



# Biomarcadors del metabolisme de la dopamina en alteracions neurològiques en la infància

Marta Molero Luis

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**BIOMARCADORS DEL METABOLISME DE LA DOPAMINA  
EN ALTERACIONS NEUROLÒGIQUES EN LA INFÀNCIA**

**Marta Molero Luis  
2014**





**Universitat de Barcelona**

**Facultat de Farmàcia**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Programa de doctorat en Biotecnologia**

# **BIOMARCADORS DEL METABOLISME DE LA DOPAMINA EN ALTERACIONS NEUROLÒGIQUES EN LA INFÀNCIA**

**Memòria presentada per Marta Molero Luis**

**per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona**

Els directors,

Dr. Rafael Artuch Iriberrí  
(director/tutor)

Dra. Aida Ormazabal Herrero

La doctoranda,

**Marta Molero Luis, 2014**



Barcelona, 2014

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat de Barcelona



Treball realitzat a l'Hospital Sant Joan de Déu

Esplugues de Llobregat, Barcelona



# AGRAÏMENTS



# **AGRAÏMENTS**

**RES NO ÉS TANT ALT NI TANT DIFÍCIL**

**Al meu pare,**

**A la meva mare,**



# ÍNDEX

<b>ABREVIATURES</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>19</b>
<u>1- Neurotransmissors i amines biògenes. Conceptes generals</u>	21
<u>2- Cofactors de la via dopaminèrgica (I): Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)</u>	40
<u>3- Cofactors de la via dopaminèrgica (II): Vitamina B<sub>6</sub></u>	46
<b>JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA I HIPÒTESI</b>	<b>53</b>
<u>1- Justificació de la unitat temàtica</u>	55
<u>2- Hipòtesi</u>	57
<b>OBJECTIUS</b>	<b>59</b>
<u>1- Objectiu principal</u>	61
<u>2- Objectius concrets</u>	61
<b>PACIENTS, MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>63</b>
<u>1-Pacients</u>	<b>65</b>
- Població d' estudi per l'anàlisi de l'àcid homovanílic en LCR	65
- Població d'estudi per l'anàlisi de la neopterinina com a marcador d'infecció i/o inflamació en LCR	66
- Població de pacients amb deficiència de vitamina B <sub>6</sub> en LCR i encefalopatia epilèptica	68
- Aspectes ètics	69
<u>2- Mètodes analítics</u>	<b>69</b>
- Obtenció de la mostra. Criteris d'exclusió	69
- Anàlisis automatitzades en LCR	71
- Anàlisis de neurotransmissors (àcid homovanílic) en LCR	71
- Anàlisis de pterines (neopterinina i biopterina) en LCR	73
- Anàlisis de piridoxal fosfat en LCR	76
- Altres procediments (aminoàcids, GABA i 5-metiltetrahydrofolat) en LCR	78
- Estudis moleculars dels enzims implicats en la via de la dopamina	79
<u>3- Mètodes clínics</u>	80
<u>4- Mètodes estadístics</u>	81

<b>RESULTATS</b>	<b>85</b>
<u>1- Anàlisi de les concentracions d'àcid homovanílic en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques com a eina bioquímica per la identificació d'alteracions dopaminèrgiques. Avaluar la seva utilitat como biomarcador en un ampli ventall de malalties neurològiques</u>	85
<u>2- Anàlisi de les concentracions de pterines (neopterina i biopterina) en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques per la identificació de trastorns primaris i secundaris d'aquests coenzims. Avaluar la seva utilitat com a biomarcador en processos immuno-inflamatoris.</u>	93
<u>3- Anàlisi de les concentracions de piridoxal fosfat en LCR en pacients neuropediàtrics sense diagnòstic etiològic per la identificació de trastorns primaris i secundaris: avaluar la resposta a la suplementació amb piridoxal -fosfat en un grup de pacients amb encefalopaties epilèptiques greus</u>	99
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>121</b>
<u>1. Discussió conjunta</u>	123
<u>2. Discussió per temes</u>	125
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>147</b>
<b>ANNEX</b>	<b>159</b>
1- Taula annex	161
2- Altres publicacions de la doctoranda	163
3- Nous estudis derivats	163





## ABREVIATURES

<b>AADC</b>	<b>descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics</b>
<b>ALPL</b>	<b>fosfatasa alcalina tissular</b>
<b><math>\alpha</math>-AASA</b>	<b><math>\alpha</math>-semialdehid aminoadípíc</b>
<b>AGMO</b>	<b>gliceril-èter monoxigenasa</b>
<b>BH<sub>4</sub></b>	<b>tetrahidrobiopterina</b>
<b>BHE</b>	<b>barrera hematoencefàlica</b>
<b>BP</b>	<b>biopterina</b>
<b>COMT</b>	<b>catecol-O-metiltransferasa</b>
<b>DAT</b>	<b>transportador de dopamina</b>
<b>DHFR</b>	<b>dihidrofolat reductasa</b>
<b>DHPR</b>	<b>dihidropteridin reductasa</b>
<b>D<math>\beta</math>H</b>	<b>dopa <math>\beta</math>-hidroxilasa</b>
<b>DOPAC</b>	<b>àcid dihidroxifenilacètic</b>
<b>ECM</b>	<b>errors congènits del metabolisme</b>
<b>EEG</b>	<b>electroencefalograma</b>
<b>FI</b>	<b>fosfatasa alcalina</b>
<b>GABA</b>	<b>àcid gamma aminobutíric</b>
<b>GAD</b>	<b>descarboxilasa de l'àcid glutàmic</b>
<b>GTP</b>	<b>guanosina trifosfat</b>
<b>GTP-CH</b>	<b>guanosina trifosfat ciclohidrolasa</b>
<b>5HIAA</b>	<b>àcid 5-hidroxiindolacètic</b>



<b>5HTP</b>	<b>5-hidroxitriptòfan</b>
<b>HPLC</b>	<b>cromatografia líquida d'alta resolució</b>
<b>HVA</b>	<b>àcid homovanílic</b>
<b>LCR</b>	<b>líquid cefaloraquidi</b>
<b>3MT</b>	<b>3-metoxitirosina</b>
<b>MAO</b>	<b>mono aminooxidasa</b>
<b>MHPG</b>	<b>4-hidroxi-3-metoxifenilglicol</b>
<b>5-MTHF</b>	<b>5-metiltetrahidrofolat</b>
<b>NOS</b>	<b>òxid nítric sintasa</b>
<b>NP</b>	<b>neopterina</b>
<b>NT</b>	<b>neurotransmissors</b>
<b>3-OMD</b>	<b>3-ortometildopa</b>
<b>OAT</b>	<b>transportador específic d'anions orgànics</b>
<b>OH-BH4</b>	<b>hidroxitetrahidrobiopterina</b>
<b>P5C</b>	<b>àcid pirrolina-5-carboxílic</b>
<b>P6C</b>	<b>piperidina 6'-carboxilat</b>
<b>PAH</b>	<b>fenilalanina hidroxilasa</b>
<b>PCD</b>	<b>pterina-4<math>\alpha</math>-carbinolaminadehidratasa</b>
<b>PCR</b>	<b>reacció en cadena de la polimerasa</b>
<b>PKU</b>	<b>fenilcetonúria</b>
<b>PL</b>	<b>piridoxal</b>
<b>PLP</b>	<b>piridoxal fosfat</b>
<b>PNMT</b>	<b>feniletanolamina N-metiltransferasa</b>

<b>PNPO</b>	<b>piridoxamina fosfat oxidasa</b>
<b>PTPS</b>	<b>piruvoil-tetrahydropterina</b>
<b>qBH<sub>2</sub></b>	<b>q-dihydrobiopterina</b>
<b>RM</b>	<b>ressonància magnètica</b>
<b>SNC</b>	<b>sistema nerviós central</b>
<b>SR</b>	<b>sepiapterina reductasa</b>
<b>TPH</b>	<b>triptòfan hidroxilasa</b>
<b>TH</b>	<b>tirosina hidroxilasa</b>
<b>VMA</b>	<b>àcid vanilmandèlic</b>
<b>VMAT2</b>	<b>transportador d'amines biògenes</b>



# INTRODUCCIÓ

1. *Neurotransmissors i amines biògenes. Conceptes generals.*
  - 1.1. *La Dopamina com a neurotransmissor prototip. Funcions de la dopamina.*
  - 1.2. *Metabolisme i biomarcadors de la via dopaminèrgica.*
  - 1.3. *L'àcid homovanílic, com a principal metabòlit del metabolisme dopaminèrgic.*
  - 1.4. *Errors congènits del metabolisme de la dopamina.*
    - 1.4.1. *Deficiències enzimàtiques: TH, AADC, MAO i DBH.*
    - 1.4.2. *Defectes del transport de dopamina.*
  - 1.5. *Alteracions secundaries de la dopamina.*
2. *Cofactors de la via dopaminèrgica (I): Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>).*
  - 2.1. *Principals funcions de la BH<sub>4</sub>.*
  - 2.2. *Metabolisme i biomarcadors de les pterines: biopterina i neopterina.*
  - 2.3. *Pterines com a marcadors dels ECM de la tetrahidrobiopterina.*
  - 2.4. *Neopterina, com a marcador d'inflamació i infecció del SNC.*
3. *Cofactors de la via dopaminèrgica (II): Vitamina B<sub>6</sub>.*
  - 3.1. *Principals funcions de la vitamina B<sub>6</sub>.*
  - 3.2. *Metabolisme i biomarcadors de la vitamina B<sub>6</sub>.*
  - 3.3. *Piridoxal fosfat, com a marcador de malalties genètiques.*
    - 3.3.1. *ECM propis de la vitamina : hipofosfatasia i dèficit PNPO.*
    - 3.3.2. *Malalties segrestadores de piridoxal fosfat : dèficit antiquitina i hipoprolinèmia 2.*
  - 3.4. *Piridoxal fosfat i e pilèpsia fà rmaco-resistent.*



## **1- Neurotransmissors i amines biògenes. Conceptes generals.**

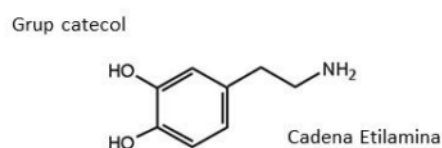
Les neurones són cèl·lules encarregades de transmetre informació d'un punt a l'altre de l'organisme. Aquesta informació, inicialment, arriba a la neurona en forma d'estímul, la qual el transforma en un impuls excitador o inhibidor. Per un procés de conducció l'estímul arriba a les terminacions neuronals produint un canvi físico-químic a les seves cèl·lules veïnes. Aquesta estreta relació i connexió que hi ha amb les cèl·lules del voltant forma la ret neuronal, necessària pel correcte funcionament i homeòstasi del sistema nerviós. La comunicació entre neurones existeix mitjançant l'alliberació de missatgers químics, anomenats neurotransmissors (NT). Aquests són alliberats després de l'arribada d'un impuls nerviós a la fibra nerviosa, passen a l'espai sinàptic (~200 Å) i posteriorment s'uneixen a receptors específics postsinàptics donant lloc a respostes bioquímiques determinades. A la zona de transmissió s'observen una gran quantitat de mitocòndries, necessàries per obtenir l'energia necessària i fer la correcte transmissió de la informació.

Bioquímicament tots els neurotransmissors segueixen una ruta concreta per tal de que es produeixi correctament la comunicació entre neurones: 1. Biosíntesis específica del NT en les neurones pre-sinàptiques a partir d'aminoàcids; 2. Emmagatzematge en vesícules especialitzades a les neurones pre-sinàptiques; 3. Alliberació del NT a l'espai sinàptic; 4. Unió del NT a receptors específics de la neurona post-sinàptica; 5. Inactivació del NT ja sigui per metabolisme d'aquest o per recaptació cap a les neurones pre-sinàptiques. Els NT poden classificar-se com a amines biògenes (catecolamines i serotonina), acetilcolina, aminoàcids (àcid gamma aminobutíric (GABA), glutamat, n-acetil aspartat, glicina i serina), purines i neuropèptids. Les amines

biògenes són funcionalment un grup molt important com NT del sistema nerviós central (SNC) i estan constituïdes per les catecolamines (noradrenalina, adrenalina i dopamina) i la serotonina. A nivell central aquestes substàncies tenen la funció del control de l'estat d'alerta, la memòria, la motivació, l'humor, la gana, la son, l'activitat motora i la secreció hormonal. A nivell perifèric estan implicades en la termorregulació, control del flux sanguini i mecanismes de dolor (Grace et al. 1998).

### 1.1. La Dopamina com a neurotransmissor prototip. Funcions de la dopamina

La dopamina és la catecolamina prototip del SNC i estructuralment està composta per un anell de benzè amb dos grups hidroxílics (anell catecol) i una cadena lateral etilamina. **Figura 1**



**Figura 1.** Estructura química de la Dopamina.

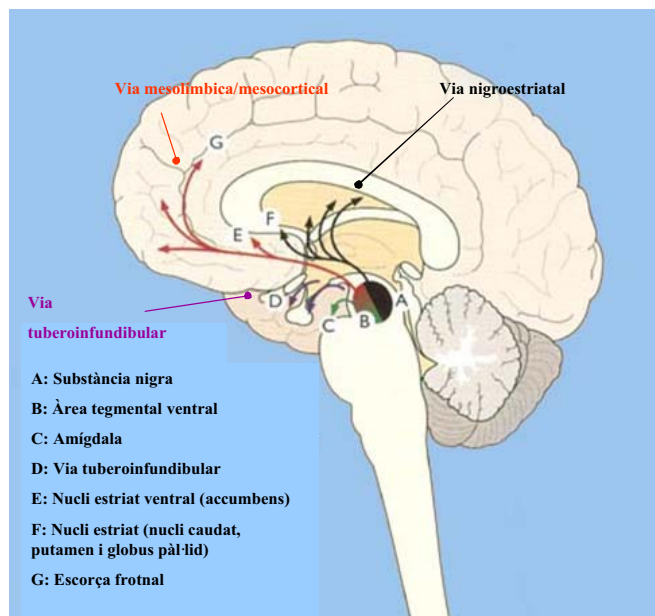
Mitjançant tècniques d'immunohistoquímica s'ha pogut conèixer la distribució de les neurones dopaminèrgiques i, tot i que són representades per pocs milers de neurones, la seva gran arborització permet la innervació d'aquestes per tot el cervell (Mravec et al. 2004). Principalment, les neurones dopaminèrgiques es troben restringides en tres àrees cerebrals i per tant, en tres vies diferents:

1.- Via nigroestriatal. Les neurones d'aquesta via s'originen a la substància nigra i participen en el control del moviment i el to muscular. El 85% de producció cerebral de dopamina té lloc en aquesta via, i per tant figura de gran importància en mantenir els nivells correctes de dopamina.

2.- Via mesolímbica i mesocortical. Les neurones d'aquestes vies s'originen a l'àrea tegmental ventral, i participen en els processos de memòria i control emocional. Així la dopamina té un paper fonamental en els circuits que controlen els aspectes motivacionals de la conducta, fent de nexa entre les estructures límbiques (de motivació) i motores (d'acció).

3.- Via tubero infundibular. Les neurones d'aquesta via són més curtes i innerven la zona intermèdia de la hipòfisis, participant en la secreció de la prolactina, on la seva alliberació i producció es veu inhibida per la dopamina. Figura 2

A nivell del sistema nerviós perifèric, la dopamina és secretada a la medulla suprenal, on activa la funcionalitat cardíaca i renal, estimula la motilitat intestinal i la tonalitat vascular.



**Figura 2.** Distribució de les vies dopaminèrgiques. La via nigroestriatal (color negre) innerva tot el cos estriat, format pel nucli estriat, putamen i globus pàl·lid. La neurones de la via mesolímbica/mesocortical (en vermell) finalitzen a l'escorça frontal i les neurones de la via tuberoinfundibular (en lila) innerven la hipòfisis.

## 1.2. Metabolisme i biomarcadors de la via dopaminèrgica

La síntesis de la dopamina (i també la resta de catecolamines) és iniciada per l'aminoàcid L -tirosina. Després d'un primer pas d'hidroxilació, regulat per l'enzim

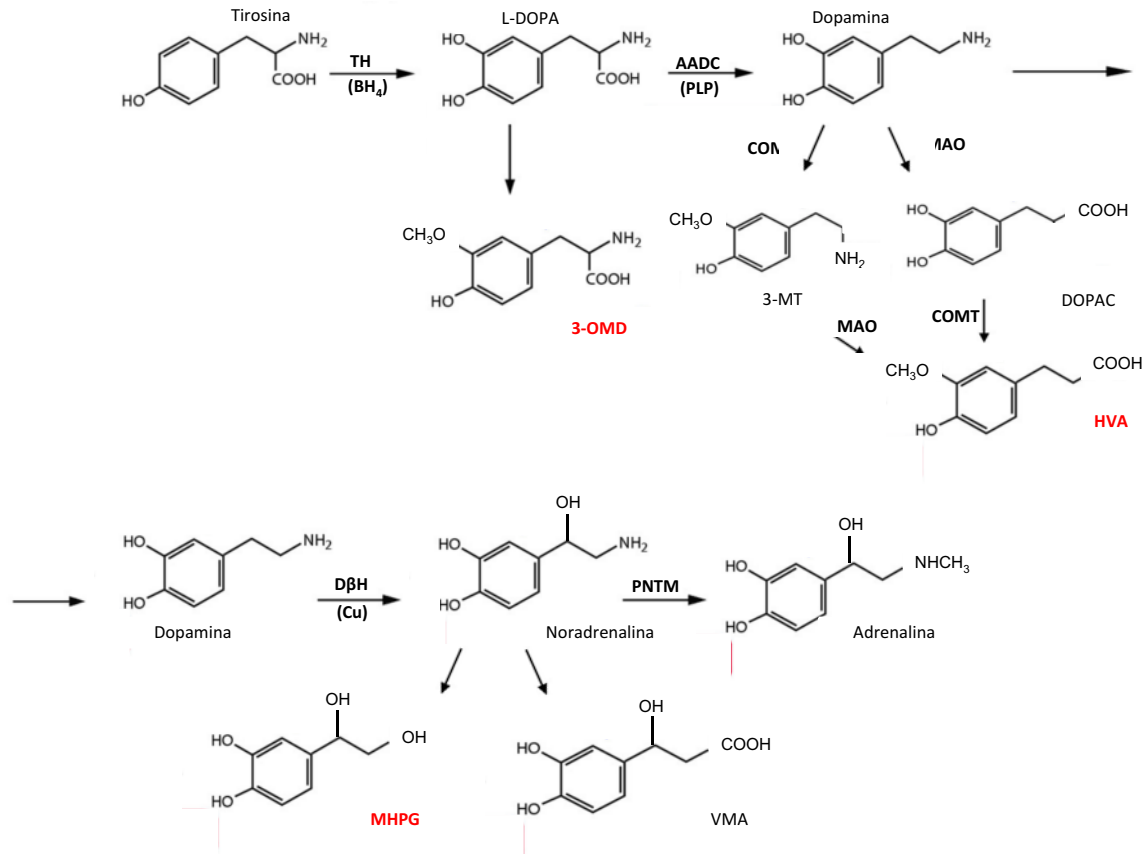


tirosina hidroxilasa (TH ; EC 1.14.16.2), s'obté la levodopa (L-dopa). Aquesta hidroxilació representa el punt de regulació de la síntesi de la dopamina (i també de la noradrenalina i adrenalina) (Nagatsu et al. 1964). La TH es troba altament concentrada a les terminals nervioses de totes les neurones catecolaminèrgiques, convertint-se amb l'enzim limitant de la síntesi d'aquestes (Levitt et al. 1965). La L-dopa és descarboxilada ràpidament per l'enzim descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (AADC ; EC 4.1.1.28) per convertir-se finalment en dopamina (Kuhar et al. 1999). Posteriorment, la major part de dopamina s'emmagatzema a les vesícules sinàptiques mitjançant un transportador específic que opera contra gradient (cost d'ATP), anomenat transportador vesicular de monoamines (VMAT2) (Bernstein et al. 2014). L'alliberació de la dopamina a l'espai sinàptic està relacionada amb l'obertura dels canals de calci de la neurona i per tant amb l'entrada de calci a dins d'aquesta (Bahena-Trujillo et al. 2000). En menor freqüència, la dopamina també pot sortir a l'espai sinàptic lliurement, sense haver de recórrer a les vesícules pre-sinàptiques (Bahena-Trujillo et al. 2000).

Una vegada la dopamina ja es troba a l'espai sinàptic pot exercir els seus efectes unint-se als receptors de membrana post-sinàptics (cinc subtipus diferents) o bé als seus receptors pre-sinàptics (autoreceptors, de dos subtipus). La dopamina és recaptada per la neurona pre-sinàptica mitjançant un transportador específic dependent de sodi i energia, anomenat DAT (Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). La degradació de la dopamina té lloc a l'espai sinàptic a partir de dos enzims diferents, la monoamino oxidasa (MAO ; EC 1.4.3.4), tant la forma MAO-A com la MAO-B, que desamina la dopamina a àcid dihidroxifenilacètic (DOPAC) i la catecol-O-metiltransferasa (COMT)

que metila la dopamina lliure de l'espai sinàptic a 3-metoxitiramina (3MT). La 3MT i la DOPAC són posteriorment degradades fins a l'obtenció de l'àcid homovanílic (HVA), metabòlit quantitativament més important de la dopamina. D'altra banda, la dopamina pot transformar-se en noradrenalina per l'enzim dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (D $\beta$ H; EC 1.14.17.1), la qual es transforma en adrenalina per l'enzim feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT; EC 2.1.1.28). La noradrenalina es metabolitzarà alliberant els metabòlits 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG) i àcid vanilmandèlic (VMA). L'HVA i el VMA són els metabòlits estables de la dopamina i noradrenalina, respectivament i ambdós compostos seran transportats del SNC cap al sistema perifèric mitjançant un transportador específic d'anions orgànics (anomenat OAT), localitzat al plexe coroïdal de la barrera hematoencefàlica (BHE). En concret és el OAT tipus 3 el que possibilita aquest traspàs dels metabòlits HVA i VMA, així com d'altres substàncies de desfet, cap a la sang perquè posteriorment siguin eliminats per via renal (Nagle et al 2013).

Les principals rutes bioquímiques són representades a la **Figura 3**.



**Figura 3.** Via de síntesi de la dopamina. TH: tirosina hidroxilasa, BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina, AADC: L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa, PLP: piridoxal fosfat, 3-OMD: 3-ortometildopa, MAO: monoaminoxidasa, COMT: catecol-O-metiltransferasa, 3-MT: 3-metoxitiramina, DOPAC: àcid dihidroxifenilacètic, HVA: àcid homovanílic, DBH: Dopamina β-hidroxilasa, Cu: coure, PNTM: feniletanolamina N-metiltransferasa, MHPG: 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol, VMA: àcid vanilmandèlic. En vermell es mostren els metabolïts analitzats en líquid cefaloraquídi.

Cal tenir present però, que a banda de l'important paper que tenen els enzims relacionats amb el metabolisme dopaminèrgic, aquests també necessiten de cofactors per funcionar correctament. Cada cofactor té la seva pròpia ruta metabòlica i qualsevol defecte en algun dels seus passos pot provocar una deficiència del mateix i, per tant, una alteració en els nivells de dopamina i/o altres substàncies que depenguin del cofactor. Els cofactors en qüestió són la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), el piridoxal fosfat (PLP) i el coure (Cu<sup>2+</sup>), sent cofactors de la TH, AADC i DBH,

respectivament (Figura 3). Els cofactors de la TH i AADC seran objectius d'aquesta tesi i seran estudiats en les seccions 2 i 3 de la introducció. El  $\text{Cu}^{+2}$  és el cofactor necessari per l'enzim  $\text{D}\beta\text{H}$ . Deficiències en aquest oligoelement, per exemple per la malaltia de Menkes, poden provocar una disminució dels nivells de noradrenalina i un augment dels nivells de dopamina provocant un clínica de sobreexcitació dopaminèrgica (Kaler et al. 2013).

### **1.3. L'àcid homovanílic, com a principal metabòlit del metabolisme dopaminèrgic.**

L'HVA és quantitativament el metabòlit més important de la via dopaminèrgica ja que representa el catabòlit més estable de la dopamina (Hyland et al. 2003, Figura 2). La quantificació dels seus nivells en líquid cefaloraquídi (LCR) pot orientar-nos sobre el reciclatge i metabolisme de la dopamina que hi ha a les zones cerebrals dopaminèrgiques més actives, les àrees nigroestriatal i mesolímbica -mesocortical (Kurian et al. 2011<sup>b</sup>) (Figura 2).

No obstant això, el paper de l'HVA va molt més enllà de reflectir la síntesis i catabolisme de la dopamina, ja que les seves alteracions en LCR, ja siguin per excés o disminució, poden representar diferents situacions patològiques (Figura 4):

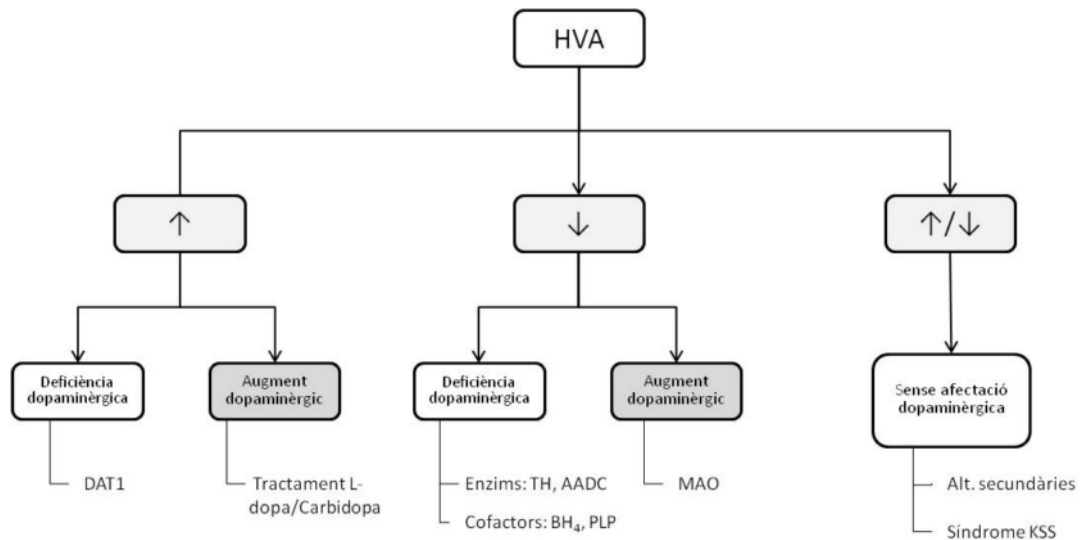
- Valors alts d'HVA, poden reflectir:
  - Tractament amb precursors dopaminèrgics. En aquesta situació la quantificació de l'HVA en LCR és útil per monitoritzar l'estat dopaminèrgic.
  - Defecte dopaminèrgic per absència del transportador específic DAT1, que permet la recaptació de dopamina de l'espai sinàptic a la neurona

dopaminèrgica pre-sinàptica (veure punt 1.4.2 de la introducció).

D'aquesta manera s'evita la degradació excessiva de dopamina i

conseqüentment l'alliberació massiva de HVA.

- Valors molt baixos d'HVA, poden reflectir:
  - Excés dopaminèrgic, per absència dels enzims relacionats en el catabolisme de la dopamina cap a HVA. Ex: Deficiència de MAO (veure punt 1.4.1 de la introducció).
  - Deficiència dopaminèrgica, per absència d'els enzims o bé dels cofactors relacionats en la síntesis de dopamina. Ex: Deficiència de TH i de la AADC cursen amb nivells molt baixos d'HVA en LCR (veure punt 1.4.1 de la introducció). Les deficiències dels cofactors (BH<sub>4</sub> i PLP) també cursen amb nivells baixos, encara que no tant com les enzimàtiques.
- Valors alts o baixos d'HVA sense reflectir una alteració dopaminèrgica. És una situació relativament freqüent, observada en varies malalties neurològiques que de manera secundària poden afectar a la generació d'HVA sense anar acompanyades d'una simptomatologia dopaminèrgica. A algunes malalties genètiques també poden causar un cúmul d'HVA sense aparició d'una disfunció dopaminèrgica. Un exemple és la síndrome de Kearns-Sayre on s'hipotitza una alteració en les proteïnes encarregades de la neurotransmissió a causa d'un defecte energètic, provocant un augment del catabolisme dopaminèrgic al espai intersinàptic (Tondo et al. 2011, Serrano et al. 2010).



**Figura 4.** Digrama relació entre concentracions d'HVA i estat dopaminèrgic

La quantificació del HVA en d'altres matrius biològiques, com la orina o la sang, no són fluids òptims per valorar l'estat dopaminèrgic cerebral (Marin-Valencia et al. 2008, Hyland et al. 1993) ja que s'ha demostrat que no existeix una correlació entre els valors d'HVA a nivell perifèric i central. L'anàlisi de les catecolamines (dopamina i noradrenalina), les metanefrines lliures, o fraccionades, juntament amb la quantificació d'VMA, en orina i/o plasma té importància quan hi ha sospita tumoral a les glàndules adrenals, com el neuroblastoma i feocromocitoma (Lenders et al. 2002).

#### 1.4. Errors congènits en el metabolisme de la dopamina

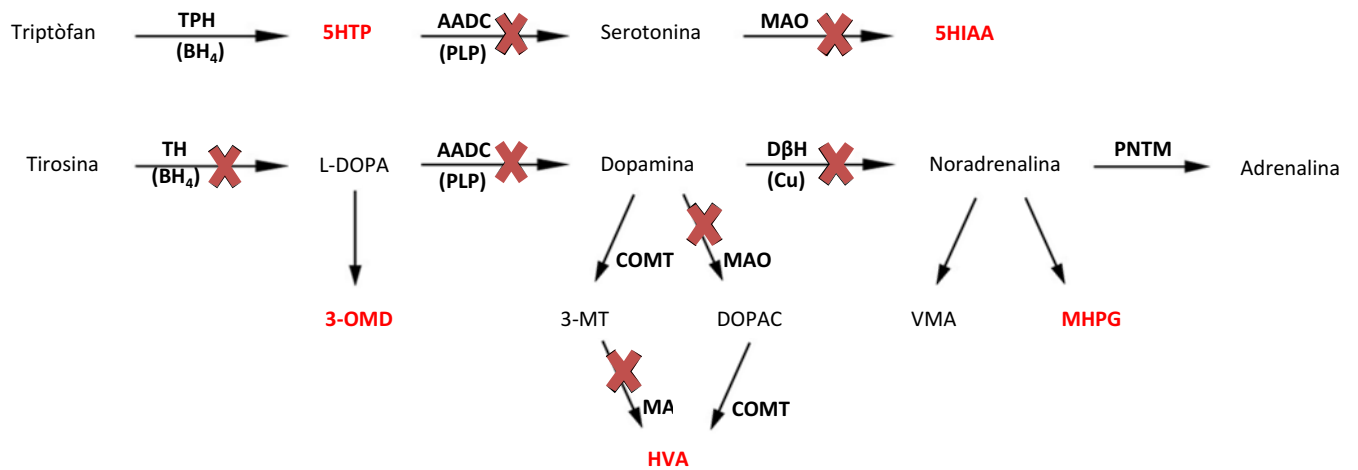
Hi ha descrit es diverses malalties genètiques que causen deficiència de ls enzims, cofactors i transportadors que participen en la síntesis, degradació i paper com a neurotransmissor, de la dopamina. Aquestes malalties "genètico-metabòliques" són considerades com a malalties minoritàries ja que són de molt baixa prevalença. Per definició, les malalties minoritàries són un conjunt molt ampli i heterogeni de condicions patològiques que poden afectar a tots els trams d'edat. S'estima que hi ha unes 8000 malalties minoritàries, i que la meitat d'elles tenen un origen genètic amb

debut a l'edat pediàtrica. La majoria d'elles presenten uns trets comuns: són malalties greus, amenaçants per la vida, multisistèmiques i molt discapacitants. Dins la Unió Europea s'ha establert un límit epidemiològic per definir aquestes malalties fins a cinc casos per cada 10.000 habitants, és a dir 1 cas per cada 2.000 habitants.

#### 1.4.1 Deficiències enzimàtiques

Fins a dia d'avui s'han descrit 4 deficiències enzimàtiques implicades directament en la biosíntesi i metabolisme de la dopamina. La deficiència de tirosina hidroxilasa (TH), la de L -aminoàcid aromàtic descarboxilasa (AADC), la de monoamina oxidasa (MAO) i la de dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (D $\beta$ H). Clínicament, la simptomatologia i l'edat de presentació d'aquests quatre defectes és bastant heterogènia (Hoffmann et al. 1998). Els pacients amb deficiències de TH i AADC acostumen a debutar a l'edat pediàtrica tenint una simptomatologia bastant similar. No obstant això, l'AADC també participa en el metabolisme de la serotonina, fent que la seva deficiència afecti també a la via serotoninèrgica. D'altra banda, els pacients amb defectes de la MAO i D $\beta$ H debuten més tard (a l'adolescència i edat adulta) i la seva clínica és totalment diferent.

A la **Figura 5** es mostren aquestes 4 deficiències i quins metabòlits dels NT es troben alterats, a partir dels quals es pot fer una primera sospita diagnòstica, des del punt de vista bioquímic.



**Figura 5:** Deficiències enzimàtiques de la via serotoninèrgica i dopaminèrgica. El metabolisme de la serotonina s'inicia a partir de l'aminoàcid triptòfan que per l'enzim triptòfan hidroxilasa (TPH) dona lloc al metabòlit 5-hidroxitriptòfan (5HTP). Aquest per l'acció de l'AADC origina la serotonina. Aquesta es metabolitzarà a àcid 5-hidroxiindolacètic (5HIAA), metabòlit quantitativament més important. Així l'HVA i el 5HIAA són els metabòlits finals de les vies dopamina i serotonina i tenen gran valor diagnòstic.

La deficiència de TH cursa amb: ↓HVA, ↓MHPG i valors normals de 5HIAA i 5HTP.

La deficiència de AADC cursa amb: ↓5HIAA, ↓HVA, ↓MHPG, ↑5HTP, ↑3-OMD.

La deficiència de DβH cursa amb: ↑HVA, ↓MHPG i valors normals de 5HIAA i 5HTP.

La deficiència de MAO cursa amb: ↓HVA, ↓5HIAA.

El diagnòstic precoç d'aquestes malalties possibilita la instauració d'un tractament que consisteix en administrar precursors de la dopamina ( L-dopa) i/o de la serotonina (5HTP) en aquells errors on hi hagi deficiència de dopamina (defectes de TH o AADC) i serotonina (defecte d'AADC). La resposta dels pacients al tractament dependrà de l'edat de diagnòstic i de l'afectació neurològica al moment del diagnòstic.

Bioquímicament, el diagnòstic es realitza en LCR per l'anàlisi de cinc metabòlits: 3-OMD, 5HTP, MHPG, 5 HIAA i HVA (Figura 5, marcats en vermell ), ja que com hem comentat anteriorment, la orina i al sang no són fluids òptims per l'estudi dels defectes dopaminèrgics cerebrals.



A més, per obtenir uns resultats fiables i que ens permetin diagnosticar els pacients, és necessari seguir un protocol estandarditzat d'extracció de la mostra, ja que existeix un gradient rostral-caudal del LCR, així i com variacions diürnes dels metabòlits de la dopamina i serotonina en LCR (Hyland et al. 1993, Ormazabal et al. 2003). Aquests factors poden causar variacions en les concentracions dels NT i per tant interpretacions errònies dels resultats. És per aquesta raó que es fa absolutament necessari establir uns valors de referència propis d'aquells metabòlits que presenten gradient rostral-caudal, i, a més a més, que els resultats dels pacients en estudi es comparin amb la mateixa fracció de LCR estudiada en els pacients control (Hyland et al. 2008, Ormazabal et al. 2005). D'altra banda, existeixen altres situacions com malformacions en el SNC o alguns tractaments farmacològics (antiepilèptics) que poden causar alteracions secundàries a la via dopaminèrgica (Clayton 2006). Tanmateix, ja ha estat demostrat que hi ha una correlació negativa entre la concentració de NT amb l'edat, sent molt més acusada els primers mesos de vida. Les altes concentracions d'HVA i 5 HIAA són necessàries per la regulació del metabolisme durant la mitosis, neurogènesis, migració i formació de la ret dopaminèrgica neuronal al període postnatal (Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). Aquesta correlació amb l'edat fa que s'hagin d'establir diferents valors de referència de cada rang d'edat (Komori et al. 1999, Hyland et al. 2003).

#### - **Deficiència de Tirosina hidroxilasa**

La deficiència de TH (MIM\*191290) és una malaltia genètica autosòmica recessiva que causa deficiències en les concentracions de dopamina, adrenalina i noradrenalina. El gen implicat (*TH*) es troba localitzat al cromosoma 11p15.5, i ja s'han

descriu més de 100 mutacions relacionades amb aquesta malaltia (Willemsen et al. 2010, sbSNP on *pubmed website*).

Clínicament existeixen dos fenotips: un fenotip més lleu on els pacients debuten al primer any de vida amb una síndrome rígida -hipocinètica i distonia generalitzada (tipus A), mentre que l'altre fenotip és més sever que cursa amb una encefalopatia durant el període perinatal amb fluctuacions diürnes i alteracions del sistema autonòmic (tipus B) (Willemsen et al. 2010). Tot i així, ambdós fenotips presenten crisis oculogires, parkinsonisme, distonia (contraccions involuntàries dels músculs) amb variació diürna, tremolor, hipokinesia, hipotonia (disminució de la força muscular), ptosis bilateral (relaxament dels músculs de les parpelles), irritabilitat i discapacitat intel·lectual (Grattan-Smith et al. 2002). Aquests pacients responen habitualment de manera positiva al tractament amb dosis variables de L-dopa i carbidopa (inhibidor de l'AADC perifèrica per garantir l'accés de la L-dopa al cervell). No obstant això, els efectes secundaris observats en aquest tractament limiten i dificulten la instauració de la dosi final.

Bioquímicament els pacients presenten valors disminuïts en LCR d'HVA, 3-OMD i MHPG (Figura 5), mentre que els nivells de pterines, tirosina i altres metabòlits en LCR es mantenen inalterats (Marin -Valencia et al. 2008). La quantificació d'HVA, 3-OMD i MHPG en orina és una metodologia que condueix errors de diagnòstic ja que poden trobar-se valors dins dels rangs de referència (Bräutigam et al. 1998, Wevers et al. 1999 i Hoffman et al. 2003<sup>b</sup>). Paral·lelament, és freqüent trobar valors de prolactina en plasma elevats, degut a una disminució de l'efecte inhibitor que exerceix la dopamina enfront la prolactina en la neurohipòfisi. La majoria de les mutacions descrites es

troben localitzades a nivell transcripcional del gen TH, encara que també s'han descrit mutacions en la zona promotora (Ribasés et al. 2007 , Willemsen et al. 2010 ). Aquest últim cas i d'altres 12 casos han estat estudiats i confirmats genèticament a l nostre departament. **(Taula annex).**

- ***Deficiència de la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics***

És una malaltia autosòmica recessiva (MIM\*107930) on el gen implicat ( AADC) es localitza al cromosoma 7p12.1 -p12.3. Aquesta entitat combina una deficiència dopaminèrgica i serotoninèrgica, ja que l'enzim AADC participa al metabolisme d'ambdues vies (Figura 5).

Clínicament aquests pacients debuten de manera primerenca al primer any de vida observant-se crisis oculogires, parkinsonisme, distonia amb variació diürna, tremolor, hipokinesia, hipotonia, ptosis bilateral, sudoració, inestabilitat tèrmica, corea, irritabilitat i retard mental (Maller et al. 1997). El tractament d'aquests pacients es basa en l'administració d'agonistes dopaminèrgics i inhibidors de la MAO per tal de mantenir la via serotoninèrgica activa.

Bioquímicament, els pacients presenten valors disminuïts d'HVA i 5 HIAA (principal metabòlit de la via serotoninèrgica) amb una elevació important de 3-OMD i 5HTP (metabòlits precursors de la dopamina i serotonina). Els nivells dels cofactors que participen en la via no es veuen afectats (Hyland et al.1992). Al diagnòstic definitiu s'hi arriba per l'estudi de l'activitat enzimàtica de l'AADC en plasma, que es troba disminuïda entre un 16 -55% (Hyland et al. 1992) i la troballa de mutacions en el gen afectat, on s'han descrit unes 30 mutacions diferents (*Genetic Association Database*). La incidència d'aquesta malaltia sembla ser més elevada que la deficiència de TH,

especialment en països orientals on inclús han observat un fenotip peculiar, amb mans i peus més petits (Lee et al. 2009). Tot i així, la nostra experiència no confirma aquesta incidència ja que en el nostre laboratori només hem pogut identificar fins a tres pacients, sent un d'aquests l'únic cas de deficiència d'AADC a l'estat espanyol. (**Taula annex)**

#### - **Deficiència de MAO**

La MAO té un paper important en la desaminació de les amines biògenes. Existeixen dues isoformes d'aquest enzim, la MAO -A i la MAO -B, que mostren afinitat per substrats i inhibidors diferents. Els gens que originen les dues isoformes es troben al braç curt del cromosoma X (Lenders et al. 2002). La pèrdua combinada d'ambdues activitats (deficiència MAO -AB combinada) ha estat descrita en alguns pacients que presenten deleccions al cromosoma X amb Malaltia de Norrie (MIM\*300658). Així mateix, a banda de la clínica deguda a la pròpia malaltia de Norrie, com la ceguera i sordesa, s'hi combina una profunda discapacitat intel·lectual, comportament autista, convulsions tòniques, funcions del sistema autonòmic alterades i tot el metabolisme de les amines biògenes alterat (Collins et al. 1992). La MAO és l'enzim encarregat de transformar la dopamina en DOPAC i la 3 -MT en HVA (Figura 3). Diversos estudis demostren que les deficiències específiques de MAO-B no provoquen un fenotip clínic concret, i que per tant no estaria associada amb alteracions de comportament. Aquesta absència d'alteracions clíniques i la normalitat dels nivells de metabòlits dels neurotransmissors indiquen que la isoforma més metabòlicament activa i important és la MAO-A (Lenders et al. 2002). No obstant això, encara no hi ha suficients treballs que demostrin la relació dels nivells d'HVA amb l'activitat de la MAO -A, havent-hi resultats

contradictoris tant en població adulta com en pediàtrica (Marin -Valencia et al. 2008). Dins la nostra experiència hem pogut estudiar fins a dos casos de dèficit de MAO -AB combinada. Un pacient de l'estat espanyol i un pacient del Hospital Sofia de Grècia, amb el qui col·laborem estretament. Bioquímicament van presentar valors d'HVA extraordinàriament baixos encara que el mecanisme fisiopatològic més important sigui probablement una acumulació de dopamina (**Taula annex**).

#### - **Deficiència de la dopamina beta hidroxilasa**

La deficiència d'aquest enzim (MIM \*609312) és una malaltia rara que es caracteritza per una alteració primària del sistema nerviós autònom, atès que hi ha nivells baixos de noradrenalina. La clínica acostuma a aparèixer al final de l'adolescència amb una hipotensió ortostàtica molt severa, ptosis ocular, congestió nasal i disfunció sexual. Bioquímicament es caracteritza per una depleció de catecolamines (noradrenalina i adrenalina) i elevació de dopamina en sang. Les concentracions d'HVA en LCR dels pocs pacients diagnosticats no estan reportades, tot i que s'esperaria trobar valors elevats d'HVA i nivells disminuïts de MHPG en LCR (Hyland et al. 2002<sup>a</sup>). Creiem que, probablement, a causa de l'edat de debut d'aquests pacients i de la seva presentació clínica extra-neurològica no hem diagnosticat cap pacient amb dèficit de DBH a la nostra població pediàtrica.

#### **1.4.3. Defectes del transport de dopamina**

##### - **Dèficit transportador específic de dopamina (DAT).**

La major part de dopamina que és recaptada de l'espai sinàptic per ser retornada a la neurona pre-sinàptica, es fa utilitzant un transportador específic de dopamina, anomenat DAT. Aquest transportador forma part de la família de les proteïnes

transmembrana dependent de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  tipus 6 (SLC6, *solut carrier 6*) (Blackstone 2009) sent el gen que codifica per aquest transportador el *SLC6A3* (o gen DAT1). La deficiència de DAT (MIM \*126455) és una malaltia recessiva de la que s'han descrit molt pocs pacients, els quals van debutar en l'edat infantil presentant una distonia i una clínica de parkinsonisme (lentitud en els moviments, rigidesa muscular i tremolor en repòs) (Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). Tot i tenir una simptomatologia de dèficit dopaminèrgic molt similar als defectes primaris de la dopamina, presenten una característica bioquímica que els fa diferenciar dels errors congènits del metabolisme (ECM) de la dopamina. En els defectes de DAT s'observen valors elevats d'HVA en LCR i una ràtio HVA/5HIAA elevada, fins a valors de 13 (valors normals: 1,2 a 4,0). Aquesta troballa es deu a que l'excés de dopamina en l'espai sinàptic és metabolitzada pels enzims MAO i COMT fins a l'obtenció del producte final, HVA. El fet que el defecte de DAT no influeixi en els valors de la serotonina, els productes del seu metabolisme (5HIAA) no estaran augmentats, fent que la ràtio HVA/5-HIAA s'elevi considerablement. A més a més, l'escassa recaptació de dopamina provoca un esgotament de les vesícules dopaminèrgiques. L'excés de dopamina per una banda provoca l'estimulació dels autoreceptors presinàptics D2, els quals per feedback negatiu, inhibeixen la TH, provocant una disminució de la síntesi de dopamina. D'altra banda aquest sobre excés de dopamina també té un efecte sobre els receptors postsinàptics, provocant una desensibilització i/o inhibició d'aquests i per tant una disminució l'efecte dopaminèrgic (Kurian et al. 2011<sup>b</sup>). Dins la nostra experiència al laboratori, actualment s'està fent l'estudi genètic a un laboratori extern (Hospital Great Ormond Street de Londres) de pacients seleccionats per clínica i bioquímica

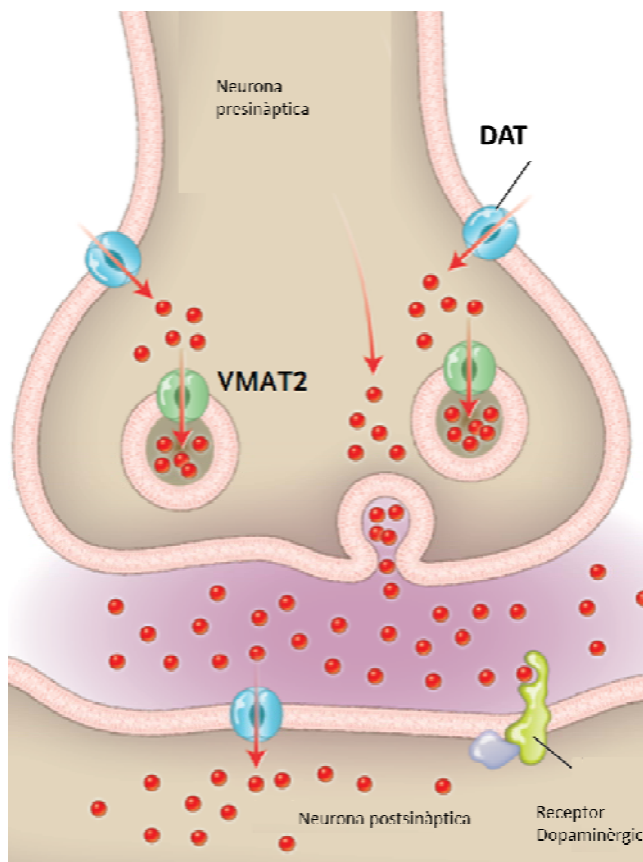
compatible amb un dèficit de DAT. Aquesta malaltia és el paradigma de com valor elevats de HVA poden significar una deficiència de dopamina.

- ***Dèficit de transportador membrana vesicular amines biògenes (VMAT2).***

El transportador de membrana vesicular d'amines biògenes (VMAT2) es troba regulat pel gen *SLC18A2* (*solut carrier 18A2*) i té la funció d'introduir les amines biògenes (dopamina i serotonina) dins les vesícules de les neurones pre-sinàptiques.

Des del punt vist clínic, el dèficit de VMAT2 (MIM\*126455) causa un trastorn en el moviment (distonia, parkinsonisme i crisis oculogires) per dèficit dopaminèrgic, una disfunció del sistema nerviós autonòmic (diaforesis, desregulació temperatura, ptosis palpebral i hipotensió postural) per dèficit d'eficiència noradrenèrgica i adrenèrgica i alteracions psiquiàtriques per la deficiència serotoninèrgica. Clínicament presenta un fenotip molt similar a la deficiència d'AADC, diferenciant-se d'aquesta entitat principalment per l'absència de l'empitjorament clínic a les nits (característica observada en la deficiència AADC a causa de la insuficient producció de NT) (Pons et al. 2004). Tot i que aquesta clínica ens indica un error en la transmissió sinàptica, no s'han descrit alteracions en LCR de les concentracions dels metabòlits de les dues vies afectades, dopamina i serotonina (Rillestone et al. 2013). No obstant això, el treball de Rillestone recomana l'anàlisi de 3-O-MD i VMA en orina, ja que de la mateixa manera que ocorre en la deficiència d'AADC, el VMAT2 s'expressa fora del SNC (sistema nerviós perifèric, medulla adrenal i plaquetes). D'aquesta manera, els metabòlits de les amines biògenes podrien estar alterats en orina i utilitzar aquest fluid per estudiar ambdós defectes. Al diagnòstic definitiu s'hi arriba per l'anàlisi molecular. Aquests pacients responen favorablement bé al tractament amb agonistes dopaminèrgics,

encara que no presenten millores clíniques amb teràpia substitutiva L-dopa/carbidopa o amb suplementes de vitamina B<sub>6</sub>.



**Figura 6.** Transmissió sinàptica de la dopamina. Les boles vermelles simbolitzen la dopamina. El transportador vesicular d'amines biògenes (VMAT2) introdueix la dopamina a les vesícules. Aquestes alliberen el seu contingut a l'espai sinàptic per tal que la dopamina pugui activar els seus receptors (post- i pre-sinàptics). La dopamina pot ser recaptada pel transportador DAT cap a la neurona pre-sinàptica. DAT: transportador tiamina. VMAT2: transportador vesicular d'amines biògenes. *Imatge modificada de Rillstone 2013.*

### 1.5. Altres alteracions secundàries

Cada vegada es van descrivint més entitats clíniques que, de manera secundària, poden causar una alteració en les vies dopaminèrgiques i també en la d'altres amines biògenes. Les concentracions d'HVA i 5-HIAA en LCR en aquests pacients es troben fora dels valors de referència, encara que no presenten uns valors tant extremadament alterats com a les deficiències primàries (Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). Aquestes alteracions poden tenir un origen genètic o no. Dins les patologies genètiques on s'ha demostrat una alteració dopaminèrgica hi ha les alteracions del metabolisme del folat, la fenilcetonúria, la Síndrome de Lesch-Nyhan, les malalties mitocondrials, la síndrome opsoclon-mioclono, la hipoplàsia pontocerebelar, la



síndrome de Rett i les leucodistrofies (Garcia Cazorla et al. 2007). Les epilèpsies, l'asfíxia perinatal, els espasmes infantils, l'autisme i les alteracions neuromusculars són entitats clíniques d'origen sindròmic de les que també s'ha descrit disminucions dels valors del HV A (Garcia-Cazorla 2008, Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). Els diferents treballs publicats remarquen la gran vulnerabilitat que tenen els noutats en les primeres etapes de la vida respecte al funcionalisme dopaminèrgic. En aquest període de vida les neurones dopaminèrgiques estan en un profund creixement i expansió cerebral (Herlenius et al. 2004). Per tant, qualsevol pertorbació cerebral en aquesta edat pot provocar una modificació de la programació neuronal dopaminèrgica provocant alteracions tant neurològiques com de maduració de la ret neuronal (Herlenius et al. 2004, Kurian et al. 2011<sup>a</sup>). Tot i que s'està reconeixent la importància de la detecció d'estat de deficiència dopaminèrgica en malalties neurològiques, l'experiència en aquesta àrea de la neuropediatria és encara molt novella, havent-hi molt pocs treballs amb series llargues de pacients que analitzin aquesta qüestió.

## **2. Cofactors de la via dopaminèrgica (I): Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)**

### **2.1. Principals funcions de la tetrahidrobiopterina**

Les pterines són components que contenen un anell 2-amino-4-oxo-priazina-pirimida (pterina), que deriven de la guanosina trifosfat (GTP) per via d'una ciclohidrolasa magnesi dependent. La BH<sub>4</sub>, és una pterina, que és cofactor del primer pas del metabolisme de la dopamina regulat per l'enzim TH. Tanmateix, també participa com a cofactor en d'altres rutes metabòliques com en la síntesi de serotonina (cofactor de la triptòfan hidroxilasa (TPH) (Figura 5), en el metabolisme de la fenilalanina (cofactor de la fenilalanina hidroxilasa (PAH; EC 1.14.16.1), l'òxid nítric

sintasa (EC 1.14.13.165) i la gliceril-èter monoxigenasa (EC 1.14.16.5) (**requadre de la Figura 7**). D'aquesta manera, una deficiència de  $BH_4$  no només comprometria la via dopaminèrgica sinó també d'altres rutes provocant malalties com la hiperfenilalaninèmia.

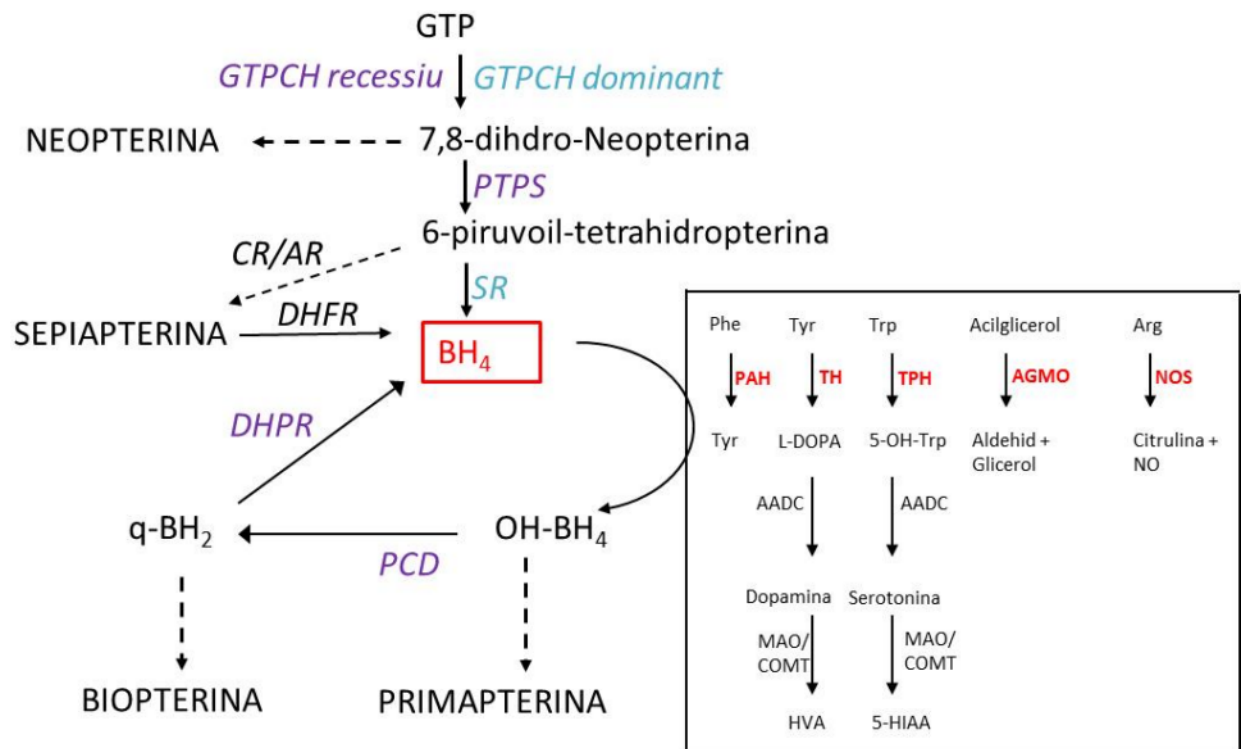


Figura 7. Metabolisme de la  $BH_4$  i reaccions en les que intervé com a cofactor (requadre). En vermell es marquen els enzims que depenen de la  $BH_4$ . En lila es mostren els enzims del metabolisme de la  $BH_4$  que quan estan deficitaris cursen amb una hiperfenilalaninèmia plasmàtica. En blau es mostren els enzims, la deficiència dels quals no cursen amb elevacions de fenilalanina en sang. PAH: fenilalanina hidroxilasa; TH: tirosina hidroxilasa; TPH: triptòfan hidroxilasa; AGMO: gliceril-èter monoxigenasa; NOS: òxid nítric sintasa.

## 2.2. Metabolisme de les pterines i biomarcadors: biopterina i neopterina

La biosíntesis de la  $BH_4$  s'inicia amb la conversió de la GTP a 7,8 -dihidro-neopterina per l'enzim guanosina trifosfat cicloh idrolasa (GTP-CH; EC 3.5.4.16). Posteriorment, la 7,8 -dihidro-neopterina per l'enzim p iruvoil-tetrahydropterina sintasa (PTPS; EC 4.2.3.13) es transforma amb la 6 -piruvoil-tetrahydropterina, la qual dona lloc

a la forma final de  $\text{BH}_4$  per l'enzim sepiapterina reductasa (SR ; EC 1.1.1.325). Els metabòlits de síntesis són la neopterinina (NP), alliberada a la primera reacció, i la biopterina (BP), alliberada una vegada la  $\text{BH}_4$  ja ha actuat com a cofactor i s'ha oxidat a hidroxitetrahidrobiopterina ( $\text{OH-BH}_4$ ). Aquesta forma oxidada és transformada de nou a  $\text{BH}_4$  per un sistema de reciclatge on hi participen dos enzims addicionals, la pterina-4 $\alpha$ -carbinolaminadehidratasa (PCD; EC 4.2.1.96) i la dihidropterinreductasa (DHPR ; EC 1.6.99.7). La PCD catalitza una primera reacció de reducció transformant la  $\text{OH-BH}_4$  a  $\text{q-BH}_2$ . L'últim pas de reciclatge és conduït per la DHPR que renovarà la molècula de  $\text{BH}_4$  (**Figura 7**). Els valors de  $\text{BH}_4$  es mantindran constants gràcies a la pròpia via de síntesi *de novo* i a les reaccions de reciclatge (Marin-Valencia et al. 2008) i ambdues vies són necessàries para una correcta funció del  $\text{BH}_4$ . Cal mencionar que encara que la SR sigui suficient per completar la síntesi *de novo* de la  $\text{BH}_4$  existeix una ruta alternativa regida per dues reductases (carbonil i aldosa reductases, CR i AR, respectivament) que permet en sintetitzar la  $\text{BH}_4$  en teixits perifèrics. Si es segueix aquesta variant metabòlica es necessita d'un altre enzim, la dihidrofolatreductasa (DHFR; EC 1.5.1.3) per finalitzar la biosíntesis de  $\text{BH}_4$ . L'expressió de DHFR és diferent segons el teixit, trobant-se a baixes concentracions al cervell. És per aquest motiu, que davant d'una deficiència genètica de SR, la síntesi de  $\text{BH}_4$  cerebral no es pot finalitzar atès la baixa expressió d'aquestes reductases al cervell (Blau et al. 2003<sup>a</sup>) però en canvi sí que ho pot fer a nivell perifèric gràcies a l'activació de la ruta alternativa.

### **2.3. Neopterinina i biopterina, com a marcadors dels ECM de la $\text{BH}_4$**

El fet que la NP sigui un metabòlit de síntesis i la BP ho sigui de la via de reciclatge de la tetrahidrobiopterina, fa que les seves determinacions en LCR, conjuntament amb la dels NT (HVA i 5-HIAA), siguin de gran utilitat pel diagnòstic bioquímic dels ECM de les pterines. Les deficiències primàries de les pterines poden dividir-se en dos subgrups. Les que cursen amb hiperfenilalaninèmia i les que no. Dins els ECM de pterines amb hiperfenilalaninèmia s'hi engloben 4 entitats diferents: la deficiència recessiva de GTP-CH (MIM\*600225), la deficiència de PTPS (MIM\*612719), la deficiència de PCD (MIM\*126090) i la deficiència de DHPR (MIM\*612676). Una deficiència de qualsevol d'aquests quatre enzims causarà una disminució dels nivells de BH<sub>4</sub> que es traduirà en un mal funcionament dels enzims que depenen d'ella com a cofactor, entre ells la TH, la TPH i la PAH. D'aquí que la determinació de la fenilalanina en sang, que s'utilitza en els programes de diagnòstic precoç neonatal d'arreu del món (Hyland et al. 2008, Blau et al. 2003<sup>a</sup>), sigui una eina essencial per la detecció d'aquests defectes. L'elevació de fenilalanina podrà ser provocada per un error enzimàtic primari de la PAH (fenilcetonúria clàssica, MIM\*612349) o bé per una deficiència de BH<sub>4</sub> a causa d'una alteració en els següents enzims: GTP-CH, PTPS, PCD o DHPR (enzims marcats en lila a la **Figura 7**). Totes elles són malalties autosòmiques recessives. La deficiència d'un d'aquests quatre enzims causa ECM potencialment greus si no són tractats de forma precoç, ja que a part d'haver-hi un increment dels nivells de la fenilalanina també hi ha una deficiència dels NT, dopamina i serotonina. La incidència d'aquests quatre ECM dins la població de pacients amb hiperfenilalaninèmia és molt baixa (1/200). Són pacients que es tracten amb BH<sub>4</sub>, juntament amb una dieta controlada en proteïnes (baixa proporció en fenilalanina segons la resposta a la BH<sub>4</sub>). A

més a més, reben suplementes de L-dopa/carbidopa i 5 HTP per estimular la síntesi de dopamina i serotonina, respectivament, atès que la BH<sub>4</sub> no passa la BHE. Pel que fa a la nostra experiència, i sent hospital de referència de la fenilcetonúria, fins ara no hem diagnosticat cap pacient a Catalunya amb hiperfenilalaninèmia a causa d'algun dels 4 ECM mencionats anteriorment.

En referència als ECM de la tetrahidrobiopterina que cursen sense hiperfenilalaninèmia, s'hi engloben dues malalties, la deficiència dominant de GTP-CH (MIM\*600225) i la deficiència de SR (MIM\*182125), d'herència autosòmica recessiva (enzims marcats en blau a la **Figura 7**). Aquestes no són detectables pels programes de detecció precoç i afecten exclusivament al SNC (Blau et al. 2003<sup>a</sup>, Hyland et al. 2008). Per tant, el diagnòstic bioquímic es realitza per quantificació en LCR de pterines (NP i BP) i dels NT. Al llarg dels anys que portem analitzant LCR hem pogut diagnosticar fins a 4 deficiències de GTP-CH autosòmiques dominants i un pacient amb deficiència de SR (**Taula annex**). A la **Taula 1** es resumeix el perfil bioquímic en LCR dels sis ECM de les pterines.

Deficiència	Phe pl	SP	NP	BP	Primafterina	HVA	5HIAA	5-MTHF
GTP-CH r	↑	N	↓↓	↓↓	N	↓↓	↓↓	N
GTP-CH d	N	N	↓	↓	N	↓	↓/N	N
PTPS	↑	N	↑↑	↓↓	N	↓↓	↓↓	N
SR	N	↑	N	↑	N	↓↓	↓↓	N
PCD	↑	N	N	↑	↑↑	↓↓	↓	N
DHPR	↑	N	N	↑	N	↓↓	↓↓	↓

Taula 1. Perfil bioquímic de pterines, NT i metiltetrahidrofolat (MTHF) en LCR dels sis ECM relacionats amb les pterines. La columna ombrada permet classificar els ECM de les pterines en dos grups, tinguin o no, la fenilalanina elevada en plasma (Phe pl). La determinació de 5-MTHF en LCR ajuda a fer el diagnòstic bioquímic dels ECM de les pterines que cursen amb hiperfenilalaninèmia. GTP-CH r: forma recessiva, d: forma dominant de deficiència de GTP-CH.

#### **2.4. Neopterina, com a marcador d'inflamació i infecció dels sistema nerviós central.**

No obstant la utilitat de les pterines en el diagnòstic dels ECM dels NT i pterines, la NP també pot tenir un gran valor relacionat en el estudi de trastorns del sistema immunitari cel·lular. S'ha evidenciat que l'activitat de l'enzim PTPS en humans i en teixits mamífers, és molt més baixa comparada amb d'altres espècies animals, sent en els macròfags i monòcits les cèl·lules que tenen menys activitat (Werner et al. 1990). A més a més, s'ha demostrat que l'interferó  $\gamma$  estimula directament l'expressió de GTP -CH sense suposar un augment de l'activitat PTPS. L'explicació bioquímica d'aquesta baixa activitat de la PTPS en macròfags encara no ha estat definida, però ha estat demostrat que qualsevol activació de la GTP -CH en macròfags humans està associada a elevacions de NP (Hoffman et al. 2003<sup>a</sup>). Tot això implica que davant d'una situació d'immunoreactivitat (elevacions d'interferó  $\gamma$ ), conduïda pels limfòcits T *helper*, s'observi una gran alliberació de citocines, i per tant un augment dels nivells de NP en els fluids cel·lulars (Dale et al. 2009, Hoffman et al. 2003<sup>a</sup>). Per tant, la NP és un indicador sensible en aquells processos immuno-inflamatoris, on la seva determinació en fluids biològics pot ser de gran utilitat.

Actualment, hi ha pocs estudis que mostrin valors de referència de NP en LCR, i els pocs que hi ha estan orientats a detectar ECM relacionats amb la BH<sub>4</sub> (Millner et al. 1998, Hyland et al. 2003, Ormazabal et al. 2005), havent-hi un buit científic en el valor quantitatiu de la NP en situacions immuno-inflamatòries en l'edat pediàtrica. La literatura relacionada menciona diferents malalties neuropediàtriques que cursen amb elevacions de la NP en LCR: meningitis bacteriana (Kawakami et al. 1996), encefalitis

vírica (Blau et al. 2003<sup>a</sup>), convulsions febrils (Millner et al. 1998), síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) (Blau et al. 2003<sup>b</sup>) i encefalopaties epilèptiques (Duarte et al. 2008).

Dins del grup de trastorn neurològics en la pediatria hi ha un gran percentatge de pacients que acaba tenint un diagnòstic sindròmic sense una etiologia no filiada, on alguns d'aquests presenten elevacions de NP en LCR, evidenciant que podria existir un procés immuno-inflamatori que justificués la simptomatologia neurològica.

### **3. Cofactors de la via dopaminèrgica (II): Vitamina B<sub>6</sub>**

#### ***3.1. Principals funcions de la vitamina B<sub>6</sub>***

La vitamina B<sub>6</sub> és una vitamina hidrosoluble de les complex B essencial pel cos humà i que necessita ser ingerida per la dieta per tal de tenir uns nivells òptims. Existeixen fins a sis formes diferents de la vitamina B<sub>6</sub>, sent el piridoxal fosfat (PLP) la forma activa. El PLP és cofactor de més de 100 reaccions a l'organisme, sent d'especial interès les reaccions que ocorren al SNC relacionades amb el metabolisme dels aminoàcids i NT (Van der Ham et al. 2012), com la dopamina, serotonina, glicina, D-serina, glutamat, gamma-aminobutirat i histamina. Per exemple en el metabolisme dels neurotransmissors dopamina i serotonina, l'AADC depèn directament del PLP. Quan existeix una deficiència primària de PLP (per un dèficit enzimàtic del seu metabolisme) s'observa un augment de la 3-OMD i una disminució de l'HVA i 5 HIAA en LCR.

Altres rols que s'han descrit de la vitamina B<sub>6</sub> estan relacionats en la regulació de la funció immunològica CD4 (Namazy et al. 2003) i activitat antioxidant, atribuint-li una capacitat comparable a les vitamines C i E (Clayton 2006).

### 3.2. Metabolisme i biomarcadors de la vitamina B<sub>6</sub>

Les formes aportades per la dieta són les formes fosfat de la vitamina B<sub>6</sub> (piridoxal fosfat, piridoxamina fosfat i piridoxina glucòsid) que, prèviament a ser absorbides per l'enteròcit, han de ser defosfatades per les fosfatases intestinals (FI) localitzades a la vora en raspall dels enteròcits. A nivell intracel·lular, les tres formes de vitamina B<sub>6</sub> (piridoxal (PL), piridoxamina i piridoxina) seran re-fosforilades per una quinasa i transformades a la forma activa PLP, per l'enzim piridoxamina fosfat oxidasa (PNPO; EC 1.4.3.5). El PLP viatjarà per la sang unit a l'albumina i entrarà a dins les cèl·lules que necessitin de vitamina B<sub>6</sub>, prèvia hidrolització del PLP a PL per la fosfatasa alcalina tissular (EC 3.1.3.1). A nivell cerebral el PL per ell mateix pot travessar la membrana hematoencefàlica. Una vegada dins del SNC serà fosforilat per poder actuar com a cofactor. **Figura 8.**

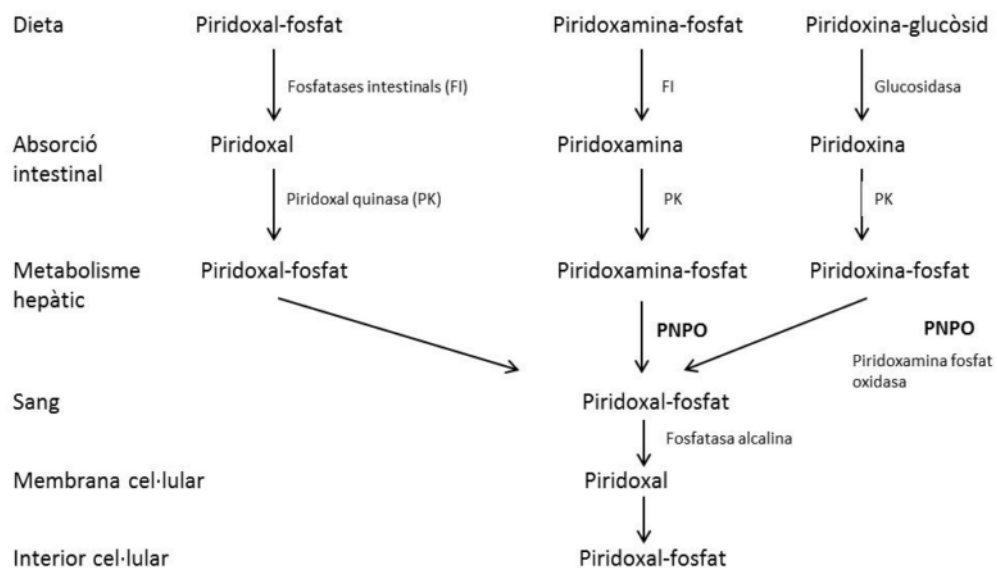


Figura 8. Absorció i metabolisme de la vitamina B<sub>6</sub>. Imatge modificada de Clayton 2006

Una disminució de PLP a nivell cerebral pot tenir conseqüències greus causant alteracions neurològiques, sent la epilèpsia la més rellevant i causada per diferents



mecanismes, principalment per la disfunció GABAèrgica, dependent de PLP (Wang et al. 2005)

Hi ha diferents situacions en l'organisme on el requeriment de vitamina B<sub>6</sub> es troba augmentat. Aquestes situacions són (Clayton 2006): ECM propis de la vitamina B<sub>6</sub>, (dèficit PNPO i hipofosfatàsia), malalties genètiques segrestadores de PLP (com la hiperprolinèmia tipus 2 i l'epilèpsia piridoxina dependent (EPD)), fàrmacs que afecten al metabolisme de la vitamina B<sub>6</sub> (ex: vigabatrina que inhibeix el gen *PNPO* i teofil·lina que inhibeix la fosfatasa quinasa), fàrmacs que s'uneixen a la molècula de PLP, inhibint-lo (ex: isoniazida o penicil·lamina), metabolopaties que afecten els enzims dependents de PLP (com l'AADC o la GABA transaminasa) i altres situacions, com la malaltia celíaca i diàlisi renal.

### **3.3. Piridoxal fosfat, com a marcador de malalties genètiques de la vitamina B<sub>6</sub>**

Dins d'aquest grup tenim els ECM propis de la vitamina B<sub>6</sub> on existeix un dèficit en els enzims que intervenen en la interconversió del PLP: la hipofosfatàsia i dèficit de PNPO. D'altra banda, també hi englobem aquelles entitats que segresten el PLP, provocant dèficit d'aquest en LCR i altres matrius biològiques. Són el dèficit d'antiquitina i la hiperprolinèmia tipus 2.

#### **3.3.1. ECM propis de la vitamina B<sub>6</sub>**

##### **- Hipofosfatàsia**

Aquest trastorn ha estat descrit per ser un ECM relacionat amb un dèficit de l'activitat enzimàtica de la fosfatasa alcalina tissular causada per mutacions al gen *ALPL* (MIM\*171760, Clayton 2006). El perfil bioquímic d'aquests pacients presenten nivells elevats de PLP i disminuïts de PL en plasma, la qual cosa indica un bloqueig en la

defosforilació del PLP a PL ( **Figura 8** ), provocant una disminució de l'accés de PL al cervell (i altres teixits) (Iqbal et al. 1998). Els pocs pacients reportats presenten clínicament convulsions que responen favorablement al tractament amb PL.

- **Dèficit de PNPO**

Aquest trastorn d'herència autosòmica recessiva és provocat per mutacions al gen *PNPO* (MIM\*603287). Tot i que presenta un perfil clínic molt similar a l'dèficit d'antiquitina, aquesta malaltia és més severa, sent el debut neonatal amb convulsions refractàries als anticonvulsivants habituals i resistent al tractament amb piridoxina les característiques més comunes. Aquests pacients responen al tractament de PLP, fent-se totalment necessària la seva immediata administració per evitar conseqüències fatals (Pearl et al. 2013). No obstant això, recentment s'ha descrit un cas atípic amb un fenotip lleuger (Baumgart et al. 2013).

El marcadors bioquímics d'aquesta entitat són, en LCR:

- ↑3-OMD, ↓5HIAA i ↓HVA per bloqueig de l'AADC (Clayton 2006).
- ↑Treonina, per bloqueig de la treonina dehidratasa (Clayton 2006).
- ↑Glicina, per bloqueig de complex enzimàtic de degradació de la glicina (Clayton 2006).

**3.3.2. Malalties segregadores de PLP.**

- **Dèficit d'antiquitina**

Aquest dèficit també és conegut com a epilèpsia piridoxina dependent i és l'ECM de la vitamina B<sub>6</sub> més freqüent. És una malaltia d'herència autosòmica recessiva i les mutacions es troben al gen *ALDH7A1* (MIM\*107323), conegut com el gen *antiquitina*. Aquest enzim actua en el metabolisme de la lisina i el seu dèficit cursa,

bioquímicament, amb cúmul d'àcid pipecòlic,  $\alpha$ -semialdehid aminoadípico ( $\alpha$ -AASA) i piperidina 6'-carboxilat (P6C) en plasma, orina i LCR (Mills et al. 2010, Clayton 2006). La explicació bioquímica del dèficit de vitamina B<sub>6</sub> és que la P6C reacciona amb el PLP per una reacció de Knoevenagel (Plecko et al. 2007), formant un adducte "segrestador" de PLP, i per tant, provocant una deficiència funcional de PLP al SNC (Plecko et al. 2007, Clayton 2006, Pearl et al. 2013) (**Figura 9.a**). La forma més comuna de debut d'aquests pacients són convulsions d'origen desconegut, refractàries als anticonvulsivants, abans dels tres anys d'edat i que responen extraordinàriament bé al tractament amb piridoxina, sent l'espectacular cessió de les convulsions un dels diagnòstics clínics més valuosos (Clayton 2006). No obstant això, també s'han descrit formes atípiques de EPD de debut més tardà (Milh et al. 2012, Pérez et al. 2013). Reconèixer aquesta última entitat es fa veritablement difícil on la principal eina d'ajut per identificar els pacients recau en l'anàlisi dels metabòlits de la vitamina B<sub>6</sub> en plasma, orina o LCR. Els principals marcadors bioquímics són el cúmul d'àcid pipecòlic i  $\alpha$ -AASA en LCR (també en plasma i orina), sent l' $\alpha$ -AASA encara present una vegada iniciat el tractament amb piridoxina (Pérez et al. 2013). El perfil de neurotransmissors pot (o no) veure's alterat observant-se un cúmul 3-OMD i una disminució de 5HIAA i HVA en LCR. No obstant això, el fet que aquest perfil cromatogràfic sigui similar a altres deficiències dels neurotransmissors (dèficit AADC i dèficit de PNPO), obliga la necessitat de determinar l'àcid pipecòlic i  $\alpha$ -AASA. Recentment s'ha identificat un pic anomenat X (d'estructura química desconeguda) en el cromatograma de NT de pacients amb dèficit de PDE ajudant a fer el diagnòstic bioquímic d'aquesta entitat (Pérez et al. 2013). Hi ha reportats diferents treballs on demostren la existència d'aquest pic X en els LCR dels

pacients diagnosticats amb PDE , demostrant que és un marcador patognòmic d'aquesta malaltia (Hyland et al. 2002<sup>b</sup>, Stockler et al. 2011). A més a més, aquests estudis han demostrat que aquest pic és químicament diferent a l'  $\alpha$ -AASA i a l'adducte entre el PLP i el P6C ( Stockler et al. 2011). El diagnòstic definitiu es basa en l'anàlisi molecular del gen de l'antiquitina (Mills et al. 2010).

### - Hiperprolinèmia tipus 2

En aquest ECM existeix una errada en el gen que codifica per l'àcid L -1-pirrolina-5 carboxílic deshidrogenasa (MIM\*606811). Aquest error provoca el cúmul de P5C (àcid pirrolina -5-carboxílic) que reacciona (per una condensació de Knoevenagel) amb el PLP, provocant un consum del mateix (Farrant et al. 2001) (Figura 9.b). Clínicament els pacients presenten convulsions, habitualment precipitades per una infecció. Des del punt de vista bioquímic, els pacients presenten elevacions de prolina i P5C en plasma i grans excrecions de prolina, hidroxiprolina i glicina en orina ( Walker et al. 2000) juntament amb nivells disminuïts de PLP en plasma.

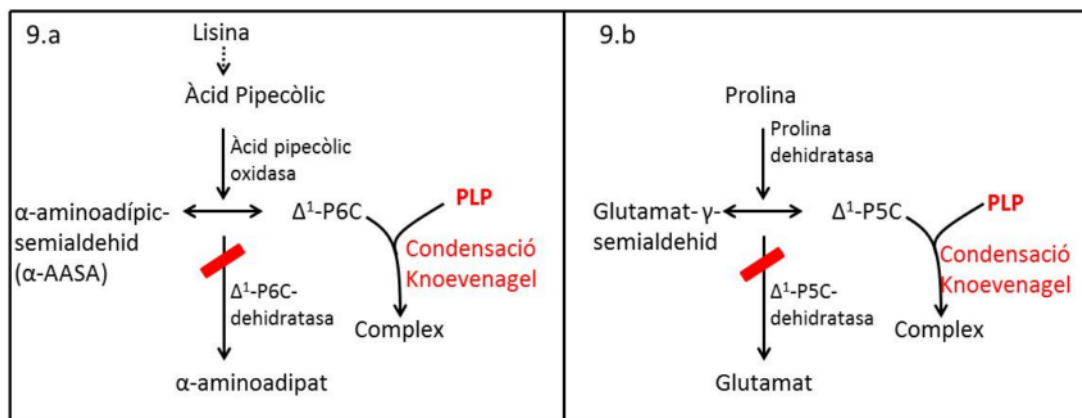


Figura 9. Mecanisme de deficiència de PLP en la deficiència d'antiquitina (Figura 9.a) i en la hiperprolinèmia tipus 2 (Figura 9.b). La deficiència dels enzims implicats ( $\Delta^1$ -P6C-dehidratasa i  $\Delta^1$ -P5C-dehidratasa) comporta un cúmul de P6C i P5C respectivament, que per una reacció de Knoevenagel, "segresta" el PLP provocant la deficiència del mateix. (Clayton 2006, Mills et al. 2010, Walker et al. 2000).

### **3.4. Piridoxal fosfat i epilèpsia farmaco-resistent**

Totes les malalties monogèniques comentades anteriorment causen una deficiència de vitamina B<sub>6</sub>, per diferents mecanismes d'acció. Tanmateix, existeixen altres patologies (algunes d'origen desconegut) que cursen amb epilèpsia, sovint refractària als anticonvulsivants habituals, i amb nivells disminuïts de PLP en LCR. Aquests pacients, se'ls hi és administrat ràpidament piridoxina i/o PLP ja que diversos estudis demostren l'efectivitat per parar les convulsions i millorar la capacitat cognitiva (Footit et al. 2013, Goyal et al. 2013). La negativitat dels estudis moleculars dels gens PNPO i antiquitina amplia l'espectre de malalties relacionades amb el metabolisme de la vitamina B<sub>6</sub>, despertant l'interès en l'estudi d'aquests pacients, des d'un punt de vista radiològic, clínic i bioquímic. De cara a aquesta última vessant, l'estudi d'altres magnituds bioquímiques en LCR (aminoàcids, neurotransmissors i GABA) es fa necessària per avaluar les diferents rutes per les quals és particip la vitamina B<sub>6</sub>. L'anàlisi sistemàtic de totes aquestes variables previsiblement obrirà noves vies d'investigació sobre l'efecte del tractament amb PLP en el control de l'epilèpsia en pacients neuropediàtrics.

## **JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA I HIPÒTESI**

*1- Justificació de la unitat temàtica*

*2- Hipòtesi*



## **1. Justificació de la unitat temàtica**

A l'any 2000 es va estandarditzar al nostre laboratori el protocol d'anàlisi de neurotransmissors en LCR pel diagnòstic de pacients pediàtrics amb afectació neurològica. Al llarg d'aquests anys s'han analitzat mostres de LCR procedents del nostre hospital, països de l'àrea mediterrània, Índia i Argentina. El propòsit d'aquesta tesi és avaluar la via del metabolisme de la dopamina, com a catecolamina prototip de neurotransmissor del SNC, estudiant els seus principals metabòlits i cofactors. Aquesta tesi parteix d'una base bioquímica però que s'ha desenvolupat a través d'un treball multidisciplinari format per diferents professionals del camp de les neurociències, incloent-hi clínics, genetistes, neuròlegs i radiòlegs.

Hem volgut centrar el primer estudi avaluant la utilitat bioquímica del metabòlit principal i més estable de la via dopaminèrgica, l'àcid homovanílic. El seu ús com a biomarcador en els errors congènits de la via dopaminèrgica ja ha estat palès en els últims anys, i és per aquesta raó que hem volgut fer un estudi de totes les mostres de LCR analitzades al hospital Sant Joan de Déu (HSJD) en els últims 13 anys. Aquest estudi ens ha permès definir no només el còmput total de malalties genètiques de la via dopaminèrgica als nostres pacients, sinó també ampliar el coneixement bioquímic, clínic i radiològic d'aquelles entitats secundàries que cursen amb alteracions dels nivells d'àcid homovanílic.

Seguint en l'avaluació del metabolisme de la dopamina, cal remarcar el valuós paper que tenen els cofactors (tetrahidrobiopterina i vitamina B<sub>6</sub>) que participen en el metabolisme dopaminèrgic (veure introducció, Figura 3). Les alteracions quantitatives d'aquests cofactors també poden provocar deficiències en la via dopaminèrgica i, per tant,



també tenen un important valor a la hora d'estudiar aquests pacients. D'altra banda, recentment s'ha demostrat el paper que té la neopterinina (metabòlit de la tetrahidrobiopterina) com a marcador bioquímic en LCR en el diagnòstic de processos immuno-inflamatoris del SNC. El nostre propòsit en aquest aspecte és estudiar les pterines com a eina d'ajut en pacients neurològics que no tenen un diagnòstic confirmat però que presenten alteracions en el valor de neopterinina i biopterina en LCR. Respecte al cofactor que regula l'últim pas de la síntesi dopaminèrgica, el piridoxal fosfat (la forma activa de la vitamina B<sub>6</sub>), les seves deficiències poden provocar trastorns marcats de la síntesis de dopamina, però també d'altres metabòlits, com aminoàcids o GABA. Clínicament, aquests pacients presenten greus alteracions neurològiques sent l'epilèpsia refractària als anticonvulsivants habituals, la simptomatologia més freqüent. De les mostres analitzades durant aquests anys hi ha pacients que presenten deficiències de piridoxal fosfat els quals han respòs favorablement a suplementes de vitamina B<sub>6</sub>.

Per tant, la unitat temàtica d'aquest treball es basa en avaluar quina utilitat tenen cadascun d'aquests marcadors bioquímics, per l'estudi de malalts neuropediàtrics greus.

## 2. Hipòtesi

Dins l'espectre de malalties neurològiques en la infància existeix un elevat tant per cent de casos on no s'arriba a un diagnòstic definitiu. Aquestes malalties són greus i invalidants ja que no disposen d'un tractament adequat a causa de la falta del coneixement etiològic del procés de base. Sovint aquestes malalties neurològiques cursen amb alteracions en els neurotransmissors, sent de gran interès el paper que representa la dopamina. La biosíntesis de dopamina consisteix en dues reaccions metabòliques controlades per diferents enzims i cofactors. D'aquests últims, les pterines i el piridoxal fosfat tenen una gran importància, no tant sols en la síntesis de dopamina sinó també en relació a altres funcions del metabolisme del SNC. D'altra banda, l'HVA és el biomarcador principal de l'estat dopaminèrgic a nivell central.

Per tant, tenint en compte les característiques de l'HVA, creiem que l'estudi i l'avaluació d'aquest biomarcador permetrà identificar pacients amb patologia neurològica i disfunció dopaminèrgica, ja sigui de caràcter genètic primari o secundari a altres malalties, incrementant així el nombre de malalties associades a trastorns del metabolisme de la dopamina. Tanmateix, l'anàlisi sistemàtic dels cofactors, pterines i piridoxal fosfat, ens permetrà estudiar la seva utilitat com a biomarcadors en malalties neurològiques en l'àmbit pediàtric, i la seva relació no només amb la disfunció dopaminèrgica, sinó també amb altres trastorns del SNC, com ara les malalties inflamatories i l'epilèpsia.



## **OBJECTIUS**

*1- Objectiu principal*

*2- Objectius concrets*



## **1. Objectiu principal**

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar la utilitat de tres biomarcadors relacionats amb el metabolisme de la dopamina (HVA, pterines i piridoxal fosfat) com a eines pel diagnòstic i la investigació de malalties neurològiques en la infància.

## **2. Objectius concrets**

- A. Analitzar les concentracions d'àcid homovanílic en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques com a eina bioquímica per la identificació d'alteracions dopaminèrgiques. Avaluat la seva utilitat com a biomarcador en un ampli ventall de malalties neurològiques.
- B. Analitzar les concentracions de pterines (neopterina i biopterina) en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques per la identificació de trastorns primaris i secundaris d'aquests coenzims. Avaluat la utilitat de la neopterina com a biomarcador en processos immuno-inflamatoris.
- C. Analitzar les concentracions de piridoxal fosfat en LCR en pacients neuropediàtrics sense diagnòstic etiològic per la identificació de trastorns primaris i secundaris: avaluar la resposta a la suplementació amb piridoxal fosfat en un grup de pacients amb encefalopaties epilèptiques greus.



## PACIENTS, MATERIAL I MÈTODES

### 1. Pacients

1.1. Població d' estudi per l'anàlisi de l' àcid homovanílic en LCR.

1.2. Població d' estudi per l'anàlisi de la neopterina com a marcador d'infecció i/o inflamació en LCR.

1.3. Població de pacients amb deficiència de vitamina B<sub>6</sub> en LCR i encefalopatia epilèptica.

1.4. Aspectes ètics

### 2. Mètodes analítics

2.1. Obtenció de la mostra. Criteris d'exclusió

2.2. Anàlisis automatitzades en LCR (glucosa, proteïnes, hematies i leucòcits).

2.3. Anàlisis de neurotransmissors (àcid homovanílic) en LCR .

2.4. Anàlisis de pterines (neopterina i biopterina) en LCR.

2.5. Anàlisis de piridoxal fosfat en LCR.

2.6. Altres procediments pel diagnòstic diferencial.

2.6.1. Anàlisis d'aminoàcids, GABA i 5-metiltetrahidrofolat en LCR

2.7. Estudis moleculars dels enzims implicats en la via de la dopamina

### 3. Mètodes clínics

3.1. Avaluació clínica dels pacients

### 4. Mètodes estadístics

4.1. Validació dels procediments analítics i valors referència

4.2. Anàlisi estadístic





## 1. Pacients

### 1.1. Població d' estudi per l'anàlisi de l'àcid homovanílic en LCR

#### ***Població control***

La població pediàtrica control va estar constituïda per 127 individus (64 nenes i 63 nens) d'edats compreses entre 11 dies i 16 anys (mitjana 3 ,8 anys). Tots ells van ser sotmesos a una punció lumbar d'urgència per sospita d'infecció de meningitis bacteriana o vírica, i que posteriorment aquestes entitats van ser descartades. Aquestes dades es recullen en un treball publicat prèviament pel nostre grup (Ormazabal et al. 2005).

Criteris d'exclusió:

- Sospita clínica o bioquímica d'errors congènits del metabolisme dels NT.
- Tractaments neurofarmacològics en el moment d'estudi (antiepilèptics, neuroleptics, antidepressius...).
- Presència d'algun trastorn neurològic (morfològic i/o funcional).
- Confirmació del diagnòstic de meningitis bacteriana o vírica.
- Mostres recollides fora de protocol (puncions traumàtiques, sense protecció de la temperatura i la llum).

#### ***Pacients***

Es van seleccionar 1386 mostres de LCR de la nostra base de dades, la major part de les quals són de pacients amb malalties neurològiques sense un diagnòstic etiològic establert en el moment de la punció (mitjana d'edat de 3 anys i 10 mesos, rang d'1 dia a 16 anys). Totes les mostres van ser analitzades al laboratori de l'HSJD procedents d'aquest hospital, així com d'altres hospitals de l'àrea mediterrània i altres països.

Criteris d'exclusió:

- Mostres recollides fora de protocol (puncions traumàtiques, sense protecció de la temperatura i la llum).

La història clínica de ls pacients procedents de l'HSJD va ser revisada exhaustiv ament per tal de determinar el diagnòstic etiològic (en cas que existís), la presència d'alteracions en l'electroencefalograma (EEG), epilèpsia, presència de microcefàlia o macrocefàlia, l'estudi de la neuroimatge mitjançant ressonància magnètica (RM) i la seva relació amb els valors de l'HVA en LCR.

Els pacients van ser distribuïts en 9 grups diferents segons diagnòstic etiològic o clínic: 1) deficiència primària en el metabolisme de la dopamina; 2) errors congènits del metabolisme (excloent les malalties mitocondrials); 3) malalties mitocondrials; 4) processos infecciosos i/o inflamatoris i/o tumors; 5) processos isquèmics i hemorràgics; 6) malalties genètiques i/o pacients amb característiques dismòrfiques; 7) encefalopaties epilèptiques i epilèpsia; 8) trastorns motors i 9) miscel·lània (alteracions psicològiques com dèficits atenció, autisme, psicosi...). Tots els pacients van ser estudiats detalladament per un neuròleg pediàtric.

## **1.2. Població d'estudi per l'anàlisi de la neopterina com a marcador d'infecció i/o inflamació en LCR**

### ***Població control***

Les mostres utilitzades per establir els valors de referència de la neopterina i biopterina van ser les mateixes que per establir els valors de referència dels neurotransmissors (Ormazábal et al. 2005).

### ***Població d'estudi per l'establiment del punt de tall de neopterina en LCR en pacients amb infecció bacteriana o vírica***

Per la determinació del nou llindar es van estudiar dos grups de pacients. El grup 1 va comprendre 68 pacients (45 nens, 23 nenes, mitjana d'edat : 6,5 anys, desviació estàndard (DS): 5,0, rang d'edat: 1 mes -19 anys) amb meningoencefalitis vírica (n=54) o bacteriana (n=14). El diagnòstic microbiològic es va realitzar per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i cultius bacteriològics al departament de microbiologia del nostre laboratori. Bioquímicament tots els pacients del grup 1 van obtenir  $>5$  limfòcits/mm<sup>3</sup>. També es va analitzar la glucosa i les proteïnes en LCR de cada pacient. Es van excloure aquelles mostres amb limfòcits elevats atribuïbles a la contaminació per sang una vegada aplicada la fórmula correctora (Ghanem et al. 2008). El grup 2 va incloure 52 nens (40 nens, 12 nenes, edat mitjana: 8 mesos, DS:12 mesos, rang d'edat: 1 mes -6 anys) amb infecció perifèrica viral (n=15) o bacteriana (n=37) confirmada per estudis microbiològics i sense evidència d'infecció al sistema nerviós central.

### ***Pacients pediàtrics amb afectació neurològica***

Es van analitzar fins a un total de 606 mostres de LCR de pacients procedents del HSJD durant el període comprès de gener 2001 -gener 2013. Els criteris d'exclusió aplicats van ser el mateixos descrits en l'apartat anterior posant especial èmfasi a la protecció de la llum de les mostres, atès que las pterines són fotosensibles. L'edat mitjana d'aquesta població d'estudi va ser de 4,5 anys, DS 4,7 anys, rang d'edat 0,16-18 anys i distribució de sexe masculí del 52,6%. Els 606 pacients van ser classificats en tres grups clínics diferents:

A) Pacients amb malalties genètiques confirmades (n=160), incloent ECM de molècules complexes, malalties mitocondrials i altres malalties neurològiques. B) Pacients amb desordres neurològics adquirits i d'etiologia desconeguda (n=423), incloent processos hemorràgics i isquèemics, desordres neurològics amb alteracions motores, retard mental amb altres signes neurològics i condicions psiquiàtriques, leucodistrofies i malformacions, epilèpsia i encefalopaties epilèptiques. C) Pacients amb malalties inflamatòries o immunològiques, incloent síndrome de Aicardi-Goutieres, encefalomielitis disseminada, Síndrome de Guillain Barré, encefalitis per anticossos anti receptor NMDA (N-methyl D-aspartate), síndrome Crònica Infantil Neurològica, Cutània i Articular (CINCA), histiocitosis, síndrome de Miastènia Gravis i parasitosis cerebral.

### **1.3. Població de pacients amb deficiència de vitamina B<sub>6</sub> en LCR i encefalopatia epilèptica**

#### ***Població control***

La població pediàtrica control va estar constituïda per 82 individus (43 nens i 39 nenes) d'edats compreses entre 1 dia i 18 anys (mitjana 4,0 anys). Tots ells van ser sotmesos a una punció lumbar d'urgència per sospita d'infecció de meningitis bacteriana o vírica, i que posteriorment van ser descartades. Aquesta valor es recullen en un treball publicat prèviament pel nostre grup (Ormazabal et al. 2008).

#### **Criteris d'exclusió:**

- Sospita clínica o bioquímica d'errors congènits del metabolisme dels NT.
- Tractaments neurofarmacològics en el moment d'estudi (antiepilèptics, neurolèptics, antidepressius...) o dietes especials.

- Presència d'algun trastorn neurològic (morfològic i/o funcional).
- Confirmació del diagnòstic de meningitis bacteriana o vírica.
- Mostres recollides fora de protocol (puncions traumàtiques, sense protecció de la temperatura i la llum).

### ***Població d'estudi***

Del total de mostres de LCR analitzades (n=147, edats compreses entre 1 dia i 19 anys, mitjana d'edat de 2,4 anys) es van seleccionar 10 pacients per la suplementació amb PLP en base a uns criteris bioquímics de deficiència (o just per sobre el límit inferior del valor de referència) de la vitamina B<sub>6</sub>. Dels deu pacients, cinc van presentar una deficiència de PLP en LCR i cinc pacients van tenir els nivells de PLP en el rang inferior dels valors de referència pel seu grup d'edat (Ormazabal et al. 2008).

#### **1.4. Aspectes ètics**

L'estudi dels pacients i controls es va realitzar d'acord amb la Declaració de Helsinki de 1975, revisada l'any 2000 per la associació mèdica mundial. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic local i es van obtenir els consentiments informats de tots els pacients, o dels seus tutors o pares.

## **2. Mètodes analítics**

### **2.1. Obtenció de la mostra. Criteris d'exclusió**

La obtenció de les mostres es va realitzar de manera rigorosa segons un protocol estandarditzat (Ormazabal et al. 2005) ja que existeixen múltiples factors que influeixen en la concentració dels NT en LCR i que, per tant, han de ser controlades.

La punció lumbar s'ha de fer de 7h a 9h del matí després de 8 a 10 hores de dejú del pacient.

En pediatria s'estableix un dejú fisiològic que és el temps en què un nen pot estar sense menjar, sent de 3 a 4 hores en nounats, de 5 a 7 hores en lactants i de 8 hores en nens més grans. Si el pacient rep alguna medicació se li administrarà després de la punció.

S'extrau simultàniament LCR i sang (aquesta uns 30' minuts abans per evitar la hiperglucèmia post-punció). L'examen bioquímic en sang consisteix en determinar l'hemograma, glucosa, lactat, piruvat, aminoàcids, creatinina, prolactina, folat i vitamina B<sub>12</sub>. En LCR existeix un gradient rostrocaudal (la concentració d'alguns metabòlits augmenta a mesura que es recullen les fraccions de líquid), per tant és important seguir un ordre a l'hora de recollir la mostra en els diferents tubs per tal que els resultats siguin comparables:

Primer tub (5 gotes) → histoquímica (proteïnes, glucosa, hematies, leucòcits i lactat).

Segon tub (10 gotes) → amines biògenes (l'HVA i l'5HIAA representen respectivament els metabolisme de la dopamina i serotonina).

Tercer tub (10 gotes) → pterines, piridoxal fosfat i 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) (tub recobert en paper de l'alumini ja que les pterines s'oxiden ràpidament).

Quart tub (10 gotes) → aminoàcids.

Cinquè tub (5 gotes) → GABA.

Un cop obtinguda la mostra, els tubs s'introdueixen en gel i són immediatament traslladats al laboratori per ser emmagatzemats a -80°C fins el moment de processar-los. Les mostres de LCR que estiguin contaminades de sang per punció traumàtica, es centrifuguen i es separa el sobrenedant abans de congelar-les. Ja que les mostres de LCR es consideren mostres de difícil obtenció i de gran valor diagnòstic, les puncions hemàtiques s'aprofiten

per aquesta finalitat i només es demana nova mostra si els resultats no es poden interpretar. De tota manera, per aquesta tesi, s'han descartat totes les punccions hemàtiques o no recollides segons el protocol.

## **2.2. Anàlisis automatitzades en LCR (glucosa, proteïnes, hematies, leucòcits i lactat)**

La determinació de glucosa, proteïna total i lactat en LCR es va realitzar per l'analitzador automàtic Architect c8000 system (Abbott Laboratories, IL, USA). El comptatge d'hematies i leucòcits es va fer utilitzant l'autoanalitzador ADVIA 2120 (Bayer HealthCare, Diagnostics Division).

## **2.3. Anàlisis de neurotransmissors (àcid homovanílic) en LCR**

La determinació d'amines biògenes al laboratori del HSJD consisteix en la detecció i quantificació dels metabòlits de la serotonina (5-hidroxitriptòfan i àcid 5-hidroxiindolacètic) i de la dopamina (3-ortometildopa, 3-metoxi-4hidrofenilglicol i àcid homovanílic) en LCR. (Figura 5, marcats en vermell). En aquest treball es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) amb parell iònic i detecció electroquímica, segons un protocol prèviament descrit (Ormazabal et al. 2005) (Figura 6). Ja que l'objectiu d'aquest treball va ser l'avaluació de l'HVA en LCR, no més s'especificuen les característiques i concentracions del calibrador d'HVA.

### ***Reactius***

- Acetat sòdic (Sigma S7670, St Louis, MO, EUA).
- Àcid cítric (Sigma C0759, St Louis, MO, EUA).
- EDTA (Sigma ED2P, St Louis, MO, EUA).
- 1-heptànosulfonat de sodi (Sigma H8901, St Louis, MO, EUA).



- Metanol absolut per HPLC (Merck, 1.06018.2500, Darmstadt, Alemanya).

### **Calibrador**

- Àcid homovanílic (HVA) (Sigma H-1252, St Louis, MO, EUA).

### **Condicions cromatogràfiques**

- HPLC (Waters, MA, USA) amb detecció electroquímica (coulochem II, ESA, Chelmsford, MA, USA).
- Columna: Nucleosil 100 C18 5 µm 25x0,4 (Teknokroma, Barcelona, Espanya).
- Precolumna: ODS 20 x 0.4mm (Teknokroma).
- Fase mòbil: Tampó citrat/acetat sòdic 0,1 mmol/L, pH 4, metanol 10%, EDTA -Na 1,2 mmol/L i 1-heptà sulfònic 1,2 mmol/L.
- Flux 1,1 ml/min.
- 30 µL de volum d'injecció de mostra i patró de calibratge.
- Cèl·lula analítica (model 5021) = +400mV; sensibilitat = 200nA.

### **Recollida de les mostres**

Seguint el protocol anteriorment citat, la mostra de LCR es recull en un tub de plàstic transparent sense cap excipient. Posteriorment, s'introdueix ràpidament en gel fins el seu trasllat al laboratori on es congela a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

### **Preparació del patró de calibratge de l'HVA**

Preparació de la solució del calibrador d'HVA a partir de la substància pura diluint -lo amb fase mòbil:

HVA → 16.5 mg/ 25 mL de fase mòbil → 3.62 mmol/L.

Preparació de la solució de treball a partir de l'anterior fent una dilució 1/10000 per obtenir una concentració final de 362 nmol/L.

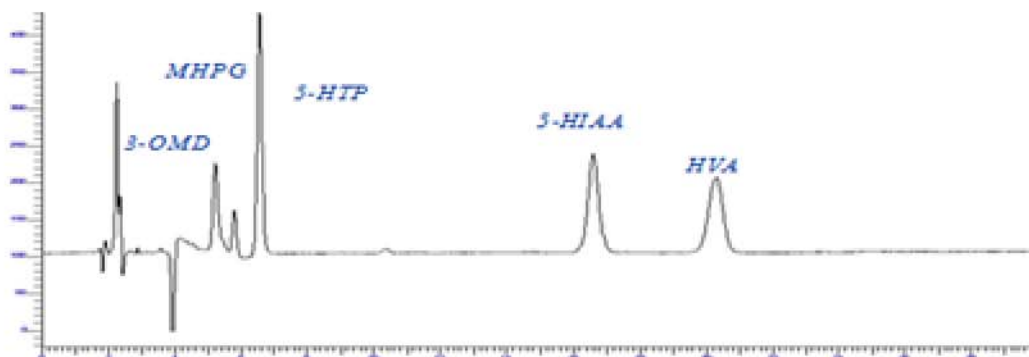
El processament posterior és igual al de les mostres.

### **Procediment analític**

Dilució (1:2) de les mostres de LCR i patró de calibratge en fase mòbil. Centrifugar (10 minuts a 1500 x g a 4°C) i filtrar el sobrenedant (Filtres 0,22 µm, Millipore, Bedford, MA, USA) directament en el vial de l'HPLC.

### **Càlcul de resultats**

Els resultats es calculen mitjançant calibratge extern amb el programa d'adquisició de dades cromatogràfiques Breeze 3.3 GP software (Waters). Els resultats s'expressen en nmol/L.



**Figura 6.** Cromatograma de patró de calibratge dels neurotransmissors.

## **2.4. Anàlisi de pterines (neopterina i biopterina) en LCR**

La determinació de pterines (neopterina i biopterina) es va realitzar per un procediment de HPLC amb detecció de fluorescència basat en un mètode prèviament descrit

(Ormazabal et al. 2005). El mètode es basa en la oxidació de les pterines reduïdes a través del diòxid de manganès.

### **Reactius**

- Diòxid de manganès (Merck 1.05957.1000, Darmstadt, Alemanya).
- Fosfat potàssic (Sigma P-5379).
- Metanol absolut per HPLC (ROMIL, H410).
- Àcid clorhídric (Merck, 1.00317.1000, Darmstadt, Alemanya).

### **Calibradors**

Neopterina (NP) (Schircks Laboratorios 11.325, Jona, Switzerland).

Biopterina (BP) (Schircks Laboratorios 11.203, Jona, Switzerland).

### **Condicions cromatogràfiques**

- HPLC amb detecció de fluorescència (Waters, MA, USA).
- Columna: Nucleosil 100 C18 5 $\mu$ m 25 x 0,4 mm (Teknokroma, Barcelona, Espanya).
- Precolumna: ODS 20 x 0.4 mm (Teknokroma).
- Fase mòbil: Fosfat potàssic 1  $\mu$ mol/L + 5% metanol.
- Flux 1 ml/min.
- 20  $\mu$ L de volum d'injecció de mostra i patró de calibratge.
- Detecció de fluorescència: Excitació = 350 nm, emissió = 450 nm.

### **Recollida de les mostres**

Seguint el protocol anteriorment citat, la mostra de LCR es recull en un tub de plàstic transparent sense cap excipient. Posteriorment, s'introdueix ràpidament en gel fins el seu trasllat al laboratori on es congela a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

### **Preparació del patró de calibratge de la NP**

Preparació de la solució dels calibradors de NP (i de BP) a partir del reactiu de la casa comercial diluint-lo amb HCl 0,1 mol/L:

NP → 3,8 mg/ 10 mL d'HCl 0,1 mol/L → 1,5 mmol/L.

BP → 4,9 mg/ 10 mL d'HCl 0,1 mol/L → 2,07 mmol/L.

Preparació de la solució de treball a partir de l'anterior fent una dilució 1/40000 amb HCl 0,1 mol/L fins a aconseguir una concentració similar a la trobada en el LCR (NP = 51,7 nmol/L; BP = 37,5 nmol/L).

El processament posterior és igual al de les mostres.

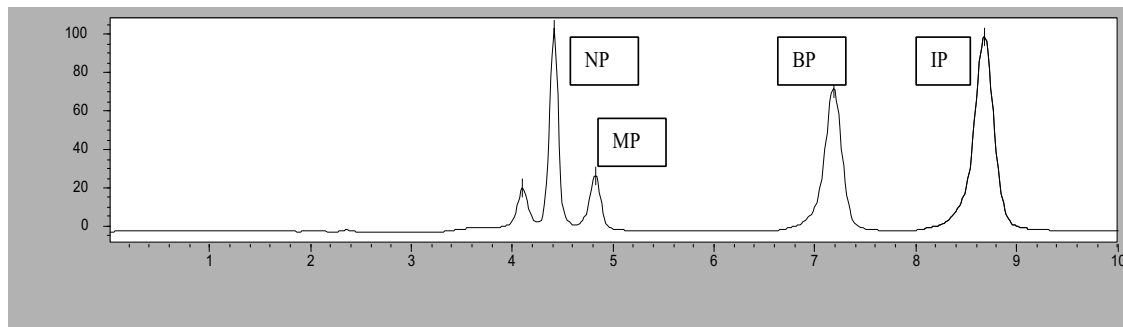
### **Procediment analític**

Les mostres de LCR han d'estar protegides de la llum durant tot el procés de manipulació. El tractament és el mateix en mostres i patrons:

Afegir en un tub *ependorf ultrafree* (Millipore, Bedford, MA, USA) 200 µL LCR + 20 µL HCl 1 mol/L + 1 mg MnO<sub>2</sub>. Agitar esporàdicament durant 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, centrifugar a 12000 x g durant 10 minuts. Recollir la solució filtrada del tub *ependorf* i introduir-la en un microinsert del vial. Tapar el vial i introduir-lo a l'HPLC.

### **Càlcul de resultats**

Els resultats es calculen mitjançant calibratge extern amb el programa d'adquisició de dades cromatogràfiques Breeze 3.3 GP software (Waters). Els resultats s'expressen en nmol/L.



**Figura 7.** Cromatograma dels patrons de calibració de pterines. Els metabòlits més útils pel diagnòstic de malalties neurològiques són la NP i BP.

### 2.5. Anàlisi de piridoxal fosfat en LCR

La determinació de piridoxal fosfat es va realitzar per un procediment de HPLC amb detecció de fluorescència basat en un mètode prèviament descrit (Ormazabal et al. 2008).

#### **Reactius**

- Àcid tricloroacètic (UN 1839 Merck, Darmstadt, Alemanya).
- Dihidrogen fosfat potàssic (P 5379, Sigma, St Louis, MO, EUA).
- Fosfat dipotàssic (P 3786, Sigma, St Louis, MO, EUA).
- Cianur de potassi (D-89555, Aldrich).
- Àcid ortofosfòric (1.00552.0250, Merck).
- Semicarbazida (1.07722.0100, Merck).

#### **Calibradors**

Piridoxal fosfat (PLP) (Teknokroma, CH-36005).

#### **Condicions cromatogràfiques**

- HPLC amb detecció de fluorescència (Waters, MA, USA).
- Columna: SymmetryShield R P8 (5 µm, 4,6 x 25 mm; Waters, MA, USA).
- Fase mòbil: Semicarbazida 75 mmol/L + dihidrogen fosfat potàssic 50 mmol/L.

- Flux 1,5 ml/min.
- 50 µL de volum d'injecció de mostra i patró de calibratge.
- Detecció de fluorescència: Excitació = 325 nm, emissió = 418 nm.

### ***Recollida de les mostres***

Seguint el protocol anteriorment citat, la mostra de LCR es recull en un tub de plàstic transparent protegit de la llum. Posteriorment, s'introdueix ràpidament en gel fins el seu trasllat al laboratori on es congela a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

### ***Preparació del patró de calibratge del piridoxal fosfat***

La substància utilitzada com a patró de calibratge és comprada en una casa comercial (Teknokroma) a una concentració de piridoxal fosfat de 125 nmol/L (dependent del número de lot). El processament posterior és igual al de les mostres.

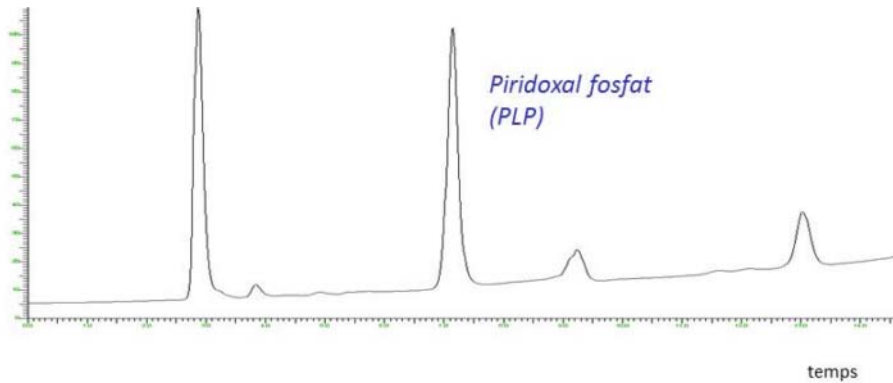
### ***Procediment analític***

Les mostres de LCR han d'estar protegides de la llum durant tot el procés de manipulació. El tractament és el mateix en mostres i calibrador:

Pipetejar 125 µL LCR i mesclar amb 125 µL d'àcid perclòric 10%. Agitar i escalfar 5 minuts a 50°C en un bloc calefactor. Centrifugar a 10000 rpm durant 10 minuts. Recollir 200 µL de sobrenedant i afegir -los en el vial de topazi per HPLC. Afegir -hi 70 µL de fosfat dipotàssic i 20 µL de cianur sòdic 0,04 mol/L. Agitar. Incubar 25 minuts a 50°C en bloc. Finalment afegir 25 µL d'àcid ortofosfòric 2,9 mol/L. Tapar el vial de topazi per HPLC i introduir-lo a l'aparell.

### ***Càlcul de resultats***

Els resultats es calculen mitjançant calibratge extern amb el programa d'adquisició de dades cromatogràfiques turbochrom Navigator (Perkin Elmer) . Els resultats s'expressen en nmol/L.



**Figura 8** Cromatograma del patró de calibratge de PLP.

## 2.6. Altres procediments pel diagnòstic diferencial

### 2.6.1. Anàlisis d'aminoàcids, GABA i 5-MTHF en LCR

En els casos que va ser necessari fer el diagnòstic diferencial per sospita de metabolopatia es van seguir fent les anàlisis pertinents en LCR a fi de trobar l'etiologia de la malaltia del pacient. Aquestes anàlisis van ser la determinació d'aminoàcids, el GABA i el 5-MTHF en LCR. L'anàlisi d'aminoàcids en LCR (mateixa metodologia utilitzada per orina i plasma) es realitza per cromatografia líquida d'intercanvi catiònic ( Biochrom 30, Pharmacia Biotech, Biochrom Ltd ). En aquesta cromatografia, la columna té una càrrega negativa i els aminoàcids entren a dins d'aquesta amb càrrega positiva. Els canvis de pH, de temperatura i de la càrrega iònica de les fases mòbils permeten que tots els aminoàcids arribin al seu punt isoelèctric (càrrega total zero), puguin eluir de la columna i ser posteriorment quantificats de manera individual (Moyano et al. 1998). La determinació de GABA en LCR ha estat una tècnica recentment instaurada al nostre laboratori (Casado et al. 2013) i es basa en una

electroforesis capil·lar (Beckman P/ACE MDQ system) amb detecció de fluorescència induïda per làser (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). La determinació del 5-MTHF en LCR es fa per cromatografia líquida amb detecció de fluorescència (Waters, MA, USA) utilitzant la longitud d'ona excitació i emissió de 295 i 355 nm, respectivament (Ormazabal et al. 2006).

## 2.7. Estudis moleculars dels enzims implicats en la via de la dopamina

Els gens estudiats, implicats directament o indirectament, en la via dopaminèrgica es troben detallats a la **Taula 2**.

L'ADN genòmic es va extreure de sang venosa perifèrica anticoagulada amb EDTA dels pacients amb sospita bioquímica i clínica de mutacions dels gens relacionats amb la via dopaminèrgica seguint les tècniques estàndard. També van ser estudiats els familiars de primer grau dels pacients diagnosticats.

L'estudi molecular dels gens *TH* i *PNPO* va ser dut a terme al nostre laboratori. Cada un dels exons dels gen estudiats es van amplificar per PCR convencional. La seqüenciació directe dels exons es va realitzar mitjançant un analitzador genètic ABI Prism 3130 de 4 capil·lars (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Respecte a l'anàlisi genètic del gen *TH* es van seqüenciar les regions codificants de cadascun dels 14 exons, juntament amb les regions *d'splicing*, els 114 parells de bases que precedeixen el primer codó i els 354 parells de bases que segueixen el codó de parada. Per aquesta anàlisi es van utilitzar 10 parells de *primers* seguint les etapes estàndard de la PCR, desnaturalització, *annealing* i elongació.



Pel que fa a l'estudi molecular del gen *PNPO* es van utilitzar cinc parells de primers per l'estudi dels set exons del gen. La resta de gens que es mostren a la Taula 2 van ser estudiats en d'altres centres.

Nom del gen estudiat, MIM*	Localització cromosòmica	Número d'exons	Centre estudi
Tirosina Hidroxilasa (TH), MIM*191290	11p15.5	14 exons	Laboratori MetaboloPATIES, HSJD, Barcelona
Descarboxilasa aminoàcids aromàtics (AADC), MIM*107930	7p12.1	15 exons	CEDEM, Madrid
Guanosina trifosfat hidroxilasa 1 (GTP-CH I), MIM*600225	14q22.2	6 exons	Laboratori Dr. Echevarne, Barcelona
Sepiapterina reductasa (SR), *MIM182125	2p13.2	3 exons	CEDEM, Madrid.
Piridoxamina 5 fosfat oxidasa (PNPO), MIM*603287	17q21.2	7 exons	Laboratori MetaboloPATIES, HSJD, Barcelona

**Taula 2.** Característiques dels gens estudiats en el treball. CEDEM: centro de diagnóstico de enfermedades metabólicas, Universitat Autònoma de Madrid. HSJD: Hospital Sant Joan de Déu

### 3. Mètodes clínics

#### 3.1. Avaluació clínica dels pacients

Els pacients van ser avaluats al servei de Neurologia de l'HSJD. Els responsables d'aquestes avaluacions van ser pediatres experts en neurologia infantil.

En primer terme, les avaluacions van iniciar-se per una anamnesis seguida d'una exploració clínica, principalment enfocada a l'estat neurològic del pacient. Les dades clíniques enregistrades per dur a terme el present treball van ser: alteracions en EEG, perímetre cranioencefàlic (presència de microcefàlia o macrocefàlia), presència d'epilèpsia i estudi de la neuroimatge mitjançant ecografia transfontanel·lar, tomografia computeritzada i RM amb les seves múltiples opcions (T1, T2, Flair, difusió de masses i espectroscopi a quantitat) per mitjà d'un aparell d'1.5 Tesles (Signa EchoSpeed System, GE Medical Systems).

Amb totes aquestes dades, a més d'un anàlisi de la història clínica de cadascun dels pacients, es va poder arribar al diagnòstic clínic de les diferents entitats nosològiques que es descriuen en els articles d'aquest treball.

#### **4. Mètodes estadístics**

##### **4.1. Validació dels procediments analítics i valors referència**

Els diferents procediments analítics utilitzats en aquesta tesi van ser validats i estandarditzats segons el requeriments de garantia qualitat del laboratori. Els diferents procediments, així com els valors de referència establerts per cada metodologia, han estat publicats en revistes científiques de caire internacional (Ormazabal et al. 2005, 2006 i 2008, Moyano et al. 1998). Tanmateix, totes les proves metodològiques esmentades a les seccions anteriors han estat certificades per AENOR (Associació Espanyola de Normalització i Certificació). Les anàlisis de neurotransmissors, pterines, 5-MTHF i aminoàcids han estat acreditades per ENAC (Entitat Nacional d'Acreditació) seguint els criteris de les normes ISO

15189. Aquesta acreditació suposa el màxim grau de competència tècnica dels laboratoris de la nostre regió.

#### **4.2. Anàlisi estadístic**

Totes les variables clíniques i bioquímiques han estat recollides en una base de dades (Microsoft Excel).

Pels estudis estadístics s'han aplicat bàsicament les següents proves:

- Per a l'estudi de distribució de dades: prova de Kolmogorov-Smirnov.
- Corbes ROC pel càlcul de sensibilitat i especificitat diagnòstica de la neopterina.
- Prova d'Odds Ratio p el càlcul del risc associat a les diferents condicions clíniques i bioquímiques de l'estudi de l'HVA.
- Per a la comparació de variables qualitatives: prova de Chi-quadrat.
- Per a la comparació de variables quantitatives:

Variabls paramètriques:

- Prova T de Student per a la comparació de mitjanes.

Variabls no paramètriques:

- Prova de Wilcoxon per a dades aparellades.
- Prova U de Mann-Whitney per a dades no aparellades.
- Proves de correlació simple:
  - Prova de Pearson per variables paramètriques.
  - Prova de Spearman per variables no paramètriques.

- Proves de regressió lineal múltiple entre una variable dependent i dues , o més , variables independents, per evitar el factor de confusió de l'edat i d'altres variables importants en l'àmbit pediàtric.

Els detalls de cada una d'aqu estes proves figuren en cada un dels articles publicats. Els càlculs estadístics es van realitzar amb el programa SPSS 19.0. Es va considerar significatiu un valor de  $p < 0.05$ .



## RESULTATS

### OBJECTIU 1

- A. Analitzar les concentracions d'àcid homovanílic en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques com a eina bioquímica per la identificació d'alteracions dopaminèrgiques. Avaluar la seva utilitat como biomarcador en un ampli ventall de malalties neurològiques.

#### **“Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders”**

Marta Molero -Luis,\* Mercedes Serrano,\* Aida Ormazabal, Belén Pérez -Dueñas, Àngels García-Cazorla, Roser Pons, Rafael Artuch. For the neurotransmitter working group.

\*These authors contributed equally to this paper.

Developmental Medicine and Child Neurology 2013 Jun;55(6):559-66. doi: 10.1111/dmcn.12116. Epub 2013 Mar 11. PubMed PMID: 23480488.

En aquest primer estudi es va plantejar l'anàlisi d'una base de dades que es va iniciar l'any 2000 i que recull informació bioquímica, clínica i radiològica de pacients pediàtrics amb simptomatologia neurològica, els quals van ser sotmesos a una punció lumbar per l'estudi de neurotransmissors i altres magnituds en LCR. Aquesta base de dades neix després d'estandarditzar-se l'anàlisi de neurotransmissors, pterines i 5-MTHF en LCR (Ormazabal et al. 2005) i, juntament amb la informació clínica i radiològica, realitzada pel departament de Neurologia de l'HSJD, permet fer estudis retrospectius i transversals des de diferents punts de vista, i en el present treball des de la vessant bioquímica.

L'objectiu principal del treball ha estat estudiar quina utilitat clínica té l'anàlisi de l'HVA en LCR, tant en pacients pediàtrics amb deficiències primàries de dopamina, com en pacients pediàtrics amb d'altres malalties neurològiques. En aquells pacients que ja tenien un diagnòstic etiològic confirmat vam voler observar les característiques del perfil de neurotransmissors en LCR. I en aquells pacients que no tenien una etiologia establerta vam buscar les relacions que existien entre els valors anòmals d'HVA en LCR i les característiques clíniques, radiològiques i electrofisiològiques que presentava cadascun d'ells.

## Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders

MARTA MOLERO-LUIS<sup>1</sup> | MERCEDES SERRANO<sup>1</sup> | AIDA ORMAZÁBAL<sup>1</sup> | BELÉN PÉREZ-DUEÑAS<sup>1</sup> |  
ÀNGELS GARCÍA-CAZORLA<sup>1</sup> | ROSER PONS<sup>2</sup> | RAFAEL ARTUCH<sup>1</sup> | FOR THE NEUROTRANSMITTER WORKING GROUP

<sup>1</sup> Neurometabolic Unit, Hospital Sant Joan de Déu and Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. <sup>2</sup> First Department of Paediatrics, Agia Sofia Hospital, University of Athens, Athens, Greece.

Correspondence to Dr Mercedes Serrano, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, Espiguas, Barcelona 08950, Spain. E-mail: mserrano@hsjbdn.org

This article is commented on by Karim on pages 493–494 of this issue.

### PUBLICATION DATA

Accepted for publication 12th December 2012.  
Published online 11th March 2013.

### ABBREVIATIONS

5HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5MTHF	5-methyltetrahydrofolate
CSF	Cerebrospinal fluid
HVA	Homovanillic acid
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
MAO	Monoamine oxidase

**AIM** To determine the prevalence of dopaminergic abnormalities in 1388 children with neurological disorders, and to analyse their clinical, neuroradiological, and electrophysiological characteristics.

**METHOD** We studied biogenic amines in 1388 cerebrospinal fluid (CSF) samples from children with neurological disorders (mean age 3y 10mo, SD 4y 5mo; 712 males, 676 females). Correlations among CSF homovanillic acid (HVA) values and other biochemical, clinical, neuroradiological, and electrophysiological parameters were analysed.

**RESULTS** Twenty-one patients with primary dopaminergic deficiencies were identified. Of the whole sample, 20% showed altered HVA. We report neurological diseases with abnormal CSF HVA values such as pontocerebellar hypoplasia, perinatal asphyxia, central nervous system infections, mitochondrial disorders, and other genetic diseases. Overlapping HVA levels between primary and secondary dopamine deficiencies were observed. Prevalence of low CSF HVA levels was significantly higher in neonatal patients ( $\chi^2=84.8$ ,  $p<0.001$ ). Abnormalities in white matter were associated with low CSF HVA (odds ratio 2.3, 95% confidence interval 1.5–3.5). **INTERPRETATION** HVA abnormalities are observed in various neurological diseases, but some are probably an unspecific finding. No clear limits for CSF HVA values pointing towards primary diseases can be stated. We report several neurological diseases showing HVA alterations. No neuroimaging traits were associated with low HVA values, except for white matter abnormalities.

Dopamine and serotonin are neurotransmitters involved in several neurological and systemic functions. Their turnover in the central nervous system (CNS) can be assessed by biochemical analysis of several biogenic amines in cerebrospinal fluid (CSF) that are closely related to them.<sup>1–4</sup> Homovanillic acid (HVA), which is the final product in dopamine catabolism, can be used as a marker of dopamine metabolism. Dopamine is synthesized from tyrosine by tyrosine hydroxylase (EC1.14.16.2), which converts tyrosine into L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) with tetrahydrobiopterin as a cofactor. Aromatic L-amino-acid decarboxylase (EC4.1.1.28) transforms L-DOPA into dopamine using pyridoxal-5'-phosphate as a cofactor. Dopamine is catabolised by monoamine oxidase (MAO, EC1.4.3.4) and catechol-O-methyltransferase (EC2.1.1.6), yielding HVA as the stable final product (Fig. S1, online supporting information). Acquired and genetic neurological diseases associated with dopaminergic dysfunction are known to cause movement disorders and neuropsychiatric disorders.<sup>1</sup> There are several genetic disorders caused by defects in the synthesis of dopamine in which the CSF HVA values

are decreased, including tyrosine hydroxylase (OMIM# 191290), L-amino-acid decarboxylase (OMIM# 107930), guanosine triphosphate cyclohydrolase (OMIM# 128230), sepiapterin reductase (OMIM# 182125), and pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase (OMIM# 603287) deficiencies. Other diseases that alter the normal function of dopamine in the synapses may increase the CSF HVA values, such as the recently reported dopamine transporter deficiency (OMIM# 126455).<sup>4</sup>

There is scientific evidence suggesting that impaired HVA values could be a biomarker for dopamine dysfunction in several neurological diseases in children.<sup>1,2,5–9</sup> In this study, we explored the prevalence of dopaminergic abnormalities in a large cohort of children with neurological disorders and correlated their HVA levels with clinical, radiological, and electrophysiological features.

### METHOD

#### STUDY GROUP

Between January 2001 and September 2010, 1713 CSF samples were analysed in the Sant Joan de Déu Hospital



Document Pdf insertat. Clicar sobre la primera pàgina per llegir l'article.

En el CD també s'adjunta l'article.

## Síntesi de resultats

### **1. Resultats de l'HVA en LCR en la mostra sencera de població (1388 pacients)**

#### **1.1. Prevalença d'alteracions en l'HVA en LCR**

- Del total de 1388 mostres de LCR analitzades, s'han diagnosticat 21 pacients (7 nens i 14 nenes) amb deficiència primària de la via dopaminèrgica: 11 deficiències de TH, quatre pacients amb deficiència de GTP -CH (dos pacients amb deficiència dominant i dos pacients amb deficiència recessiva), tres pacients amb defecte de la AADC, un cas amb deficiència de SR, un pacient amb deficiència combinada de MAO -A i MAO -B i un pacient amb deficiència de PNPO.

- Una vegada excloses les deficiències primàries (n=21), de les 1367 mostres restants, es va estudiar la prevalença de tenir els nivells d'HVA per sobre o per sota dels valors de referència per edat. El 15,4 % de les mostres van presentar deficiències d'HVA i el 4,6% van presentar valors d'HVA per sobre els valors de referència.

#### **1.2. Prevalença d'alteracions en l'HVA en LCR per grups d'edat de població**

- Pel test de  $\chi^2$  de Pearson es va analitzar la associació entre els grups d'edat de la població i la proporció de tenir l'HVA alterat (nivells augmentats o disminuïts), variables que van mostrar diferències significatives ( $\chi^2=84,8$ ,  $p<0,001$ ). Per tal d'estu diar quin era el grup d'edat amb més risc de tenir l'HVA disminuït es va aplicar el test d'Odds ratio, on el risc de presentar valors baixos d'HVA va ser més elevat en els pacients de menys d'un mes d'edat respecte als grups d'edat més grans (OR 1,78; IC 95% 1,08-298).

- Es va comparar el grau de deficiència d'HVA entre els pacients amb deficiència primària de dopamina (n=21) i aquells amb deficiència secundària. Es va observar un

solapament de valors d'HVA en els dos grups estudiats, sobretot en els pacients de major edat.

### **1.3. Associació entre els valors d'HVA i altres paràmetres bioquímics en LCR**

- Per estudiar la relació dels valors d'HVA en LCR amb la resta de magnituds bioquímiques analitzades en LCR es va realitzar un test de correlació lineal de Pearson. Es va observar una forta associació entre l'HVA i el valor de 5HIAA ( $r=0,75$ ;  $p<0,001$ ), així com entre l'HVA i l'edat ( $r=-0,51$ ;  $p<0,001$ ). L'associació amb els valors de biopterina ( $r=0,38$ ;  $p<0,001$ ) i neopterina ( $r=0,15$ ;  $p<0,001$ ) va ser inferior. A més a més, vam fer un estudi multivariant per tal d'observar la variable que mostra una associació més forta amb l'HVA. Una vegada, ajustada la variable edat, el 5HIAA va ser la variable que va mostrar major associació amb l'HVA.

### **2. Associació entre els valors d'HVA i la informació clínica i radiològica (696 pacients)**

- De les 1367 mostres analitzades es va tenir accés a la informació clínica i radiològica de 696 pacients. Es va estudiar la proporció de tenir l'HVA alterat i les proporcions van ser molt similars en quant a la totalitat de la mostra (15,8% de presentar l'HVA baix i 5,0% de tenir-lo elevat).

- Dels nou grups clínics establerts per classificar els 696 pacients, només el grup definit com a "processos hemorràgics i hipòxico-isquèmic" va tenir un risc més elevat de presentar alteracions en els valors del HVA (OR 2,1; IC 95% 1,0-41). La resta de grups clínics no van presentar significació estadística.

- En relació amb les resultats de les proves neurofisiològiques, l'EEG alterat i la presència d'epilèpsia va ser del 64,3% i 53,3%, respectivament, on cap d'aquestes condicions va incrementar el risc de tenir valors incrementats o disminuïts d'HVA.

- Respecte a l'estudi de la circumferència cranial, el 29,9% va presentar microcefàlia, 4,5% macrocefàlia i la resta de la població va tenir valors normals de circumferència.

Aquestes troballes clíniques tampoc van mostrar una associació estadísticament significativa per tenir més o menys quantitat d'HVA en LCR.

- En quant als resultats radiològics, dels 696 pacients un 38,5% (n=217) de pacients van presentar alteracions a la substància blanca. Única condició que sí que va suposar tenir més risc de tenir valors baixos d'HVA en LCR (OR 2,3; IC 95% 1,5–3,5). En aquests pacients va haver-hi una relació significativament estadística de tenir valors baixos d'HVA en LCR i valors baixos de 5-MTHF el LCR (OR 2,8; IC 95% 1,2–6,3).

### **3. Resultats de l'HVA en la població de diagnòstic confirmat (256 pacients)**

- Dels 696 pacients, fins a un total de 256 pacients es va disposar de la seva etiologia diagnòstica. Dins d'aquest grup, fins a un total de 70 pacients van tenir valors d'HVA alterats. Els valors baixos d'HVA van ser més freqüents en pacients amb infeccions al SNC (n=6/38), amb encefalopatia hipòxico-isquèmica perinatal (n=10/27), amb malalties mitocondrials (n=8/47) i hipoplàsia pontocerebel·lar tipus 2 (n=4/6). - D'altra banda, els pacients amb prematuritat (n=4/7) van ser els que van presentar valors més elevats d'HVA, així com les malalties mitocondrials que fins a 7 pacients (n=7/47) van presentar valors d'HVA per sobre els valors de referència.



## OBJECTIU 2

B. Analitzar les concentracions de pterines (neopterina i biopterina) en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques per la identificació de trastorns primaris i secundaris d'aquests coenzims. Avaluar la seva utilitat com a biomarcador en processos immuno-inflamatoris.

### **“Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropediatric patients: establishment of a new cut off-value for the identification of inflammatory-immune mediated processes”**

Marta Molero -Luis, BS, Sergio Fernández -Ureña, MD, Iolanda Jordán, MD, Merced Serrano, MD, PhD, Aida Ormazabal, PhD, Àngels Garcia -Cazorla, MD, PhD, Rafael Artuch, MD, PhD. For neopterin working group. PLoS One. 2013 Dec 18;8(12):e83237. doi: 10.1371/journal.pone.0083237. PubMed PMID: 24367586; PubMed Central PMCID: PMC3867431.

La tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) és el cofactor de la TH, enzim limitant per la síntesi de dopamina. D'aquesta manera, la quantitat de BH<sub>4</sub> és essencial atès que és necessària per la síntesi de les amines biògenes i la fenilalanina (Millner et al. 1998). No obstant això, la neopterina (metabòlit de síntesi de la BH<sub>4</sub>) també és alliberada quan hi ha una activació del sistema immunitari cel·lular a causa de l'estimulació que exerceix l'interferó -γ sobre la GTP-CH (primer enzim de la síntesi de BH<sub>4</sub>) durant els processos inflamatoris (Figura 6) (Hoffmann et al. 2003<sup>a</sup>, Dale et al. 2009). Per tant, la neopterina és un indicador sensible en aquells processos immuno-inflamatoris on la seva determinació en fluids biològics és de gran utilitat.

Actualment, hi ha pocs estudis que descriguin valors de referència de neopterina en LCR en edat pediàtrica, i els pocs que hi ha, estan orientats a detectar errors congènits del metabolisme de la BH<sub>4</sub> (Millner et al. 1998, Ormazabal et al. 2005, Blau et al. 2003<sup>a</sup>, Hyland et al. 1993). A raó d'això, que establir un punt de tall de neopterina en LCR d'una cohort de pacients amb inflamació al SNC, o amb malalties immuno-inflamatòries, podria ser de gran utilitat per poder confirmar bioquímicament que estem davant d'un procés immuno-inflamatori. En aquest sentit, sabent que molts pacients neuropediàtrics acaben tenint un diagnòstic sindròmic d'etiologia no filiada (Molero-Luis et al. 2013<sup>a</sup>), en aquells que presenten un valor de neopterina en LCR per sobre del valor de tall podria indicar que existeix un procés immuno-inflamatori, facilitant el diagnòstic diferencial entre d'altres causes neurològiques i, d'altra banda aportant una millor orientació terapèutica.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball va ser, en primer lloc, establir un nou valor de la neopterina en LCR a partir d'una població pediàtrica amb malalties immuno-inflamatòries. Amb aquest nou valor, vam avaluar, des del punt de vista bioquímic, clínic i radiològic, una cohort de 606 pacients neuropediàtrics amb la finalitat de reorientar el diagnòstic i/o tractament d'aquells pacients sense una etiologia clara.

# Cerebrospinal Fluid Neopterin Analysis in Neuropediatric Patients: Establishment of a New Cut Off-Value for the Identification of Inflammatory-Immune Mediated Processes

Marta Molero-Luis<sup>1\*</sup>, Sergio Fernández-Ureña<sup>2</sup>, Iolanda Jordán<sup>2</sup>, Mercedes Serrano<sup>1</sup>, Aida Ormazábal<sup>1</sup>, Àngels Garcia-Cazorla<sup>1</sup>, Rafael Artuch<sup>1</sup>, the Neopterin working group<sup>1,2,3†</sup>

**1** Clinical Biochemistry and Neuropediatric Departments, University Hospital Sant Joan de Déu, and Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, **2** Intensive Pediatric Care Unit Service, University Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **3** Molecular Microbiology Department, Microbiology Service, University Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

## Abstract

**Objective:** A high level of cerebrospinal fluid (CSF) neopterin is a marker of central nervous system inflammatory-immune mediated processes. We aimed to assess data from 606 neuropediatric patients, describing the clinical and biochemical features of those neurological disorders presenting CSF neopterin values above a new cut-off value that was defined in our laboratory.

**Methods:** To establish the new CSF neopterin cut-off value, we studied two groups of patients: Group 1 comprised 68 patients with meningoencephalitis, and Group 2 comprised 52 children with a confirmed peripheral infection and no central nervous system involvement. We studied 606 CSF samples from neuropediatric patients who were classified into 3 groups: genetic diagnosis (A), acquired/unknown etiologic neurologic diseases (B) and inflammatory-immune mediated processes (C).

**Results:** The CSF neopterin cut-off value was 61 nmol/L. Out of 606 cases, 56 presented a CSF neopterin level above this value. Group C had significantly higher CSF neopterin, protein and leukocyte values than the other groups. Sixteen of twenty-three patients in this group had a CSF neopterin level above the cut-off, whereas three and seven patients presented increased leukocyte and protein values, respectively. A significant association was found among CSF neopterin, proteins and leukocytes in the 606 patients. White matter disturbances were associated with high CSF neopterin concentrations.

**Conclusion:** Although children with inflammatory-immune mediated processes presented higher CSF neopterin values, patients with other neurological disorders also showed increased CSF neopterin concentrations. These results stress the importance of CSF neopterin analysis for the identification of inflammatory-immune mediated processes.

**Citation:** Molero-Luis M, Fernández-Ureña S, Jordán I, Serrano M, Ormazábal A, et al. (2013) Cerebrospinal Fluid Neopterin Analysis in Neuropediatric Patients: Establishment of a New Cut Off-Value for the Identification of Inflammatory-Immune Mediated Processes. PLoS ONE 8(12): e83237. doi:10.1371/journal.pone.0083237

**Editor:** Tai-Wei Chan-Ling, University of Sydney, Australia

**Received:** June 18, 2013; **Accepted:** November 1, 2013; **Published:** December 18, 2013

**Copyright:** © 2013 Molero-Luis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was supported by Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER, ISCIII). Dr. Mercedes Serrano and Mercedes Casado were supported by a CIBERER contract. Dr. Rafael Artuch is supported by the "programa de intercalificación de la actividad investigador" from ISCIII. Marta Molero was supported by program Río Hortega (ISCIII) and José Luis Castro Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mmolero@hsjdbcn.org

† Membership of the Neopterin working group is provided in the Acknowledgments.

## Introduction

Neopterin is a pterin containing a 2-amino-4-oxo-pyrazine-pyrimidine (pterin) ring and is formed from guanosine-triphosphate in the synthetic pathway of tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) [1]. BH<sub>4</sub> acts as a cofactor in the rate-limiting enzymatic step of dopamine and serotonin biosynthesis (hydroxylation of tyrosine and tryptophan) [2]. It also acts as a cofactor in the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine [3] and plays a role in the inducible

nitric oxide synthase reaction [2]. Moreover, neopterin is a direct response to T-helper cell 1 stimulation by interferon- $\gamma$  [4], [5], the central cytokine involved in the activation of the cellular immune system. Therefore, neopterin is a sensitive indicator in immune-mediated and inflammatory disorders [1], [6]. Its concentration in biological fluids may be useful for the diagnosis of inflammatory and immune-mediated diseases in which T-helper cell 1 and macrophages are involved [2], [6], [7]. It is also useful for the



Article Pdf insertat. Clicar sobre la primera pàgina per llegir l'article.

En el CD també s'adjunta l'article.

## Síntesi de resultats

- Per establir el valor de tall de la neopterina en LCR es va aplicar un corba ROC entre el grup 1 (infeccions del sistema nerviós central, n=68) i grup 2 (infeccions perifèriques, n=52). La millor discriminació es va obtenir amb un valor de neopterina en LCR de 61 nmol/L (AUC=0,934; rang: 0,883-0,985), amb una sensibilitat i especificitat de 91,3% i 88,5%, respectivament. Pel test d'U de Mann -Whitney es van comparar els resultats de les variables bioquímiques estudiades entre aquestes dos grups, observant-se diferències estadísticament significatives en el valor de leucòcits en LCR ( $p < 0,001$ ), neopterina en LCR ( $p < 0,001$ ), glucosa en LCR ( $p = 0,038$ ) i proteïnes en LCR ( $p < 0,001$ ).
- De tota la cohort neurològica seleccionada (n=606), es va estudiar l'associació (coeficient de correlació d'Spearman) entre la neopterina en LCR i les altres magnituds bioquímiques analitzades en LCR. Es va observar una correlació positiva entre la neopterina i les proteïnes ( $r = 0,178$ ,  $p < 0,001$ ), i neopterina i leucòcits ( $r = 0,148$ ,  $p < 0,001$ ), però no es va trobar correlació estadística amb l'edat i la glucosa.
- Dels 606 pacients neurològics estudiats, 56 d'ells van presentar la neopterina en LCR amb valors superiors al *cut-off* definit (61 nmol/L). El grup clínic catalogat de "malalties immuno-inflamatòries" (Grup C, n=23) va obtenir uns valors de neopterina ( $p < 0,001$ ), proteïnes ( $p = 0,002$ ) i leucòcits ( $p = 0,044$ ) més elevats que els altres dos grups clínics, A (malalties genètiques, n=160) i B (malalties neurològiques sense sospita inflamatòria/infecciosa, n=423). A més a més, el 69,6% de pacients del grup C (16/23) van presentar valors de neopterina per sobre el punt de tall. D'aquests 16 pacients, només tres van tenir els leucòcits en LCR elevats ( $> 5$  cèl·lules/mm<sup>3</sup>) i set pacients les proteïnes en LCR elevades ( $> 40$  mg/dL). No obstant això, els grups A i B

van presentar un percentatge de pacients amb valors de neoptèrina elevats, inclús alguns casos amb valors molt similars als obtinguts al grup C.

- En relació als pacients amb neoptèrina per sota el punt de tall (n=550) no es van trobar diferències estadístiques en les diferents variables bioquímiques estudiades. Tot i així, el nombre de pacients amb valors augmentats de proteïnes o leucòcits va ser elevat, sent de 68 i 9 pacients, respectivament.
- Pel test d'Odds ratio es va estudiar si l'increment de neoptèrina (>61 nmol/L) podia relacionar-se en tenir més risc de tenir les proteïnes elevades (>40 mg/dL), de tenir els leucòcits elevats (>5 cèl·lules/mm<sup>3</sup>), de presentar alteracions a la substància blanca o de tenir epilèpsia. Es va observar una associació significativa en tenir la neoptèrina elevada i les proteïnes elevades en el grup sencer de la població (OR=1,95; IC 95%= 1,1-3,48; p=0,026) i leucòcits elevats (OR=3,39; IC 95% = 1,44-7,98; p=0,028). El risc de tenir alteracions a la substància blanca amb la neoptèrina elevada només es va observar en el grup clínic B (OR=2,30; IC 95%= 1,72-3,07; p<0,001). D'altra banda, no es va observar risc significatiu en tenir les proteïnes elevades, leucòcits elevats, alteracions a la substància blanca o epilèpsia quan els valors de la neoptèrina en LCR eren inferiors a 61 nmol/L.

### OBJECTIU 3

- C. Analitzar les concentracions de piridoxal fosfat en LCR en pacients neuropediàtrics sense diagnòstic etiològic per la identificació de trastorns primaris i secundaris. Avaluar la resposta a la suplementació amb piridoxal fosfat en un grup de pacients amb encefalopaties epilèptiques greus.

#### **CSF VITAMIN B<sub>6</sub> LEVELS IN A LARGE COHORT OF NEUROPEDIATRIC PATIENTS: RESPONSE TO PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE IN DIVERSE EPILEPTIC ENCEPHALOPATHIES**

Cortès-Saladelafont E\*, Molero -Luis M\*, Duarte S, Casado M, Sierra C, O'Callaghan -Gordo M, Sanmartí-Vilaplana X, Fons C, González -Álvarez V, Pérez -Dueñas B, Poo P, Ramos F, Armstrong-Morón J, Artuch R, García-Cazorla À. \* Both authors contributed equally.

De la mateixa manera que la BH<sub>4</sub>, el manteniment d'uns valors òptims de vitamina B<sub>6</sub> és essencial pel correcte metabolisme de la dopamina, sent cofactor de l'enzim AADC. La vitamina B<sub>6</sub> participa com a cofactor en moltes reaccions de l'organisme, tenint un important paper en el metabolisme dels neurotransmissors a l'SNC: serina, histidina, glutamat, GABA, glicina, serotonina i dopamina (Clayton 2006). La síntesis de la forma activa de la vitamina B<sub>6</sub> (piridoxal fosfat) inclou diverses reaccions enzimàtiques, sent la última d'aquestes la més important i regulada per l'enzim PNPO. Bioquímicament, la deficiència d'aquest enzim comporta nivells disminuïts de PLP en LCR, i des del punt de vista clínic, els pacients debuten neonatalment amb epilèpsies refractàries als anticonvulsivants habituals, sent només controlables amb suplementes de PLP de manera immediata. No obstant això, a banda del dèficit primari de la PNPO existeixen d'altres

entitats nosològiques, o situacions, que poden cursar amb nivells disminuïts de PLP en LCR juntament amb alteració d'altres paràmetres bioquímics.

L'objectiu d'aquest treball ha estat analitzar les concentracions PLP en LCR en una cohort de pacients pediàtrics (n=147) amb la finalitat d'identificar trastorns primaris i secundaris relacionats amb la vitamina B<sub>6</sub>. Més específicament, donada la relació entre el PLP i la epilèpsia, hem avaluat la resposta a la suplementació amb aquesta vitamina en un grup de pacients amb encefalopaties epilèptiques greus d'etiologia desconeguda. En aquest pacients, hem aplicat, a més a més, estudis de diagnòstic diferencial mitjançant proves metabòliques i genètiques per descartar possibles causes conegudes de epilèpsia i de deficiència de vitamina B<sub>6</sub>. Des del punt de vista clínic, es descriu l'evolució clínica de tots els pacients així i com la resposta al tractament amb PLP de cadascun d'ells.

## CSF VITAMIN B<sub>6</sub> LEVELS IN A LARGE COHORT OF NEUROPEDIATRIC PATIENTS: RESPONSE TO PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE IN DIVERSE EPILEPTIC ENCEPHALOPATHIES

Elisenda Cortès -Saladelafont\*<sup>1</sup>, Marta Molero\*<sup>2,3</sup>, Sofia Duarte<sup>4,5</sup>, Mercedes Casado<sup>2,3</sup>, Cristina Sierra<sup>2,3</sup>, Maria del Mar O'Callaghan -Gordo<sup>1,2</sup>, Francesc Sanmartí-Vilaplana<sup>1,2</sup>, Carme Fons<sup>1,2</sup>, Verónica González-Álvarez<sup>1,2</sup>, Belén Pérez-Dueñas<sup>1,2</sup>, Pilar Poo<sup>1,2</sup>, Federico Ramos<sup>1,2</sup>, Alfredo García-Alix<sup>6</sup>, Judith Armstrong-Morón<sup>3</sup>, Rafael Artuch<sup>2,3</sup>, Àngels García-Cazorla<sup>1,2</sup>

\* Both authors contributed equally.

<sup>1</sup>Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>CIBER-ER (Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Department of Genetics and Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona.

<sup>4</sup>Molecular Medicine Institute, University of Lisbon, Portugal.

<sup>5</sup>Child Neurology Department, Hospital D. Estefânia, Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

<sup>6</sup>Department Neonatology, Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

### Corresponding author:

A.García-Cazorla,

Neurology Department, Hospital Sant Joan de Déu,

Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 280 4000; fax +34 93 203 3959. E

-mail address: [agarcia@hsjdbcn.org](mailto:agarcia@hsjdbcn.org)

## Abstract

Pyridoxal-phosphate (PLP) is the active form of vitamin B<sub>6</sub> and it is the cofactor of many enzyme reactions including neurotransmitter metabolism. Primary and secondary PLP metabolism disturbances can produce refractory seizures in the newborn period and in infancy, which may respond to this vitamin supplementation.

After the analysis of PLP in cerebrospinal fluid in 147 patients, we recruited a series of 10 patients who disclosed low-normal CSF PLP values and we assessed their response to PLP treatment. Patients (aged 1 day to 4 years) presented mainly with epileptic encephalopathy. Three of them had a definite diagnosis (Phelan McDermid syndrome, *KCNQ2* and *SCN9A* mutations). In the remaining 7 patients, no diagnosis was achieved after extensive metabolic and genetic workup. Metabolic markers of PLP deficiency in plasma and CSF showed normal or unspecific alterations in all cases. None of patients had evidences of secondary PLP deficiencies. Response to PLP treatment (10 to 30 mg/kg day) was positive for seizure control and cognitive performance in 5 cases, while the others showed no positive response. PLP side-effects were noticeable in 2 patients.

In conclusion, several hypotheses may explain the clinical response to PLP supplementation in our series of patients. PLP is the essential cofactor for multiple enzymes in central nervous system, chaperone activity demonstrated for PLP may contribute to different therapeutic benefits, and CSF PLP values probably do not reflect the optimal PLP concentrations in different types of neurons and brain areas.

## Introduction

Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is the active form of vitamin B<sub>6</sub>, which is the essential cofactor for over 100 metabolic reactions, including enzymes involved in the metabolism of the neurotransmitters glutamate, GABA, glycine, serine, dopamine, serotonin and noradrenaline (Clayton 2006). PLP is synthesized via phosphorylation of vitamin B<sub>6</sub> through the action of an ubiquitous kinase and oxidation by pyridoxamine 5'-prime-phosphate oxidase (PNPO: EC 1.4.3.5). It has recently been described its chaperone activity in the folding of some altered enzymes involved in rare diseases (Cellini 2013). Furthermore, its role in participating in some actions beyond its coenzyme function has been deeply investigated (Allen et al 2010) regarding the L-aromatic amino acid decarboxylase activity (AADC: EC 4.1.1.28). They demonstrated that PLP may prevent the degradation of some PLP-dependent enzymes, interacts with transcription factors and it is involved in AADC folding, dimerization and splicing.

PLP-responsive seizures may be caused by mutations in *PNPO* gene (MIM \*603287). This inborn error of metabolism was initially described as a cause of neonatal vitamin B<sub>6</sub>-responsive epileptic encephalopathy (Mills et al 2005; Plecko et al 2009). As PNPO is the main enzyme involved in the synthesis of PLP, it is thought that mutations in the *PNPO* gene would explain most disorders that account with decreased levels of PLP in cerebrospinal fluid (CSF). But beyond those *PNPO* mutations, there are patients already described with no mutations at this gene but presenting with low CSF PLP levels (Goyal et al 2013). Other genetic conditions related with PLP deficiency are pyridoxine-dependent epilepsy (MIM\*107323), hyperprolinemia type II (MIM\*606811), hypophosphatasia (MIM\*171760) and sulfite oxidase deficiency (MIM\*606887) (Clayton 2006; Footitt et al 2011). Environmental factors, like the presence of seizures, treatment with some drugs or malabsorptive syndromes have been related with PLP deficiency.

In this work, we aimed to describe our experience in CSF PLP analysis in 147 neuropsychiatric patients focusing our attention in a series of 10 selected cases presenting low to normal CSF PLP values, who showed different clinical features and a variable response to PLP treatment.

## 2. Methods

### 2.1. Study setting and inclusion criteria



Over the last 10 years, we have biochemically studied CSF samples from 1388 neuropsychiatric patients. Details of this study have been reported elsewhere (Molero et al, 2013). Among the whole group of patients, we analyzed PLP in a 147 subset of CSF samples due to clinical picture (mainly epilepsy of unknown origin), or because the biochemical profile was suggestive of PLP deficiency. Among these patients, we selected a series of 10 cases with different phenotypes but presenting epilepsy as a common clinical feature for PLP supplementation. These 10 cases presented low CSF PLP values or PLP values close to the lowest limit of our reference intervals. All patients' biochemical results were compared with our reference values, established in a control population, as previously reported (Moyano et al 1998, Ormazabal et al 2005, 2008)

## 2.2. Biochemical methods

Plasma and CSF amino acids were analyzed by ion exchange chromatography with ninhydrin detection (Biochrom 30, Pharmacia Biotech, Biochrom, Cambridge, Science Park, England). Alkaline phosphatase was analyzed with standard automated spectrometric procedures. Urine sulfites were analyzed by qualitative test strips according to manufacturer's protocol (Merck Millipore, MA, USA). CSF neurotransmitter analysis (3-orthomethyldopa, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindoleacetic and homovanillic acids) and PLP were done by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical (Coulchem II, ESA, Chelmsford, USA) and fluorescence (Perkin Elmer, serie 200, Norwalk, CT, USA) detection, according to previously reported procedures (Ormazabal et al. 2005, 2008).

## 2.3. Molecular studies

Genomic DNA was isolated from venous whole blood from all patients except for one who died at 30 days of age. We amplified and sequenced the *PNPO* coding regions gene in the nine patients using a set of seven primers pairs. Patients 2 and 5 were studied by massive sequencing technology (Sure Select XT kit, Agilent Technology) and HiSeq 2000 system (Illumina, USA) to study 84 genes associated to neonatal or infantile epilepsy (early epileptic encephalopathy panel). Patient 9 was studied by multiplex ligand-dependent probe amplification (MLPA, MRC-Holland®).

## 2.4. PLP treatment

All patients were treated with PLP according to the existing recommendations. Oral doses ranged from 10 -30 mg/Kg/day (Clayton 2006; Wang et al 2005). We started with 10 mg/Kg/day scaling doses every week up to 30mg/Kg/day. All patients were under treatment with PLP for at least 2 -3 months. In two patients that reported gastrointestinal symptoms (abdominal pain, diarrhea and nausea) treatment was discontinued after 2 months of PLP therapy. In the others treatment was discontinued when no response was observed after 3 months of therapy.

#### 2.5. Caregiver's consent

All caregiver's were informed of the analysis' results and the supplementary treatment with PLP was proposed. All gave their written consent as part of clinical and investigation care.

### 3. Patients and results

Reference values for CSF PLP were stratified into four reference intervals, as previously reported (Ormazabal et al 2008). Results of CSF PLP analysis in the cohort of 147 patients (mean age: 2,4 years; range age: 1 day -19 years) are stated in **Figure 1**. 25 out of 147 patients (17.1%) showed decreased CSF PLP values (14 out of these 25 cases had less than one month of age). None of the 25 cases (except for patient who was diagnosed by PNPO deficiency (Ruiz et al 2008)) with low CSF PLP showed impaired results in biomarkers associated with PLP deficiency (CSF amino acids and neurotransmitters, data not shown). We also did a correlation analysis in order to explore the association of CSF PLP concentrations with other related variables, such as patient's age, and CSF 5HIAA and HVA concentrations. Since CSF PLP values negatively correlated with age (Spearman test  $r = -0.259$ ,  $p = 0.002$ ) multiple linear regression analysis was applied to minimize the confounding effect of the patient's age. No correlation was observed among 5HIAA and HVA as dependent variables with CSF PLP values and the age of patients as independent ones (data not shown). We compared the values of our reference population with those of patients of our cohort with normal CSF PLP values (U -mann-whitney test), and both groups did not show significant differences (**Figure 1**).

#### 3.1. Patient phenotype

Patient main clinical features are summarized in **Table 1** . Although epilepsy was the commonest clinical sign, not all patients presented a similar phenotype. In 3 patients, genetic diagnosis was achieved: Patient 2, who started with seizures at 17 hours of age, harbored a heterozygous mutation in the sodium channel, *SCN9A* gene (c.469T>C; p.Tyr157His), related with genetic epilepsy with febrile seizures plus Dravet syndrome. Patient 4 harbored a heterozygous mutation in gene *KCNQ3*, encoding a protein in a potassium channel (c.2306C>A; p.Pro769His). The parental molecular study confirmed this mutation, and now investigation of mutation pathogenicity is being done. And patient 9, presenting intellectual disability, was diagnosed with Phelan-McDermid syndrome (-22q) by multiplex ligand-dependent probe amplification (MLPA) . No mutations at *PNPO* gene were detected in the 10 patients (**Table 1**).

### 3.2. Laboratory findings

All laboratory results regarding CSF PLP, neurotransmitters and amino acids levels are summarized in **Table 2**. Five cases presented with CSF PLP deficiency and 5 with PLP values close to the lowest limit of the reference interval. No X -Peak was detected in any CSF studied. Studies conducted in plasma and urine for differential diagnosis disclosed normal results in all patients (sulfites, phosphatase alkaline activity, amino acids, etc).

### 3.3. Clinical outcomes

PLP treatment response of patients is summarized in **Table 3** , as well as previous or concomitant treatments. The clinical response to PLP supplementation was diverse. Among those who showed an evident improvement there were patients 1, 3, 4, 7 and 10. Patients 6 and 9 showed no clinical improvement and the treatment were discontinued after 3 months of PLP therapy. Patients 2 and 5 had a very severe clinical picture with a fatal outcome in spite that PLP treatment was maintained until they died. The cause of epilepsy had not yet been elucidated. Patient 8 also had gastrointestinal adverse effects, but during the treatment attempt period, he showed no clinical changes. Overall, PLP response was not related either with CSF PLP concentrations or the etiology of the disease.

## 4. Discussion

We have identified 25 patients presenting low CSF PLP values, being an important percentage of the cases studied. Most of these cases were detected in the newborn period, suggesting that probably in this moment there is an increasing demand of PLP for the growing brain, as has been demonstrated for other CNS metabolites and cofactors (Herlenius et al 2004, Pons et al 2004 ). We also detected a case with mutations at the *PNPO* gene, showing the lowest CSF PLP values (Ruiz et al 2008). Concerning PLP correlations with the other variables assessed, we confirmed, as previously suggested (Ormazabal et al 2008), that CSF PLP values did not correlate with both HVA and 5-HIAA, being the age of patients a confounding variable. An explanation for this observation would be that the rate-limiting enzymatic step for dopamine and serotonin biosynthesis is the hydroxylation of both tyrosine and tryptophan for dopamine and serotonin biosynthesis, but not the PLP-dependent AADC activity (Pons et al 2004).

After the description of *PNPO* deficient patients responding to PLP administration, some other patients with deficient CSF PLP values with no mutations at the *PNPO* gene were described (Goyal et al 2013; Veerapandiyam et al 2011) . All that rises the interest in other secondary forms of CSF PLP deficient status (Mills et al 2005; Clayton 2006; Fo otitt et al 2011). The most common causes of secondary PLP deficiency were excluded in our series (malabsorption síndromes and drugs containing amino groups, such as hydrazines, hydroxilamines, penicillamine, methylxanthines and sulphhydryl compounds (Clayton 2006) ). No patient exhibited clinical signs of hypophosphatasia and alkaline phosphatase was within the normal range. The sulfite test in urine was negative for all patients. Inborn errors of metabolism that cause accumulation of metabolites that can react with PLP we rule out; 1) hyperprolinaemia; all patients showed normal plasma proline concentrations. 2) pyridoxine-responsive epilepsy (antiquitin deficiency): any patient had a neurotransmitter profile indicating an antiquitin deficiency (high CSF 3-OMD and low CSF 5-HIAA and HVA (Kurian et al 2011 , Hyland 2003; Clayton 2006). Additionally, peak X was not present in any of our patients. This peak X, an unidentified compound originally described in patients with folinic acid-responsive seizures (Hyland et al 2002), is used as a pathognomonic biomarker for antiquitin deficiency (Stockler et al 2011 ; Pérez et al 2013) . Additionally, the genetic *PNPO* testing did not show mutations in all patients as well.

In our patients response to treatment was different from that expected in the primary PNPO defect, where an early response and complete cessation of the clinical events are expected (Schmitt et al 2010). Our patients, except from patient 10 who had a complete normalization of the EEG, had a mild -slower response observed within days or weeks. Moreover, no relationship was observed between CSF PLP values and the clinical outcome after PLP supplementation. Those improvements conferred an important positive impact on the day - to-day routine of those families.

In conclusion, several hypotheses may explain the clinical response to PLP supplementation in our series of patients. PLP is the essential cofactor for multiple enzymes, most of them acting in different CNS metabolic pathways. Thus, those neurological signs associated with a suboptimal PLP status are expected to be diverse and multiple. Chaperone activity demonstrated for PLP may contribute to different therapeutic benefits, and such effects would not be necessarily related with a central nervous system PLP deficient status. Furthermore, CSF PLP values probably do not reflect PLP concentrations in different types of neurons and brain areas, gradient phenomena, different PLP metabolic kinetic constants and other factors may contribute to this disparity. Finally, the antiepileptic effect of PLP through GABA synthesis and catabolism may be a key factor regarding epilepsy control.

## References

- Allen, G. F. G., Neergehen, V., Oppenheim, M., Fitzgerald, J. C., Footitt, E., Hyland, K., Clayton P., Land J., Heales, S.. (2010). Pyridoxal 5' -phosphate deficiency causes a loss of aromatic L -amino acid decarboxylase in patients and human neuroblastoma cells, implications for aromatic L-amino acid decarboxylase and vitamin B(6) deficiency states. *Journal of Neurochemistry*, 114, 87–96. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06742.x
- Cellini, B., Montioli, R., Oppici, E., Astegno, A., & Voltattorni, C. B. (2013). The chaperone role of the pyridoxal 5' -phosphate and its implications for rare diseases involving B6 -dependent enzymes. *Clinical Biochemistry*. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.11.021
- Clayton, P. T. (2006). B6 -responsive disorders: a model of vitamin dependency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2-3), 317–26. doi:10.1007/s10545-005-0243-2
- Footitt, E. J., Heales, S. J., Mills, P. B., Allen, G. F. G., Oppenheim, M., & Clayton, P. T. (2011). Pyridoxal 5'-phosphate in cerebrospinal fluid; factors affecting concentration. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 529–538. doi:10.1007/s10545-011-9279-7
- Goyal, M., Fequiere, P. R., McGrath, T. M., & Hyland, K. (2013). Seizures with decreased levels of pyridoxal phosphate in cerebrospinal fluid. *Pediatric Neurology*, 48(3), 227–31. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2012.11.006
- Hyland K, Arnold LA. Value of lumbar puncture in the diagnosis of infantile epilepsy and folinic acid-responsive seizures. *J Child Neurol*. 2002 Dec;17 Suppl 3:3S48 -55; discussion 3S56. Review.
- Hyland K. The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases. *Ann Neurol* 2003;54:S13-17.
- Kuo, M.-F., & Wang, H.-S. (2002). Pyridoxal phosphate-responsive epilepsy with resistance to pyridoxine. *Pediatric Neurology*, 26(2), 146–147.
- Kurian, M. A., Gissen, P., Smith, M., Heales, S., & Clayton, P. T. (2011). The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurology*, 10(8), 721–33. doi:10.1016/S1474-4422(11)70141-7
- Mills PB, Surtees RA, Champion MP, Beesley CE, Dalton N, Scambler PJ, Heales SJ, Briddon A, Scheimberg I, Hoffmann GF, Zschocke J, Clayton PT. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5' -phosphate oxidase. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 15;14(8):1077-86
- Mintzer, S., Skidmore, C. T., & Sperling, M. R. (2012). B-vitamin deficiency in patients treated with antiepileptic drugs. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 24(3), 341 –4. doi:10.1016/j.yebeh.2012.04.132

- Molero-Luis M, Serrano M, Ormazabal A, Pérez -Dueñas B, García -Cazorla A, Pons R, Artuch R. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2013a Jun;55(6):559-66.
- Moyano, D., Vilaseca, M. A., Artuch, R., & Lambruschini, N. (1998). Plasma amino acids in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Nutrition* , 52(9), 684–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756126>
- Ormazabal, A., García -Cazorla, A., Fernández, Y., Fernández -Alvarez, E., Campistol, J., & Artuch, R. (2005). HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *Journal of Neuroscience Methods*, 142(1), 153–8. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.08.007
- Ormazabal, A., Oppenheim, M., Serrano, M., García -Cazorla, A., Campistol, J., Ribes, A., Ruiz A, Moreno J, Hyland K, Clayton P, Heales S , Artuch, R. (2008). Pyridoxal 5' -phosphate values in cerebrospinal fluid: reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Molecular Genetics and Metabolism* , 94(2), 173 –177. doi:10.1016/j.ymgme.2008.01.004
- Pérez B, Gutiérrez-Solana LG, Verdú A, Merinero B, Yuste -Checa P, Ruiz-Sala P, Calvo R, Jalan A, Marín LL, Campos O, Ruiz MÁ, San Miguel M, Vázquez M, Castro M, Ferrer I, Navarrete R, Desviat LR, Lapunzina P, Ugarte M, Pérez -Cerdá C. Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine -dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia*. 2013 Feb;54(2):239 -48. Pérez, B., Gutiérrez-Solana, L. G., Verdú, A., Merinero, B., Yuste -Checa, P., Ruiz -Sala, P., ... Pérez-Cerdá, C. (2013). Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine -dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia*, 54, 239 –48. doi:10.1111/epi.12083
- Plecko, B., & Stöckler, S. (2009). Vitamin B6 dependent seizures. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* , 36 Suppl 2 , S73–S77.
- Ruiz A, García-Villoria J, Ormazabal A, et al. A new fatal case of pyridox(am)ine 5' -phosphate oxidase (PNPO) deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 93: 216-8.
- Schmitt, B., Baumgartner, M., Mills, P. B., Clayton, P. T., Jakobs, C., Keller, E., & Wohlrab, G. (2010). Seizures and paroxysmal events: symptoms pointing to the diagnosis of pyridoxine-dependent epilepsy and pyridoxine phosphate oxidase deficiency. *Developmental Medicine and Child Neurology*. doi:10.1111/j.1469-8749.2010.03660.x
- Stockler S, Plecko B, Gospe SM Jr, Coulter -Mackie M, Connolly M, van Karnebeek C, Mercimek-Mahmutoglu S, Hartmann H, Scharer G, Struijs E, Tein I, Jakobs C, Clayton P, Van Hove JL. Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and

molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Mol Genet Metab.* 2011 Sep-Oct;104(1-2):48-60

Veerapandiyan, A., Winchester, S. a, Gallentine, W. B., Smith, E. C., Kansagra, S., Hyland, K., & Mikati, M. a. (2011). Electroencephalographic and seizure manifestations of pyridoxal 5'-phosphate-dependent epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B* , 20(3), 494 –501. doi:10.1016/j.yebeh.2010.12.046

Wang, H. -S., Kuo, M. -F., Chou, M. -L., Hung, P. -C., Lin, K. -L., Hsieh, M. -Y., & Chang, M. -Y. (2005). Pyridoxal phosphate is better than pyridoxine for controlling idiopathic intractable epilepsy. *Archives of Disease in Childhood* , 90(5), 512 –515. doi:10.1136/adc.2003.045963



Table 1. Patient's characteristics

Patients		Diagnostic				Neonatal / F. history	Clinical			
	Age	Main diagnostic	CSF PLP (nmol/L)	Plasma PLP	PNPO genetics		Seizures (age at onset)	Seizures description	EEG	Other
P1	11y1m	E + CP	13 (11-40)	N	Negative	NR	1m	Partial complex	Lentificated ground pattern	Pyramidal signs
P2	Exitus	Mutation in the sodium channel SCN9A (exitus at 2m): E	<b>9.4</b> <b>(32-78)</b>	N	Negative	NR	17 hours	Mioclonic	BS	Developmental delay
P3	5y9m	E + MR + ataxia + hipoacusia	<b>8</b> <b>(11-40)</b>	L	Negative	NR	11m	Generalized	Occipital paroxisms	Motor retardation
P4	14m	Channelopathy (mutation in gene KCNQ3): E + cortical dysplasia	<b>5</b> <b>(32-78)</b>	L	Negative	NR	18d	Clonic + subtle	Lentificated ground pattern	Hypertonia
P5	Exitus	EE (exitus at 30 days of life)	<b>23</b> <b>(32-78)</b>	L	No DNA	NR	17d	Central apnea + tonic	BS	Encephalopathy
P6	3m	E + hypotonia	<b>19</b> <b>(32-78)</b>	H	Negative	NR	13d	Hypotonia	Central discharges	Developmental delay, hypotonia, failure to thrive
P7	5y	Dyskinesia + MR	22 (11-40)	N	Negative	NR	No epilepsy		Lentificated ground pattern	Spastic-distonic palsy
P8	15y6m	E + MR + behavior disorder	12 (11-40)	N	Negative	Seizures (mother, sister)	No seizures	Behavior disorder	Bifrontal discharges	Psychiatric symptoms
P9	8y10m	Sd. Phelan-McDermid (-22q)	14 (11-40)	H	Negative	NR	6y	Behavior disorder	Fronto temporal discharges + lentificated ground pattern	Developmental delay
P10	8y2m	E + MR	18 (11-40)	N	Negative	NR	17m	Generalized	SW 3Hz	Motor retardation

In bold letters are stated the patients with low CSF PLP. In brackets are indicated our reference values ( Ormazabal et al. 2008). BS=burst-suppression; CP=cerebral palsy; E=epilepsy; EE=epileptic encephalopathy; H=high; L=low; LL=lower limit; MR=mental retardation; N=normal; ND=not determined; NR=not relevant.

Table 2. Laboratory findings.

Patients		Laboratory				
		Plasma	CSF			
	Age at LP	PLP	PLP (nmol/L)	3-OMD (nmol/L)	5-HIAA (nmol/L)	HVA (nmol/L)
P1	10.5y	N	13 (11-40)	N	76 (87-366)	N
P2	19d	N	<b>9.4</b> <b>(32-78)</b>	N	N	N
P3	4.5y	L	<b>8</b> <b>(11-40)</b>	N	94 (106-658)	N
P4	1m	L	<b>5</b> <b>(32-78)</b>	379 (24-148)	N	N
P5	1m	L	<b>23</b> <b>(32-78)</b>	N	352 (428-1122)	328 (658-1434)
P6	17d	H	<b>19</b> <b>(32-78)</b>	N	N	N
P7	4.1y	N	22 (11-40)	N	N	N
P8	14.1y	N	12 (11-40)	ND	ND	ND
P9	7y	H	14 (11-40)	N	49 (87-366)	N
P10	6.6y	N	18 (11-40)	N	68 (106-316)	N

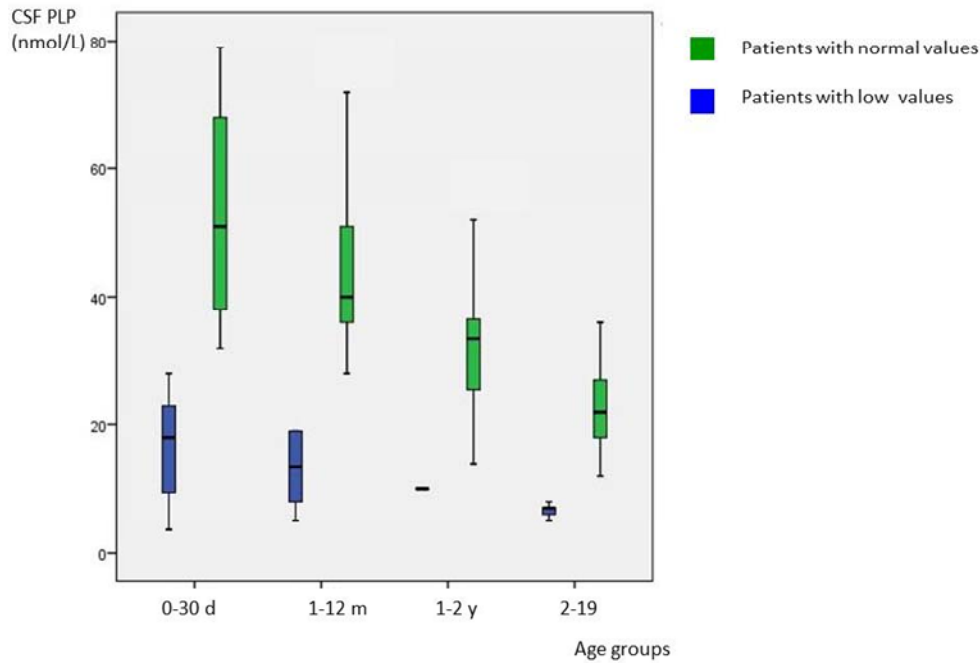
Plasma PLP levels are classified into N, L or H according to our reference intervals. In bold letters are stated the patients with low CSF PLP. In brackets are indicated our reference values (Ormazabal et al. 2008). LP: lumbar puncture; PLP: pyridoxal phosphate; 3-OMD=3-orthomethyldopa; 5-HIAA=5-hydroxyindoleacetic acid; HVA=homovanilic acid; N=normal; L=low; H=high; ND=not determined.

Table 3. Response to treatment

Patients	Treatment		
	Pharmacological	Antiepileptic drugs	Response to PLP treatment
P1	Baclofen, carnitine	CBZ+LEV+FB (VPA discontinued)	Less seizures / Subjective cognitive improvement
P2		FB + LEV + PH	No improvement
P3	Q10	CBZ + VPA	Adverse effects (gastrointestinal)
P4		FB since 20dol	Subjective cognitive improvement
P5	Tiamine, biotine	FB	No improvement
P6	Biotine	FB	No improvement
P7	Trihexifenidile hidrocloruro + melatonine +L-Dopa	No AED	Subjective improvement: less movement disorders, less sleep disturbances
P8	Aripiprazol, metilphenidat, atomoxetine	VPA	Adverse effects (gastrointestinal) -- no improvement during treatment
P9	Risperidone, levomepromazine	CBZ + CLZ	No improvement
P10	Folinic acid	VPA	Normal EEG after treatment initiation

CBZ=carbamacepine; CLZ=clobazam; FB=phenobarbital; LEV=levetiracetam; PH=phenytoin; VPA=valproic

acid

**Figure 1.** Blox-plot and table with CSF PLP values for study cohort.

Age group	0-30 d	1-12 mo	1-2 y	2-19 y
Reference values ( <i>Ormazabal 2008</i> )	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 39
Median ( <i>Ormazabal 2008</i> )	51.5	43.1	30.5	20.7
Range ( <i>Ormazabal 2008</i> )	32-78	24-87	14-59	11-40
Patients with normal CSF PLP values ( <i>n</i> =147)*	<i>n</i> = 19	<i>n</i> = 26	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 25
Median (nmol/L)	51	40	33.5	22
Range (nmol/L)	32-79	28-77	14-55	12-36
Patients with low CSF PLP values ( <i>n</i> = 25)	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 5
Median (nmol/L)	18.50	10	10	7
Range (nmol/L)	4.28	5-19	--	5-8

Figure 1. Box-plot representation of patients with normal and low CSF PLP values stratified in four age paediatric groups. The length of the boxes indicates the interquartile space (p25 – p75); the horizontal line into the box represents the median (p50) and the whiskers indicate the adjacent values. The upper and lower limits of the reference intervals were the maximum and minimum values obtained for the different age -groups. Table shows the median and range of CSF PLP of both study groups, as well as our previously published reference values (Ormazabal et al. 2008). \*Patients of elevated CSF PLP values (n=31) were not considered in the Figure due to they were under PLP supplementation

### **Acknowledgements**

We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the National Network Biobanks of ISCIII for the sample and data procurement.

## Síntesi de resultats

### *Resultats bioquímics*

#### **1- Anàlisi de la mostra sencera d'estudi (n=147)**

Es va analitzar la concentració de PLP de 147 mostres de LCR (rang d'edat: 0,02 a 19 anys) de pacients que havien estat sotmesos a un punció lumbar per sospita de malaltia neurometabòlica.

Després de testar la distribució de les variables d'estudi (PLP, edat, HVA i 5HIAA) per la prova de Kolmogorov-Smirnov i comprovar que no segueixen una distribució Gaussiana, es va prosseguir l'estudi utilitzant les proves no paramètriques corresponents.

Es va estudiar la prevalença de tenir els nivells de PLP per sota dels valors de referència per edat, els quals s'havien establert prèviament al nostre laboratori (Ormazabal et al. 2008). De les 147 mostres, un total de 25 mostres (17,1%) van mostrar concentracions de PLP per sota dels valors de referència per edat. Tot i que 12 d'aquests pacients van pertànyer al grup d'edat més petit (0 a 30 dies d'edat), no es van observar diferències significatives respecte als altres grups d'edat (prova Kruskal-Wallis,  $p=0,066$ ,  $\chi^2=7,182$ ). Dels pacients amb valors de PLP disminuït (n=25), un pacient va ser confirmat genèticament de deficiència de PNPO (Ruiz et al. 2008), mentre que la resta de pacients (n=24) no van presentar un perfil d'aminoàcids i neurotransmissors associat a una deficiència de PLP.

D'altra banda, es va estudiar la correlació lineal (variable Rho d'Spearman) entre les variables PLP, HVA, 5HIAA i edat, així com la regressió lineal múltiple, per tal d'identificar la variable més influenciable enfront el PLP (variable dependent). Es va observar una correlació estadísticament significativa entre el PLP i l'edat ( $r = -0,259$ ,  $p=0,002$ ) i PLP i 5HIAA ( $r = 0,176$ ,  $p=0,036$ ). Tot i aquests resultats i, sabent per la literatura publicada (Ormazabal et al. 2008,

Footit et al. 2011) que l'edat té un gran efecte amb els valors del PLP, vam fer una regressió lineal múltiple per minimitzar la influència d'aquesta variable. Amb aquest anàlisi es va comprovar que no existia correlació entre els valors de PLP i les concentracions de les amines biògenes, resultats similars als ja publicats en un treball previ (Ormazabal et al. 2008).

Es van comparar els valors de la nostra població pediàtrica de referència amb els dels pacients de la cohort d'estudi que no presentaven deficiència de PLP (test d'U de Mann-Whitney), on ambdós grups no van mostrar diferències significatives.

## ***2- Anàlisi de pacients amb dèficit de PLP en LCR amb clínica associada a dèficit de PLP (n=10)***

### ***Resultats bioquímics***

Es va fer una selecció de 10 pacients que mostraven nivells alterats, o bé propers al límit inferior de la normalitat, de PLP amb una clínica compatible d'ECM relacionat amb el metabolisme de la vitamina B<sub>6</sub>. Dels 10 pacients, 5 d'ells van presentar valors de PLP en LCR per sota els valors de referència per edat mentre que la resta de pacients (pacients 1, 7, 8, 9 i 10) van presentar valors de PLP en LCR propers al límit inferior de l'interval de referència (Ormazabal et al. 2008).

A la Taula 2 de l'article es mostren els resultats dels aminoàcids i NT en LCR, així com els valors de PLP tant en plasma com en LCR. L'anàlisi dels NT en LCR va permetre comprovar la inexistència del pic X en el cromatograma, indicant la absència del dèficit d'antiquitina. La resta de paràmetres bioquímics estudiats en LCR, plasma i orina van mostrar resultats normals en tots els pacients, o amb alteracions inespecífiques.

### ***Resultats clínics***

Les principals característiques clíniques es mostren a la Taula 1 de l'article. La presentació clínica del deu pacients va ser molt heterogènia sent l'epilèpsia la característica comuna en tots ells.

En tres pacients es va arribar al diagnòstic genètic. El pacient 2, el qual va començar a convulsionar a les 17 hores de vida, va presentar una mutació en heterozigosi al canal de sodi del gen *SCN9A* (c.469T>C; p.Tyr157His), una canalopatia d'herència dominant relacionada amb epilèpsia, convulsions febrils i síndrome de Dravet. El pacient 4 va presentar una mutació en heterozigosi al gen *KCNQ3* (c.2306C>A; p.Pro769His), una canalopatia d'herència dominant del canal de potassi. L'estudi patern va confirmar aquesta troballa, on actualment s'està investigant la patogenicitat d'aquesta mutació. L'anàlisi genètic d'aquests dos pacients es va realitzar per panells genètics d'encefalopatia epilèptica. Aquest panell genètic consisteix en l'anàlisi de 84 gens associats a malalties que causen epilèpsia neonatal o infantil.

També es va arribar al diagnòstic genètic de la pacient 7 a partir de l'anàlisi genètic per MLPA (*multiplex ligation probe amplification*). L'estudi va confirmar una pèrdua de material genètic del braç llarg del cromosoma 22 (-22q) associat amb una discapacitat intel·lectual amb síndrome de Phelan-McDermid.

L'estudi molecular del gen *PNPO* es va realitzar en els deu pacients seleccionats, on cap d'ells va presentar mutacions patogèniques.

### **Resposta al tractament amb piridoxal fosfat**

La resposta al suplement amb PLP va ser diversa (veure Taula 3 de l'article). Els pacients que presenten una millora més evident van ser els pacients 1, 3, 4, 7 i 10. Els pacients 6 i 9 no



van mostrar cap millora i el tractament va ser retirat als 3 mesos de teràpia. Els pacients 2 i 5 van tenir una clínica molt complicada amb poca resposta al tractament, encara que aquesta es va mantenir fins que ambdós pacients van morir a conseqüència de la malaltia. Actualment, la causa de l'epilèpsia no ha estat identificada. El pacient 8 també va presentar efectes adversos gastrointestinals, tot i que durant la teràpia no va presentar cap canvi simptomatològic. En vista a aquests resultats, la resposta al suplement amb PLP no va estar relacionada ni amb el nivells de PLP en LCR ni amb la etiologia de la malaltia.

## DISCUSSIÓ

1- *Discussió conjunta*

2- *Discussió per objectius*



## 1- Discussió conjunta

Després de l'estandardització de l'anàlisi dels metabòlits relacionats amb el metabolisme de dopamina, hem aportat millores en el coneixement de les diferents malalties relacionades amb aquest neurotransmissor. La síntesi i catabolisme de la dopamina inclou diferents etapes metabòliques que poden avaluar-se a partir de la quantificació dels metabòlits presents a LCR, així com dels cofactors que hi participen. En aquesta tesi s'ha avaluat el paper del metabòlit final i estable de la degradació de dopamina, l'àcid homovanílic. Aquest metabòlit ens ha permès diagnosticar varis ECM relacionats amb la via dopaminèrgica però també detectar estats dopaminèrgics deficitaris probablement causats per altres malalties de forma secundàries. L'important paper dels cofactors en la síntesis de la dopamina, com la tetrahydrobiopterina (analitzant els seus metabòlits, neopterinina i biopterina) i la vitamina B<sub>6</sub> (analitzant el piridoxal fosfat, que és el vitàmer actiu) ha completat l'anàlisi de ls biomarcadors relacionats amb la dopamina en les cohorts estudiades a l'hospital Sant Joan de Déu. De la mateixa manera que l'anàlisi de l'HVA a LCR, s'han pogut diagnosticar varis ECM relacionats amb els defectes de les pterines i de la vitamina B<sub>6</sub>, però també millorar el coneixement científic respecte a altres alteracions tant de la neopterinina com del piridoxal fosfat en LCR.

Aquest estudi s'ha realitzat en pacients procedents de l'HSJD, però també d'altres hospitals internacionals, com de Portugal, Argentina, Grècia, Turquia, Índia, entre altres. La col·laboració amb altres serveis del nostre hospital ha donat un component traslacional als tres treballs presentats en aquesta tesi, que inclouen dades clíniques, bioquímiques i moleculars, aportant un aspecte més holístic i tenint

una aplicació pràctica i valuosa per l'estudi de pacients amb malalties neuropediàtriques greus .

## 2- Discussió per temes

### Anàlisi de les concentracions d'àcid homovanílic en LCR en pacients pediàtrics amb malalties neurològiques com a eina bioquímica per la identificació d'alteracions dopaminèrgiques. Avaluació de la seva utilitat com a biomarcador en un ampli ventall de malalties neurològiques

Segons el nostre coneixement, fins l'actualitat no s'havia publicat un treball amb una cohort d'estudi pediàtrica amb simptomatologia neurològica tant gran (1388 pacients) amb informació bioquímica (principalment de neurotransmissors), clínica i radiològica. La punció lumbar i l'anàlisi del LCR són procediments essencials pel diagnòstic de moltes malalties relacionades amb els neurotransmissors. Les altres matrius biològiques, com la orina o el plasma, poden mostrar resultats falsament negatius a causa principalment de que aquestes malalties no s'expressen en fluïds perifèrics (Ormazabal et al. 2005, Peatson et al. 2004).

Durant els darrers anys, es van analitzar 1388 mostres de LCR i es van diagnosticar fins a 21 deficiències primàries de la dopamina, representant un 1,4% de totes les mostres avaluades. Aquest percentatge ens indica que es fa estrictament necessari fer una acurada selecció dels pacients d'estudi en base no només a la simptomatologia que presenten els pacients, sinó també a altre informació complementària, com la bioquímica i radiològica.

L'establiment d'uns valors propis de referència és un pas crític a l'hora d'interpretar uns resultats bioquímics, on s'han de considerar aspectes importants com les variacions geogràfiques i les variabilitats interlaboratori (les degudes a diferències en les anàlisis dels neurotransmissors entre laboratoris). Els valors de referència publicats en la literatura són bastant similars als nostres, sent l'edat dels pacients la causa més important de les petites diferències observades (Ormazabal et al. 2005, Hyland et al. 2008). Paral·lelament, hem

participat al programa de control extern de la qualitat ERNDIM (*External Research Network for the screening and Diagnosis of Inborn errors of Metabolism*) per l'anàlisi del 5-HIAA i l'HVA. Hem obtingut bons resultats, la qual cosa significa que els nostres resultats compleixen amb els requisits d'exactitud. A més a més, aquest procediment ha estat acreditat per l'ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) seguint la norma ISO 15189.

Ja ha estat descrit que la quantitat de la reducció d'HVA en LCR pot suggerir un diagnòstic de defectes genètics primaris del metabolisme de la dopamina. No obstant això, no s'han definit uns marges per la concentració d'HVA en LCR que indiquin la presència d'aquests ECM. En pacients amb valors disminuïts d'HVA en LCR, s'haurien de considerar altres possibilitats diagnòstiques, sobretot quan les manifestacions clíniques no són suggestives. En la nostra experiència, alguns pacients amb alteracions secundàries van mostrar valors més baixos d'HVA en LCR que aquells pacients diagnosticats amb errors primaris (Taula 2 de l'article). És important remarcar que el grau de deficiència d'HVA en les alteracions primàries i secundàries és molt similar en el grup de pacients més gran d'edat (11-16 anys, Figura 2 de l'article). Aquesta observació podria explicar-se per una banda pel fet que les dues pacients diagnosticades de deficiència dominant de GTP-CH estan classificades en el grup d'edat més gran (11-16 anys). I per d'altra banda, que aquesta deficiència de GTP-CH dominant cursa amb valors parcialment disminuïts de pterines, causant un descens no massa acusat d'HVA en LCR (Blau et al. 2003<sup>a</sup>).

Els valors més baixos d'HVA en LCR del grup de les malalties primàries van ser detectats en els pacients amb deficiència de TH i AADC. Els valors més baixos en el grup de pacients amb alteracions secundàries van ser els pacients amb hipoplàsia pontocerebel·lar tipus 2, neoplàsia del SNC, malaltia de Steinert, síndrome de Miller Fisher, deficiència de

metilentetrahidrofolat reductasa, varies malalties amb alteracions motores i algunes encefalopaties epilèptiques amb diagnòstic desconegut. No obstant això, no totes les malalties mencionades en aquest estudi van mostrar una reducció consistent dels nivells d'HVA, suggerint que la deficiència d'HVA podria ser una troballa inespecífica en diversos pacients indicant la poca probabilitat d'un efecte patofisiològic primari a la malaltia, en relació amb una disfunció dopaminèrgica. De manera interessant, el grup de pacients més jove va tenir el percentatge més gran de deficiència en HVA, suggerint que el sistema dopaminèrgic és més sensible a les diferents condicions neurològiques durant el període neonatal. En general, els pacients amb alteracions secundàries no van mostrar característiques clíniques que fossin suggestives de deficiència dopaminèrgica, com per exemple trastorns en el moviment, ciris oculogires o desordres del sistema nerviós autònom. Les característiques parkinsonianes han estat observades en alguns pacients amb malalties mitocondrials (García-Cazorla et al. 2008). Aquest grup de malalties poden presentar valors d'HVA en LCR tant baixos com alts (García-Cazorla et al. 2008, Serrano et al. 2008). Un estudi previ va publicar característiques clíniques de parkinsonisme en un grup de pacients amb malalties mitocondrials, on la resposta a L-dopa va ser limitada (García-Cazorla et al. 2008). Les alteracions en els valors d'HVA en LCR poden seguir diferents mecanismes patofisiològics en les malalties mitocondrials i, per tant, trobar una explicació única d'aquesta observació és difícil i encara desconeguda (García-Cazorla et al. 2008, Serrano et al. 2008). En qualsevol cas, i independentment de la implicació del dèficit d'HVA en la fisiopatologia d'aquestes malalties, el fet de trobar alteracions en el valor de l'HVA en LCR té una utilitat diagnòstica important, com per exemple en la síndrome de Kearns Sayre (Tondo et al. 2011).



Es va observar una correlació significativa entre l'HVA i la resta de variables bioquímiques estudiades, sent el 5HIAA la variable amb la correlació més forta. Aquesta observació suporta la idea que existeix una estreta correlació entre el metabolisme de la dopamina i serotonina, tot i que les seves neurones específiques ocupen àrees cerebrals diferents (Marín-Valencia et al. 2008, De Grandis et al 2010). El 43% de la població estudiada també va presentar valors alterats (augmentats o disminuïts) de 5HIAA, indicant que probablement hi ha una alteració en les dues vies en diverses situacions i que el mecanisme explicatiu en aquestes malalties mereix més investigació. S'ha reportat que les alteracions en els nivells de 5HIAA en LCR són més freqüents que les alteracions en els nivells d'HVA (Serrano et al. 2007, De Grandis et al. 2010), suggerint que la serotonina és més fàcilment pertorbada en un gran ventall de malalties, potser, a causa de l'elevada innervació i connectivitat de les neurones serotoninèrgiques en el cervell (De Grandis et al. 2010).

La hiperprolactinèmia és sovint detectada en desordres primaris dopaminèrgics atès el paper inhibitor que exerceix la dopamina en la secreció de la prolactina. En el nostre estudi, tots els pacients amb deficiència de TH inicialment van presentar elevacions de prolactina en plasma (rang de 1046 -2151 mU/L, valors de referència en població pediàtrica: 73-325 mU/L en nens i 108 -466 mU/L en nenes). En altres deficiències primàries de la dopamina, com la deficiència de GTP-CH, la hiperprolactinèmia va ser variable (un pacient amb valors normals mentre l'altre va presentar valors incrementats). Per tant, nosaltres no vam trobar una associació consistent entre els nivells d'HVA en LCR i els valors de prolactina en plasma. A conseqüència d'aquestes troballes, hipotitzem que els valors de referència de prolactina en plasma s'haurien de reavaluar en població pediàtrica per detectar variacions subtils quan hi ha un sospita de deficiència dopaminèrgica.

Amb relació als 696 pacients, dels quals disposava de la informació clínica detallada, no es va trobar associació estadísticament significativa entre les alteracions d'HVA i les característiques en l'EEG, presència d'epilèpsia o anormalitats en la circumferència cranial. Hi ha poca literatura en referència als valors de l'HVA i les epilèpsies, i la poca que hi ha mostra resultats contradictoris. Alguns treballs hipotitzen que l'HVA pot incrementar-se just després de les convulsions (Devinsky et al 1992) i d'altres esmenten que l'epilèpsia, com a entitat crònica, pot no alterar els valors d'HVA (Duarte et al . 2008). En relació al nostre estudi i als estudis reportats, la falta d'associació entre l'HVA i l'epilèpsia podria ser atribuïble a l'epilèpsia com a condició crònica (Devinsky et al 1992, Duarte et al . 2008). Referent als resultats de la neuroimatge, tot i que les alteracions a la substància blanca van estar associades amb els valors disminuïts d'HVA, la presència d'anormalitats a la substància gris no va mostrar cap associació amb els valors d'HVA en LCR. Aquests resultats són difícils d'interpretar vist que el 85% de les neurones dopaminèrgiques formen part de la via nigroestriatal, i per tant, s'esperaria trobar valors disminuïts d'HVA quan aquestes àrees es troben alterades. En el grup de pacients amb anormalitats a la substància blanca es va trobar una associació significativa entre els canvis d'HVA i de 5-MTHF (el risc de presentar valors baixos d'HVA va ser 2.78 vegades més elevat en els pacients amb valors baixos de 5-MTHF en LCR). Aquesta associació vindria condicionada pel fet que tant per l'adequada producció d'HVA com per la formació i estabilitat de la substància blanca (mielina) es necessita una concentració cerebral òptima de 5-MTHF (Surtees et al 1994).

L'anàlisi del HVA pot revelar deficiències de l'estat dopaminèrgic associat a malalties en les quals no s'esperaria trobar-ne, obrint un nou camí de possibilitats cap a nous tractaments. En aquest estudi s'esmenten les entitats, tant d'origen metabòlic com no, en

les quals les concentracions d'HVA es troba alterat (Taula SI de l'article). Les malalties associades amb valors baixos d'HVA descrites per primera vegada (fins i tot de manera anecdòtica) són la hipoplàsia pontocerebel·lar tipus 2, hiperglicinèmia no cetòsica, oligosacaridosis, malaltia de Niemann -Pick tipus C, síndrome de la banya anterior (*occipital horn syndrome*), dèficit de serina, deficiència transportar de tiamina tipus 2, malaltia de desaparició de substància blanca (*vanishing white matter disease*), síndrome de Miller Fisher i l'encefalomielitis aguda disseminada. Les malalties associades amb concentracions elevades d'HVA inclouen la síndrome d'Angleman, la prematuritat amb diferents graus d'hemorràgies intraventriculars i un cas de deficiència de carbamil fosfat sintetasa (defecte del cicle de la urea). Amb referència als grups clínics establerts, el grup de pacients amb processos isquèmics i hemorràgics va mostrar el risc més elevat d'associació amb valors alterats d'HVA, recolzant a les hipòtesis prèvies de que aquest grup de pacients pogués presentar un risc d'alteracions dopaminèrgiques molt més elevat que la resta de grups clínics, a excepció òbviament dels trastorns genètics primaris.

Varis treballs publiquen la presència d'alteracions secundàries en el perfil de neurotransmissors en LCR de pacients neurològics, molts dels quals pateixen malalties cròniques que són intractables des del punt de vista etiològic (Marín -Valencia et al . 2008, Serrano et al. 2008, 2010). Un assaig terapèutic amb L-dopa i carbidopa podria està justificat en pacients amb valors molt baixos d'HVA i simptomatologia compatible amb deficiència dopaminèrgica, ja que oferiria una nova opció terapèutica. No obstant això, els tractaments amb L-dopa s'han de supervisar cautelosament atès als possibles efectes adversos que es poden derivar (Pons et al . 2004). En la nostra experiència (no es mostren els resultats), la

resposta clínica a L-dopa és variable i no sempre produeix un efecte satisfactori, exceptuant els defectes primaris, que mostren una resposta molt bona a aquest tractament.

Una de les limitacions d'aquest estudi és la gran variació que pot haver en els valors de referència d'HVA en LCR segons les diferents àrees geogràfiques, fent que els resultats dels pacients que no siguin de la mateixa àrea geogràfica sempre s'haurien de valorar més cautelosament. No obstant això, els intervals de referència reportats per altres grups (Hyland et al., 1993), sent d'àrees geogràfiques diferents, són similars als valors que apareixen a la nostra població (Ormazabal et al., 2005). Una altra limitació és que la nostra cohort estudiada presenta un biaix cap a una població de pacients amb sospita de tenir una malaltia neurològica rara, com les malalties mitocondrials, la síndrome de Rett o deficiències primàries de la dopamina. Finalment, les concentracions de l'HVA en LCR s'haurien d'interpretar amb compte, ja que els seus valors no sempre reflecteixen una funció dopaminèrgica alterada. De fet, una disfunció dopaminèrgica pot associar-se a valors baixos, normals i, fins i tot, alts d'HVA (Kurian et al., 2011<sup>a</sup>), depenent d'on es trobi el defecte. Per exemple, un defecte del transportador de dopamina DAT1 provoca un cúmul de dopamina a l'espai intersinàptic amb el consegüent hipermetabolisme dopaminèrgic i augment d'HVA. Així amb aquest trastorn hi ha una simptomatologia de dèficit dopaminèrgic amb valors elevats d'HVA en LCR (Kurian et al., 2011<sup>a</sup>).

## **Anàlisi de les concentracions de pterines (neopterina i biopterina) en LCR en pacients**

### **pediàtrics amb malalties neurològiques per la identificació de trastorns primaris i**

### **secundaris d'aquests coenzims. Avaluació de la seva utilitat com a biomarcador en processos**

#### **immuno-inflamatoris.**

Respecte a la identificació de defectes genètics primaris del metabolisme de les pterines, en aquest any hem identificat defectes del enzim GTP-CH (principalment de la forma dominant) (Lopez-Laso et al. 2009) i defectes de la activitat de la sepiapterina reductasa (Arrabal et al. 2011). Per ambdues malalties, la quantificació de neopterina, biopterina i sepiapterina a LCR ha sigut una eina definitiva per assolir el diagnòstic. Com a fet rellevant, gràcies a aquest estudi vam identificar una de les poblacions més nombroses del món de defectes dominants de l'enzim GTP-CH, localitzada a la província de Córdoba (Dr. López-Laso et al. 2009).

La neopterina és alliberada en el primer pas de la biosíntesis de la BH<sub>4</sub> controlada per l'enzim GTP-CH I. Algunes citocines inflamatòries, principalment l'interferó gamma, estimulen específicament aquest enzim en macròfags, comportant una producció i acumulació de neopterina en els diferents fluids de l'organisme de pacients que tenen processos immuno-inflamatoris (Blau et al. 2003<sup>b</sup>, Schoedon et al. 1986). Ja és sabut que hi ha una síntesis intratecal de neopterina per les cèl·lules de la microglia, les quals formen part del sistema immunitari innat del SNC (Millner et al. 1998, Idecola et al. 2011). Ja que la BHE té una baixa permeabilitat a la neopterina perifèrica (Millner et al. 1998), l'estudi de la neopterina en LCR podria ser una eina útil pel diagnòstic de processos immuno-inflamatoris al SNC sense ser falsament alterat per la neopterina perifèrica. Pel que sabem al respecte, no existeixen valors límit de neopterina en LCR per identificar processos mediats

immunològicament. A més a més, hi ha molt pocs treballs que continguin cohortes amb un número tant gran de pacients neuropediàtrics avaluant els nivells de neoptèrina en LCR (Dale et al . 2009, Furukawa et al . 1992). En un treball previ realitzat al nostre laboratori (Ormazabal et al. 2005) vam observar que la neoptèrina en LCR correlaciona estadísticament amb l'edat, principalment en els nens més petits d'un mes de vida. A més a més, durant l'etapa postnatal hi ha una gran variació en la formació de la ret neuronal, en l'estabilitat de la BHE i en les quantitats dels neurotransmissors (Ormazabal et al . 2005, Herlenius et al . 2004), provocant grans variacions en el valor de pterines en LCR. En base a aquests dos fets (la dependència de l'edat i les variacions clíniques i bioquímiques postnatsals), abans de començar aquest estudi, vam excloure tots els pacients amb una edat inferior a un mes de vida. A partir d'una cohort de pacients dividits en dos grups (un grup amb infeccions confirmades al SNC i un segon grup sense infeccions als SNC) vam establir un nou punt de tall de la neoptèrina en LCR de 61 nmol/L.

El fet que hi hagués una considerable diferència entre les mitjanes d'edat dels dos grups d'estudi per establir el valor de tall (6,5 anys al grup amb infecció al SNC *versus* 8 mesos al grup sense infecció al SNC) vam decidir comprovar si aquesta diferència d'edat podia influir en el valor de la neoptèrina. Així que vam fer dues corbes ROC, una corba que incloïa pacients d'un mes a un any d'edat (resultats no presentats) i una segona corba ROC amb edats compreses d'un mes d'edat a 19 anys (resultats de l'article). Vam obtenir dos valors de tall de la neoptèrina amb sensibilitats i especificitats molts semblants. Aquests resultats i la absència de correlació entre la neoptèrina en LCR i edat dels 606 pacients neuropediàtrics van corroborar en la poca influència que exercia la variable edat en els valors de la neoptèrina del nostre estudi.

El nou punt de tall definit (61 nmol/L) va tenir un valor més discriminatiu que el límit superior dels valors de referència publicats en la literatura, els quals es troben en un rang de concentracions de 20-34 nmol/L (Dale et al. 2009, Hyland et al. 1993, Ormazabal et al. 2005, Blau et al. 2003<sup>a</sup>).

De manera interessant, 56/606 pacients neurològics van tenir la neopterina per sobre el valor de tall. Aquesta troballa va ser un fet remarcable ja que molts d'aquests pacients no tenien sospita de tenir un procés mediat immunològicament (en excepció dels 23 casos amb malalties inflamatòries). D'altra banda, si haguéssim utilitzat com a valor de tall el límit superior del nostre valor de referència (34 nmol/L), s'haguessin quedat per sobre d'aquest valor 87 dels 606 pacients. Utilitzant el valor de 34 nmol/L, el número de pacients que queden per sobre sembla ser massa elevat, sent molts d'ells, pacients amb una clínica sense evidència de tenir processos immuno -mediats, com per exemple malalties neurometabòliques. Tot i així, només un pacient, classificat al grup de processos immuno -inflamatoris, va presentar un valor de neopterina entre els valors de 34 i 61 nmol/L. Probablement, utilitzant el nou valor de 61 nmol/L, la discriminació entre aquells processos immuno-inflamatoris i els purament neurològics (de causa probablement metabòlica o genètica) serà major. Aquesta diferenciació pot ser crítica per arribar a un diagnòstic etiològic i, en conseqüència, a un millor tractament, atès que les estratègies terapèutiques ja sigui un diagnòstic o un altre són completament diferents.

Només hi ha un estudi previ que parli sobre els valors de neopterina en LCR en pacients neurològics (Dale et al. 2009 ). Aquest estudi consta de 158 pacients neurològics agrupats segons el debut i l'evolució de la malaltia. En el nostre cas, es van agrupar els pacients neurològics segons si tenien una malaltia amb diagnòstic genètic confirmat (grup

A), si tenien una malaltia adquirida o sense etiologia definida (grup B), o bé si tenien una malaltia amb un procés immuno-infecció (grup C). Aquesta classificació ens va permetre identificar quin grup clínic tenia els valors de neopterina amb LCR per sobre el valor de tall. Tal i com s'esperava trobar, el valor de neopterina en LCR va ser significativament elevada en els pacients amb processos immuno-inflamatoris (Blau et al. 2003<sup>b</sup>). De tota manera, set dels 23 pacients classificats en el grup C, van presentar uns valors de neopterina normals, tenint, a més a més, valors dels marcadors clàssics d'infecció, com el recompte de leucòcits i una quantificació de proteïnes en LCR, dins dels valors normals (<5 cèl·lules/mm<sup>3</sup> i <40 mg/dL, respectivament) (Taules 2 i 3 de l'article). Tanmateix, el percentatge de pacients dins d'aquest grup amb valors alterats de cèl·lules o proteïnes era clarament inferior que el percentatge de pacients que tenien la neopterina en LCR elevada. Aquests fets emfatitzen la idea que la neopterina en LCR tindria una major sensibilitat i especificat respecte al recompte de leucòcits i quantificació de proteïnes (Dale et al. 2009). El fet que les malalties immuno-inflamatòries es caracteritzin per presentar-se en forma episòdica i que algunes entitats com la síndrome d'Aicardi-Goutières (Blau et al. 2003<sup>b</sup>) i algunes encefalitis (Millner et al. 1998; Dale et al. 2009; Azumagawa et al. 2003) puguin tenir valors normals de citoquines i altres marcadors immunològics, podria explicar la normalitat dels paràmetres d'infecció reportats a les Taules 2 i 3.

En relació amb els pacients neurològics amb malalties genètiques (grup A, n=160), 10 pacients va tenir el valor de la neopterina per sobre els 61 nmol/L (8 dels quals eren pacients amb malalties mitocondrials). Aquesta elevació probablement reflecteixi un procés inflamatori associat a dany al SNC (Dale et al. 2009) ja que d'aquests vuit pacients, dos presentaven alteració a la substància blanca, un pacient tenia atrofia cerebral i cinc pacients



tenien alteracions als ganglis basals. La resta de pacients del grup C (n=14) van mostrar majoritàriament valors normals de neopterinina en LCR ja que aquest tipus de malalties no acostumen a presentar-se amb processos associats a reaccions inflamatòries, demostrant l'elevada especificitat de la determinació de neopterinina a LCR. Respecte als pacients amb desordres neurològics adquirits o sense etiologia definida, tot i que el percentatge de pacients amb neopterinina elevada va ser molt similar al grup A (7.1% *versus* 6.2%), alguns pacients van mostrar valors en el rang de les malalties immuno-inflamatòries (Taula 2 de l'article). En aquests casos, després de realitzar-se l'anàlisi de la neopterinina, la orientació diagnòstica va canviar d'un procés metabòlic o genètic a un procés mediat immunològicament.

Les alteracions de la substància blanca per RM van estar associades amb tenir elevada el valor de la neopterinina (> 61 nmol/L) en el grup B de pacients. Aquests resultats podrien explicar-se perquè les cèl·lules glials del cervell, podrien actuar com a possibles connectores de la inflamació, neurodegeneració i regeneració (Speth et al. 2000; De Grandis et al. 2010). Aquests esdeveniments poden trobar-se en processos inflamatoris primaris però també en aquelles malalties neurològiques adquirides o d'etiologia no definida, en les quals la neuroimatge indica un dany al SNC. L'infart, l'epilèpsia i la isquèmia són diferents processos al SNC que poden ocasionar una hipòxia i produir radicals lliures que causen una activació de la cascada inflamatoria. Aquests productes inflamatoris i estrès oxidatiu no només alliberen citocines proinflamatòries sinó també alteren la BHE, alteren la interacció entre neurones i micròglies i incrementen els valors de glutamat extracel·lular. Tots aquests esdeveniments podrien explicar els valors elevats de neopterinina en LCR en els pacients del grup B (Iadecola et al. 2011). Així mateix, aquests pacients serien candidats de rebre un

tractament antiinflamatori. En el grup B, no es va trobar un major risc de tenir epilèpsia per fet de tenir la neoptèrina > 61 nmol/L. No obstant això, aproximadament el 50 % dels pacients (Taula 2 de l'article) amb elevació de la neoptèrina tenien epilèpsia. Aquest fet seria un aspecte per seguir investigant ja que alguns treballs demostren una relació entre tenir epilèpsia i inflamació del SNC (Duarte et al. 2008), amb un pitjor pronòstic de tenir ambdues condicions (epilèpsia i neoptèrina en LCR elevada) (Duarte et al. 2008).

Respecte als pacients amb neoptèrina per sota els 61 nmol/L (n=550), nou pacients va tenir el comptatge de leucòcits incrementat (>5 leucòcits/mm<sup>3</sup>), i 66 pacients amb el valor de les proteïnes per sobre els 40 mg/dL. A més a més, en els grups B i C, va haver-hi una clara diferència entre el percentatge de pacients amb neoptèrina en LCR elevada i aquells amb leucòcits en LCR elevats (Figura 2 de l'article), mostrant la major sensibilitat dels valors de la neoptèrina. No obstant això, les concentracions de proteïnes en LCR van estar més freqüentment elevades, probablement reflectint altres fenòmens patofisiològics a banda dels propis events immunològics, com per exemple les alteracions cerebrals per malalties vasculars (Ballabh et al. 2004) i augment de la permeabilitat de la BHE en els desordres de metabolisme energètic (Abbott et al. 2012). Aquest últim fet explicaria l'elevat percentatge de pacients amb les proteïnes en LCR elevades. Un altra fet que va evidenciar el bon paper de la neoptèrina com a biomarcador d'inflamació va ser l'associació del seu increment en LCR amb un risc més elevat de tenir alteracions en el comptatge de leucòcits en LCR (>5 leucòcits/mm<sup>3</sup>) i la concentració de proteïnes (40 mg/dL). Aquesta troballa és important des de del punt de vista de la pràctica clínica, ja que aquests dos marcadors són els paràmetres més freqüentment aplicats en el diagnòstic dels events immuno-inflamatoris en els laboratoris clínics.

**Anàlisi de les concentracions de piridoxa l fosfat en LCR en pacients neuropediàtrics sense diagnòstic etiològic per la identificació de trastorns primaris i secundaris: avaluar la resposta a la suplementació amb piridoxal -fosfat en un grup de pacients amb encefalopaties epilèptiques greus**

En aquest estudi es van identificar 25 pacients amb valors baixos de PLP en LCR, representant un important percentatge dels casos estudiats (n=147). La major part dels 25 pacients van ser detectats al període neonatal, suggerint que probablement hi hagi un augment de la demanda de PLP probablement relacionades amb el desenvolupament i la maduració neuronal, tal i com també s'ha reportat amb d'altres metabòlits i cofactors del SNC (Herlenius et al. 2004).

Durant l'anàlisi d'aquests 147 mostres es va detectar un pacient amb mutacions al gen de la PNPO, presentant els valors més baixos de PLP en LCR (3,6 nmol/L) observats al nostre laboratori (Ruiz et al 2008).

En relació a les correlacions de PLP amb les altres variables estudiades es van confirmar les associacions que prèviament s'havien establert en un treball anterior del nostre laboratori (Ormazabal et al. 2008). El PLP en LCR no va correlacionar amb les concentracions de 5HIAA ni HVA, sent l'edat dels pacients la variable que més influència exercia (variable de confusió). Un raonament per explicar aquesta troballa és que el pas limitant de la biosíntesis de la dopamina i serotonina és la hidroxilació de la tirosina i triptòfan (reaccions dependents del cofactor BH<sub>4</sub>) deixant en segon terme el pas catalitzat per l'enzim AADC (dependent de PLP) (Pons et al. 2004). Aquest fet explicaria la falta de correlació entre els nivells dels metabòlits de la dopamina (HVA) i serotonina (5HIAA) amb el PLP.

Els pacients amb deficiència de PNPO presenten una encefalopatia epilèptica amb convulsions neonatals refractàries als anticonvulsivants habituals, i que només responen al tractament amb PLP. Aquesta malaltia ha estat recentment estudiada amb profunditat però en una cohort de menys de 20 casos descrits al món (Goyal et al. 2013). Bioquímicament aquests pacients a part de presentar valors molt baixos de PLP en LCR, poden presentar un perfil alterat de NT en LCR (disminució dels nivells d'HVA i 5HIAA i augment de la 3-OH-OMD, (Kurian et al. 2011<sup>b</sup>)). Altres alteracions bioquímiques són l'augment de glicina, serina i treonina en LCR, ja que els enzims responsables del seu metabolisme necessiten de PLP com a cofactor per la transaminació d'aquests aminoàcids. Respecte a l'anàlisi del gen *PNPO* dels deu pacients seleccionats cap d'ells va presentar mutacions patogèniques relacionades amb un dèficit de PNPO.

Tot i el millor coneixement d'aquesta nova entitat neurometabòlica, hi ha variats estudis científics que descriuen a pacients amb nivells baixos de PLP en LCR amb estudi molecular negatiu del gen *PNPO* (Goyal et al. 2013, Veerapandiyan et al. 2011). Aquests últims fets emfatitzen l'interès d'estudiar altres malalties que causen deficiències de les concentracions de PLP en LCR (Mills et al. 2005, Clayton 2006, Footitt et al. 2011).

L'últim pas metabòlic de la síntesis de vitamina B<sub>6</sub> per entrar a les cèl·lules de l'organisme (inclús les cerebrals) necessita de la fosfatasa alcalina per poder hidrolitzar -se (Clayton 2006). La mesura de la activitat de la fosfatasa alcalina en plasma pot orientar -nos en un dèficit del mateix. De la nostre selecció de deu pacients, cap d'ells va presentar hipofosfatàsia, on l'activitat de la fosfatasa alcalina en plasma va ser normal.

El molibdè és cofactor dels enzims sulfit, xantina i aldehid oxidasa (Footitt et al. 2013). El test de sulfits en orina alterat, per cúmul de sulfits, ens pots orientar cap a un dèficit

d'aquest cofactor. La negativitat del test de sulfits (i d'altres proves bioquímiques) al nostre grup de pacients va permetre de descartar la deficiència del cofactor de molibdè (MoCoF) com a responsable de un defecte secundari de PLP.

Aquells ECM relacionats amb la vitamina B<sub>6</sub> que causen acumulació de metabòlits que reaccionen amb el PLP van estar descartades: 1) Hiperprolinèmia. Tots els pacients van mostrar valors normals de prolina en plasma. 2) Epilèpsia piridoxina dependent (deficiència d'antiquitina). Cap pacient va presentar un perfil de NT compatible amb aquesta malaltia (elevació de la 3-OHD i disminució de l'HVA i 5HIAA en LC) (Kurian et al. 2011<sup>b</sup>, Clayton 2006). A més a més, el pic X no va ser present en cap cromatograma de NT dels pacients estudiats. Aquest pic X és un compost desconegut descrit en pacients amb convulsions tractables amb àcid folínic (Hyland et al. 2002<sup>b</sup>), que s'utilitza com biomarcador patognomònic per la PDE (Stocker et al. 2011).

Les causes més comunes de deficiència secundària de PLP van ser excloses en els deu pacients seleccionats de l'estudi. Processos de malabsorció (Cellini et al. 2013), administració de fàrmacs amb grups amino que reaccionen amb el PLP (hidrazines, hidroxilamines, penicil·l·amines, i metilxantines) (Clayton 2006) o bé component químics amb grups sulfhidril (Clayton 2006) es van descartar en tots els pacients estudiats.

La millora clínica dels pacients amb l'administració de PLP també és una informació molt útil alhora de fer el diagnòstic (Goyal et al. 2013). La resposta al tractament dels pacients va ser diferent del que s'espera en els dèficit primaris de PNPO, on s'observa una resposta molt ràpida amb una completa cessió de les convulsions (Schmitt et al. 2010). Els nostres pacients, exceptuant el pacient 10 que va normalitzar completament l'EEG, van presentar una lleugera a moderada millora clínica després d'uns dies o setmanes de

tractament. A més a més, no es va observar cap relació entre els valors de PLP en LCR i la millora dels pacients post tractament amb PLP. Aquestes millores van significar un impacte positiu en la rutina habitual dels tutors responsables dels pacients.

Alguns treballs reporten l'activitat xaperona associada a la molècula de PLP, ja que per una banda millora l'eficiència del plegament proteic i per d'altra banda incrementa l'estabilitat de la proteïna mutada contra la degradació intracel·lular. (Clayton 2006, Cellini et al 2013). Aquesta activitat de xaperona li dona un aspecte positiu alhora de tractar els pacients amb PLP i també explicaria la diferent resposta observada en els nostres pacients, la qual no ha estat associada en presentar valors més o menys alterats de PLP.

Tanmateix, és important recordar que les concentracions de PLP en LCR poden no reflectir les concentracions reals a les diferents àrees cerebrals. Això pot ser causat per fenòmens de gradient que pugui haver-hi al cervell així com les diferents constants enzimàtiques dels enzims piridoxal-dependents. Un exemple és el diferent valor de Km de la PNPO (Km=0,0062 mM amb el substrat de piridoxamina fosfat) respecte a les Km de l'AADC (Km=0,13 mM amb el substrat de L-dopa) o la GAD (la descarboxilasa de l'àcid glutàmic, Km=1,28 mM amb el substrat de L-Glutamat)([www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)). Les diferents Km posen de manifest la diferent sensibilitat dels enzims (a menys valor de Km, més sensibilitat de l'enzim).

Conegut l'efecte anticonvulsivant i els pocs efectes adversos del PLP fa recomanable la seva administració en aquells casos amb convulsions refractàries als fàrmacs habituals (Footitt et al. 2013). Una de les explicacions bioquímiques és que el PLP és cofactor de la GAD, enzim necessari per la síntesi cerebral de GABA. La dificultat de la GAD per sintetitzar GABA contribueix a l'aparició de convulsions (Kuo et al. 2002). No obstant aquest fet, es creu

que també poden haver-hi altres proteïnes implicades en el metabolisme del GABA (Baxter et al. 2005).

## CONCLUSIONS





1. Els valors alterats del l'HVA en LCR són una troballa relativament freqüent en pacients pediàtrics que tenen malalties neurològiques d'etiologia diversa, reforçant el valor de l'HVA com a biomarcador diagnòstic.
2. Els pacients amb ECM del metabolisme de la dopamina presenten valors d'HVA que poden solapar-se amb els valors d'HVA de pacients que presenten altres malalties neurològiques, especialment en els pacients més grans.
3. Des del punt de vista bioquímic, els valors d'HVA van correlacionar principalment amb els valors de 5HIAA, metabòlit de la serotonina. Respecte a les característiques neurològiques, només les alteracions a la substància blanca en la ressonància magnètica van estar associades a valors baixos d'HVA en LCR.
4. La recerca d'un nou punt de tall de la neopterina en LCR ha permès establir aquest nou valor pel diagnòstic de malalties associades a processos immuno-inflamatoris. Aquest valor és quantitativament diferent al límit superior de l'interval de referència de la neopterina, orientat al diagnòstic dels ECM de les pterines.
5. Un percentatge moderat de pacients amb alteracions neurològiques sense sospita de malaltia immuno-inflamatòria, va presentar valors de neopterina per sobre el nou punt de tall establert.
6. El nou punt de tall de la neopterina va presentar una sensibilitat i especificitat diagnòstiques molt elevades, suggerint el seu ús com a marcador complementari pel diagnòstic de malalties inflamatòries del SNC.
7. Un percentatge relativament important de pacients va presentar valors disminuïts de PLP en LCR, la major part d'ells sense una etiologia definida.

8. Dels 10 pacients amb encefalopaties epilèptiques i suplementació amb PLP, no es va observar una associació entre els valors de PLP en LCR i l'etiologia de la malaltia, ni amb la resposta al suplement amb PLP.
9. Una explicació a aquest fet podria ser l'efecte xaperona del PLP, la seva capacitat antiepilèptica de modular la síntesis de GABA i/o que el valor de PLP en LCR probablement no reflecteixi el seu estat en les diferents neurones i compartiments cerebrals.

## BIBLIOGRAFIA

### A

Abbott NJ, Friedman A (2012) Overview and introduction: the blood -brain barrier in health and disease. [Epub ahead of print] *Epilepsia Suppl* 6:1 –6 as doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03696.x

Allen, G. F. G., Neergheen, V., Oppenheim, M., Fitzgerald, J. C., Footitt, E., Hyland, K. Heales, S. J. R. Pyridoxal 5'-phosphate deficiency causes a loss of aromatic L-amino acid decarboxylase in patients and human neuroblastoma cells, implications for aromatic L - amino acid decarboxylase and vitamin B(6) deficiency states. *Journal of Neurochemistry* 2010; 114, 87–96.

Azumagawa K, Suzuki S, Tanabe T, Wakamiya E, Kawamura N, et al. Neopterin, biopterin, and nitric oxide concentrations in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system infections. *Brain Dev* 2003; 25: 200–202.

### B

Bahena-Trujillo R, Gonzalo Flores J, Arias -Montaño A. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed* 2000; 11:39-60.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood -brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implication. *Neurobiol Dis* 2004; 16:1-13.

Baumgart A, Spiczak SV, Verhoeven -Duif NM, Møller RS, Boor R, Muhle H, Jähn JA, Klitten LL, Hjalgrim H, Lindhout D, Stephani U, Kempen MJ, Helbig I. Atypical Vitamin B6 Deficiency: A Rare Cause of Unexplained Neonatal and Infantile Epilepsies. *J Child Neurol*. 2013 Oct 10.

Baxter P. Pyridoxine or pyridoxal phosphate for intractable seizures? *Arch Dis Child*. 2005 May;90(5):441-2.

Bernstein AI, Stout KA, Miller GW. The vesicular monoamine transporter 2: An underexplored pharmacological target. *Neurochem Int*. 2014 Jan 4. pii: S0197-0186(13)00313-6.

Blackstone C. Infantile parkinsonism -dystonia: a dopamine "transportopathy". *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1455-8.

Blau N, Bonafé L, Blaskovics ME (2003)<sup>a</sup>. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson K, editors. Berlin, Heidelberg, New York: Springer pp. 89–106.

Blau N, Bonafé L, Krägeloh -Mann I, Thöny B, Kierat L, et al. Cerebrospinal fluid pterins and folates in Aicardi -Goutières syndrome: a new phenotype. *Neurology* (2003)<sup>b</sup>; 61:642-647.

Bräutigam C, Wevers RA, Jansen RJ, et al. Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 1998;44:1897–904.

## C

Casado m, Molero-Luis m, Sierra c, Garcia-Cazorla A, Ormazabal A, Artuch R. Analysis of cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2013. Dec.

Cellini B, Montioli R, Oppici E, Astegno A, Voltattorni CB. The chaperone role of the pyridoxal 5'-phosphate and its implications for rare diseases involving B6-dependent enzymes. *Clin Biochem* 2013. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.11.021.

Clayton, P. T. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2006; 29(2-3), 317–26.

Collins, F.A., D.L. Murphy, A.L. Reiss, K.B. Sims, J.G. Lewis, L. Freund, F. Karoum, D. Zhu, I.H. Maumenee, and S.E. Antonarakis. Clinical, biochemical and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. *Am. J. Med. Genet* 1992; 42:127–134.

## D

Dale RC, Brilot F, Fagan E, Earl J. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation. *Dev Med Child Neurol* 2009; 51:317-323.

De Grandis E, Serrano M, Pérez -Dueñas B, et al. Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 803–9.

Duarte S, Sanmarti F, Gonzalez V, et al. Cerebrospinal fluid pterins and neurotransmitters in early severe epileptic encephalopathies. *Brain Dev* 2008;30:106 - 111.

## F

Farrant RD, Walker V, Mills GA, Mellor JM, Langley GJ. Pyridoxal phosphate deactivation by pyrroline -5-carboxylic acid. Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):15107-16.

Footitt EJ, Heales SJ, Mills PB, Allen GF, Oppenheim M, Clayton PT. Pyridoxal 5' -phosphate in cerebrospinal fluid; factors affecting concentration. *J Inher Metab Dis* 2011; 34(2):529-538.

Footitt EJ, Clayton PT, Mills K, Heales SJ, Neergheen V, Oppenheim M, Mills PB. Measurement of plasma B6 vitamers profiles in children with inborn errors of vitamin B6 metabolism using an LC -MS/MS method. *J Inher Metab Dis*. 2013 Jan;36(1):139 - 45.

Furukawa Y, Nishi K, Kon do T, Tanabe K, Mizuno Y. Significance of CSF total neopterin and biopterin in inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sc* 1992; 111:65-72.

## G

García-Cazorla A, Serrano M, Pérez -Dueñas B, González V, Ormazábal A, Pineda M, Fernández-Alvarez E, Campistol JM, Artuch RM. Secondary abnormalities of neurotransmitters in infants with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2007 Oct;49(10):740-4

García-Cazorla A, Duarte S, Serrano M et al. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion* 2008; 8:273-278.

Ghanem E, Houssock C, Pulido L, Han S, Jaber FM, et al. Determining "true" leukocytosis in bloody joint aspiration. *J Arthroplasty* 2008; 23:182-187.

Goyal, M., Fequiere, P. R., McGrath, T. M., & Hyland, K. Seizures with decreased levels of pyridoxal phosphate in cerebrospinal fluid. *Pediatric Neurology* 2013; 48(3), 227-31.

Grace AA, Gerfen CR, Aston -Jones G. Catecholamines in the central nervous system. Overview. *Adv Pharmacol*. 1998;42:655-70. Review.

Grattan-Smith PJ, Wevers RA, Steenbergen -Spanjers GC, Fung VS, Earl J, Wilcken B. Tyrosine hydroxylase deficiency: clinical manifestations of catecholamine insufficiency in infancy. *Mov Disord*. 2002 Mar;17(2):354-9.

## H

Herlenius E, Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 2004; 190 Suppl 1:S8–21. Review.

Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune System activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res* (2003)<sup>a</sup>; 52: 313-321.

Hoffmann GF, Surtees RA, Wevers RA. Cerebrospinal fluid investigations for neurometabolic disorders. *Neuropediatrics*. 1998 Apr;29(2):59-71. Review.

Hoffmann GF, Assmann B, Bräutigam C, et al. Tyrosine hydroxylase deficiency causes progressive encephalopathy and dopa -nonresponsive dystonia. *Ann Neurol* 2003<sup>b</sup>;54:S56–65.

Hyland K, Surtees RA, Heales SJ, Bowron A, Howells DW, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr Res* (1993); 34:10-14.

Hyland K. Disorders of neurotransmitter metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, editors. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Heidelberg: Springer; 2002<sup>a</sup>. p. 107–22.

Hyland K, Arnold LA. Value of lumbar puncture in the diagnosis of infantile epilepsy and folinic acid-responsive seizures. *J Child Neurol*. 2002<sup>b</sup> Dec;17 Suppl 3:3S48 -55; discussion 3S56. Review.

Hyland K. The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases. *Ann Neurol* 2003;54:S13-17.

Hyland K. Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2008; 54: 633–41.

## I

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 7:796–808. doi: 10.1038/nm.2399. Review.

Iqbal SJ, Brain A, Reynolds TM, Penny M, Holland S. Relationship between serum alkaline phosphatase and pyridoxal -5'-phosphate levels in hypophosphatasia. *Clin Sci (Lond)*. 1998 Feb;94(2):203-6.

## K

Kaler SG, Holmes CS. Catecholamine metabolites affected by the copper -dependent enzyme dopamine-beta-hydroxylase provide sensitive biomarkers for early diagnosis of menkes disease and viral -mediated ATP7A gene therapy. *Adv Pharmacol*. 2013;68:223-33.

Kawakami Y, Fukunaga Y, Hashimoto K. (1996) Changes of neopterin in cerebrospinal fluid and serum in children with meningitis [Abstract]. *No To Hattatsu* 28:23-29.

Komori H, Matsuishi T, Yamada S, Ueda N, Yamashita Y, Kato H. Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of bipterin and biogenic amines. *Acta Paediatr*. 1999 Dec;88(12):1344-7.

Kuhar M, Couceyro P, Lambert P. *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Biosynthesis of catecholamines*. Editors: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al. 6<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.

Kuo, M.-F., & Wang, H.-S. (2002). Pyridoxal phosphate -responsive epilepsy with resistance to pyridoxine. *Pediatric Neurology*, 26(2), 146–147.

Kurian MA, Li Y, Zhen J, Meyer E, Hai N, Christen HJ, Hoffmann GF, Jardine P, von Moers A, Mord ekar SR, O'Callaghan F, Wassmer E, Wraige E, Dietrich C, Lewis T, Hyland K, Heales S Jr, Sanger T, Gissen P, Assmann BE, Reith ME, Maher ER. Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet Neurol*. 2011<sup>a</sup> Jan;10(1):54-62.

Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales S Jr, Clayton PT. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurol*. 2011<sup>b</sup> Aug;10(8):721-33.

## L



Lee HF, Tsai CR, Chi CS, Chang TM, Lee HJ. Aromatic L -amino acid decarboxylase deficiency in Taiwan. *Eur J Paediatr Neurol*. 2009 Mar;13(2):135-40.

Lenders JW, Pacak K, Eisenhofer G. New advances in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma: moving beyond catecholamines. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Sep;970:29-40. Review.

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the rate -limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea -pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 23:1493-501.

Lopez-Laso E, Ochoa -Sepulveda J, Ochoa -Amor J, et al. Segawa syndrome due to mutation Q89X in the GCH1 gene: a possible founder effect in Cordoba (southern Spain). *J Neurol* 2009; 256: 1816-24.

## M

Maller A, Hyland K, Milstien S, Biaggioni I, Butler IJ. Aromatic L -amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, diagnosis, and treatment of a second family. *J Child Neurol*. 1997 Sep;12(6):349-54.

Marín-Valencia I, Serrano M, Ormazabal A, Pérez -Dueñas B, García -Cazorla A, Campistol J, Artuch R. Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. *Clin Biochem*. 2008 Nov;41(16-17):1306-15.

Milh M, Pop A, Kanhai W, Villeneuve N, Cano A, Struys EA, Salomons GS, Chabrol B, Jakobs C. Atypical pyridoxine -dependent epilepsy due to a pseudoexon in ALDH7A1. *Mol Genet Metab*. 2012 Apr;105(4):684-6

Millner MM, Franthal W, Thalhammer GH, Berghold A, Aigner RM, et al. (1998). Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children. *Clin Chem* 44:161-167.

Mills PB, Surtees RA, Champion MP, Beesley CE, Dalton N, Scambler PJ, Heales SJ, Bridson A, Scheimberg I, Hoffmann GF, Zschocke J, Clayton PT. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5' -phosphate oxidase. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 15;14(8):1077-86.

Mills PB, Footitt EJ, Mills KA, Tuschl K, Aylett S, Varadkar S, Hemingway C, Marlow N, Rennie J, Baxter P, Dulac O, Nabbout R, Craigen WJ, Schmitt B, Feillet F, Christensen E, De Lonlay P, Pike MG, Hughes MI, Struys EA, Jakobs C, Zuberi SM, Clayton PT. Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine -dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). *Brain*. 2010 Jul;133(Pt 7):2148-59.

Molero-Luis M, Serrano M, Ormazabal A, Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pons R, Artuch R. For Neurotransmitter Group. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2013<sup>a</sup> Jun;55(6):559-66.

Molero-Luis M, Fernández Ureña S, Serrano M, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Artuch R. For Neopterin Group. Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropediatric patients: establishment of a new cut off -value for the identification of inflammatory -immune mediated processes. *PLOS ONE*, 2013<sup>b</sup>. Volumen 8.

Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Lambruschini N. Plasma amino acids in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:684-689.

Mravec B, Kiss A. [The brain catecholamines : brief anatomy and participation in the stress reaction and regulation of cardiovascular function]. *Cesk Fysiol*. 2004;53(3):102 - 16. Review.

## N

Nagatsu T, Levitt M, Uderfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964; 239:2910-7.

Nagle MA, Wu W, Eraly SA, Nigam SK. Organic anion transport pathways in antiviral handling in choroid plexus in Oat1 (Slc22a6) and Oat3 (Slc22a8) deficient tissue. *Neurosci Lett*. 2013 Feb 8;534:133-8.

Namazi MR (2003) Pyridoxal 5-phosphate as a novel weapon against autoimmunity and transplant rejection. *FASEB J* 17: 2184–2186.

## O

Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández -Alvarez E, Campistol J, et al. (2005) HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods* 142:153-158.

Ormazabal A, García -Cazorla A, Pérez -Dueñas B, Gonzalez V, Fernández -Alvarez E, Pineda M, Campistol J, Artuch R. Determination of 5 -methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: reference values for a paediatric population. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):159-62.

Ormazabal A, Oppenheim M, Serrano M, García-Cazorla A, Campistol J, Ribes A, Ruiz A, Moreno J, Hyland K, Clayton P, Heales S, Artuch R. Pyridoxal 5'-phosphate values in cerebrospinal fluid: reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Mol Genet Metab*. 2008 Jun;94(2):173-7.

## P

Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 2004; 41:17-38.

Pearl PL, Hyland K, Chiles J, McGavin CL, Yu Y, Taylor D. Partial Pyridoxine Responsiveness in PNPO Deficiency. *JIMD Rep*. 2013;9:139-42.

Pérez B, Gutiérrez-Solana LG, Verdú A, Merinero B, Yuste-Checa P, Ruiz-Sala P, Calvo R, Jalan A, Marín LL, Campos O, Ruiz MÁ, San Miguel M, Vázquez M, Castro M, Ferrer I, Navarrete R, Desviat LR, Lapunzina P, Ugarte M, Pérez -Cerdá C. Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine-dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia*. 2013 Feb;54(2):239-48.

Plecko B, Paul K, Paschke E, Stoeckler -Ipsiroglu S, Struys E, Jakobs C, Hartmann H, Luecke T, di Capua M, Korenke C, Hikel C, Reutershahn E, Freilinger M, Baumeister F, Bosch F, Er wa W. Biochemical and molecular characterization of 18 patients with pyridoxine-dependent epilepsy and mutations of the antiquitin (ALDH7A1) gene. *Hum Mutat*. 2007 Jan;28(1):19-26.

Plecko B, Stöckler S. Vitamin B6 dependent seizures. *Can J Neurol Sci*. 2009 Aug;36 Suppl 2:S73-7. Review.

Pons R, Ford B, Chiriboga CA, et al. Aromatic L -amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. *Neurology* 2004;62:1058-65.

## R

Ribasés M, Serrano M, Fernández -Alvarez E, Pahisa S, Ormazabal A, García -Cazorla A, Pérez-Dueñas B, Campistol J, Artuch R, Cormand B. A homozygous tyrosine

hydroxylase gene promoter mutation in a patient with dopa-responsive encephalopathy: clinical, biochemical and genetic analysis. *Mol Genet Metab.* 2007 Nov;92(3):274-7.

Rilstone JJ, Alkhatir RA, Minassian BA. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *N Engl J Med.* 2013 Feb 7;368(6):543-50.

Ruiz A, García-Villoria J, Ormazabal A, et al. A new fatal case of pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase (PNPO) deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 93: 216-8.

## S

Schoedon G, Troppmair J, Adolf G, Huber C, Niederwieser A (1986) Interferon-gamma enhances biosynthesis of pterins in peripheral blood mononuclear cells by induction of GTP-cyclohydrolase I activity. *J Interferon Res* 6:697-703.

Serrano M, Ormazabal A, Pérez-Dueñas B, Artuch R, Coroleu W, Krauel X, Campistol J, García-Cazorla A. Perinatal asphyxia may cause reduction in CSF dopamine metabolite concentrations. *Neurology.* 2007 Jul 17;69(3):311-3.

Serrano M, Pérez-Dueñas B, Ormazabal A, Artuch R, Campistol J, Torres RJ, García-Cazorla A. Levodopa therapy in a Lesch-Nyhan disease patient: pathological, biochemical, neuroimaging, and therapeutic remarks. *Mov Disord.* 2008 Jul 15;23(9):1297-300.

Serrano M, García-Silva MT, Martín-Hernandez E, O'Callaghan Mdel M, Quijada P, Martínez-Aragón A, Ormazabal A, Blázquez A, Martín MA, Briones P, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Artuch R, Pineda M. Kearns-Sayre syndrome: cerebral folate deficiency, MRI findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochondrion.* 2010 Aug;10(5):429-32.

Schmitt, B., Baumgartner, M., Mills, P. B., Clayton, P. T., Jakobs, C., Keller, E., & Wohlrab, G. (2010). Seizures and paroxysmal events: symptoms pointing to the diagnosis of pyridoxine-dependent epilepsy and pyridoxine phosphate oxidase deficiency. *Developmental Medicine and Child Neurology.*

Speth C, Stoöckl G, Fuchs D, Wirleitner B, Widner B, et al. (2000) Inflammation marker 7,8-dihydroneopterin induces apoptosis of neurons and glial cells: a potential contribution to neurodegenerative processes. *Immunobiology* 202:460-476.

Stockler S, Plecko B, Gospe SM Jr, Coulter -Mackie M, Connolly M, van Karnebeek C, Mercimek-Mahmutoglu S, Hartmann H, Scharer G, Stru ijs E, Tein I, Jakobs C, Clayton P, Van Hove JL. Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow - up. *Mol Genet Metab.* 2011 Sep-Oct;104(1-2):48-60.

## T

Tondo M, Málaga I, O'Callaghan M, Serrano M, Emperador S, Ormazabal A, Ruiz -Pesini E, Montoya J, Garcia-Silva MT, Martin-Hernandez E, Garcia-Cazorla A, Pineda M, Artuch R. Biochemical parameters to assess choroid plexus dysfunction in Kearns -Sayre syndrome patients. *Mitochondrion.* 2011 Nov;11(6):867-70.

## V

Van der Ham M, Albersen M, de Koning TJ, Visser G, Middendorp A, Bosma M, Verhoeven-Duif NM, de Sain-van der Velden MG. Quantification of vitamin B6 vitamers in human cerebrospinal fluid by ultra performanc e liquid chromatography -tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2012 Jan 27;712:108-14.

Veerapandiyan, A., Winchester, S. a, Gallentine, W. B., Smith, E. C., Kansagra, S., Hyland, K., & Mikati, M. a. (2011). Electroencephalographic and seizure manifesta tions of pyridoxal 5' -phosphate-dependent epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B* , 20(3), 494–501.

## W

Walker V, Mills GA, Peters SA, Merton WL. Fits, pyridoxine, and hyperprolinaemia type II. *Arch Dis Child.* 2000 Mar;82(3):236-7.

Wang, H.-S., Kuo, M.-F., Chou, M.-L., Hung, P.-C., Lin, K.-L., Hsieh, M.-Y., & Chang, M.-Y. (2005). Pyridoxal phosphate is better than pyridoxine for controlling idiopathic intractable epilepsy. *Archives of Disease in Childhood*, 90(5), 512–515.

Werner ER, Werner -Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP -1, and T 24 cells. GTPcyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin red uctase are constitutively present. *J Biol Chem* 1990; 265: 3189–92.

Wevers RA, de Rijk -van Andel JF, Bräutigam C, et al. A review of biochemical and molecular genetic aspects of tyrosine hydroxylase deficiency including a novel mutation (291delC). *J Inher Metab Dis* 1999;22:364–73.

Willemsen MA, Verbeek MM, Kamsteeg EJ, de Rijk -van Andel JF, Aeby A, Blau N, Burlina A, Donati MA, Geurtz B, Grattan -Smith PJ, Haeussler M, Hoffmann GF, Jung H, de Klerk JB, van der Knaap MS, Kok F, Leuzzi V, de Lonlay P, Megarbane A, Monaghan H, Renier WO, Rondot P, Ryan MM, Seeger J, Smeitink JA, Steenbergen -Spanjers GC, Wassmer E, Weschke B, Wijburg FA, Wilcken B, Zafeiriou DI, Wevers RA. Tyrosine hydroxylase deficiency: a treatable disorder of brain catecholamine biosynthesis. *Brain*. 2010 Jun;133(Pt 6):1810-22.



## **ANNEX**

- 1- Taula annex
- 2- Altres publicacions de la doctoranda
- 3- Nous estudis derivats





1- **Taula Annex.** Llista dels pacients amb ECM relacionats amb els NT, pterines i vitamina B<sub>6</sub> diagnosticats a l'Hospital Sant Joan de Déu.

Deficiència enzimàtica	Edat debut	5HIAA (% alt)	HVA (% alt)	NP (% alt)	BP (alt %)	Altres det. bioquímiques	Mutacions puntuals
TH	5 m	N	↓(-91.2)	N	N		p.L236P/p.L236P
	5 m	N	↓(-99.8)	N	N		p.L236P/p.L236P
	7 m	N	↓(-94.8)	N	N		p.L236P/p.L236P
	1 a	N	↓(-87.0)	N	N		p.R233H/p.R233H
	2 a	N	↓(-78.5)	N	N		g-70C>T/g-70C>Y
	2 a	N	↓(-85.5)	N	N		p.L236P/p.L236P
	3 a	N	↓(-50.3)	N	N		g-71G>A/c.[1197-25_1391del]
	3 a	N	↓(-93.4)	N	N		p.R238W/p.T399W
	8 a	N	↓(-97.5)	N	N		p.L236P/p.L236P
	13 a	N	↓(-85.9)	N	N		En estudi
	16 a	N	↓(-66.0)	N	N		p.R233H/p.R233H
	19 a	N	↓(-98.0)	N	N		En estudi
	25 a	N	↓(-85.2)	N	N		p.R233H/p.R233H
AADC	11 m	↓(-85.3)	↓(-68.6)	N	N		p.G123R/p.T245I
	1 a	↓(-98.8)	↓(-98.0)	N	N		p.R412W/p.R412W
	4 a	↓(-93.4)	↓(-85.5)	N	N		p.R347Q/p.R347Q
MAO-A/B	1 a	Ind. (-100)	Ind. (-100)	N	N		Xp11.del 43.2-43.7
	1 a	Ind. (-100)	Ind. (-100)	N	N		Xp11.del 43.2-43.7
GTP-CH recessiva	15 a	N	↓(-33.3)	↓(-70)	↓(-50)	5-MTHF ↓	c.595C>G/c.595C>G
	15 a	N	↓(-41.0)	↓(-80)	↓(-50)	5-MTHF ↓	c.595C>G/c.595C>G
GTP-CH dominant (Segawa)	1 a	N	↓(-22.1)	↓(-75)	↓(-60)		p.Q89X
	7 a	N	N	↓(-62.5)	↓(-60)		p.Q89X
	25 a	N	↓(-51.9)	↓(-50)	↓(-80)		En estudi

	23 a	N	↓(-85.2)	↓(-50)	↓(-70)		En estudi
<b>Deficiència enzimàtica</b>	<b>Edat debut</b>	<b>5-HIAA (% alt)</b>	<b>HVA (% alt)</b>	<b>NP (% alt)</b>	<b>BP (alt %)</b>	<b>Altres det. bioquímiques</b>	<b>Mutacions puntuals</b>
PTPS	19 a	↓(-98.4)	↓(-91.2)	↑(+504)	↓(-63.5)	Phe ↑	En estudi
	16 a	↓(-98.4)	↓(-78.8)	↑(+354)	↓(-63.5)	Phe ↑	En estudi
SR	11 a	↓(-60.3)	↓(-69.2)	N	↑(+8.3)	Sepiapterina ↑	p.R150G/p.G102C
PNPO	1 dia	N	↓(-0.6)	N	N	PLP ↓	p.A174X/p.A174X

## **2- Altres publicacions de la doctoranda**

- Francisco J. Pérez -Cano, Carolina Ramírez -Santana, Marta Molero -Luís, Margarida Castell, Montserrat Rivero, Cristina Castellote, and Àngels Franch. Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy. Journal of Lipid Research. 2009 Mar;50(3):467-76.
- Marques T, Molero M, Tondo M, Hernández M, Vilar P, Cusí V, Torres M, Farré C. Asociación entre la diabetes mellitus de tipo 1 y la enfermedad celíaca: 6 años de cribado serológico sistemático. Revista del Laboratorio Clínico, 2009.
- Tondo M, Poo P, Naudó M, Ferrando T, Genovés J, Molero M, Martorell L. Predisposition to epilepsy in fragile X syndrome: Does the Val66Met polymorphism in the BDNF gene play a role? Epilepsy Behav. 2011 Sep 2.
- Mercedes Casado, Marta Molero -Luis, Cristina Sierra, Àngels Garcia -Cazorla, Aída Ormazábal, Rafael Artuch. Analysis of cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. ELECTROPHORESIS, 2013. Dec.

## **3- Nous estudis derivats**

Després de finalitzar l'estudi de l'HVA en LCR en pacients neuropediàtrics (Molero - Luis et al. 2013<sup>a</sup>), ens hem plantejat desenvolupar dos treballs que significarien una continuació a aquest primer article. Per una banda, i des d'un punt de vista bioquímic i estadístic, estem preparant un treball, l'objectiu principal del qual és definir la correlació real entre les variables HVA i 5HIAA en LCR en una població neuropediàtrica, ja que dades preliminars ens suggereixen que aquesta correlació podria ser propera a 1 en un nombre molt important de la població. Aquesta recta de regressió ens

permetrà fer una predicció de l'associació entre les dues variables i comprovar la validesa dels nostres valors de referència per edat. D'altra banda, el segon treball sorgeix dels resultats observats en el primer article d'aquesta tesi, on la única alteració de la ressonància magnètica que va correlacionar amb nivells disminuïts d'HVA en LCR van ser les alteracions a la substància blanca. Per tant, creiem que estudiar amb més profunditat una cohort de pacients amb alteracions a la substància blanca pot ser de gran interès ja que inclou un aspecte més holístic, abarçant el punt de vista radiològic, clínic i bioquímic. Aquesta avaluació intentaria identificar quines patologies amb alteracions a la substància blanca són més freqüents de tenir nivells alterats de NT en LCR (5HIAA i HVA) i per d'altra banda, definir quins subtipus d'alteracions de la substància blanca (desmielinització, dismielinització i hipomielinització) cursen amb nivells de NT més alterats.

Respecte a la continuació del segon article presentat en aquesta tesi (Molero-Luis et al. 2013<sup>b</sup>), volem definir un nou punt de tall de la neopterina però en pacients nounats. Per l'estudi d'aquesta població (d'1 a 30 dies d'edat), atès que presenta un desenvolupament neurològic molt actiu i uns valors normals de NP en LCR més elevats que la resta de població (Ormazabal et al. 2005), fa necessari estudiar-los com a grup independent i no mesclar-los amb els pacients més grans. Actualment, creiem que hi ha un buit científic en base aquest marcador i aquest grup d'edat.

Per últim, la nostra observació de l'efecte positiu de la suplementació amb PLP respecte al control de l'epilèpsia, obre una nova via de treball respecte al tractament amb aquesta vitamina en epilèpsies fàrmaco-resistents.