sup>a</sup>	[c.60+5G>T]	4.3
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3	Bajío <sup>a</sup>	[c.60+5G>T]	4.3
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3	Bajío <sup>a</sup>	[c.60+5G>T]	4.3
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3	Bajío <sup>a</sup>	[c.60+5G>T]	4.3
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3	Torreón, Coahuila	[p.Val388Met]	4.3
PKU Moderada	Bajío	4.3	Bajío	[p.Val388Met]	4.3
HPA Benigna	Bajío	4.3	Bajío	[p.H170D]	4.3
PKU Clásica	La Paz, Baja California	4.3 <sup>b</sup>	La Paz, Baja California	[c.441+5G>T]	1.9
PKU Clásica	Bajío	4.3 <sup>b</sup>	Bajío	[c.1066-11G>A]	11.7
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3 <sup>b</sup>	Bajío <sup>a</sup>	[p.Arg243*]	1.6
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	4.3 <sup>b</sup>	Torreón, Coahuila	[p.Glu280Lys]	11.7
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	NI	Bajío <sup>a</sup>	[c.441+5G>T]	NI
PKU Moderada	Bajío	NI	Bajío	[p.Val388Met]	NI
PKU Clásica	Mexico DF	NI	Mexico DF	[c.754C>T]	NI
PKU Clásica	Puebla, Puebla	NR	Puebla, Puebla	[p.Arg252Trp]	NR
PKU Clásica	Bajío <sup>a</sup>	NR	Bajío <sup>a</sup>	[c.1315+1G>A]	NR

a: Originarios de los Altos de Jalisco. b. Haplotipo integrado con los genotipos de los padres. NI: No integrado debido a que no fue posible integrar la fase. NR: No realizado.

También se amplió el estudio de haplotipos en los familiares de primer grado de los pacientes que presentan alguna de las tres mutaciones más frecuentes. En un total de 22 familias estudiadas se ingresaron los genotipos de los tríos (ambos padres y caso índice) o dúos (madre y caso índice) en el programa Haploview 4.2 [Barrett JC., et al 2005]. Se obtuvo de manera significativa el alelo más frecuente para cada marcador en dichos individuos (FIGURA VI.4). Estos alelos individuales también conforman el H4.3, lo cual concuerda con la alta frecuencia de la mutación c.60+5G>T en nuestra muestra, que como ya se mencionó se encuentra asociada a este haplotipo.

#	Name	Overtransmitted	T:U	Chi Square	p value
1	marcador5	C	12:3	5.4	0.0201
2	marcador1	C	16:3	8.895	0.0029
3	marcador4	T	12:3	5.4	0.0201
4	marcador2	C	15:2	9.941	0.0016
5	marcador3	T	11:2	6.231	0.0126

FIGURA VI.4. IMAGEN DEL HAPLOVIEW 4.2. Donde se muestran los alelos más frecuentes en las 22 familias estudiadas que presentan alguna de las tres mutaciones más frecuentes. Los marcadores son los RFLP sitios creados por: marcador1 *Bgl*II, marcador2 *Pvu*IIa, marcador3 *Pvu*IIb, marcador4 *Msp*I y marcador5 *Xmn*I. El cuadro rojo señala los alelos individuales que en conjunto conforman el H4.3.

## VI.5 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En el 64.6% de los casos se obtuvo una concordancia entre el fenotipo teórico esperado por el genotipo de los pacientes con el fenotipo observado clínicamente. En cambio en el 27% de los casos se observó una discordancia en dicha correlación. Finalmente en el 8% de los casos no fue posible determinar el fenotipo teórico debido a que se desconoce la actividad residual de alguno de los alelos de dicho genotipo. (TABLA VI.5)



TABLA VI.5 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

Número de Pacientes	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo Teórico	Fenotipo Observado
<b>Pacientes con genotipo-fenotipo concordante n=31 (64.6%)</b>				
1	c.1066-11G>A	p.Arg176*	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.1066-11G>A	p.Arg261*	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.1066-11G>A	p.Arg270Lys	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.1066-11G>A	p.Asn376Ilefs*24	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.1066-11G>A	p.Ser349Pro	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.441+5G>T	c.441+5G>T	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.441+5G>T	c.842+1G>A	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.60+5G>T	c.1066-11G>A	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.60+5G>T	c.1315+1G>A	PKU Clásica	PKU Clásica
2	c.60+5G>T	c.441+5G>T	PKU Clásica	PKU Clásica
4	c.60+5G>T	c.60+5G>T	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.60+5G>T	p.Arg243*	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.60+5G>T	p.Arg252Trp	PKU Clásica	PKU Clásica
1	c.60+5G>T	p.Glu280Lys	PKU Clásica	PKU Clásica
1	p.Gln304Gln	p.Gln304Gln	PKU Clásica	PKU Clásica
1	p.Glu280Lys	p.Glu280Lys	PKU Clásica	PKU Clásica
1	<b>p.Met1Leu*</b>	<b>p.Met1Leu*</b>	PKU Clásica	PKU Clásica
1	p.Phe55Leufs*6	c.441+5G>T	PKU Clásica	PKU Clásica
1	p.Ser349Pro	p.Arg158Trp	PKU Clásica	PKU Clásica
1	p.Ser349Pro	p.Pro147Ser	PKU Clásica	PKU Clásica
2	p.Val388Met	c.60+5G>T	PKU Moderada	PKU Moderada
1	p.Arg241His	<b>p.Met1Leu*</b>	PKU Leve	PKU Leve
1	p.Arg243Gln	p.Arg241His	PKU Leve	PKU Leve
1	p.Arg68Ser	p.Arg261Gln	PKU Leve	PKU Leve
1	p.Glu390Gly	p.Glu390Gly	PKU Leve-HPA Benigna	PKU Leve
1	p.His170Asp	c.60+5G>T	HPA Benigna	HPA Benigna

<b>Pacientes con genotipo-fenotipo discordante n=13 (27%)</b>				
1	c.441+5G>T	p.Ser349Pro	PKU Clásica	PKU Moderada
1	c.1066-11G>A	<b>c.969+6T&gt;C*</b>	PKU Clásica	PKU Moderada
1	p.Val388Met	c.1315+2T>C	PKU Moderada	PKU Clásica
1	p.Val388Met	c.1066-11G>A	PKU Moderada	PKU Clásica
1	p.Val388Met	c.1315+1G>A	PKU Moderada	PKU Clásica
2	p.Val388Met	c.60+5G>T	PKU Moderada	PKU Clásica
1	p.Val388Met	c.969+6T>A	PKU Moderada	HPA Benigna
1	p.Arg261Gln	p.Arg261*	PKU Moderada	PKU Clásica
1	p.Leu348Val	p.Ile65Tre	PKU Moderada- PKU Leve	PKU Clásica
1	p.His170Asp	c.842+1G>A	HPA Benigna	PKU Moderada
1	p.His170Asp	c.1315+1G>A	HPA Benigna	PKU Leve
1	p.Glu390Gly	p.Ser349Pro	HPA Benigna	PKU Leve
<b>Pacientes Sin Clasificar n=4 (8.4%)</b>				
1	p.Arg252Trp	p.Tyr386Cys	ND	PKU Clásica
1	p.Pro314His	p.Arg270Lys	ND	PKU Leve PKU
1	p.Ser303Ala	p.Pro225Tre	ND	HPA Benigna
1	p.Arg261Gln	p.Pro147Ser	ND	PKU Clásica

\* Mutaciones nuevas identificadas en el presente estudio. ND: No determinado.

## VI.6 PREDICCIÓN TEÓRICA DE LA RESPUESTA AL COFACTOR BH<sub>4</sub> DE ACUERDO AL GENOTIPO CARACTERIZADO.

Se asignó la respuesta teórica al cofactor BH<sub>4</sub> por genotipo, así la combinación de dos alelos catalogados como respondedores de acuerdo a la BIOPKU y a lo reportado en la literatura se determinó como respondedor definitivo lo cual se encontró en el 16.7% de los casos. El 20.8% de los casos se catalogó como potencialmente respondedor debido a la presencia de un alelo respondedor y otro no respondedor. El 50% fue no respondedor al tener una combinación de alelos no respondedores y finalmente en el 12.5% no se pudo determinar porque de ambos no se conoce su actividad enzimática residual, ni su respuesta a BH<sub>4</sub>, dentro de los cuales se encuentran las mutaciones nuevas identificadas en este estudio (TABLA VI.6).

TABLA VI.6 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL COFACTOR BH4 DE ACUERDO AL GENOTIPO CARACTERIZADO.

Registro Interno de los pacientes	Alelo 1	Alelo 2	Respuesta teórica a BH4	Respuesta reportada en BIOPKU
<b>Respondedores Definitivos n=8 (16.7%)</b>				
PKU23	p.Ser349Pro	p.Pro147Ser	R	R
PKU29	p.Arg243Gln	p.Arg241His	R	-
PKU70	p.Arg68Ser	p.Arg261Gln	R	-
PKU76	p.Glu390Gly	p.Glu390Gly	R	R
PKU120	p.His170Asp	c.60+5G>T	R	R
PKU117	p.Leu348Val	p.Ile65Tre	R	R
PKU95	p.Glu390Gly	p.Ser349Pro	R	R
PKU171	p.Phe55Leufs*6	c.441+5G>T	R	R
<b>Potencialmente respondedores n=10 (20.8%)</b>				
PKU66, PKU81, PKU78 y PKU138	p.Val388Met	c.60+5G>T	PR	-
PKU114	p.Val388Met	c.1315+2T>C	PR	-
PKU40	p.Val388Met	c.1315+1G>A	PR	-
PKU27	p.Val388Met	c.969+6T>A	PR	-
PKU45	p.His170Asp	c.842+1G>A	PR	-
PKU155	p.His170Asp	c.1315+1G>A	PR	-
PKU101	p.Arg261Gln	p.Pro147Ser	ND	-
<b>No respondedores n= 24 (50%)</b>				

PKU98	c.1066-11G>A	p.Arg176*	NR	-
PKU38	c.1066-11G>A	p.Arg261*	NR	NR
PKU163	c.1066-11G>A	p.Arg270Lys	NR	-
PKU55	c.1066-11G>A	p.Ser349Pro	NR	NR
PKU168	c.441+5G>T	c.441+5G>T	NR	NR
PKU21	c.441+5G>T	c.842+1G>A	NR	-
PKU16	c.60+5G>T	c.1066-11G>A	NR	-
PKU128	c.60+5G>T	c.1315+1G>A	NR	-
PKU48 y PKU90	c.60+5G>T	c.441+5G>T	NR	-
PKU8, PKU35, PKU52 y PKU58	c.60+5G>T	c.60+5G>T	NR	-
PKU13	c.60+5G>T	p.Arg243*	NR	-
PKU140	c.60+5G>T	p.Arg252Trp	NR	-
PKU84	c.60+5G>T	p.Glu280Lys	NR	-
PKU10	p.Gln304Gln	p.Gln304Gln	NR	NR
PKU106	p.Glu280Lys	p.Glu280Lys	NR	-
PKU135	c.441+5G>T	p.Ser349Pro	NR	-
PKU126	p.Val388Met	c.1066-11G>A	NR	NR
PKU83	p.Arg261Gln	p.Arg261*	NR	NR
PKU33	c.1066-11G>A	p.Asn376Ilefs*24	NR	-
PKU61	p.Ser349Pro	p.Arg158Trp	NR	-
<b>Respuesta no determinada n=6 (12.5%)</b>				
PKU111	<b>p.Met1Leu</b>	<b>p.Met1Leu</b>	<b>NUEVA</b>	-
PKU159	p.Arg241His	<b>p.Met1Leu</b>	<b>NUEVA</b>	-
PKU93	c.1066-11G>A	<b>c.969+6T&gt;C</b>	<b>NUEVA</b>	-
PKU146	p.Pro225Tre	p.Ser303Ala	ND	-
PKU107	p.Arg270Lys	p.Pro314His	ND	-
PKU132	p.Arg252Trp	p.Tyr386Cys	ND	-

R: Respondedor PR: Potencialmente Respondedor. NR: No Respondedor. ND: No Determinado. -: No reportado en la base de datos [www.biopku.org](http://www.biopku.org)

## VII. DISCUSIÓN

La HPA es el error innato del metabolismo de aminoácidos más frecuente [Dahri S., et al 2010]. Se trata de un trastorno con heterogeneidad genética, con patrón de herencia autosómico recesivo y es causada en la mayoría de los casos por la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH). La falla para convertir Phe en tirosina lleva al incremento de la primera, lo cual condiciona toxicidad a nivel del SNC cuya principal secuela es el retraso mental, a menos de que se inicie un manejo dietético estricto y temprano con restricción nutricional de Phe.

El Instituto Nacional de Pediatría fue designado desde 1995 como el Centro Nacional de Referencia de Errores Innatos del Metabolismo, por ende recibe pacientes de toda la República Mexicana (GRÁFICO VI.2) con posible diagnóstico de HPA y aquí es donde se realiza el estudio confirmatorio a través de HPLC y Espectrometría de Masas en Tándem. En el 2012 se publicaron las recomendaciones clínicas prácticas para el tratamiento nutricional para el manejo del paciente pediátrico y adolescente con fenilcetonuria [Secretaría de Salud., 2012], puesto que se instituyó de forma obligatoria el tamiz neonatal para HPA. A pesar de esto, todavía no tiene cobertura universal por lo que se aplica a menos del 30% de los recién nacidos mexicanos [Ramírez-Farías C., et al 2007].

### VII.1 ESPECTRO MUTACIONAL DEL GEN PAH EN LA MUESTRA ANALIZADA

Desde 1985 se obtuvo la secuencia del cDNA del gen *PAH* y a partir de entonces se empezaron a identificar las mutaciones causales de PKU. Actualmente se han descrito alrededor de 790 mutaciones en el gen *PAH*, las cuales se distribuyen a lo largo de los 13 exones y los bordes exón-intrón. En México solo existen dos reportes con estudio molecular de HPA realizados en la década de los 90's que incluyeron 6 y 7 pacientes respectivamente, en los que únicamente se buscó la mutación c.1066-11G>A y se consideró como la más frecuente [Perez B., et al 1993; Nicolini H., et al 1995].

Según lo descrito en la base de datos internacional las mutaciones causantes de HPA por orden de frecuencia son de sentido erróneo (60.5%), deleciones pequeñas de menos de 22 bp (13.5%), de splicing del RNAm (11%), de paro o sin sentido (5%) y pequeñas inserciones (1.8%). Los resultados en 48 pacientes mexicanos con HPA, reveló 34 distintos alelos PKU (Tabla VI.2). De éstos, las mutaciones de sentido erróneo comprenden el 45%, seguido a la par por las mutaciones de splicing (45%), lo cual claramente difiere de las frecuencias alélicas internacionales en PKU, donde las mutaciones de splicing comprenden únicamente el 10% de los alelos PKU. El resto son mutaciones sin sentido 5% y 2% por corrimiento en el marco de lectura.

Con respecto a las mutaciones de sentido erróneo, a nivel internacional se ha descrito que éstas involucran principalmente de los residuos 148 (exón 5) al 438 (exón 12), los cuales incluyen al dominio catalítico (residuos 143-410) [Scriver CR., 2007]. Nuestros resultados también indican que las mutaciones de sentido erróneo se encuentran principalmente localizadas en el dominio catalítico (90%), solo el 10% en el dominio regulador y ninguna en el de tetramerización. En cuanto a su distribución, en la literatura se reporta que el 20% de las mutaciones responsables de PKU ocurren en amplicón del exón 7, lo cual es similar con nuestros hallazgos, pues el 19% de las mutaciones encontradas (18/96) se ubican en dicho exón. Es interesante señalar que 16/96 alelos (16%) involucran mutaciones en codones de arginina (p.Arg68Ser, p.Arg158Trp, p.Arg176\*, p.Arg241His, p.Arg243\*, p.Arg243Gln, p.Arg252Trp, p.Arg261\*, p.Arg261Gln, p.Arg270Lys). Dado que 4 de los 6 tripletes que codifican para este aminoácido incluyen un dinucleotido CpG, ello podría ser un factor predisponente para transiciones C por T a través de desaminación oxidativa espontánea de 7 metilcitosina, y que particularmente coincide la abundancia de este tipo de codones en el exón 7 del gen *PAH* [Luleyap HU., et al 2006].

Cabe mencionar que las mutaciones en sitios de splicing presentes en el 45% de los alelos PKU identificados en nuestra muestra, se relacionan a fenotipos de PKU clásica con pobre respuesta al cofactor BH<sub>4</sub> [Quirk M., et al 2012], por lo que este hallazgo sugiere que la mayoría de los genotipos prevalentes en pacientes mexicanos con PKU, condicionarían fenotipos clásicos no respondedores al cofactor enzimático, una situación similar a la observada en población polaca donde por genotipo, únicamente el 10.5% de los pacientes potencialmente responderían a BH<sub>4</sub> [Dobrowolski SF., et al 2009]. Sin embargo, para confirmar ello se requerirán de mayores estudios, ya que hasta el momento no podemos eliminar el sesgo en la selección de los pacientes, pues todavía cerca del 50% de los casos son casos que se diagnostican de forma tardía por el fenotipo severo, con manifestaciones clínicas reconocidas por los pediatras y por ende referidos tardíamente a esta institución. Además, no se cuenta con redes de referencia sólidas para los casos positivos detectados por tamiz neonatal que retrasan la identificación de los pacientes e inicio del tratamiento, incluso que por motivos de distancia, podrían no acudir hasta el INP para su manejo. Posiblemente cuando empiece a aplicarse la nueva la Norma Oficial Mexicana sobre el Tamiz Neonatal (NOM-034-SSA-2010), se empezaran a diagnosticar de forma oportuna las HPA en nuestro país, momento en el cual se podrá calcular la frecuencia real de esta enfermedad e inclusive se podrían postular estrategias de detección molecular específicas por estado, como se discutirá más adelante.

La distribución encontrada de los alelos PKU (TABLA VI.2) está acorde con las grandes diferencias del espectro mutacional de las HPA descrito en diversas poblaciones. Llama la atención que la p.Arg408Trp considerada la mutación más frecuente en Europa (9.2%), particularmente en el Norte y Este [www.pahdb.mcgill.ca], no fue identificada en nuestro estudio. Lo anterior posiblemente esté en relación a la nula o baja prevalencia de esta mutación en España [Desviat., et al 1999], población que es la principal fuente de contribución genética europea en nuestro país.



Por otro lado, destaca que la mutación de splicing c.60+5G>T fue la primera en frecuencia, pues se identificó en 20.8% de los alelos PKU caracterizados, porcentaje que hasta el momento no se ha reportado en ninguna otra población. De forma interesante, esta mutación está presente en 75% de los alelos de los pacientes que son originarios del Bajío, particularmente de la región de los Altos de Jalisco. De los 4 pacientes que son homocigotos para la c.60+5G>T provienen de los Altos (PKU8, PKU35, PKU52 y PKU58) y sólo uno de ellos (PKU8) cuenta con antecedente de consanguinidad en los padres, lo cual podría sugerir una alta prevalencia de portadores de esta mutación en esta región geográfica. En tanto, para el resto de las mutaciones, no se identificó una distribución geográfica preferencial. Así, la predominancia de alelos c.60+5G>T en pacientes del Bajío, aunado a su asociación con el haplotipo H4.3, apoya la hipótesis de Velázquez A. y col; acerca de un probable efecto de fundador para PKU en dicha región.

En la década de los 90 se propuso por Nicolini y colaboradores que la mutación c.1066-11G>A era la responsable del efecto de fundador para PKU postulado para el estado de Jalisco, dado a que ésta fue identificada en 5 de 12 alelos estudiados (42%), sin embargo, los autores no describen el origen geográfico de los pacientes y tampoco se encontró esta mutación asociada a un haplotipo único [Nicolini H., et al 1995] a diferencia de nuestros hallazgos para la c.60+5G>T y su asociación con el haplotipo H4.3.

La c.60+5G>T ha sido reportada en población Española, Alemana [Aulehla-Sholz., et al 2003] y Danesa, y aunque su incidencia global en esas poblaciones es muy baja (<0.35%) [www.pahdb.mcgill.ca] también se encuentra ligada al haplotipo H4.3. Lo anterior apoyaría el origen europeo de la c.60+5G>T por efecto de fundador en los Altos de Jalisco y/o el Bajío. En un escenario ideal, la realización de estudios moleculares dirigidos para la identificación de la mutación c.60+5G>T en una muestra representativa de la población abierta y/o de tamiz neonatal, determinarían con precisión la frecuencia alélica de la c.60+5G>T, la prevalencia de portadores y de forma indirecta la estimación teórica de los individuos

homocigotos afectados en esta región, lo cual podría brindar argumentos definitivos para confirmar el efecto de fundador propuesto en nuestro estudio.

Debido a la baja incidencia de la mutación c.60+5G>T descrita a nivel mundial, no existen reportes de su actividad enzimática residual *in vitro* o de su efecto patogénico a nivel molecular, aunque ya han sido descritos pacientes homocigotos para esta mutación con fenotipo clásico, como el reportado por Yang y colaboradores en una corte de tamiz neonatal en Texas que incluía hispanos [Yang Y., et al 2001]. Así, la c.60+5G>T ha sido clasificada como una mutación severa [Guldborg P., et al 1998] y recientemente, como no respondedora a BH<sub>4</sub> [Quirk M., et al 2012], lo cual está acorde a lo observado en los pacientes PKU8, PKU35, PKU52 y PKU58, que tienen un fenotipo bioquímico severo. La base +5 en los intrones es una región altamente conservada dentro de la filogenia y aproximadamente el 78% de los intrones humanos presentan una “G” en dicha posición. Estudios previos, incluso en otras enfermedades monogénicas, han demostrado que mutaciones en IVS+5 disminuyen la afinidad del sitio donador natural de splicing, con la consecuente generación de sitios crípticos, puesto que es un sitio relativamente débil de reconocimiento del factor U1 [Buratti E., et al 2007]. Lo anterior coincide con los resultados del análisis preliminar *in silico* por medio el programa ESE FINDER 3.0 (FIGURA VI.3), donde se observa que la c.60+5G>T disminuye la afinidad de los sitios ESE 5'. Sin embargo, el mecanismo molecular real que conlleva la mutación c.60+5G>T a la pérdida de la función del gen *PAH*, aún no está definido, pues como el gen *PAH* se expresa en tejido hepático, se dificulta el acceso para obtener el RNA y analizar las alteraciones de splicing resultantes en el transcrito mutante.

El ensayo de PCR-Restricción diseñado para la identificación rápida de la c.60+5G>T, podría aplicarse en los casos positivos para PKU detectados en nuestro país, principalmente en aquellos con fenotipo severo y que sean originarios de Jalisco y/o el Bajío, así como para el diagnóstico rápido de portadores. El ensayo de PCR-Restricción para las tres mutaciones más

frecuentes serviría además para asesoramiento genético de las familias, ya que estas tres mutaciones conforman cerca del 40% de los alelos *PAH* de la población analizada y hasta el 72% de los alelos *PAH* de pacientes provenientes de Jalisco. Inclusive el incluirlo como una prueba molecular subsecuente en la misma muestra de tamiz neonatal, posterior a la confirmación de la elevación de Phe sérica, como sucede en fibrosis quística [Comeau AM., et al 2004] o galactosemia clásica [Calderon FR., et al 2007], podría anticipar rápidamente en los pacientes positivos para la mutación severa c.60+5G>T una no respuesta al cofactor, lo cual obviaría la necesidad de aplicar una prueba terapéutica laboriosa y de costo elevado.

En segundo lugar y con la misma frecuencia del 8.3%, se encuentran las mutaciones p.Val388Met y la c.1066-11G>A. La mayoría de las mutaciones de sentido erróneo como la p.Val388Met, deterioran la actividad enzimática al causar inestabilidad y agregación de la proteína. La p.Val388Met condiciona generalmente un fenotipo bioquímico de HPA Moderada, sin embargo ha sido también reportada en PKU Clásica [Rivera I., et al 2010] dependiendo de la 2ª mutación, por lo que es considerado un alelo inconsistente. En nuestro estudio llama la atención que 5 de los 8 pacientes con esta mutación presentan PKU Clásica, todos ellos tienen un genotipo heterocigoto compuesto, acompañado de una mutación de splicing (dos para la c.60+5G>T y uno para la c.1066-11G>A , c.1315+1G>A y c.1315+2T>C respectivamente). Lo anterior apoya lo descrito por Blau y colaboradores en 2011 donde describe que la predicción del fenotipo bioquímico no debe basarse en las mutaciones individuales sino en el genotipo, puesto que existen diversas asociaciones fenotípicas y a que generalmente la presencia de una mutación de splicing condiciona un fenotipo severo [Blau N., et al 2011], tal y como se observó en nuestros pacientes heterocigotos compuestos para p.Val388Met más una mutación de splicing. También cabe señalar que la frecuencia de esta mutación es elevada en la península ibérica, donde conforma el alelo más prevalente en Portugal (8.6%) y el segundo más frecuente en España (6.2%), y por su presencia en otras regiones de Latinoamérica, como en Chile

(13%) y en ciertas regiones de Brasil (21%), era factible el encontrarla en nuestros pacientes.

De igual forma, la c.1066-11G>A conocida como la “mutación mediterránea”, se encontró presente en 8 de 96 alelos (8.3%) y es la segunda en frecuencia reportada en la base de datos PKU (7.4%). Esta es una de las principales mutaciones en el gen *PAH* reportadas en España (20%), Italia (12%) y Turquía (39%) asociada al haplotipo 6 [www.pahdb.mcgill.com], lo cual por razones históricas dada la importante influencia genética de los inmigrantes mediterráneos, también era de esperarse el identificarla en nuestra población [Nicolini H., et al 1995]. La c.1066-11G>A se encuentra asociada a los fenotipos más severos; además los pacientes homocigotos presentan una PKU clásica que no responde al tratamiento con el cofactor BH<sub>4</sub> [Couce M., et al 2013].

Como ya ha sido mencionado el primer análisis molecular del gen *PAH* en pacientes mexicanos realizado por Nicolini y colaboradores con una pequeña muestra de pacientes, sus resultados sugerían que la c.1066-11G>A era la mutación probablemente asociada a un efecto de fundador por los inmigrantes que llegaron al continente Americano, sobretodo en el estado de Jalisco [Nicolini H., et al 1995]. Sin embargo a través de este estudio el cual cuenta con una cohorte más amplia de pacientes, se descarta que esta mutación sea la más prevalente en pacientes con HPA mexicanos y/o de Jalisco, puesto que sólo 1 de nuestros 11 pacientes originarios de Jalisco la presentaron en estado heterocigoto (TABLA VI.4) y asociada al haplotipo 11.7.

Es interesante señalar que dentro de nuestros resultados encontramos a la mutación p.Gln304Gln (c.912G>A) en estado homocigoto en una paciente (PKU10) hija de padres consanguíneos, la cual está catalogada como patogénica a pesar de ser una mutación silente a nivel de codón, sin embargo ésta modifica el procesamiento del RNA debido a que afecta el borde exón-intron del exón 8 [Gulberg P., et al 1996] y promueve el “salto exónico” [Song W., et al 2005], por lo

tanto fue considerada como una mutación de splicing. Esta familia tiene dos hijas homocigotas para la p.Gln304Gln, ambas afectadas por PKU Clásica, lo cual refuerza el efecto severo de esta mutación.

Se identificó a una familia con diagnóstico adicional de rasgo talasémico  $\beta$ . La  $\beta$  Talasemia es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por reducción en la síntesis de la cadena beta de la hemoglobina que conduce a una anemia microcítica hipocrómica, frotis de sangre periférica anormal y reducción de la hemoglobina A. Las manifestaciones clínicas son muy variables para los pacientes portadores de una mutación en el gen *HBB*, desde ser asintomáticos hasta presentar anemia grave con hepatoesplenomegalia. La mutación en el gen *PAH* que presenta esta familia es la p.Met1Leu, en estado homocigoto y es una mutación nueva; en tanto, para el gen *HBB* se identificó la mutación p.Gln40\* en estado heterocigoto, que condiciona el rasgo talasémico  $\beta$ . Debido a que son pacientes originarios de Veracruz asumimos que la presencia de esta mutación en *HBB* está en relación a la alta incidencia de esta enfermedad en las regiones de la costa del golfo de México, en donde la incidencia de portadores de  $\beta$ -talasemia se ha estimado hasta un 15%, debido a migraciones tanto europeas como africanas [Resi-Cruz G., et al 1990].

La embriopatía por HPA materna se desencadena por un mal apego al tratamiento dietético que conlleva a elevaciones de la Phe durante la gestación. La Phe atraviesa la placenta y ejerce un efecto teratogénico sobre el producto que ocasiona microcefalia, cardiopatía congénita, retraso en el crecimiento y mayor riesgo de pérdida del embarazo. La paciente PKU83 cuyo genotipo es [p.Arg261\*];[p.Arg261Gln] cuenta con el antecedente de un óbito a los 8 meses de embarazo con múltiples malformaciones secundarias embriopatía por HPA materna debido al mal apego de la dieta durante y antes del embarazo. Los padres de esta paciente la mantuvieron en control durante su infancia por lo que cuenta con IQ en rangos normales pero desde la adolescencia se reportan niveles

séricos altos de Phe por su pobre apego a la dieta, lo cual condiciona que la paciente además presente trastornos psiquiátricos como depresión y agorafobia.

## VII.2 CARACTERIZACIÓN DE HAPLOTIPOS DEL GEN *PAH*

Una de las principales aplicaciones del análisis de haplotipos en el estudio poblacional de la PKU, es que existen haplotipos particulares que se encuentran ligados a mutaciones específicas causantes de enfermedad.

A través del estudio del haplotipo del gen *PAH*, se han logrado distinguir diversas mutaciones recurrentes en diversas localizaciones geográficas, así como una correlación entre las mutaciones más prevalentes y determinados haplotipos en diversas poblaciones. Esta gran diversidad en los haplotipos presentes en alelos PKU europeos sugiere múltiples orígenes independientes de la fenilcetonuria. De hecho, no existe una sola mutación que se presente en todas las poblaciones europeas, aunque algunas mutaciones son específicas de ciertas regiones y poblaciones [Daiger SP., et al 1989] como p.Ile65Tyr ligada al H9 en la península Ibérica y la c.1066-11G>A en la región del Mediterráneo al H6 [Scriver CR., 2007]. Esta presencia de diferentes distribuciones y frecuencia de los haplotipos parece deberse a un efecto fundador o al fenómeno de deriva génica, ya que al menos en la población caucásica europea, se estima que se han presentado cuatro eventos mutacionales independientes condicionantes de PKU (p.Arg408Trp tanto para H1 y H2, c.1066-11G>A para el H6, p.Tyr414Cys para el H4 y la c.1315+1G>A para el H3) [Neufeld EF., et al 2010].

Por los eventos históricos en nuestra población, se esperarían frecuencias haplotípicas y alélicas similares a la población europea, sin embargo el único reporte en población mexicana que se realizó con una pequeña serie de pacientes (n=7) [Velázquez A., et al 1995], no describe un haplotipo predominante, y de hecho se sugiere una heterogeneidad de haplotipos PKU en México. Por otro lado, existen datos que postulan un probable efecto de fundador en la población de

Jalisco, debido a que aproximadamente el 40% de los pacientes diagnosticados en el INP y en Los Ángeles USA, provienen de esta parte del país. Interesantemente este hecho concuerda con la alta frecuencia de la mutación c.60+5G>T en nuestra población, y particularmente en aquellos pacientes de Jalisco. Además, al demostrarse que en los homocigotos y heterocigotos c.60+5G>T, son portadores del H4.3 apoya que la mutación fue introducida en los pacientes de Jalisco por un efecto de fundador muy probablemente por los pobladores europeos que llegaron a México y no por un evento mutacional independiente.

Recientemente Riviera y cols., reportaron los haplotipos presentes en el Sur de Portugal, donde principalmente hallaron al haplotipo 1 con diferentes VNTR como el más frecuente, también identificaron al haplotipo 6.7 lo cual refleja la presencia de la mutación c.1066-11G>A. En el paciente PKU93, se identificó el haplotipo 5 o 6, puesto que no es posible clasificarlo de forma definitiva ya que no se realizó la genotipificación del sitio *EcoRV*; éste paciente también presenta la mutación c.1066-11G>A la cual se asocia al haplotipo 6.7 en los europeos mediterráneos, lo cual está acorde con nuestros resultados.

Una de las principales limitaciones en la realización de haplotipos fue que únicamente pudo asignarse de manera inequívoca en 45% de los pacientes en los que se realizó el estudio, esto debido especialmente a la alta frecuencia de genotipos heterocigotos que dificultaron la asignación de la fase del haplotipo. Sin embargo, a través del programa HAPLOVIEW se obtuvieron los alelos de los RFLPs que se transmiten predominantemente en los casos índice de las tres mutaciones más frecuentes, estos alelos también integran el H4, lo cual probablemente esté relacionado con la alta frecuencia (20.8%) de la c.60+5G>T en nuestra serie de pacientes. Como se muestra en la tabla VI.3 se integró el haplotipo en las mutaciones nuevas, donde la mutación p.Met1Leu se encuentra asociada al H1.7, el cual como ya se mencionó generalmente se encuentra en

desequilibrio de ligamiento para pacientes con PKU en población europea, lo que apoya su asociación a la enfermedad.

También se identificó que el paciente PKU168 homocigoto para la c.441+5G>T, presenta el haplotipo 1.8 que ha sido asociado a esta mutación en australianos, alemanes y turcos por lo que se infiere un origen europeo para esta mutación en nuestra serie, a diferencia de lo encontrado en Venezuela donde el haplotipo asociado es el 5.8 ó 6.8 presente de forma única en pacientes originarios de una pequeña ciudad de los Andes lo que sugiere un origen independiente en esta región [De Lucca., et al 2009]. Así mismo se encontró el H11 asociado a la mutación p.Asn376Ilefs\*24 presente en PKU33, el cual ha sido descrito en mutaciones privadas de Noruega, Suiza y Dinamarca, situación acorde con la baja frecuencia de este alelo, el cual únicamente ha sido identificado en otro paciente mexicano pero asociado al haplotipo 1 [www.pahdb.mcgill.ca].

### VII.3 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Predecir la actividad enzimática residual de la enzima PAH por estudios hechos *in vitro* es posible, sin embargo la relación fenotipo clínico con el bioquímico y el genotipo no siempre es consistente, lo que orienta a la existencia de otros factores que influyen en el fenotipo, como la cinética y distribución de la Phe en la barrera hematoencefálica, síntesis y procesamiento del cofactor, presencia de proteasas y chaperonas, aunque estos factores aún no se encuentran bien caracterizados. Así es como la HPA se considera una enfermedad influenciada por diversos factores como el ambiente (ingesta de Phe), el genotipo (alelos PKU) y el genoma (genes modificadores, cofactor BH4, etc) los cuales explicarían las posibles diferencias entre las alteraciones cognitivas y metabólicas observados en los pacientes con HPA [Scriver C., et al 1999].

En la mayoría de los casos el genotipo es el principal determinante para el fenotipo, sin embargo existen pacientes descritos en la literatura e incluso en



nuestra cohorte, que a pesar de presentar el mismo genotipo mutante PKU no tienen el mismo fenotipo, como es el caso de algunos heterocigotos para la [c.60+5G>T];[p.Val388Met], en los que se presenta tanto PKU Moderada (PKU81 y PKU138) como PKU clásica (PKU66, PKU78), que como ya se mencionó puede atribuirse a la presencia de la p.Val388Met. Actualmente algunos autores sugieren que la identificación de alelos “leves” en pacientes con HPA, les condicionaría un manejo con menos restricción dietética y menor número de controles bioquímicos para su seguimiento médico [Mitchell JJ., et al 2011], como serían aquellos con una actividad residual moderada y alta (actividad enzimática residual de 10-≥30%). Esto se ejemplifica con las pacientes PKU76 y PKU95 que son portadoras de la p.Glu390Gly con actividad residual de 70-85% que tienen mayor tolerancia a la Phe y por lo tanto requieren de una menor restricción dietética.

Tal como se observa en la TABLA VI.5 encontramos una correlación del fenotipo esperado contra el observado en el 64.5% casos (31/48) menor al 80% reportado a nivel mundial [Blau N., et al 2011], esto posiblemente sea explicado por el alto número de alelos conocidos como inconsistentes dentro de los casos discordantes (11/26) como son: p.Val388Met, p.Arg261Gln, p.His170Asp, p.Ile65Tre y la p.Glu390Gly. Estos alelos inconsistentes inducen una complementación interalelica negativa, que se refiere a la propiedad única que tienen las enzimas homodiméricas que con ciertos cambios heterocigotos compuestos tienen un fenotipo más severo que si fueran homocigotas para alguna de las mutaciones por lo tanto afectan las interacciones entre las interfases de las subunidades y esto condiciona una gran variedad de fenotipos [Rivera I., et al 2011] [Leandro J., et al 2011].

Es posible enfatizar que la correlación genotipo-fenotipo es mucho más certera en aquellos pacientes con un fenotipo clásico, dado que el 77% (26/31) de los casos concordantes pertenecen a esta categoría y presentan mutaciones nulas. Las mutaciones son clasificadas en nulas cuando eliminan por completo la función del producto codificado, tales como aquellas que causan alteraciones estructurales o

modificaciones en el sitio catalítico, las que afectan splicing, las mutaciones puntuales sin sentido, de corrimiento del marco de lectura y algunas de sentido erróneo.

A nivel mundial el 75% de los genotipos de los pacientes con PKU son heterocigotos compuestos y en nuestra muestra fue del 81.2%. La identificación de la c.60+5G>T predominantemente en fenotipos clásicos de nuestro estudio (27%, 13 pacientes), se encuentra acorde con el carácter severo de esta mutación descrito en la literatura [Guldberg P., et al 1998] y con la alta frecuencia de PKU Clásica en nuestra muestra.

En términos generales la combinación de las mutaciones en enfermedades autosómico recesivas explicaría o predeciría el fenotipo, donde el efecto de una mutación leve o hipomorfa prevalecerá sobre la severa o amorfa. Cuando se presentan dos mutaciones catalogadas con la misma severidad, el fenotipo puede ser más leve del predicho por el genotipo como lo observado en caso PKU135 con genotipo [c.441+5G>T];[p.Ser349Pro] o en el caso PKU93 con genotipo [c.969+6T>C];[c.1066-11G>A] ambos con mutaciones severas pero con PKU moderada, esto pudiera ser debido a que las mutaciones de splicing bajo ciertas condiciones pudiesen generar algunos transcritos maduros normales que atenuarían el fenotipo [Blau N., et al 2011].

#### VII.4 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA A BH<sub>4</sub>.

A partir de la base de datos BIOPKU [www.biopku.org] se ha podido determinar que las mutaciones que generan menos de 15% de actividad enzimática *in vitro* causan PKU clásica y tienden a la no respuesta con BH<sub>4</sub>. En cambio aquellas con actividad residual de más del 20% suelen responder al tratamiento con el cofactor y por lo general condicionan HPA moderadas o leves. Recientemente se ha propuesto no únicamente catalogar la respuesta al BH<sub>4</sub> con la disminución de los valores de Phe, si no también que esta refleje la posibilidad de incrementar la

ingesta de Phe en la dieta y la disminución del uso de la fórmula especial [Quirk M., et al 2012]. Nuestros resultados demuestran que la predicción teórica del genotipo con base a la respuesta al cofactor BH<sub>4</sub> y a lo reportado en la base BIOPKU, el 16.7% de los pacientes serán respondedores y 20.8% son potencialmente respondedores, por lo tanto el 37.5% podría ser teóricamente respondedor a la terapia (TABLA VI.6). En España se han reportado frecuencias de respuesta al BH<sub>4</sub> desde 38% [Couce M., et al 2013] hasta, 73% [Bueno., et al 2013], el primero con una cifra cercana a lo observado en nuestro estudio y cuya discrepancia con el segundo, depende principalmente de la frecuencia de alelos relacionados a HPA.

Actualmente se considera que el genotipo es el principal factor predictor de la respuesta a BH<sub>4</sub>, particularmente en aquellos pacientes con dos alelos nulos quienes serán definitivamente no respondedores [Anjema., et al 2013; Quirk M., et al 2012]; así, estimamos con base al genotipo identificado que el 45.8% de nuestros pacientes pueden ser catalogados como no candidatos para la terapia (TABLA VI.6). Por otro lado, se acepta que estrictamente no es indispensable el disponer previamente del genotipo *PAH* para decidir la realización de la prueba terapéutica con BH<sub>4</sub> en un paciente con HPA [Blau N., et al 2010].

Así, el único método contundente para determinar la respuesta a BH<sub>4</sub> en un paciente con PKU es el realizar la prueba terapéutica al cofactor, especialmente en los casos que presentan un alelo respondedor, los cuales son clasificados como potencialmente respondedores (20.8%) y a los no determinados (12.5%). Es así como los candidatos a la prueba terapéutica en nuestra cohorte sería del 50% (respondedores, potencialmente respondedores y no determinados) (TABLA VI.6). Sin embargo, por el fenotipo observado en el presente estudio y lo descrito en la literatura para la c.60+5G>T [Guldborg P., et al 1998; Quirk M., et al 2012] proponemos que la identificación rápida por PCR-restricción de al menos un alelo con esta mutación severa en un paciente con PKU clásica (27%, 13 pacientes) evitaría someter al paciente a una prueba muy probablemente innecesaria de

respuesta a BH4, la cual es de un costo elevado y requiere de un proceso laborioso para su realización, que incluye una cuantificación precisa de la ingesta de Phe, que en algunos casos obliga al paciente a hospitalizarse.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El conocer la base molecular de la HPA en los diferentes países permite obtener información relevante para el desarrollo de estrategias de detección con base a las frecuencias alélicas genotípicas del gen *PAH* de cada población, así como para predecir un eventual éxito en la implementación del manejo farmacológico con BH<sub>4</sub>. La utilización de este cofactor es importante para los pacientes, ya que permite disminuir la restricción dietética que conlleva a un mejor estado nutricional y un mejor apego al tratamiento con un buen control de los niveles séricos de Phe.

El realizar el análisis molecular del gen *PAH* previo a la prueba terapéutica permitiría una selección racional de los pacientes que serán candidatos al cofactor, sobretodo en países como México donde los recursos son limitados y el costo del medicamento es elevado. Bajo esta premisa, los resultados de los genotipos obtenidos en nuestro estudio predicen que la proporción teórica de los casos mexicanos que serían candidatos a someterse a la prueba terapéutica de respuesta al BH<sub>4</sub> sería de 37.5% (respondedores y potencialmente respondedores) lo cual es muy similar a lo encontrado en el norte de España (38%). Como era esperado, los fenotipos no clásicos son los que preferentemente tendrán una respuesta al BH<sub>4</sub> por lo tanto entre más casos sean detectados por tamiz neonatal con fenotipos menos severos la proporción de pacientes con posible respuesta pudiera incrementarse.

Nuestros resultados presentan una distribución distintiva de las mutaciones responsables de HPA en el gen *PAH* en pacientes mexicanos donde destaca un predominio de la mutación c.60+5G>T (20.8%) particularmente en pacientes del Bajío y la cual es infrecuente en otras poblaciones, así como la ausencia de la mutación p.Arg408Trp altamente prevalente en Europa. El espectro mutacional identificado sugiere que se podría plantear un algoritmo inicial de diagnóstico molecular en los pacientes mexicanos con HPA, que abarque el análisis de los exones 1, 7 y 11 puesto que en ellos se han encontrado el 58% (53/96) de las

mutaciones responsables de HPA y diferir el estudio de los exón 13, donde no se identificaron mutaciones. Así mismo, a través de la información genotípica obtenida en el presente estudio, se pudiera proponer un cribado mutacional en todo paciente con diagnóstico confirmado de HPA, el cual incluya un panel dirigido para las mutaciones c.60+5G>T, p.Val388Met y c.1066-11G>A ya que estos alelos conforman el 37% de las mutaciones en nuestra población. Particularmente este panel de bajo costo comparado con la secuenciación automatizada completa del gen *PAH*, sería aplicable como estudio molecular de primera línea a pacientes originarios del estado de Jalisco y/o Bajío, con una probabilidad del 35% (7/20 pacientes del Bajío) de identificar el genotipo completo y en el 60% (12/20) al menos una mutación. Adicionalmente este resultado permitiría identificar a aquellos pacientes con alta probabilidad de no respuesta al tratamiento con el cofactor BH<sub>4</sub>, lo que evitaría la realización de las pruebas terapéuticas de un alto costo y los esfuerzos se encaminarían principalmente al tratamiento nutricional.

Nuestros resultados subrayan la marcada diferencia del espectro mutacional PKU entre poblaciones y la importancia de conocer la ancestría o el lugar de origen de los pacientes para delinear la epidemiología de esta enfermedad y así orientar esfuerzos en la identificación de las mutaciones más frecuentes o características de cada región. El análisis de haplotipos propuesto en el proyecto, apoya la hipótesis previamente propuesta de un efecto fundador para PKU en México pero a diferencia de la mutación c.1066-11G>A postulada inicialmente, nuestros resultados apuntan a que la c.60+5G>T es la mutación responsable de PKU con efecto de fundador en pacientes provenientes de la región del Bajío/Los Altos de Jalisco.

## IX. ANEXOS

### IX.1 ANEXO 1

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (MENORES DE EDAD)

##### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

1. Yo \_\_\_\_\_ he sido informado(a) que mi hija(o) \_\_\_\_\_, padece de una enfermedad metabólica denominada HIPERFENILANINEMIA (FENILCETONURIA) que se caracteriza por presentar elevación en sangre de fenilalanina con riesgo a padecer retraso mental.
2. Se me ha informado que el propósito del estudio es conocer las características clínicas, bioquímicas y las mutaciones (alteraciones en un gen) en una muestra de pacientes mexicanos con diagnóstico de HPA y del posible beneficio en el tratamiento que este estudio podría tener al identificar el gen mutado responsable de la enfermedad en mi hijo(a).
3. Se que al consentir en que mi hijo(a) participe en este estudio se le realizará un examen físico completo por especialistas del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz y del Laboratorio de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría para conocer las manifestaciones clínicas de la enfermedad y su capacidad intelectual.

4. Estoy enterado(a) que a mi hijo(a) se le tomará una muestra de orina y de sangre, la cual no tiene ningún riesgo, aunque ocasionalmente se puede formar un “moretón” o referir dolor pasajero en el sitio del cual se extrae la sangre.
5. Si decido participar en el estudio, hago constar que no recibiré compensación económica alguna, así mismo los estudios derivados de la presente investigación no tendrán ningún costo para mí.
6. Entiendo que nuestra participación es total y absolutamente voluntaria, y que puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo en cualquier servicio de la institución.
7. Entiendo que los datos personales de mi hija(o) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto.
8. Se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.
9. Se me ha informado que la muestra de DNA de mi hijo (a) quedará codificada bajo una clave que no incluya su nombre o datos clínicos en el contenedor de



dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de la HPA y entidades relacionadas hasta que mi hijo (a) cumpla la mayoría de edad y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

#### DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo(a) participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Tengo también el conocimiento de que si decido dejar de participar en cualquier momento, esto no traerá ninguna repercusión en la atención que se le brinda a mi hijo(a) por parte de los doctores de esta institución.

Nombre del niño (a) \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la madre, padre o tutor \_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_

IX.2 ANEXO 1.1

**CARTA DE ASENTIMIENTO (MAYORES DE EDAD)**

**CARTA DE ASENTIMIENTO**

México, D.F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

1. Yo \_\_\_\_\_ he sido informada(o) que padezco de una enfermedad denominada HIPERFENILALANINEMIA (FENILCETONURIA) que se caracteriza por presentar elevaciones de fenilcetonuria en sangre.

2. Se me ha informado que el propósito del estudio es conocer las características clínicas, bioquímicas y las mutaciones (alteraciones en un gen) en una muestra de pacientes mexicanos con diagnóstico de HPA y del posible beneficio en el tratamiento que este estudio podría tener al identificar el gen mutado responsable de la enfermedad en mi y en mi familia, ya que estos resultados se me informarán dentro del asesoramiento genético para entender la probabilidad de recurrencia del padecimiento en otros integrantes de mi familia y establecer la mejor estrategia para el manejo y tratamiento de mi enfermedad.

3. Se que al consentir participar en este estudio se me realizará un examen físico completo por especialistas del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz y del Laboratorio de Neurodesarrollo del Instituto Nacional de Pediatría con la finalidad de conocer las manifestaciones clínicas de la enfermedad y determinar mi capacidad intelectual.

4. Estoy enterada(o) que se me tomará una muestra de orina y de sangre, la cual no tiene ningún riesgo, aunque ocasionalmente se puede formar un “moretón” o referir dolor pasajero en el sitio del cual se extrae la sangre.
5. Si decido participar en el estudio, hago constar que no recibiré compensación económica alguna, así mismo los estudios derivados de la presente investigación no tendrán ningún costo para mí.
6. Entiendo mi participación es total y absolutamente voluntaria, y que puedo abandonar el estudio y retirar mi asentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en mi atención en cualquier servicio de la institución.
7. Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto.
8. Se me ha asegurado que toda mi información clínica e impresa recabada para el presente proyecto quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.
9. Se me ha informado que la muestra de mi DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un

periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de la hiperfenilalaninemia (fenilcetonuria) y entidades relacionadas, siempre y cuando se conserve la confidencialidad de los datos derivados de dichas investigaciones.

#### DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Tengo también el conocimiento de que si decido dejar de participar en cualquier momento, esto no traerá ninguna repercusión en la atención que se me brinda por parte de los doctores de esta institución.

Nombre y firma \_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_

IX.3 ANEXO 2

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA HIPERFENILALANINEMIA (FENILCETONURIA) EN PACIENTES MEXICANOS.**

Caso índice: \_\_\_\_\_

Edad Dx: \_\_\_\_\_ Edad inicio Tx: \_\_\_\_\_ Edad actual: \_\_\_\_\_

Sexo: F  M  Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Lugar de Origen: \_\_\_\_\_ Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_

Institución tratante: \_\_\_\_\_ No. Exp. \_\_\_\_\_

No. Registro Interno (muestra de orina): \_\_\_\_\_

No. Registro Interno (muestra DNA): \_\_\_\_\_

Árbol Genealógico

Las manifestaciones por aparatos y sistemas enunciadas a continuación se definieron en el marco teórico.

1 Si = Presente

2 No = Ausente

I. PIEL Y FANERAS

Hipopigmentación del cabello

Hipopigmentación cutánea

Eczema malar

II. SNC

Crisis Convulsivas

Tremor

Irritabilidad

III. GASTROINTESTINAL

Rechazo al alimento

Vómito

IV. Edad mental: \_\_\_\_\_

V. Phe sérica: \_\_\_\_\_ Phe/Tyr: \_\_\_\_\_

VI. Deficiencia enzimática:

PAH

Cofactor BH<sub>4</sub>

VII. Fenotipo bioquímico previo a tratamiento:

PKU clásica

PKU moderada

PKU leve

HPA benigna

## X. BIBLIOGRAFÍA

Anderson PJ y Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010; 99, S3-9.

Aulehla-Scholz C, Heilbronner H. Mutational Spectrum in German Patients with Phenylalanine Hydroxylase deficiency. *Human Mutation*. 2003.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005.

Berry SA, Brown C, Grant M, et al. Newborn screening 50 years later: access issues faced by adults with PKU. *Genetics in Medicine*. 2013;

Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010; 376:1417-27.

Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011;104, S2–S9.

Borrajo GJC. Panorama epidemiológico de la fenilcetonuria (PKU) en Latinoamérica. *Acta Pediátrica de México*. 2012; 33(6): 279-287.

Brown TA. En *Genomes* 2ª edición. Oxford; Wiley-Liss, 2002

Bueno MA, González-Lamuño D, Delgado-Pecellín, et al. Molecular epidemiology and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria patients from South Spain. *Journal of Human Genetics*. 2013; 58(5):279-84.

Buratti E, Chivers M, Kralovic J, et al. Aberrant 5´ splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Research*. 2007, 35, 13.

Calderon FR, Nelson L, Dobrowolski P, et al. Combination of enzyme analysis, allele-specific PCR and sequencing to detect mutations in the *GALT* gene. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007; 30, 818.

Camp KM, Loyd-Puryear MA, Huntington KL. Nutritional treatment for inborn errors of metabolism: Indications, regulations, and availability of medical foods and dietary supplements using phenylketonuria as an example. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;107:3–9

Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*. 2002. 3,4,285-98.

Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, et al. Population-Based Newborn Screening for Genetic Disorders When Multiple Mutation DNA Testing Is Incorporated: A Cystic Fibrosis Newborn Screening Model Demonstrating Increased Sensitivity but More Carrier Detections. *Pediatrics* 2004;113:1573–1581.

Christ SE, Huijbregts CJS, de Sonnevile MJL, White DA. Executive function in early-treated phenylketonuria: Profile and underlying mechanisms. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010;99: S22–S32.

Cui JD, Qiu JQ, Fan XW, et al. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013

Couce ML, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A., et al. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene*. 2013 25;521(1):100-4

Daiger SP, Reed TL, Huang SS, et al. Polymorphic DNA Haplotypes at the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus in Asian Families with Phenylketonuria (PKU). *American Journal of Human Genetics*. 1989;45:319-324.

Dahri S, Desviat LR, Pérez B, et al. Mutation analysis of phenylketonuria patients from Morocco: High prevalence of mutation G352fsdelG and detection of a novel mutation p.K85X. *Clinical Biochemistry*. 2010, 43, 76–81

De Lucca M, Arias I, Casique L, et al. Improving phenylketonuria genotyping by screening for the IVS4+5G>T mutation in the PAH gene. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 402, 206–208.

Dobrowolski SF, Borski K, Ellingson CC, et al. A limited spectrum of phenylalanine hydroxylase mutations is observed in phenylketonuria patients in western Poland and implications for treatment with 6R tetrahydrobiopterin. *Journal of Human Genetics*. 2009; 54: 335–339.

Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011; 10:116–121.

Donlon J, Levy H, Scriver CR. en *The Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 2010. Capítulo 77. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. [www.ommbd.com](http://www.ommbd.com).

Eisensmith RC, Woo SLC. Molecular Basis of Phenylketonuria and Related Hyperphenylalaninurias: Mutations and Polymorphisms in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Human Mutation*. 1992; 1: 13-23.

Eisensmith RC, Golsov AA, Woo SLC. A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. *Prenatal Diagnosis*. 1994; 14, 1113-1118

Elsas LJ, Greto J, Wierenga A. The effect of blood phenylalanine concentration on Kuvan™ response in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011; 102(4):407-12.

Embury JE, Charron CE, Martynyuk M, et al. PKU is a reversible neurodegenerative process within the nigrostriatum that begins as early as 4 weeks of age in *Pahenu2* mice. *Brain Research*. 2007; 1127(1): 136–150.

Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 1999. 68:103–125.

Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, et al. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* 2005; 15: 3176-8.

Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2013. 65(4):341-9.

Giannattasio S, Lattanzio P, Bobba A, Marra E. Detection of microsatellites by ethidium bromide staining. The analysis of an STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Cell Pro* 1997; 11: 81–83



- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E., et al. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutrition and Metabolism*. 2012; 9:7
- Groselj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, et al. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012; 106:142–148
- Goltsov AA, Eisensith RC, Koneckit DS, et al. Associations between Mutations and a VNTR in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *American Journal of Human Genetics*.1992; 51:627-636.
- Guillén-López S, Vela-Amieva M. Actualidades en el tratamiento nutricional de la fenilcetonuria. *Acta Pediátrica de Mexico*. 2011;32(2):107-114.
- Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, et al. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the maternal PKU collaborative study. *American Journal of Human Genetics*. 1996; 59: 84-94.
- Guldberg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. *American. Journal of. Human. Genetics*. 1998; 63:71–79
- Harding CO, Gibson KM. Therapeutic liver repopulation for phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010. 33: 681-687.
- Jaffe EK, Stith L, Lawrence SH, et al. A new model for allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase: implications for disease and therapeutics. *Archives of Biochemical and Biophysics*. 2013. 530(2):73-82.
- Kidd KK. Allele Frequency Database (ALFRED) Database 2011. <http://alfred.med.yale.edu>
- Kidd JR, Pakstis AJ, Zhao H, et al. Haplotypes and linkage disequilibrium at the phenylalanine hydroxylase locus, PAH, in a global representation of populations. *American Journal of Human Genetics*. 2000; 66: 1882-99.
- Kozak L, Hrabincova E, Kintr J, et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006; 89: 300-9.
- Kure S, Sato K, Fujii K, et al. Wild-type phenylalanine hydroxylase activity is enhanced by tetrahydrobiopterin supplementation in vivo: an implication for therapeutic basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004; 83: 150-6
- Lanconi E, Lanconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Seminars of Cell Development and Biology*. 2002. 13: 433-438.
- Lara dos Santos L, de Castro Mahalhaes M, de Oliveira Reis A, et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genetics Molecular Research*. 2006; 5: 16-23.
- Leandro J, Leandro P, Flatmark T. Heterotetrameric forms of human phenylalanine hydroxylase: Co-expression of wild-type and mutant forms in a bicistronic system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1812:602–612.

Lidsky AS, Law ML, Morse HG, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985a;82:6221-6225.

Lidsky AS, Ledley FD, DiLella AG, et al. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *American Journal of Human Genetics*. 1985b; 37: 619-34.

Longo N, Disorders of bipterin metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2009; 32: 333-42.

Luleyap HU, Alptekin D, Pazarbas A, et al. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenylalanine hydroxylase gene. *Mutation Research*. 2006 601, 39–45.

Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007, 30:153-158.

Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genetics in Medicine*. 2011 Aug;13(8):697-707.

Monroy-Santoyo S, Belmont-Martínez L, Fernández-Lainez C, et al. Experiencia con sapropterina en pacientes mexicanos con hiperfenilalaninemia. *Acta Pediatr Mex* 2012;33(6):331-334.

Montgomery K, Kucherlapati R. Chromosome 12. En: *Encyclopedia of life science*. 2007; doi: 10.1002/9780470015902.a0005821.pub2

Neufeld EF, Muenzer J, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Online 2010. doi: 10.1007/s00439-001-0669-z.

Okano Y, Wang T, Eisensmith RC, et al. Recurrent Mutation in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *American Journal of Human Genetics*. 1990; 46: 919-924.

Pérez B, Desviat LR, Díe M, et al. Presence of the Mediterranean PKU mutation IVS10 in Latin America. *Human Molecular Genetics*. 1993; 2, 8:1289-90.

Perez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the Spanish Population: Mutation Profile and Association with Intragenic Polymorphic Markers. *American Journal of Human Genetics*. 1997, 60, 95-102.

Pey AL, Desviat LR, Gámez A, et al. Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations *PAH*. *Human Mutation* 2003; 21: 370-8.

Quirk ME, Dobrowolski SF, Nelson BE, et al. Utility of phenylalanine hydroxylase genotype for tetrahydrobiopterin responsiveness classification in patients with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012. 107, 31–36.

Ramírez-Farías C, Pérez-Andrade ME, Ibarra-González I, et al. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. Propuesta de unificación *Acta Pediátrica de Mexico*. 2007, 28, 6: 261-9.

Resi-Cruz G, Hernández-Acasiete M, Ruiz-Resi G. Identification of a focus of beta-thalassemia in Tamiahua, Veracruz. *Revista de Investigación Clínica*. 1990; 42, 3:189-92.

Recomendaciones Clínicas Prácticas para el Tratamiento Nutricional para el manejo del paciente pediátrico y adolescente con Fenilcetonuria, México. Secretaría de Salud, 2012.

- Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, et al. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *Journal of Medical Genetics*. 1998;35(4):301-4.
- Santana da Silva LC, Santos Carvalho T, Britto da Silva F. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003. 79; 17–24
- Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. 96; 2339-2344.
- Sarkissian CN, Gamez A, Wang L. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. 105; 20894-9.
- Sallé-Alonso MA, Van den Eynde A. En La Emigración Española en América: Historias y lecciones para el futuro. Fundación Directa. 2009.
- Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human Mutation*. 2007; 28: 831-845
- Torres-Sepúlveda MR, Martínez-de Villarreal LE, Esmer C, et al. Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry: Two years' experience in Nuevo León, Mexico. *Salud Pública de México*. 2008;50:200-206.
- van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010; 99:S90-95.
- Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Belmont-Martínez L, et al. Historia de la fenilcetonuria. *Acta Pediátrica de México*. 2011;32(5):281-6.
- Velázquez A, Loera-Luna A, Aguirre BE, et al. Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria. *Salud Pública de México*. 1994; 36:249-256.
- Velázquez A, Bilbao G, González-Trujillo LJ, et al. Apparent higher frequency of phenylketonuria in the Mexican state of Jalisco. *Human Genetics*. 1996; 97: 99-102.
- Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*. 1983. 306:151–155
- Yang Y, Drummond-Borg M, Garcia-Heras J. Molecular Analysis of Phenylketonuria (PKU) in Newborns From Texas. *Human Mutation*. 2001;17, 6, 523.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003; 21: 345-56.
- <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>
- <http://www.pahdb.mcgill.ca/>
- <http://www.biopku.org/BH4>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>
-