



Aproximación a la fisiopatología de las anomalías neurológicas en la fenilcetonuria y evaluación de nuevas opciones terapéuticas

Belén Pérez Dueñas

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) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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

Facultat de Medicina

Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Medicina Física

***APROXIMACIÓN A LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS
ANOMALÍAS NEUROLÓGICAS EN LA
FENILCETONURIA Y EVALUACIÓN DE NUEVAS
OPCIONES TERAPÉUTICAS***

Tesis presentada por

BELÉN PÉREZ DUEÑAS

para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Barcelona, 2006

Director de la Tesis

Dr. Jaume Campistol Plana

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

Agradecimientos

A mi querido Ton

A nuestros hijos, a quiénes debemos nuestra felicidad

A mis padres, por ser las mejores personas que conozco. Por haberme enseñado los valores que me han permitido formarme como persona y como médico

A mi hermana Visia, porqué por ella y personas como ella merece la pena seguir luchando

A Jaume Campistol, por la confianza que siempre me ha demostrado, y por haberme dado la oportunidad de trabajar en una enfermedad tan fascinante como es la fenilcetonuria

A Maria Antònia Vilaseca, por el tiempo infinito que ha dedicado a ayudarme en esta Tesis. Por haberme enseñado el rigor del trabajo científico. Por sus dulce conversación y sus buenos sentimientos

A Rafael Artuch, por el trabajo que hemos realizado juntos. Por esa cabecita divertida que piensa a la velocidad del rayo

A todo el Laboratorio de Metabólicas, por el interés y la sensibilidad con que trabajan en la fenilcetonuria

A Àngels García, por su apoyo y su amistad que han hecho más fácil el trabajo duro

A Anna Vernet, por haberme enseñado la parte más humana de la medicina

A todos los compañeros del Servicio de Neurología, de quiénes cada día aprendo algo nuevo

A Josep Valls, por la ayuda que me ha prestado en el estudio del temblor. Por ser una persona excelente para quien aprender y enseñar tienen el mismo valor

A Jesús Pujol y Carles Soriano, por el tiempo que hemos compartido intentando resolver unos hallazgos tan complejos

A la Unitat de Seguiment de la Fenilcetonúria, por los buenos ratos que hemos pasado debatiendo sobre los pacientes

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

A la Asociación de Padres Fenilcetonúricos, por el trabajo que realizan a favor de la fenilcetonuria

A REDEMETH (G03/054), por haberme concedido la Beca que me ha permitido trabajar en el estudio de la fenilcetonuria

A la Dirección Médica del Hospital Sant Joan de Déu, por el apoyo que siempre me ha demostrado

A la Cátedra de Pediatría del Hospital Sant Joan de Déu, por mostrarse siempre accesible con las personas que, como yo, comienzan

A la beca FIS 021450, que ha financiado los estudios que conforman esta Tesis

Y sobre todo, a los pacientes, y a todo el que convive con la fenilcetonuria

Índice

Introducción	Página	7
1. Qué es la fenilcetonuria		8
1.1. Definición		8
1.2. Historia		8
1.3. Clasificación		10
2. Fenotipo clínico de la fenilcetonuria		12
2.1. Fenilcetonuria clásica no tratada		12
2.2. Fenilcetonuria clásica tratada precozmente		14
3. El temblor en la fenilcetonuria		14
3.1. Prevalencia y características clínicas		14
3.2. Aspectos neurofisiológicos		16
3.3. Factores etiológicos		16
4. Anomalías cerebrales en la fenilcetonuria		18
4.1. Cambios histopatológicos en la sustancia gris cerebral		18
4.2. Cambios histopatológicos en la sustancia blanca cerebral		19
4.3. Técnicas de resonancia magnética cerebral		21
4.4. Correlación con datos clínicos y bioquímicos		22
5. Opciones terapéuticas en la fenilcetonuria		22
5.1. Tratamiento clásico mediante dieta restrictiva en fenilalanina		22
5.2. Respuesta al test de sobrecarga con tetrahidrobiopterina		24
5.3. Tratamiento con tetrahidrobiopterina		26
Justificación de la unidad temática		27
Hipótesis de trabajo		29
Objetivos		31
1. Objetivo principal		31
2. Objetivos concretos		31

	33
Pacientes y métodos	34
1. Sujetos del estudio	35
2. Material y métodos del estudio neurofisiológico del temblor	35
2.1. Examen neurológico	36
2.2. Examen neurofisiológico	36
3. Material y métodos del estudio volumétrico mediante RM	36
3.1. Adquisición y procesamiento de IRM	37
4. Material y métodos de laboratorio	37
4.1. Determinación de fenilalanina	37
4.2. Determinación de coenzima Q10	38
4.3. Determinación de pterinas	38
4.4. Prueba de sobrecarga combinada con Phe/Bh4	38
5. Tratamiento con BH4	38
5.1. Protocolo de tratamiento con BH4	39
5.2. Examen antropométrico y nutricional	39
5.3. Evaluación de la tolerancia a la Phe	39
5.4. Control bioquímico nutricional	40
6. Evaluación neuropsicológica	40
7. Análisis estadístico	43
Investigación y resultados	
1. <i>Characterization of tremor in phenylketonuric patients.</i> Caracterización del temblor en pacientes fenilcetonúricos. J Neurol 2005; 252: 1328-34	45
2. <i>Tremor in phenylketonuria is associated with decreased plasma coenzyme Q10 concentrations.</i> El temblor en la fenilcetonuria está asociado a un descenso en las concentraciones plasmáticas de Coenzima Q10. J Neurol 2005; pendiente de aceptación	57
3. <i>Global and regional volume changes in the brain of phenylketonuric patients.</i> Cambios volumétricos globales y regionales en el cerebro de pacientes fenilcetonúricos. Neurology 2005; in press	67

4. <i>Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria.</i> Respuesta a la tetrahydrobiopterina en pacientes con fenilcetonuria. Clin Biochem 2004; 37: 1083-1090	91
5. <i>Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy.</i> Evaluación clínica y nutricional de pacientes fenilcetonúricos en monoterapia con tetrahydrobiopterina. Mol Genet Metab 2005; 86: S54-S60	103 115
Discusión conjunta	115
1. Caracterización del temblor en la fenilcetonuria	117
2. Temblor y déficit de coenzima Q10	118
3. Estudio volumétrico cerebral en la fenilcetonuria	120
4. Respuesta a la prueba de sobrecarga con tetrahydrobiopterina	
5. Evaluación clínica y nutricional del tratamiento con tetrahydrobiopterina	122 125
Conclusiones	127
Estudios futuros	129
Bibliografía	137
Anexo	139
1. Otras publicaciones relacionadas con el tema	163
2. Comunicaciones a congresos relacionadas con el tema	

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

Abreviaturas

PKU	Fenilcetonuria
Phe	Fenilalanina
Tyr	Tirosina
PAH	Fenilalanina hidroxilasa
BH4	Tetrahidrobiopterina
CoQ10	Coenzima Q10
RM	Resonancia Magnética
SNC	Sistema nervioso central

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

Introducción

1. Qué es la fenilcetonuria
 - 1.1. Definición
 - 1.2. Historia
 - 1.3. Clasificación
2. Fenotipo clínico de la fenilcetonuria
 - 2.1. Fenilcetonuria clásica no tratada
 - 2.2. Fenilcetonuria clásica tratada precozmente
3. El temblor en la fenilcetonuria
 - 3.1. Prevalencia y características clínicas
 - 3.2. Aspectos neurofisiológicos
 - 3.3. Factores etiológicos
4. Anomalías cerebrales en la fenilcetonuria
 - 4.1. Cambios histopatológicos en la sustancia gris cerebral
 - 4.2. Cambios histopatológicos en la sustancia blanca cerebral
 - 4.3. Técnicas de resonancia magnética cerebral
 - 4.4. Correlación con datos clínicos y bioquímicos
5. Opciones terapéuticas en la fenilcetonuria
 - 5.1. Tratamiento clásico mediante dieta restrictiva en fenilalanina
 - 5.2. Respuesta al test de sobrecarga con tetrahidrobiopterina
 - 5.3. Tratamiento con tetrahidrobiopterina

1. Qué es la fenilcetonuria

1.1. Definición

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica autosómica recesiva causada por un déficit de fenilalanina mono-oxigenasa (PAH, EC1.14.16.1), un enzima hepático que cataliza la conversión de fenilalanina (Phe) en tirosina, usando tetrahidrobiopterina (BH4) como coenzima. El déficit de PAH causa una acumulación de Phe y un descenso de tirosina en los tejidos y fluidos biológicos (Scriver et al, 2001).

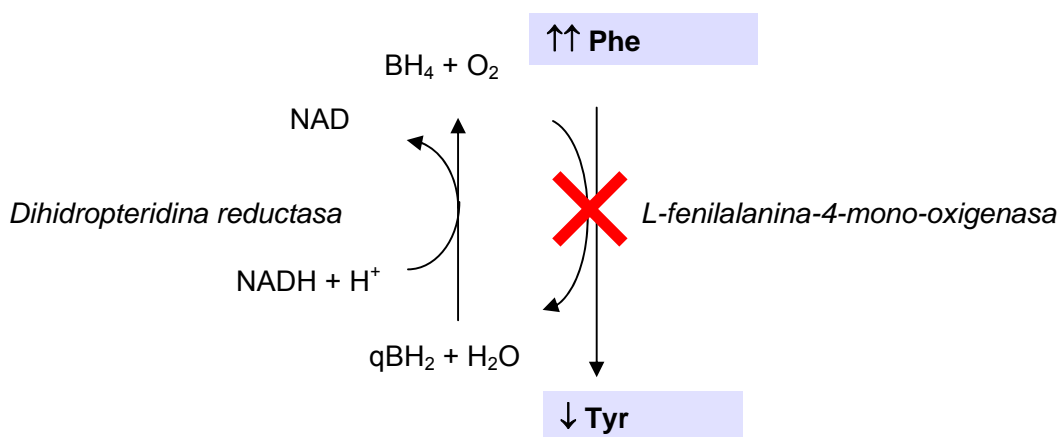


Figura 1. Metabolismo de la fenilalanina

1.2. Historia

En 1934 Asbjörn Fölling describió por primera vez la enfermedad en dos hermanos con retraso mental y un olor corporal especial, al observar que sus orinas acidificadas tomaban un intenso color verde al añadirles unas gotas de cloruro férrico. Tras una larga investigación química con los escasos recursos de su época, Fölling dedujo que lo que determinaba el color y el olor de la orina era el ácido fenilpirúvico. El estudio de otros pacientes con retraso mental ingresados en instituciones especiales evidenció que ocho de ellos pertenecientes a tres familias excretaban orina con el mismo olor y color a la

adición de cloruro férrico (Fölling, 1994). Basándose en estos datos describió la enfermedad como un trastorno metabólico hereditario, llamándola "idiotia fenilpirúvica", y relacionando por primera vez el retraso mental con un error congénito del metabolismo, concepto que había estado olvidado desde que fue descrito por Sir Archibald Garrod en 1908. Fölling observó la herencia autosómica recesiva de esta enfermedad e identificó posteriormente la fenilalanina como marcador bioquímico de la misma y precursor del ácido fenilpirúvico (Centerwall et al, 2000).



Figura 2. *Dr. Asbjörn Fölling, en la época del descubrimiento de la PKU, a la cual él denominó "idiotia fenilpirúvica".*

En 1937 la enfermedad fue denominada fenilcetonuria (PKU) por Penrose y Quastel, nombre que ha prevalecido como el de uso más común hasta nuestros días. En 1953, Jervis demostró el defecto de actividad de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa. En el mismo año, Bickel describió la primera posibilidad de terapia, mediante la restricción de la fenilalanina de la dieta, que constituye la base del tratamiento de estos pacientes. El siguiente hito en la historia de la PKU fue el desarrollo, en 1961, de un método simple de cribaje de la concentración sanguínea de fenilalanina, la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie, que permitió prevenir el retraso mental de los pacientes fenilcetonúricos al aplicar la restricción dietética de fenilalanina desde el período neonatal (Fölling, 1994; Centerwall et al, 2000). La aplicación del cribaje poblacional permitió descubrir que no todas las hiperfenilalaninemias eran causadas por defectos de actividad de la PAH, ya que algunas se debían a defectos en la síntesis o el reciclaje del cofactor tetrahidrobiopterina (Güttler et al, 1990).

En 1983 Woo localizó el gen de la PAH en el cromosoma 12q24.1, siendo clonado e

identificadas las primeras mutaciones, cuyo número se ha multiplicado desde entonces hasta una cifra superior a 400 mutaciones descritas en la actualidad. En los años 90 se han iniciado los ensayos de expresión in vitro de numerosas mutaciones del gen de la PAH, cristalizando y visualizando la estructura espacial del enzima humano y realizándose los primeros estudios sobre terapia génica.

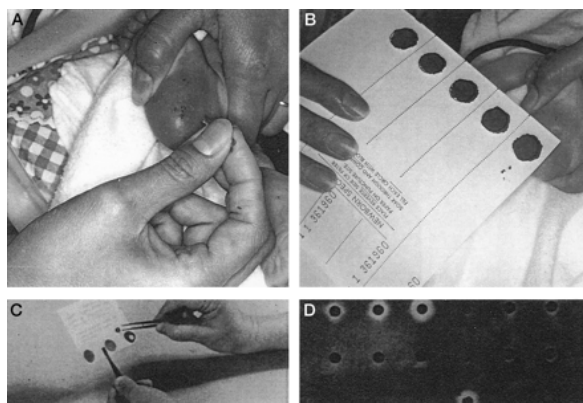


Figura 3. La prueba de Guthrie consistía en incubar sangre seca impregnada en papel de filtro en un medio especial rico en *Bacillus subtilis*. La presencia de fenilalanina facilitaba el crecimiento bacteriano, resultando en el crecimiento de un halo alrededor de la gota (C y D).

1.3. Clasificación

La hiperfenilalaninemia causada por mutaciones en el gen que codifica la fenilalanina hidroxilasa representa un amplio espectro de fenotipos metabólicos debido a la posible combinación de un elevado número de mutaciones alélicas. La clasificación es pues, arbitraria y se basa en las concentraciones plasmáticas de fenilalanina al diagnóstico y la tolerancia a la fenilalanina, es decir, en la cantidad de fenilalanina de la dieta capaz de mantener las concentraciones plasmáticas del aminoácido dentro de un rango recomendado (Scriver et al, 2001; Güttler et al, 1990).

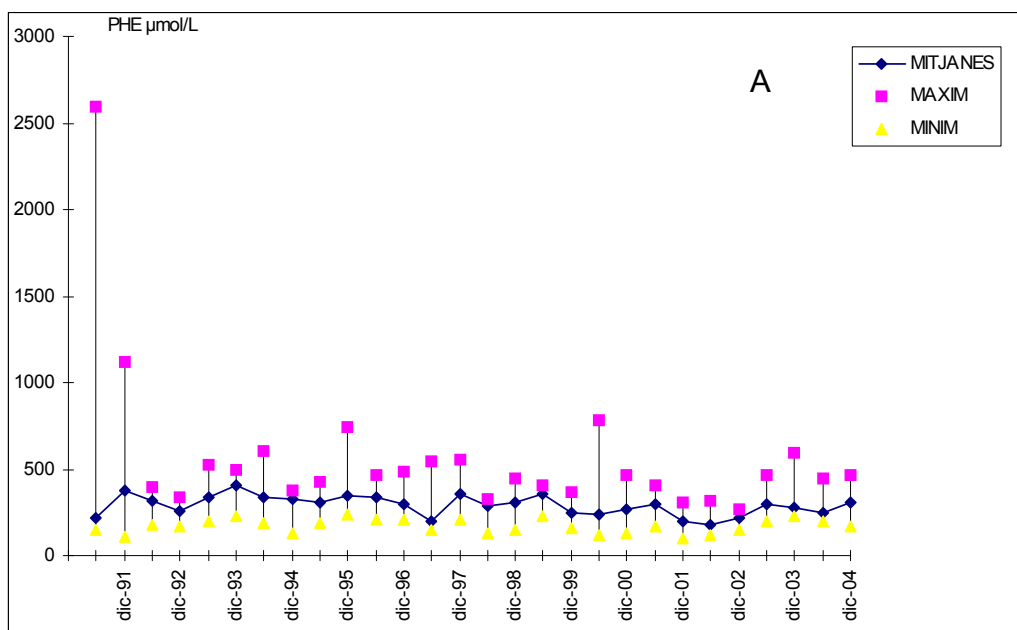
En la forma grave o fenilcetonuria clásica, las concentraciones plasmáticas de fenilalanina al diagnóstico son superiores a 1200 $\mu\text{mol/l}$ y la tolerancia de fenilalanina es inferior a 350 mg/día. La actividad enzimática residual de PAH es prácticamente indetectable.

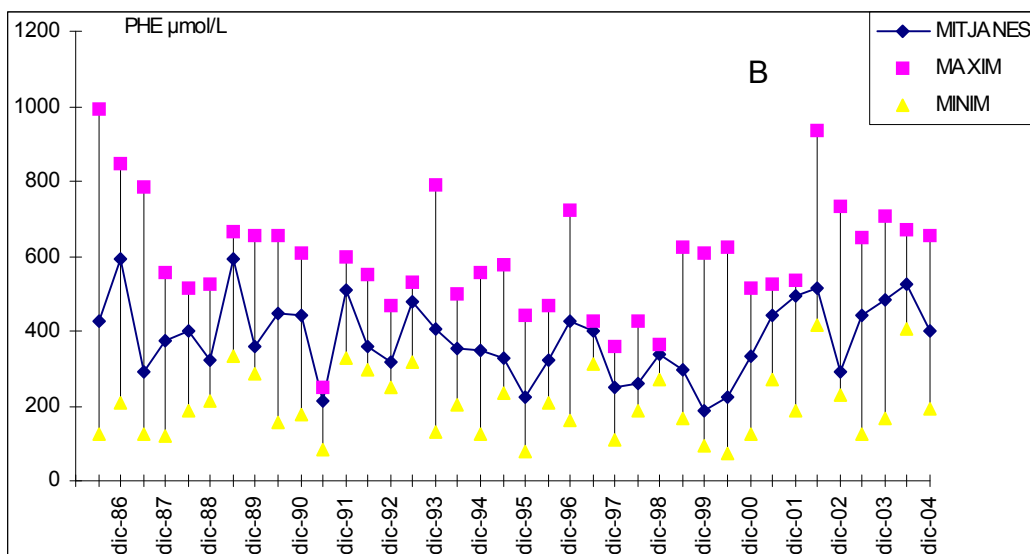
La variante moderada de PKU muestra unas concentraciones plasmáticas de fenilalanina

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

comprendidas entre 600 $\mu\text{mol/l}$ y 1200 $\mu\text{mol/l}$ y los pacientes que las padecen muestran una tolerancia comprendida entre 350-400 mg/día de fenilalanina en la dieta. La variante leve muestra una fenilalanina comprendida entre 360 $\mu\text{mol/l}$ y 600 $\mu\text{mol/l}$ y una tolerancia a fenilalanina entre 400 y 600 mg/día. La actividad enzimática residual es inferior al 10% de la normal en ambas variantes y requieren, por lo tanto tratamiento.

La hiperfenilalaninemia moderada (HPA) es una forma benigna, clínica y bioquímicamente, con concentraciones plasmáticas de fenilalanina inferiores a 360 $\mu\text{mol/l}$. Es causada por mutaciones leves del gen PAH que dan lugar a un defecto parcial de actividad enzimática (actividad residual del 10-35% de la normal), lo que determina que esta condición no requiera tratamiento dietético. Estas formas moderadas son relativamente frecuentes en el área mediterránea (1:11160 en Cataluña), comparadas con la fenilcetonuria clásica (1:21740 en Cataluña), mucho más prevalente en los países del Norte de Europa y América (Campistol et al, 2006).





Figuras 4A y 4B. Las gráficas muestran el control metabólico durante los primeros años de vida de dos pacientes PKU: (A) con fenotipo severo y (B) con fenotipo moderado. Destaca el buen control metabólico que presenta el paciente con el fenotipo metabólico severo de la enfermedad comparado con el paciente con fenotipo moderado. Estas gráficas son un ejemplo de la ausencia de correlación que existe entre el fenotipo metabólico y el genotipo en la fenilcetonuria. El adecuado cumplimiento dietético es pues el factor más importante que condiciona el pronóstico de la enfermedad.

2. Fenotipo clínico de la fenilcetonuria

2.1. Fenilcetonuria clásica no tratada

Los recién nacidos con fenilcetonuria presentan una exploración neurológica normal al nacimiento. Durante las primeras semanas de vida pueden aparecer signos inespecíficos, tales como dificultades en la alimentación, irritabilidad, hipotonía, y un olor característico a rancio debido a la excreción del ácido fenilacético. A partir de los 4 a 6 meses de vida aparece un retraso del desarrollo psicomotor progresivo que puede ir asociado a crisis epilépticas. El deterioro neurológico progresa hasta los 3-4 años de vida, siendo el coeficiente intelectual de los pacientes fenilcetonúricos no tratados con frecuencia inferior a 50 (Knox, 1972).

Asociadas al retraso mental existen anomalías neurológicas en un 75% de los pacientes no tratados. La epilepsia está presente en un 25% de los casos con anomalías

electroencefalográficas en un 80%. El patrón EEG es edad dependiente siendo frecuente la presencia de hipsarritmia en el primer año de vida (Brenton et al, 2000). Otras anomalías neurológicas son microcefalia, signos piramidales, trastornos de la marcha, atrofia óptica, estrabismo, discinesias entre las que se incluye un síndrome Parkinsoniano y temblor (Pites, 1998). El temblor en los pacientes no tratados tiene una prevalencia elevada (entre el 30 y el 60% según las series) (Leuzzi et al, 1995; Thompson et al, 1993). Se ha descrito con frecuencia un temblor postural y de acción, aunque en otras ocasiones los pacientes pueden presentar un temblor de reposo no asociado con otros signos parkinsonianos (Pites, 1998).

Son asimismo frecuentes los rasgos psicóticos en forma de tendencias destructivas, automutilaciones, impulsividad y ataques incontrolados de agresividad. Los rasgos físicos característicos son ojos, piel y cabellos claros, olor corporal especial y eccema que se puede encontrar en un 30% de los casos.

Debido al inicio tardío de los síntomas y al curso inexorable de la enfermedad hacia un deterioro neurológico irreversible, actualmente en gran número de países existen programas de detección precoz en el periodo neonatal aplicables a toda la población, que permiten el diagnóstico y el tratamiento precoz, indispensable y efectivo para evitar la aparición de los síntomas.

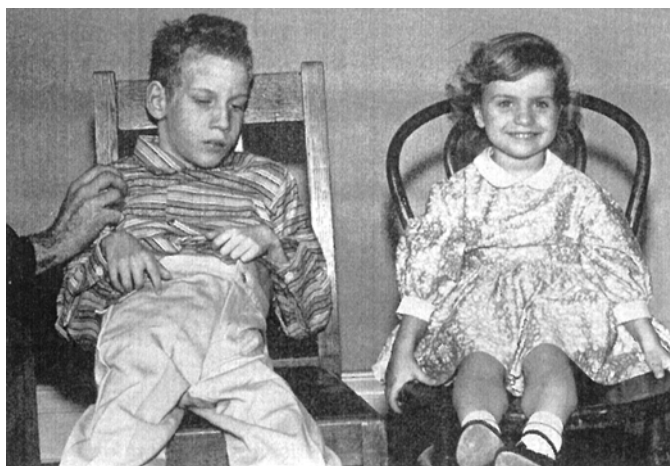


Figura 5. *Dos hermanos afectados de PKU. El hermano mayor, de 11 años, fue tratado tardíamente y está afecto de un retraso mental severo, mientras que su hermana de 2 años y medio fue tratada desde los primeros meses de vida y presenta un desarrollo neurológico normal (Centerwall et al, 2000).*

2.2. Fenilcetonuria clásica tratada precozmente

Los pacientes tratados precozmente alcanzan una inteligencia normal, aunque los valores medios de cociente intelectual (CI) son ligeramente inferiores a los de la población general. Estos valores de CI están relacionados con el control metabólico de los primeros 6 años de vida, lo cual sugiere que un estricto cumplimiento de la dieta en la primera década de la vida es crucial para el desarrollo de las funciones cognitivas (Gassió et al, 2005).

Se ha descrito una alteración específica de las funciones ejecutivas en los pacientes tratados precozmente (Diamond et al, 1997; Arnold et al, 1998; Leuzzi et al, 2004; Gassió et al, 2005). Se ha postulado que estos déficits son debidos a una alteración de la inervación dopaminérgica del córtex prefrontal (Diamond, 1994), donde se han demostrado bajas concentraciones de dopamina y sus metabolitos en animales de experimentación (Diamond et al, 1994; Joseph et al, 2003).

Dejando aparte las alteraciones neurocognitivas, es frecuente el hallazgo de otros signos neurológicos menores en pacientes PKU de diagnóstico precoz, tales como hiperreflexia en extremidades inferiores, torpeza en la coordinación motriz y temblor (Thompson et al 1993; Cleary et al, 1994). El temblor en los pacientes diagnosticados precozmente es un signo de disfunción neurológica muy frecuente (entre un 5 a 28% según las series) (Cleary et al, 1994; McDonnell et al, 1998; Pietz et al 1998; Thompson et al, 1993; Weglage et al 1995) cuyas causas en la actualidad se desconocen. Recientemente, se han realizado estudios evaluando las habilidades motoras finas como indicador sensible de disfunción neurológica en pacientes PKU de tratamiento precoz, obteniendo los pacientes de diagnóstico precoz peores resultados que el grupo control (Weglage et al 1995; Arnold et al 1998). Por todo ello se reconoce en la actualidad que existe un daño cerebral mínimo en pacientes PKU de diagnóstico precoz, cuyos factores causales no están en absoluto esclarecidos.

3. El temblor en la fenilcetonuria

3.1. Prevalencia y características clínicas

El temblor es un signo neurológico muy frecuente en la fenilcetonuria. Entre pacientes de diagnóstico precoz, la presencia de temblor ha sido reportada en un 5% a 28%

dependiendo de las series. Entre pacientes de diagnóstico tardío, en cambio, la prevalencia estimada asciende hasta un 60% de casos. Existen escasos datos en la bibliografía actual que describan las características clínicas del temblor en los pacientes PKU. La mayoría de autores describen un temblor fino postural y/o de acción (Leuzzi et al, 1995; Pietz et al, 1998), pero en ocasiones también se ha descrito un temblor de reposo en ausencia de otros signos de Parkinsonismo (Cleary et al, 1994; Weglage et al 1995). El temblor se ha descrito asociado con frecuencia a otros signos de disfunción neurológica como hiperreflexia osteotendinosa o torpeza en la motricidad fina (McDonnell et al 1998; Thompson et al 1993; Cleary et al 1994). Thompson et al realizaron una evaluación de la severidad del temblor y de otros signos neurológicos mediante una escala del 1 (signo físico) al 3 (dificultades moderadas a severas). En su serie, solo un paciente de diagnóstico precoz y dos pacientes de diagnóstico tardío refirieron cierto grado de repercusión en sus actividades diarias. La mayoría de autores, sin embargo, no han aportado datos sobre la amplitud o la severidad del temblor en los pacientes PKU. Así pues, se desconoce la repercusión que el temblor pueda tener en la vida cotidiana de estos enfermos, la evolución natural de dicho temblor, o las causas que motivan su presencia en pacientes que siguen un adecuado control metabólico.

Referencia	Prevalencia	Pacientes PKU	Tipo de temblor
Thompson et al, 1993	5/9 p. (55%) 6/25 p. (24%)	14-32 a D. Tardío 8-30 a D. Precoz	n.d.
Cleary et al, 1994	5/77 p. (6.5%)	10-50 a D. Precoz	De reposo
Leuzzi et al, 1995	9/16 p. (56%)	8-25 a D. Tardío	Postural y/o de acción
Weglage et al, 1995	1/20 p. (5%)	9-13 a D. Precoz	De reposo
Mc Donnell et al, 1998	5/23 p. (21%)	18-39 a D. Precoz	Postural
Pietz et al, 1998	16/57 p. (28%) vs 15% controles	17-33 a D. Precoz	Postural y/o de acción

Figura 6. Referencias bibliográficas del temblor en la PKU.
(p, pacientes; a, años)

3.2. Aspectos neurofisiológicos

Los trabajos que recogen aspectos neurofisiológicos del temblor en la fenilcetonuria son escasos y están basados en un grupo muy reducido de enfermos. En un trabajo de Pietz et al (1998), el estudio electromiográfico detectó un temblor postural fino manual de una frecuencia superior a los 8 Hz, que fue definido por los autores como un temblor fisiológico exagerado en dos casos y como un temblor esencial en otros dos. En estos pacientes, la amplitud del temblor se incrementó al añadir un peso a la extremidad, mientras que la frecuencia del temblor permaneció estable. Recientemente, Evans et al (2004) publicaron un caso de una mujer adulta PKU con una historia de temblor manual progresivo y anomalías de la marcha. El examen reveló la presencia de un temblor irregular de 6 a 8 Hz en las manos, piernas y tronco, predominantemente postural y de acción. Esta paciente mostró asimismo síntomas de Parkinsonismo que respondieron al tratamiento con levodopa durante 10 años.

3.3. Factores etiológicos

Las causas relacionadas con la presencia de temblor en los pacientes PKU son desconocidas. El temblor podría estar causado por la exposición reciente a elevadas concentraciones de Phe, estar presente desde el nacimiento, ser consecuencia de un mal control metabólico durante los primeros años de vida, o estar relacionado con el genotipo de los pacientes.

En 1998 Pietz et al realizaron un examen neurológico en 57 pacientes PKU de diagnóstico precoz en busca de signos de disfunción neurológica, y compararon los resultados con una población de controles sanos. Detectaron que los pacientes PKU tenían una prevalencia de temblor significativamente superior que el grupo control, peores resultados en los test de habilidades motoras finas y un CI significativamente inferior. En este trabajo los autores no pudieron establecer ninguna asociación entre la presencia de temblor y el control metabólico de diferentes períodos de la vida. Según nuestro conocimiento, no existen otros trabajos que hayan investigado las causas que originan la aparición del temblor en los enfermos con fenilcetonuria.

Varios autores han descrito la aparición de un deterioro neurológico junto a un temblor incapacitante coincidiendo con el abandono de la dieta restrictiva en Phe en la edad adulta (Villasana et al, 1989; Williams et al, 1998). La optimización del control metabólico

tuvo como consecuencia una mejoría clínica evidente del temblor en estos pacientes. Es evidente, por tanto, que el efecto tóxico de la hiperfenilalaninemia no se limita a los primeros años de desarrollo neurológico, pudiendo ser causante de la aparición de temblor en estadios tardíos de la vida.

Por otro lado, los pacientes PKU que siguen un adecuado control metabólico pueden presentar alteraciones metabólicas secundarias, como una disminución de las concentraciones plasmáticas de coenzima Q10 (Turunen et al, 2002), que también podrían tener un papel en la fisiopatología del temblor de estos pacientes. Existen tres factores principales implicados en las bajas concentraciones de CoQ10 en los pacientes fenilcetonúricos. En primer lugar, la aplicación de una dieta restrictiva en alimentos ricos en proteínas de origen animal conlleva una reducción de los aportes exógenos de CoQ10 (Weber et al, 1997). En segundo lugar, se ha demostrado que las concentraciones elevadas de fenilalanina causan una inhibición del enzima limitante de la colesteroénesis, vía de síntesis común del CoQ10 (Castillo et al, 1988). En tercer lugar, la tirosina es un precursor de la síntesis de CoQ10, y el déficit de tirosina secundario al defecto metabólico en la fenilcetonuria podría condicionar asimismo una disminución de la síntesis endógena, aunque este aspecto parece ser menos importante (Artuch et al, 2001).

El CoQ10 desempeña un papel importante en el metabolismo energético mitocondrial, actuando como transportador de electrones entre los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y favoreciendo la síntesis de ATP (Brandt, 1998; Kroger et al, 1973). Además, su forma reducida (ubiquinol) es uno de los principales antioxidantes de nuestro organismo. Su acción antioxidante implica al menos tres mecanismos diferentes (Ernster et al, 1995; Stocker et al 1991). En primer lugar protege las membranas lipídicas del daño peroxidativo; en segundo lugar neutraliza los radicales peroxilo lipídicos; y en tercer lugar reduce otros antioxidantes naturales como el tocoferol o vitamina E a su forma activa.

En la PKU, no se ha detectado que el déficit de CoQ10 interfiera en la función de la cadena respiratoria, pero sí se ha demostrado su asociación con un aumento del estrés oxidativo (Turunen et al, 2002). En concreto, se ha observado que las concentraciones bajas de CoQ10 están asociadas a un aumento del consumo de tocoferol y a concentraciones plasmáticas elevadas de malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica (Colome et al, 2003).

Aunque la implicación clínica del déficit secundario de CoQ10 en la PKU no ha sido investigada hasta el momento, los modelos experimentales indican que el estrés oxidativo

puede estar implicado en la fisiopatología del daño cerebral en la PKU. Varios estudios (Kienzle-Hagen et al, 2002; Martínez-Cruz et al, 2002) han observado una alteración de los marcadores de estrés oxidativo (malondialdehído, concentraciones de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa) en los cerebros de ratones expuestos a hiperfenilalaninemia. Asimismo, estos autores han demostrado que el estrés oxidativo induce cambios morfológicos significativos en los cerebros de los ratones PKU. Por tanto, existe la posibilidad de que el déficit de CoQ10 pueda jugar un papel en la fisiopatología del temblor en pacientes PKU en tratamiento dietético.

Finalmente, existen datos que refuerzan la hipótesis de que el temblor en la PKU podría ser una manifestación de un déficit dopaminérgico. En este sentido, Burlina et al (2000) demostraron un déficit de la vía dopaminérgica en el líquido cefalorraquídeo de una serie de pacientes PKU en tratamiento dietético que presentaban temblor. Asimismo, en la paciente que publicaron Evans et al (2004), el temblor y los síntomas Parkinsonianos mejoraron ostensiblemente con el tratamiento con levodopa. Sin embargo, las técnicas de que disponemos en la actualidad solo permiten investigar el déficit dopaminérgico mediante un análisis de sus metabolitos a nivel del líquido cefalorraquídeo. La realización de una punción lumbar en pacientes con síntomas neurológicos leves y una buena calidad de vida como es el caso de los pacientes PKU, plantea problemas éticos que dificultan la continuidad de esta línea de investigación.

4. Anomalías cerebrales en la fenilcetonuria

4.1. Cambios histopatológicos en la sustancia gris cerebral

La descripción de lesiones corticales en la fenilcetonuria son escasas y con resultados dispares. El motivo de esta falta de consistencia es que los métodos neuropatológicos convencionales solo son apropiados para la descripción de lesiones destructivas, degenerativas o neoplásicas, muy diferentes a los procesos patológicos presentes en la fenilcetonuria y en otras enfermedades neurometabólicas. El córtex cerebral tiene una apariencia normal en las tinciones habituales, excepto por la presencia de cambios inespecíficos y cuestionables, como son una reducción en el número de neuronas corticales y una apariencia inmadura (Malamud, 1966).

La fenilcetonuria es una enfermedad que se manifiesta a partir del nacimiento. Por tanto el

efecto tóxico de la hiperfenilalaninemia se produce durante el periodo de crecimiento lineal y arborización de las dendritas de las neuronas corticales, la formación de las sinapsis, y el proceso de remodelamiento de las ramas sinápticas que sigue posteriormente (Huttenlocher, 2000). Estos cambios patológicos son muy complejos y puramente cuantitativos, y solo pueden ser detectados mediante métodos histológicos cuantitativos. Solo existen dos trabajos que hayan aplicado estos métodos para el estudio del cerebro de seres humanos afectados de fenilcetonuria (Williams et al, 1980; Bauman et al, 1982). Estos autores encontraron una disminución en el número de espinas dendríticas a nivel de las neuronas piramidales corticales, así como un aumento en la densidad neuronal de forma similar a lo que se observa en estadios precoces de desarrollo neurológico. Estos hallazgos confirman la existencia de una detención del desarrollo cerebral en los pacientes PKU no tratados. Se han descrito hallazgos similares en ratas expuestas a hiperfenilalaninemia afectando a las neuronas piramidales, células de Purkinje y neuronas del hipocampo (Robain et al, 1981; Cordero et al, 1983; Lacey, 1984 y 1986).

4.2. Cambios histopatológicos en la sustancia blanca

Malamud en 1966 publicó un estudio histopatológico en ocho pacientes con PKU y realizó una revisión bibliográfica. En su trabajo concluyó que existen unas alteraciones estructurales distintivas en todos los casos de PKU, que varían desde cambios espongiiformes hasta una franca desmielinización. La mayoría de trabajos coinciden en la descripción de un aspecto pálido en las tinciones de mielina, con frecuencia asociado a gliosis. Estos cambios patológicos predominan en las regiones de sustancia blanca que mielinizan postnatalmente, lo cual apoya la hipótesis de que estas lesiones son debidas a los efectos tóxicos de la hiperfenilalaninemia (Huttenlocher, 2000).

Más recientemente, los estudios en un modelo murino PAHenu2 para la PKU han demostrado que la patogénesis de la sustancia blanca es debida a que la hiperfenilalaninemia produce una inhibición de la síntesis del colesterol a nivel de los oligodendrocitos (Dyer et al, 1996; Shefer et al, 2000). Dado que la colesterogénesis es una vía común de síntesis del CoQ10, las elevaciones de Phe podrían asimismo causar una disminución de la síntesis endógena de CoQ10 a nivel de los oligodendrocitos. Esta hipótesis es especialmente interesante teniendo en cuenta que el CoQ10 es una sustancia fundamental en el metabolismo neuronal, pues participa en la síntesis de

energía a nivel de la mitocondrial y previene el daño causado por la peroxidación lipídica. Shefer et al (2000) ha demostrado que existe una sensibilidad selectiva a las elevaciones de Phe a nivel de los oligodendrocitos localizados en los tractos de sustancia blanca que mielinizan postnatalmente, y que corresponden con las áreas de sustancia blanca que se ven afectadas en los estudios por resonancia magnética, es decir, sustancia blanca periventricular y subcortical de predominio en regiones posteriores. Estos trabajos han detectado una hipomielinización selectiva del cuerpo caloso y la comisura anterior, observándose mediante microscopio electrónico una reducción superior al 50% del número de axones mielinizados (Shefer et al 2000).

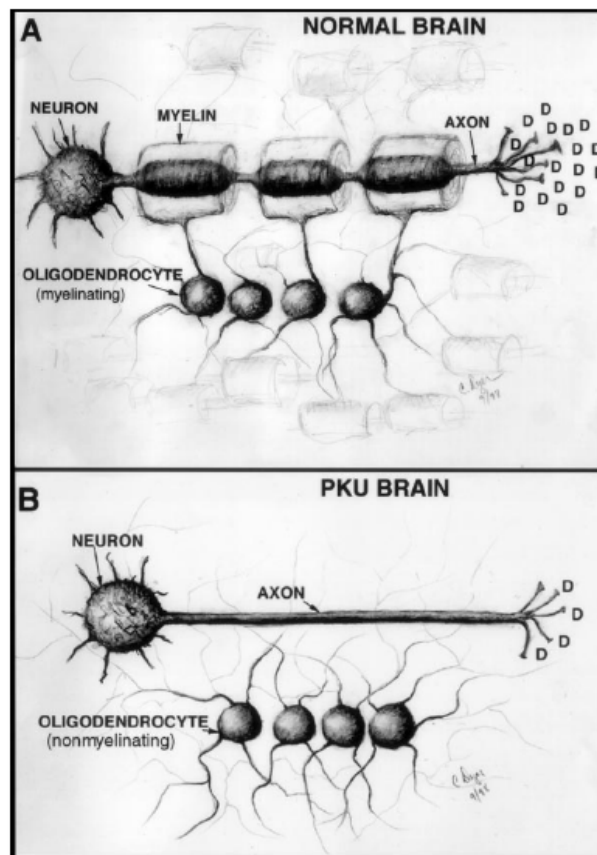


Figura 7. Estas imágenes describen la hipotética interconexión entre dos mecanismos patogénicos en la PKU. En el cerebro PKU (B) la hiperfenilalaninemia inhibe la capacidad de síntesis de mielina de los oligodendrocitos. La falta de mielina provoca una inmadurez neuronal que tiene como consecuencia un déficit de síntesis dopaminérgica (Dyer et al, 1999).

4.3. Técnicas de resonancia magnética cerebral

Los estudios de neuroimagen en la PKU se han centrado en el análisis de áreas bilaterales de hiperintensidad observadas en secuencias T2 que afectan predominantemente la sustancia blanca periventricular posterior, pero que pueden extenderse a otras áreas de sustancia blanca en pacientes con descompensaciones metabólicas severas (Cleary et al, 1994; Thompson et al, 1993; Bick et al, 1991 y 1993; Leuzzi et al, 1993; Ullrich et al, 1994).

La naturaleza exacta de estas lesiones se desconoce, aunque su carácter reversible tras una disminución de los valores plasmáticos de Phe junto con el hallazgo de valores normales de N-acetilaspártato (NAA) en espectroscopia por resonancia magnética (Bick et al, 1993; Kreis et al, 1995; Pietz et al 1996) prácticamente excluyen la posibilidad de un daño permanente con degeneración axonal.

Los estudios más recientes de RM por difusión muestran un patrón restrictivo de agua coincidiendo con las áreas donde se observan estas anomalías de señal en la sustancia blanca (Dezortova et al, 2001; Phillips et al 2001; Sener, 2004). El patrón restrictivo de difusión podría explicarse por alteraciones en las vainas de mielina afectadas por cambios regenerativos, los cuales presumiblemente presentan una geometría diferente y un aumento de su tortuosidad (Phillips et al 2001).

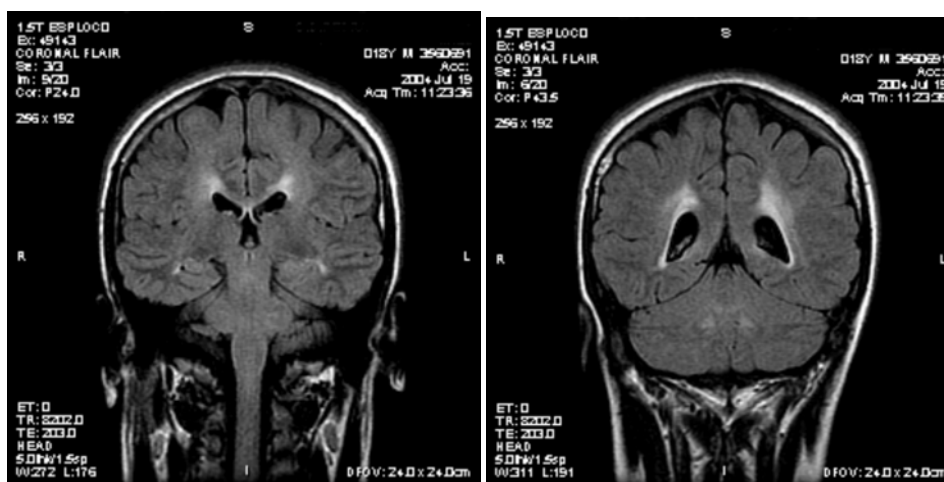


Figura 8. Imágenes coronales (secuencia FLAIR) que muestran la presencia de lesiones hiperintensas en la sustancia blanca periventricular posterior en paciente PKU con Phe plasmática de 900 $\mu\text{mol/L}$.

4.4. Correlación de los hallazgos de neuroimagen con datos clínicos y bioquímicos

Dado que las alteraciones de la sustancia blanca han sido consideradas por la mayoría de autores como el proceso patológico más importante en la fenilcetonuria, el esfuerzo de la mayoría de autores se ha centrado en correlacionar los hallazgos clínicos con las anomalías de la sustancia blanca que se observan mediante técnicas de resonancia magnética. En la actualidad se conoce que las alteraciones de la sustancia blanca están asociadas a elevaciones recientes de Phe plasmática (Thompson et al, 1993; Ullrich et al, 1994; Pietz et al, 1996) y pueden revertir parcialmente con una normalización del control metabólico (Bick et al, 1993; Ullrich et al, 1994; Thompson et al, 1990). Sin embargo, las alteraciones de la sustancia blanca no guardan ninguna relación con el cociente intelectual, la presencia de temblor u otros signos neurológicos, y las alteraciones detectadas en los potenciales visuales (Cleary et al, 1994; Pietz et al, 1998; Thompson et al, 1993; Bick et al, 1993). No es de extrañar la ausencia de correlación entre las lesiones de sustancia blanca y algunas de las manifestaciones clínicas más comunes de la enfermedad, como son el déficit cognitivo o la epilepsia, pues éstas no son alteraciones fácilmente explicables por un trastorno primario de la sustancia blanca. Por tanto, es muy probable que existan alteraciones anatómicas en otras regiones del cerebro en pacientes PKU que pudieran explicar el por qué de estas manifestaciones neurológicas.

5. Opciones terapéuticas en la fenilcetonuria

5.1. Tratamiento clásico mediante dieta restrictiva en fenilalanina

Partiendo de los trabajos pioneros de Bickel (1953), la restricción de fenilalanina de la dieta continua siendo la base del tratamiento actual de estos pacientes. La detección precoz de la enfermedad y el inicio de la dieta en el período neonatal han dado sus frutos en una generación de pacientes PKU con una buena calidad de vida. Durante los años 70-80 existía la hipótesis de que las concentraciones elevadas de fenilalanina a partir de los 7-8 años de vida no eran tóxicas para el SNC. Por tanto la práctica clínica aconsejaba liberalizar la dieta en Phe a partir de esa edad. Dicha estrategia terapéutica se abandonó en los años 90, cuando se demostró que la interrupción del tratamiento conducía a una disminución de 6 puntos en el CI, así como a la aparición de problemas de carácter y

comportamiento en forma de agitación, trastornos del sueño, temblores y otras complicaciones neurológicas más graves en algunos casos (Weglage et al, 1995 y 1996). En la actualidad el tratamiento que se ha demostrado eficaz en todos los pacientes PKU es el nutricional. El tratamiento de la PKU es para toda la vida y se basa en la reducción del aporte de alimentos que contienen fenilalanina, lo cual se traduce en la práctica en una restricción de casi todos los alimentos ricos en proteínas, pero también en minerales, oligoelementos y vitaminas. Por todo ello la dieta restrictiva en fenilalanina debe ir combinada con la administración de una fórmula especial que contiene los demás aminoácidos, vitaminas y oligoelementos (Burgard et al, 1999; Wappner et al 1999). Se trata de una dieta muy estricta, difícil de cumplimentar por algunos pacientes, y en especial, en algunas etapas de la vida como la adolescencia y la edad adulta. Recientemente, tras el descubrimiento de Kure et al (1999) de un grupo de pacientes fenilcetonúricos que presentaban una buena respuesta a la administración de BH4, se ha abierto una línea de investigación basada en esta novedosa estrategia terapéutica.

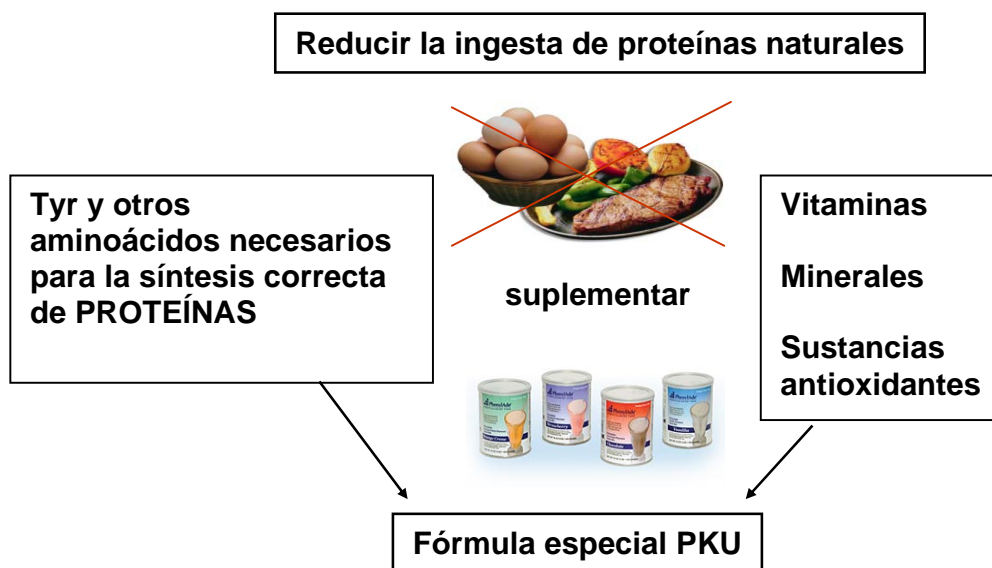


Figura 9. Base del tratamiento dietético de la PKU

5.2. Respuesta al test de sobrecarga con tetrahidrobiopterina

El test de sobrecarga con BH4 ha servido tradicionalmente para el diagnóstico diferencial de las hiperfenilalaninemias. Éstas pueden estar causadas bien por un déficit de PAH (Fenilcetonuria) o bien por varios defectos enzimáticos del metabolismo de la BH4. Los pacientes con mutaciones en el gen PAH presentaban tradicionalmente una respuesta pobre a la prueba de sobrecarga con BH4, mientras que los pacientes con un defecto primario del metabolismo de la BH4 presentaban una buena respuesta. Este dato, junto con el perfil de pterinas en suero y/o orina, permitía identificar el defecto metabólico.

Sin embargo, en 1999 Kure y cols describieron cuatro pacientes con buena respuesta a la BH4 y mutaciones conocidas en el gen PAH. Estos resultados fueron atribuidos a la utilización de dosis superiores de BH4 y de mayor pureza. La identificación posterior de un mayor número de pacientes PKU con buena respuesta a BH4 (Spaapen et al, 2001; Lindner et al, 2001; Blau et al 2002; Lässker et al 2002; Lindner et al 2003) ha abierto recientemente una nueva estrategia de tratamiento aplicable sólo a ciertos pacientes con PKU moderada o leve y con buena respuesta al cofactor.

Se han descrito muchas mutaciones en el gen de la PAH en pacientes que responden a la BH4 (Spaapen et al 2003; Muntau et al 2002; Weglage et al 2002; Bardelli et al 2002; Matalon et al 2004), y actualmente los grupos de investigación básica están estudiando la razón de esta respuesta al cofactor. Sin embargo, dado que la mayoría de pacientes PKU son heterocigotos combinados para dos mutaciones diferentes y que se han descrito más de 400 mutaciones en el gen de la PAH, el genotipo no permite predecir la respuesta al cofactor y por tanto es necesario una prueba de sobrecarga con BH4 para seleccionar a los pacientes respondedores a esta terapia.

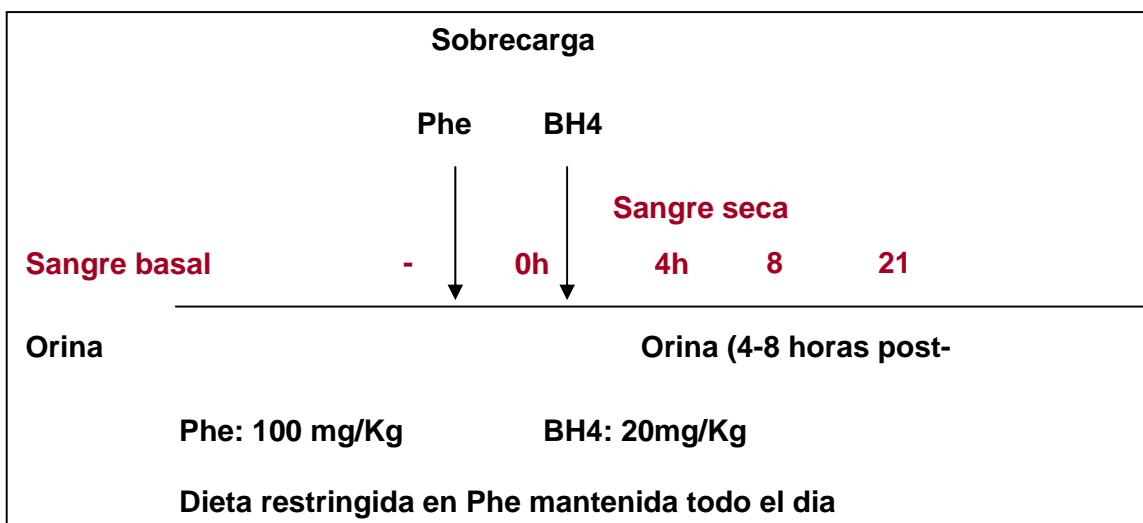


Figura 10. Prueba de sobrecarga combinada con Phe/BH4.

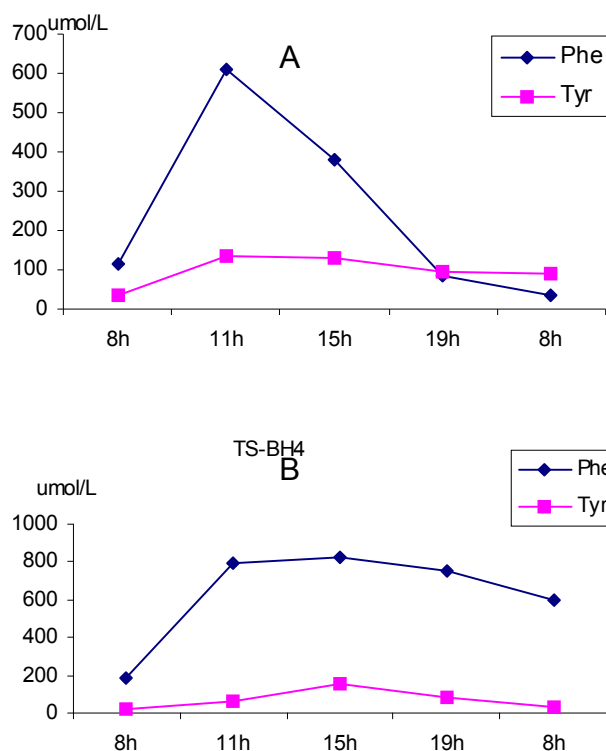


Figura 11. Resultados de dos pruebas de sobrecarga: (A) paciente con buena respuesta; (B) paciente con mala respuesta.

5.3. Tratamiento con tetrahidrobiopterina

El tratamiento con BH4 en los pacientes fenilcetonúricos que responden a este cofactor ha resultado en un control satisfactorio de los niveles plasmáticos de Phe y ha permitido una liberalización progresiva de la dieta restrictiva en este aminoácido (Trefz et al, 2000; Koch et al, 2002; Steinfeld et al, 2002; Lücke et al, 2003; Cerone et al, 2004; Shintaku et al, 2004; Steinfeld et al, 2004). Sin embargo, a pesar de un aumento en la experiencia en la utilización de BH4, existen pocos datos acerca de la evolución clínica y nutricional de los pacientes en tratamiento. Se han aplicado diferentes estrategias terapéuticas. Algunos pacientes han sido tratados a partir del cribaje metabólico en el período neonatal, cuando la prueba de sobrecarga con BH4 aplicada para el diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia mostró una buena respuesta al cofactor (Trefz et al, 2000; Steinfeld et al, 2002; Lücke et al, 2003). Otros autores han realizado un tratamiento con BH4 en combinación con una dieta restrictiva en Phe, con la finalidad de incrementar sensiblemente la tolerancia de Phe (Cerone et al, 2004; Shintaku et al 2004). En resumen, a partir de los trabajos publicados en la literatura, podemos concluir que no existe un consenso sobre la estrategia terapéutica con BH4 más adecuada a realizar en los pacientes PKU que responden a este cofactor, ni tampoco estudios a largo plazo que confirmen la eficacia e inocuidad de un tratamiento prolongado con BH4.

Justificación de la unidad temática

En el conjunto de trabajos que forman esta tesis doctoral, hemos intentado identificar y caracterizar las alteraciones neurológicas que presentan los pacientes fenilcetonúricos que siguen un adecuado tratamiento dietético. Paralelamente, hemos pretendido esclarecer algunos puntos sobre los mecanismos fisiopatológicos que condicionan la aparición de dichas anomalías. Por último, hemos investigado la aplicación de una novedosa estrategia terapéutica basada en la administración de tetrahidrobiopterina, el cofactor de la enzima fenilalanina hidroxilasa, deficitaria en esta enfermedad.

Partiendo de los escasos trabajos sobre el temblor en la fenilcetonuria, realizamos un análisis sistemático del temblor en nuestra población de enfermos fenilcetonúricos. Establecimos la prevalencia de dicho temblor, sus características clínicas y neurofisiológicas, así como la amplitud o severidad del temblor por medio de escalas clínicas de gradación reconocidas internacionalmente. Por último, realizamos un análisis de los posibles factores clínicos o bioquímicos que pudieran estar relacionados con la aparición del temblor en estos enfermos.

Nos centramos de forma preferente en el estudio del déficit de coenzima Q10 y su posible asociación con el temblor. La deficiencia de coenzima Q10 es una alteración metabólica secundaria de origen multifactorial en la PKU, que puede condicionar un aumento del estrés oxidativo en estos enfermos. Dado que el estrés oxidativo es un mecanismo potencialmente lesivo para el sistema nervioso central, hemos intentado analizar su implicación en el temblor de la PKU, un síntoma que puede definirse como un marcador de daño cerebral y que se puede cuantificar de forma objetiva.

A continuación, nuestro objetivo fue realizar un análisis volumétrico cerebral mediante resonancia magnética con la finalidad de detectar anomalías anatómicas que pudieran justificar la aparición de signos de disfunción neurológica en un grupo reducido de esta población de enfermos PKU. Mediante una técnica morfométrica de análisis vóxel a vóxel de todo el cerebro, describimos alteraciones volumétricas regionales en los enfermos PKU que afectaban a diversas estructuras cerebrales tanto de la sustancia blanca como

sustancia gris. Estudiamos también las alteraciones globales en el volumen de estos dos tejidos. Pretendimos finalmente investigar la relación que dichos hallazgos pudieran guardar con las anomalías neurológicas y bioquímicas presentes en estos enfermos.

Dado que las alteraciones neurológicas detectadas en los pacientes PKU parecen estar relacionadas con un inadecuado cumplimiento de la dieta y con deficiencias de sustratos antioxidantes relacionadas con un insuficiente aporte exógeno, sería muy interesante encontrar otras alternativas terapéuticas que garantizaran un buen control metabólico desde el nacimiento y que evitaran la aparición de estas alteraciones neurológicas. Por este motivo, investigamos la respuesta a la prueba de sobrecarga con BH4 siguiendo el protocolo recomendado por Blau et al (2004) y establecimos unos criterios de respuesta. De este modo pudimos realizar una selección de pacientes candidatos al tratamiento con tetrahidrobiopterina.

Iniciamos el tratamiento de forma protocolizada en un grupo seleccionado de enfermos con excelente respuesta al cofactor. Progresivamente los controles clínicos y metabólicos obligaron a individualizar las dosis según las características particulares de cada enfermo. Realizamos una evaluación nutricional y cognitiva con el fin de monitorizar de forma global los beneficios y posibles efectos indeseados de este tratamiento a largo plazo. Consideramos una buena respuesta al tratamiento cuando las dosis recomendadas de BH4 permitieron incrementar la tolerancia a la Phe y eliminar por completo la fórmula especial. De esta forma los pacientes sustituyeron la dieta restrictiva en Phe por una dieta libre asociada a un tratamiento con BH4.

En esta tesis doctoral se ha realizado un análisis exhaustivo de las alteraciones neurológicas en la PKU, mediante técnicas neurofisiológicas y de neuroimagen. Asimismo, se han investigado posibles alteraciones metabólicas inherentes al defecto metabólico primario y también alteraciones metabólicas secundarias que pudieran estar relacionadas con la aparición de estas anomalías neurológicas. De este modo hemos pretendido avanzar en la comprensión de los mecanismos que condicionan la aparición de dichas anomalías neurológicas. Asimismo, se ha consolidado una nueva línea de tratamiento con BH4 que ha demostrado ser segura y eficaz en el control metabólico y en el desarrollo neurológico de los enfermos.

Hipótesis de trabajo

La hipótesis de esta tesis doctoral postula que las manifestaciones neurológicas presentes en pacientes fenilcetonúricos que siguen un adecuado tratamiento dietético podrían estar condicionadas por un daño estructural a nivel del sistema nervioso central. Estas anomalías neurológicas podrían ser debidas al defecto metabólico primario de la fenilcetonuria, o bien a alteraciones metabólicas secundarias relacionadas con el tratamiento dietético, como el aumento del estrés oxidativo y el déficit de CoQ10. El tratamiento con BH4 supondría una alternativa terapéutica a la dieta restrictiva en Phe que, aparte de mejorar la calidad de vida de estos enfermos, podría garantizar un adecuado control metabólico y así prevenir la aparición de estas alteraciones neurológicas.

Objetivos

Objetivos principales

1. Caracterizar las anomalías neurológicas y los mecanismos fisiopatológicos que condicionan su aparición en pacientes fenilcetonúricos que siguen un adecuado tratamiento dietético
2. Evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con tetrahidrobiopterina como terapia alternativa a la dieta restrictiva en Phe

Objetivos concretos

1. Establecer las características clínicas y neurofisiológicas del temblor y correlacionar los hallazgos obtenidos con otras variables clínicas y bioquímicas relacionadas con el control metabólico.
2. Investigar la posible relación entre el déficit de coenzima Q10 y la presencia de temblor en pacientes fenilcetonúricos.
3. Analizar posibles cambios en el volumen global y regional del parénquima cerebral de pacientes fenilcetonúricos
4. Investigar la respuesta a la prueba de sobrecarga combinada con Phe/BH4 en los pacientes en tratamiento dietético, con la finalidad de ofrecer esta alternativa terapéutica a los pacientes con buena respuesta.
5. Evaluar desde el punto de vista clínico, nutricional y cognitivo los efectos del tratamiento prolongado con BH4 en monoterapia.

Material y métodos

1. Sujetos del estudio
2. Material y métodos del estudio neurofisiológico del temblor
 - 1.1. Examen neurológico
 - 1.2. Examen neurofisiológico
3. Material y métodos del estudio volumétrico mediante RM
 - 1.3. Adquisición y procesamiento de IRM
4. Material y métodos de laboratorio
 - 1.4. Determinación de fenilalanina
 - 1.5. Determinación de coenzima Q10
 - 1.6. Determinación de pterinas
 - 1.7. Prueba de sobrecarga combinada con Phe/Bh4
5. Tratamiento con BH4
 - 1.8. Protocolo de tratamiento con BH4
 - 1.9. Examen antropométrico y nutricional
 - 1.10. Evaluación de la tolerancia a la Phe
 - 1.11. Control bioquímico nutricional
6. Evaluación neuropsicológica
7. Análisis estadístico

1. Sujetos del estudio

1.1. Pacientes

En el conjunto de trabajos que se incluyen en esta tesis, han participado un total de 64 pacientes fenilcetonúricos monitorizados periódicamente en nuestro hospital (Centro de Referencia para la PKU en Cataluña).

1.2. Controles

En el trabajo nº3 titulado “Cambios volumétricos globales y regionales en el cerebro de pacientes fenilcetonúricos” han participado un total de 27 sujetos control del mismo área sociodemográfica y apareados por edad y sexo con los pacientes PKU.

Las características de los pacientes que participaron en cada parte del estudio, así como los criterios de inclusión y exclusión, se describen con más detalle en cada uno de los trabajos publicados.

El número de pacientes de cada uno de los diferentes trabajos que forman parte del estudio y los períodos en los que se realizaron los trabajos se detallan a continuación:

1^{er} trabajo: “Characterization of tremor in phenylketonuric patients”.

Incluye 54 pacientes fenilcetonúricos. El estudio se llevó a cabo entre Abril y noviembre de 2003.

2^o trabajo: “Tremor in phenylketonuria is associated with decreased plasma coenzyme Q10 concentrations”

Incluye 41 pacientes fenilcetonúricos. El estudio se llevó a cabo entre Enero y Julio de 2005.

3^{er} trabajo: “Global and regional volume changes in the brain of phenylketonuric patients”.

Incluye 27 pacientes fenilcetonúricos y 27 controles sanos. El estudio se llevó a cabo entre Enero y Julio de 2004.

4º trabajo: *“Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria”*. Incluye 64 pacientes fenilcetonúricos. El estudio se llevó a cabo entre Abril y noviembre de 2003.

5º trabajo: *“Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy”*.

Incluye 14 pacientes fenilcetonuricos. El estudio se llevó a cabo entre Febrero de 2004 y Febrero de 2005.

Aspectos éticos:

Todos los pacientes o sus tutores firmaron un consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en Edimburgo en el año 2000.

El comité Ético y de Investigación del Hospital Sant Joan de Déu aprobó los diferentes estudios.

2. Material y métodos del estudio neurofisiológico del temblor

2.1. Examen neurológico

Se realizó un examen neurológico a todos los pacientes el mismo día y previamente al estudio neurofisiológico. La severidad del temblor se cuantificó mediante la aplicación de la escala de temblor denominada Washington Heights-Inwood Genetic Study of Essential Tremor (WHIGET). Un video de aprendizaje para la aplicación de la escala (Louis et al, 2001) fue utilizada por el examinador. El examen consistió en la evaluación del temblor de reposo (el paciente sentado en una silla en posición de reposo), temblor postural (el paciente sentado en una silla con las extremidades superiores en extensión) y temblor de acción (cinco tests: verter agua entre dos vasos, beber agua de un vaso, utilizar una cuchara para beber agua, realizar el movimiento dedo-nariz y dibujar una espiral de Arquímedes). Las puntuaciones fueron las siguientes: 0 (temblor no visible), 1 (temblor de baja amplitud apenas perceptible o intermitente), 2 (temblor que cumple tres criterios: amplitud moderada, presencia constante y claramente oscilatorio), y 3 (gran amplitud, temblor espasmódico que resulta en derramar agua, dificultando la realización del test) (Louis et al, 1997; Louis et al, 2001).

2.2. Examen neurofisiológico

Se aplicó un acelerómetro sobre el dorso de la mano en el 2º o 3º espacio interóseos para grabar las oscilaciones del temblor. En 6 pacientes el temblor fue asimismo registrado mediante electrodos bipolares de superficie para electromiografía en músculos flexores y extensores del carpo. Los pacientes fueron grabados en reposo, manteniendo una postura (sentados en una silla con los brazos extendidos) y tras añadir una masa de 500 gr. distal a la localización del acelerómetro. Las grabaciones se repitieron en la mano dominante y no dominante. Cada grabación tuvo una duración de 20 segundos. La señal grabada fue transferida al Sistema Biopac (MP100WSW, Bionic) y digitalizada utilizando un filtro de señal a 50 Hz.

La frecuencia del temblor fue calculada como la frecuencia correspondiente al pico más grande obtenido a partir del análisis espectral de la transformada de Fourier. Asimismo, utilizamos los resultados de la transformada de Fourier para determinar la potencia relativa del análisis espectral en un espacio de 1.6 Hz centrado en el pico de frecuencia más grande, expresado como el porcentaje de la potencia del análisis espectral en una banda incluida entre los 2 y 20 Hz (Raethjen et al, 2004).

3. Material y métodos del estudio volumétrico mediante RM

3.1. Adquisición y procesamiento de IRM

Todos los estudios de imagen fueron adquiridos en un imán de 1.5-T (Signa; GE Medical Systems, Milwaukee, Wis). Se adquirieron 60 cortes en el plano sagital con una secuencia tridimensional (SPGR). Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: tiempo de repetición, 40 milisegundos; tiempo de eco, 4 milisegundos; ángulo del pulso, 30º; campo de visión, 26 cm; y tamaño de la matriz, 256 ×192 pixels. El grosor de la cada corte fue de 2.5 mm. El tiempo de adquisición fue de 8 minutos y 13 segundos. Estos parámetros producen voxels anisotrópicos con una resolución espacial moderada (dimensión del vóxel de 1.0×1.3×2.5 mm) y una relación señal-ruido óptima, permitiendo una segmentación del tejido cerebral fidedigna (Pujol J et al 2004).

Los datos de la imagen se procesaron en un ordenador con plataforma Microsoft Windows con los software MATLAB 6.5 (The MathWorks Inc, Natick, Mass) y SPM2 (The Wellcome

Department of Imaging Neuroscience, London, England).

Previamente al análisis, las imágenes fueron revisadas para descartar la presencia de artefactos. Dos pacientes fueron excluidos del estudio por este motivo. De forma esquemática, el preprocesamiento de las imágenes se realizó mediante varios procedimientos automáticos destinados a (1) crear las plantillas específicas del estudio para los diferentes tipos de tejido cerebral, utilizando las imágenes de todos los sujetos participantes; (2) segmentar las imágenes en sustancia gris, blanca y líquido cefalorraquídeo; (3) normalizar espacialmente (al espacio estereotáctico del Instituto Neurológico de Montreal) y de manera óptima para cada tipo de tejido las imágenes segmentadas, usando las plantillas previamente creadas; (4) modular los valores de los vóxeles a partir de los parámetros de normalización espacial para restaurar la información volumétrica perdida en la transformación espacial; y (5) promediar los valores de los vóxeles con sus vecinos en un radio tridimensional de 12mm de acuerdo a la altura en el punto medio de una función gaussiana (*smoothing*). Cada paso de este procesamiento ha sido descrito en detalle previamente (Pujol et al, 2004).

4. Material y métodos de laboratorio

4.1. Determinación de fenilalanina

La extracción de muestras sanguíneas para la determinación de fenilalanina se realizó tras una noche de ayuno. La sangre recogida sobre EDTA fue centrifugada, y el sobrenadante se preparó para la determinación de aminoácidos. La Phe y Tyr plasmáticas se analizaron mediante cromatografía de intercambio iónico (Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) con detección espectrométrica de los derivados de ninhidrina.

Se establecieron diferentes Índices de Control Dietético (ICD), que se calcularon a partir de la media de todas las medianas de Phe semestrales a lo largo de 4 periodos de la vida: los 6 primeros años de vida (ICD_A), de los 6 a 12 años (ICD_B), de los 12 a 18 años (ICD_C) y de los 18 años hasta el momento actual (ICD_D).

4.2. Determinación de coenzima Q10

Las concentraciones plasmáticas de coenzima Q10 fueron determinadas mediante un procedimiento de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica (Perkin Elmer, Serie 200, Norwalk, CT, USA), según un procedimiento previamente descrito (Artuch et al, 2001).

4.3. Determinación de pterinas

Las concentraciones de biopterina y neopterina en orina se determinaron mediante HPLC con detección de fluorescencia (Perkin Elmer, Serie 200, Norwalk, CT, USA) (Ferré et al, 1988).

4.4. Prueba de sobrecarga combinada con Phe/BH4

La prueba de sobrecarga combinada se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por Blau et al (2004) para pacientes PKU en tratamiento dietético. En breve, tras un mínimo de 3 horas de ayuno, se administraron 100 mg/kg de Phe vía oral (Roig Farma, SA, Terrasa). Tres horas después se administró una dosis única de 20mg/kg de BH4 vía oral (Schircks Laboratories, Jona, Switzerland). Las muestras de sangre para el análisis de aminoácidos se extrajeron inmediatamente antes de la sobrecarga de Phe y a las 0, 3, 7, 11 y 21 horas tras la sobrecarga de BH4. Se recogieron dos muestras de orina para el análisis de pterinas, correspondientes a las 12 horas previas a la sobrecarga de Phe y durante las 4 a 8 horas siguientes a la sobrecarga de BH4. Las muestras de orina se guardaron congeladas y preservadas de la luz. Se mantuvo una dieta restrictiva en Phe durante la prueba de sobrecarga. La respuesta a la BH4 se definió como una disminución en Phe plasmática superior al 30% del valor previo a la administración de BH4, tras un período de 21 horas tras la sobrecarga de BH4.

5. Tratamiento con BH4

5.1. Protocolo de tratamiento con BH4

La BH4 se obtuvo en cápsulas de 50 mg (Schircks, Jona, Switzerland). Se administró una dosis inicial de 5mg/kg/día a los pacientes seleccionados. Dado que la vida media de

eliminación tras la administración oral de BH4 es alrededor de 8 horas, el tratamiento con BH4 se administró repartido en 3 tomas diarias. La dieta restrictiva en Phe fue progresivamente liberalizada añadiendo 200 mg de Phe al día cada semana a lo largo de 2 meses, mientras la fórmula fue reduciéndose gradualmente hasta su completa retirada. La BH4 se suspendió en aquellos pacientes cuya tolerancia no se consiguió incrementar en más de 400 mg de Phe al día y no pudo ser retirada la fórmula especial. Los pacientes fueron evaluados clínica y nutricionalmente cada mes a lo largo del tratamiento.

5.2. Examen antropométrico y nutricional

Se realizó una evaluación antropométrica a partir del peso (kg) y la talla (cm). La evaluación del estado nutricional se realizó mediante la medición del área braquial muscular y adiposa. El área braquial se calculó midiendo la circunferencia del brazo. El área braquial muscular (mm^2) se midió como el cociente del grosor del pliegue cutáneo a nivel del tríceps y la circunferencia del brazo. El área braquial adiposa (mm^2) se calculó a partir de la diferencia entre el área braquial y el área braquial muscular. Los valores obtenidos de estas mediciones se compararon con los percentiles específicos según la edad y el sexo para una población sana previamente establecidos (Frisancho et al, 1981).

5.3. Evaluación de la tolerancia a la Phe

La tolerancia a la Phe fue definida como la máxima ingesta de Phe que permitiera mantener las concentraciones de Phe en el rango recomendable (120-360 $\mu\text{mol/L}$). Se utilizó un cuestionario dietético de tres días para calcular la ingesta de Phe con el Programa DietSource 2.0 Sanutrin (Novartis Consumer Health).

5.4. Control bioquímico nutricional

La albúmina sérica y la ferritina se analizaron según los procedimientos automatizados con el Analizador Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics). Las vitaminas A y E en suero se determinaron mediante HPLC con detección ultravioleta, y las vitaminas B (folato y B12) mediante un procedimiento de quimioluminiscencia automatizado (Centaur, Bayer). Los oligoelementos en suero (Selenio y zinc) se midieron por espectrometría de absorción atómica. La ingesta diaria de vitaminas y oligoelementos se calculó con el Programa

DietSource 2.0 Sanutrin (Novartis Consumer Health).

6. Evaluación neuropsicológica

Los cocientes de desarrollo en pacientes menores de 3 años se calcularon mediante el test de Brunet-Lezine. La capacidad intelectual general fue evaluada mediante los test de inteligencia siguientes: Kaufman Assessment Battery (K-ABC) (pacientes de 3 a 6.5 años), Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R) (pacientes de 6.5 años a 16.5 años) y el Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) para el resto de pacientes. Los resultados se expresaron como T score: media 100; DE 85-115.

7. Análisis estadístico

Todas las variables clínicas, neurofisiológicas, neuroradiológicas y bioquímicas han sido recogidas en una base de datos (Microsoft Excel).

Los estudios estadísticos se han realizado con el programa estadístico SPSS (versión 11.0), aplicando básicamente las siguientes pruebas:

- 1 Para el estudio de distribución de datos: prueba de Kolmogorov-Smirnov
- 2 Para la comparación de variables cualitativas: prueba de Chi-cuadrado
- 3 Para la comparación de variables cuantitativas:
 - Variables paramétricas:
 - Prueba T de Student para comparación de medias
 - ANOVA para el análisis de varianzas, con corrección de Bonferroni en comparaciones múltiples
 - MANOVA para el análisis multivariante de varianzas
 - Variables no paramétricas:
 - Prueba de Wilcoxon para datos apareados
 - Prueba U de Mann-Whitney para datos no apareados
- 4 Pruebas de correlación simple:
 - Variables paramétricas:
 - Prueba de Pearson
 - Variables no paramétricas:
 - Prueba de Spearman

5 Mapas estadísticos paramétricos (MEP, SPM en inglés)

- Los MEP se realizaron con el programa SPM2. Se analizaron las diferencias regionales de volumen a lo largo de todo el cerebro voxel a voxel. Las comparaciones entre los grupos se realizaron de forma separada para sustancia blanca y sustancia gris. Se analizaron tanto los valores que expresaban valores absolutos para cada voxel, como los valores normalizados a los valores globales de cada tejido. Para ello, se usó un método de escalamiento proporcional del valor de voxel a una media global de 100. Las comparaciones entre grupos generaron dos MEP para el estadístico t (SPM $\{t\}$), que correspondían a dos contrastes opuestos: incremento y decremento de volumen en los pacientes con PKU. Estos mapas se realizaron con un umbral de significación para cada voxel de $p < 0.001$. No obstante, las diferencias regionales se consideraron significativas cuando $p < 0.05$ tras aplicar la corrección para comparaciones múltiples.

Las diferentes pruebas estadísticas aplicadas se detallan en cada parte del trabajo.

La significación estadística fue aceptada cuando $P < 0.05$.

Investigación y resultados

- Los resultados del estudio que hacen referencia al objetivo (1) se presentan en el trabajo:

“Characterization of tremor in phenylketonuric patients”. Caracterización del temblor en pacientes fenilcetonúricos. J Neurol 2005; 252: 1328-34.

- Los resultados del estudio que hacen referencia al objetivo (2) se presentan en el trabajo:

“Tremor in phenylketonuria is associated with decreased plasma coenzyme Q10 concentrations”

El temblor en la fenilcetonuria está asociado a un descenso en las concentraciones plasmáticas de Coenzima Q10. J Neurol 2005; pendiente de aceptación.

- Los resultados del estudio que hacen referencia al objetivo (3) se presentan en el trabajo:

Global and regional volume changes in the brain of phenylketonuric patients. Cambios volumétricos globales y regionales en el cerebro de pacientes fenilcetonúricos. Neurology 2005; en prensa.

- Los resultados del estudio que hacen referencia al objetivo (4) se presentan en el trabajo:

Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. Respuesta a la tetrahidrobiopterina en pacientes con fenilcetonuria. Clin Biochem 2004; 37: 1083-1090.

- Los resultados del estudio que hacen referencia al objetivo (5) se presentan en el trabajo:

Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuric patients on tetrahydrobiopterin monotherapy. Evaluación clínica y nutricional de pacientes fenilcetonúricos en monoterapia con tetrahidrobiopterina. Mol Genet Metab 2005; 86: S54-S60.

“CHARACTERIZATION OF TREMOR IN PHENYLKETONURIC PATIENTS”

Caracterización del temblor en pacientes fenilcetonúricos.

J Neurol 2005; 252: 1328-34.

Belén Pérez Dueñas, Josep Valls-Solé, Emilio Fernández-Álvarez, Joan Conill, Maria Antonia Vilaseca, Rafael Artuch, Jaume Campistol.

En este trabajo se ha realizado un estudio sistemático del temblor en una amplia población de pacientes fenilcetonúricos en tratamiento dietético. Los trabajos publicados hasta el momento sobre el temblor en la fenilcetonuria son escasos y están basados en un pequeño número de enfermos. Por tanto, no existen datos sobre los factores causales del temblor en estos enfermos, y se desconocen sus bases fisiopatológicas. Nuestros objetivos han sido establecer la prevalencia, características clínicas y neurofisiológicas del temblor. Asimismo, hemos investigado otros datos clínicos o bioquímicos relacionados con el control metabólico que pudieran estar asociados con la presencia del temblor en estos pacientes. En este trabajo se ha evaluado por primera vez la severidad del temblor mediante una escala de gradación clínica y se han establecido las características neurofisiológicas del temblor. Con todo ello hemos esclarecido algunos puntos sobre las bases fisiopatológicas del temblor en la fenilcetonuria.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Síntesis de resultados

- Se detectó la presencia de un temblor postural y de acción en 15 pacientes, y un temblor exclusivo de acción en 7 pacientes más. Por tanto la prevalencia del temblor estimada mediante la observación clínica fue del 40.7% en nuestra serie.
- 13 de 18 pacientes fenilcetonúricos de diagnóstico tardío presentaban signos de disfunción neurológica, incluyendo la presencia de movimientos oscilatorios rítmicos durante la postura o acción compatibles con temblor en 11 casos. En muchos de ellos, la amplitud aumentaba considerablemente durante la acción, interfiriendo en las tareas cotidianas.
- 11 de 36 pacientes de diagnóstico precoz presentaron temblor de acción o postural de baja amplitud que raramente representaba un motivo de queja por parte de los pacientes o sus familiares.
- Tras la aplicación de la escala de WHIGET, todos los pacientes de diagnóstico precoz con temblor obtuvieron puntuaciones iguales a 1, es decir, un temblor de baja amplitud e intermitente. Los pacientes de diagnóstico tardío obtuvieron puntuaciones significativamente superiores en las pruebas de temblor postural y de acción (verter agua entre dos vasos, beber agua con una cuchara, movimiento dedo-nariz y espiral de Arquímedes).
- El registro neurofisiológico demostró en todos los casos un temblor postural de elevada frecuencia (media 10.5 Hz; rango 7-12.7 Hz) y muy regular (la potencia relativa del pico de mayor frecuencia fue del 15% al 30% respecto a la potencia absoluta de todo el espectro de frecuencias).
- La frecuencia del temblor no se vio modificada al añadir un peso a la extremidad, lo cual indicó que el temblor no dependía de mecanismos periféricos, y apoyaba la hipótesis de que el generador del temblor en la fenilcetonuria estaba localizado a nivel del sistema nervioso central.
- El registro electromiográfico mostró una actividad en salvas alternante correspondiente a los músculos flexores y extensores del carpo muy sugestiva de temblor. No se observó actividad muscular sugestiva de distonía o mioclonias en ningún caso.
- Tras comparar otras variables clínicas y bioquímicas entre pacientes con y sin temblor, se observó que los pacientes con temblor eran más mayores que los

pacientes sin temblor ($p = 0.007$) y tenían valores de Phe superiores durante los primeros 6 años de vida ($p = 0.003$). No obstante, al estratificar los pacientes en función del diagnóstico precoz o tardío, estas diferencias dejaron de ser significativas, lo cual confirmaba que las diferencias observadas inicialmente estaban sesgadas por la edad al diagnóstico de la enfermedad.

- Las cifras de coeficiente intelectual y los valores recientes de Phe no mostraron diferencias entre pacientes con y sin temblor. En cambio, los pacientes con temblor presentaban una edad más tardía al diagnóstico ($p < 0.0001$), reforzando la hipótesis en tantas ocasiones comprobada de que la edad al diagnóstico de la enfermedad es el factor pronóstico más importante en la evolución neurológica de estos enfermos.

“TREMOR IN PHENYLKETONURIA IS ASSOCIATED WITH DECREASED PLASMA COENZYME Q10 CONCENTRATIONS”

El temblor en la fenilcetonuria está asociado a un descenso en las concentraciones plasmáticas de Coenzima Q10.

J Neurol 2005; pendiente de aceptación

Belén Pérez Dueñas, Raquel Montero, Rafael Artuch, Josep Valls-Solé, Maria Antonia Vilaseca, Jaume Campistol.

Las causas del temblor en la fenilcetonuria son desconocidas; de hecho, no se ha podido establecer una asociación entre el temblor y las variables bioquímicas relacionadas con el control metabólico. Sin embargo, los pacientes PKU presentan anomalías metabólicas secundarias, como el déficit de CoQ10, el cual se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo en estos enfermos. Aunque la implicación clínica del déficit secundario de CoQ10 en la PKU no ha sido investigada hasta el momento, es conocido que el déficit primario de CoQ10 puede provocar encefalopatías muy severas y un cuadro de disfunción cerebelosa. Por tanto, existe la posibilidad de que el déficit de CoQ10 pudiera jugar un papel en la fisiopatología del temblor en pacientes PKU. A partir de esta hipótesis, el objetivo del presente trabajo ha sido investigar la posible asociación entre las concentraciones plasmáticas de coenzima Q10 y el temblor en una serie de enfermos PKU con buen control metabólico.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Síntesis de resultados

- 10 de 41 pacientes presentaban temblor postural y de acción. Tras la aplicación de la Escala WHIGET de gradación del temblor, 4 pacientes obtuvieron puntuaciones de 2 en los test posturales y de acción, mientras que los otros 6 pacientes obtuvieron puntuaciones de 1. El registro mediante acelerómetro mostró un rango de frecuencia del temblor entre 7 y 12 Hz. Los 31 pacientes restantes no presentaban temblor a la inspección ni movimientos oscilatorios rítmicos sugestivos de temblor durante el registro neurofisiológico.
- Los pacientes con temblor presentaban concentraciones de CoQ10 inferiores a los pacientes PKU sin temblor ($p = 0.029$). La mediana de los valores de CoQ10 plasmática correspondientes a los tres años previos al estudio también era inferior en el grupo con temblor respecto al grupo sin temblor ($p = 0.012$). Asimismo, todos los pacientes con temblor presentaban concentraciones de CoQ10 inferiores al límite inferior de los valores de referencia, mientras que esta condición solo se observó en 16 de 31 pacientes sin temblor ($p = 0.006$). Aunque las concentraciones plasmáticas de CoQ10 pueden no reflejar la distribución tisular de este coenzima, estos resultados sugieren que el déficit de CoQ10 podría estar implicado en el origen del temblor en la PKU, quizás induciendo un daño oxidativo en los circuitos involucrados en el origen del temblor en estos pacientes. El estudio de otros marcadores de estrés oxidativo no demostró ninguna asociación con la presencia del temblor en esta serie.
- Los pacientes con temblor presentaban con mayor frecuencia una edad de diagnóstico tardía comparada con los pacientes sin temblor ($p = 0.006$). Por tanto, es muy probable que el temblor en la PKU tenga un origen multifactorial. El aumento del estrés oxidativo condicionado por el déficit de CoQ10 podría ser un mecanismo lesivo en la fenilcetonuria. Sin embargo, la exposición a elevadas concentraciones de Phe durante los primeros años de desarrollo neurológico debida a un diagnóstico tardío de la enfermedad, continúa siendo un factor importante en la aparición del temblor en estos pacientes.

“GLOBAL AND REGIONAL VOLUME CHANGES IN THE BRAIN OF PHENYLKETONURIC PATIENTS”

Cambios volumétricos globales y regionales en el cerebro de pacientes fenilcetonúricos.

Neurology 2005; in press.

Belén Pérez Dueñas, Jesús Pujol, Carles Soriano-Mas, Héctor Ortiz, Rafael Artuch, Maria Antonia Vilaseca, Jaume Campistol.

Pese a que la fenilcetonuria es una enfermedad tratable, los pacientes fenilcetonúricos que inician una dieta restrictiva en fenilalanina de forma tardía o que presentan un mal cumplimiento de ésta con frecuentes descompensaciones metabólicas, podrían presentar daño cerebral irreversible. Este daño cerebral podría expresarse en forma de alteraciones estructurales a nivel de la sustancia blanca u otras regiones vulnerables del sistema nervioso central. Dichas anomalías podrían justificar la aparición de signos clínicos de disfunción neurológica en estos pacientes. El primer objetivo de este trabajo ha sido analizar posibles cambios en el volumen del parénquima cerebral de pacientes fenilcetonúricos mediante resonancia magnética tridimensional y un método de análisis vóxel a vóxel que permite la medición de pequeñas variaciones en el tamaño de los diferentes elementos anatómicos cerebrales. Nuestro segundo objetivo ha sido correlacionar los hallazgos obtenidos con los datos clínicos y bioquímicos referentes al control metabólico.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Síntesis de resultados

1. Las mediciones del volúmen cerebral global (obtenido de las imágenes de resonancia antes de la normalización) obtuvieron los siguientes resultados:
 - 1.1. El grupo de pacientes fenilcetonúricos presentó una reducción significativa del volumen del parénquima cerebral respecto al grupo control. Estas diferencias eran debidas fundamentalmente a una reducción del volumen de la sustancia gris, mientras que no se observaron diferencias significativas a nivel de la sustancia blanca.
 - 1.2. Investigamos si estas diferencias en el volumen de sustancia gris estaban presentes de forma independiente en el grupo de pacientes de diagnóstico precoz y tardío. Observamos diferencias entre los pacientes de diagnóstico tardío y sus controles apareados, mientras que las diferencias entre pacientes de diagnóstico precoz y sus correspondientes controles solo mostraron una tendencia a la significación.
2. El análisis vóxel a vóxel de los volúmenes regionales de sustancia gris y sustancia blanca mostró los siguientes hallazgos:
 - 2.1. Se detectó una reducción absoluta del volumen de sustancia gris a nivel del córtex motor bilateral, con extensión al área motora suplementaria y córtex premotor y tálamo izquierdos. También se observó un aumento relativo (con los datos normalizados al volumen global de sustancia gris) del volumen del estriado ventral del hemisferio izquierdo, incluyendo el núcleo accumbens.
 - 2.2. A nivel de la sustancia blanca, sólo se observaron diferencias tras normalizar los datos a los volúmenes globales de sustancia blanca. Los pacientes fenilcetonúricos mostraron una reducción relativa en la sustancia blanca periventricular, incluyendo el fórceps anterior derecho del cuerpo caloso. También se apreció una tendencia a la disminución del volumen de forma bilateral en los fórceps posteriores. Estas regiones han demostrado ser especialmente vulnerables al efecto tóxico de la Phe, pues en ellas es frecuente observar cambios de señal en secuencias T2 y FLAIR en pacientes descompensados. Nuestros resultados indican que el efecto tóxico de la Phe sobre la sustancia blanca periventricular puede condicionar una pérdida irreparable de tejido en las zonas más vulnerables.
Por otro lado, observamos un aumento relativo de sustancia blanca en la región

del brazo posterior de la cápsula interna, con extensión hacia el tálamo y estriado. El aumento relativo de volumen de sustancia blanca en los núcleos subcorticales tiene una relación inversa con la pérdida de sustancia gris observada en estas estructuras.

3. El estudio de correlaciones con los datos clínicos y bioquímicos mostró los siguientes resultados:
 - 3.1. En los pacientes PKU, el volumen de sustancia gris mostró una relación lineal con las cifras de CI ($p = 0.039$) e inversa con la edad al diagnóstico ($p = 0.036$). Estos resultados indican que elevadas concentraciones de fenilalanina durante los primeros años de desarrollo neurológico interfieren en el crecimiento cerebral y provocan una reducción global del volumen de sustancia gris. La detención del desarrollo cerebral tiene como consecuencia una disminución del CI.
 - 3.2. Con respecto a los volúmenes de sustancia blanca, en el grupo de pacientes de diagnóstico precoz se observaron correlaciones significativas entre sustancia blanca y los valores puntuales de Phe ($p = 0.014$), y entre sustancia blanca y valores medios de Phe correspondientes a los 12 meses previos al estudio ($p = 0.003$). Estos resultados indican que las elevaciones recientes de Phe producen de forma aguda un aumento difuso del volumen de la sustancia blanca cerebral. Este aumento de volumen podría ser debido a cambios estructurales en las vainas de mielina o bien a una alteración de los procesos osmóticos.
 - 3.3. Se llevaron a cabo análisis de correlaciones vóxel a vóxel entre la anatomía cerebral y la edad al diagnóstico de PKU, el CI, la presencia de temblor y los Índices de Control Dietético. En ningún caso estas variables fueron predictivas de forma significativa de los cambios anatómicos regionales detectados en los cerebros PKU.

“TETRAHYDROBIOPTERIN RESPONSIVENESS IN PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA”

Respuesta a la tetrahidrobiopterina en pacientes con fenilcetonuria.

Clin Biochem 2004; 37: 1083-1090.

Belén Pérez Dueñas, Maria Antonia Vilaseca, Anna Mas, Nilo Lambruschini, Rafael Artuch, Lilian Gómez, Julia Pineda, Alejandra Gutiérrez, Montse Mila, Jaume Campistol

El test de sobrecarga con BH4 se utilizaba tradicionalmente para el diagnóstico diferencial de las hiperfenilalaninemias. Los pacientes con defectos enzimáticos en el metabolismo de la BH4 presentaban una buena respuesta a la administración del cofactor, mientras que los pacientes fenilcetonúricos presentaban una respuesta pobre al test de sobrecarga. No obstante, en 1999, Kure y cols describieron cuatro pacientes con buena respuesta a la BH4 y mutaciones conocidas en el gen PAH, a los que siguieron la identificación de un gran número de pacientes respondedores. Estos resultados fueron atribuidos a la utilización de dosis superiores de BH4 y de mayor pureza. Estos hallazgos han supuesto el descubrimiento de una nueva estrategia terapéutica con BH4, que permite prescindir de la fórmula especial y liberalizar la dieta en Phe. Se han descrito muchas mutaciones en el gen de la PAH asociadas con una buena respuesta a la BH4. Sin embargo, la gran heterogeneidad genotípica de los pacientes PKU hace imposible predecir la respuesta al cofactor. El objetivo de este trabajo es investigar la respuesta al test de sobrecarga con BH4 de forma sistemática en los enfermos fenilcetonúricos en tratamiento dietético, con la finalidad de ofrecer esta alternativa terapéutica a los pacientes con buena respuesta.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Síntesis de resultados

- 28 de 64 pacientes PKU presentaron una disminución de Phe superior al 30% tras 21 horas de sobrecarga con BH4. La respuesta fue diferente en función del fenotipo metabólico, respondiendo el 100% de pacientes con PKU suave, el 75% de pacientes con PKU moderada y el 21% de pacientes con PKU clásica ($p < 0.0001$).
- Se observó una correlación negativa entre los valores de Phe al diagnóstico y el porcentaje de respuesta a la BH4 ($p < 0.001$). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de Phe solo disminuyeron hasta valores considerados seguros en el grupo de pacientes con el fenotipo leve, siendo superiores a los valores recomendados en los pacientes con fenotipo moderado y clásico ($p < 0.0001$).
- Los resultados descritos en el apartado 1 y 2 indican que aquellos pacientes con un fenotipo metabólico más leve tienen una mejor respuesta a la prueba de sobrecarga con BH4. Estos hallazgos indican que es necesario un cierto grado de actividad residual del enzima PAH para que la respuesta a la sobrecarga con BH4 sea favorable.
- Se identificó un grupo de 12 pacientes respondedores lentos a la sobrecarga con BH4 (descenso de los valores de Phe $> 30\%$ a las 21 horas de la sobrecarga). Estos pacientes precisan una consideración especial a la hora de evaluar la respuesta a la BH4, puesto que la aplicación de pruebas de sobrecarga con BH4 de duración ≤ 11 horas los hubiera clasificado como no respondedores.
- La excreción de biopterina en orina fue significativamente inferior a los valores posteriores a la sobrecarga ($p < 0.0001$). No se observó, en cambio, ninguna correlación entre el porcentaje de descenso de Phe y los valores de biopterina tras la sobrecarga. Estos datos confirmaron que la respuesta a la BH4 dependía principalmente de la actividad residual del enzima PAH, y descartaban la posibilidad de que la absorción de BH4 pudiera jugar un papel importante en el grado de respuesta.
- 14 mutaciones en el gen de la PAH, en combinación con mutaciones nulas, se asociaron con una respuesta a la BH4. Diez de ellas ya han sido descritas como respondedoras a la BH4 con anterioridad: L48S, I65T, E178G, R241H, R243Q, R261Q, V388M, E390G, Y414C, y D415N, mientras que cuatro mutaciones se han descrito por primera vez en este trabajo: P147S, D222G, P275S, y P362T.

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

“CLINICAL AND NUTRITIONAL EVALUATION OF PHENYLKETONURIC PATIENTS ON TETRAHYDROBIOPTERIN MONOTHERAPY”

Evaluación clínica y nutricional de pacientes fenilcetonúricos en monoterapia con tetrahidrobiopterina.

Mol Genet Metab 2005; 86: S54-S60.

Nilo Lambruschini, **Belén Pérez Dueñas**, Maria Antonia Vilaseca, Anna Mas, Rafael Artuch, Rosa Gassió, Lilian Gómez, Alejandra Gutiérrez, Jaume Campistol

Desde la descripción de Bickel en 1950, la base del tratamiento en la fenilcetonuria ha sido la restricción de Phe de la dieta, lo que a efectos prácticos significa una restricción de todos los alimentos ricos en proteínas, junto a una suplementación de aminoácidos sin Phe. Más recientemente, tras la descripción en 1999 por Kure y cols de un grupo de pacientes PKU que respondían a la BH₄, el tratamiento con este cofactor ha resultado en un control satisfactorio de los niveles de Phe en plasma en muchos pacientes PKU. No obstante, las dosis utilizadas, el manejo de la dieta y los objetivos del tratamiento con BH₄ han sido muy diferentes según los diversos trabajos publicados. Asimismo, a pesar de la creciente experiencia en el tratamiento con BH₄, existen muy pocos datos que hagan referencia a la evolución clínica y nutricional de estos pacientes. Al iniciar un tratamiento con BH₄ en los pacientes PKU, nos hemos planteado como objetivo principal conseguir un aumento en la tolerancia de Phe que permitiera retirar totalmente la fórmula especial. Por otro lado, nuestro segundo objetivo ha sido evaluar desde el punto de vista nutricional y neuropsicológico el beneficio y posibles inconvenientes del tratamiento con BH₄ a largo plazo.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Síntesis de resultados

- Se seleccionaron 14 pacientes PKU con una buena respuesta a la prueba de sobrecarga con BH4 (descenso de Phe entre el 45.7% y el 94% tras 21 horas de la sobrecarga) para iniciar tratamiento con dicho cofactor
- Se inició el tratamiento con BH4 a una dosis de 5mg/kg/día de BH4 en todos los pacientes, consiguiéndose en 11 de ellos un aumento significativo de la tolerancia a Phe (de 356 ± 172 mg/día hasta 1546 ± 192 mg/día con BH4; $p = 0.004$) y la retirada de la fórmula especial.
- En tres pacientes, el control metabólico fue considerado insuficiente pese a un incremento de hasta 10 mg/kg/día de BH4. Un paciente presentaba las mutaciones IVS10-11G>A/R243Q y dos hermanas las mutaciones V388M/P362T. Dado que no fue posible mejorar la tolerancia a la Phe ni retirar la fórmula especial, el tratamiento con BH4 fue retirado en estos 3 pacientes de acuerdo con sus familias.
- El tratamiento en monoterapia con BH4 consiguió mantener un adecuado control metabólico (valores medios de Phe < 360 $\mu\text{mol/L}$) en 10 pacientes con dosis de 5mg/kg/día, mientras que en una paciente los niveles de Phe recomendables solo se alcanzaron tras subir la dosis de BH4 hasta 7mg/kg/día.
- Los datos bioquímicos referentes a la evaluación del estado nutricional (oligoelementos y vitaminas) no mostraron diferencias significativas al comparar los valores previos al inicio del tratamiento y tras un año de seguimiento, excepto para el selenio, cuyos valores aumentaron ($p = 0.017$). Dado que el aporte de selenio en la dieta antes y después de la terapia con BH4 no mostró diferencias significativas, una posible explicación a estos hallazgos es que el selenio ingerido de la dieta presenta una mayor biodisponibilidad que el selenio ingerido a partir de la fórmula especial.
- Los valores antropométricos en los 11 pacientes en tratamiento con BH4 permanecieron en el mismo percentil en la mayoría de pacientes con una tendencia a aumentar en el área muscular braquial (4 pacientes) y en el área adiposa (6 pacientes). Estos resultados indican que el tratamiento con BH4 garantiza un desarrollo normal en los pacientes, al menos en términos del examen antropométrico y nutricional.
- Los cocientes de desarrollo en los pacientes de edad inferior a los 3 años se encontraban dentro de los valores de referencia tras un año de tratamiento con

BH4. Las puntuaciones de los test de inteligencia antes del inicio del tratamiento con BH4 en los pacientes de mayor edad no mostraron diferencias significativas respecto a los valores tras 12 meses de terapia con BH4. Mediante la anamnesis mantenida con el paciente y familiares, se descartaron la aparición de síntomas de hipercinesia, trastornos de conducta o trastornos del sueño en todos los casos. Pese a que son necesarios estudios a más largo plazo que determinen la evolución neurológica de los pacientes en tratamiento con BH4, estos resultados preliminares indican que el uso de BH4 garantiza un correcto desarrollo neurológico.

Discusión conjunta

1. Caracterización del temblor en la fenilcetonuria

Nuestros resultados indicaron que el temblor en la fenilcetonuria es un trastorno del movimiento muy frecuente, estando presente en un 30% de pacientes de diagnóstico precoz y en un 61% de pacientes de diagnóstico tardío. En la mayoría de los pacientes de nuestra serie, el temblor se asociaba a otros signos de disfunción neurológica como hiperreflexia en extremidades inferiores y torpeza en la coordinación motriz. Estos hallazgos se corresponden con trabajos previos publicados por otros autores (Cleary et al, 1994; Mc Donnell et al, 1998; Thompson et al, 1993), y señalan la presencia de una disfunción cerebral específica en los pacientes fenilcetonúricos pese a un adecuado tratamiento dietético.

Según nuestro conocimiento, no hay antecedentes sobre la aplicación de escalas clínicas que evalúen la severidad del temblor en pacientes PKU, y los datos publicados sobre el impacto del temblor en la calidad de vida de estos pacientes son muy limitados (Thompson et al, 1993). En este trabajo hemos aplicado de manera satisfactoria la escala WHIGET de gradación del temblor para el estudio de nuestros pacientes. Los pacientes de diagnóstico tardío recibieron puntuaciones superiores en las pruebas posturales y de acción, debido a que la amplitud del temblor se incrementaba notablemente durante el movimiento. En algunos casos estos hallazgos se traducían en una discapacidad para las actividades de la vida cotidiana. Pese a que es necesario un seguimiento a más largo plazo que confirme estos resultados, podemos afirmar que el temblor es más frecuente y también más severo entre los pacientes PKU de diagnóstico tardío.

El registro del movimiento demostró la presencia de un temblor manual rápido y muy regular, cuya frecuencia no se modificó de forma significativa tras añadir un peso a la extremidad. Estos hallazgos sugieren que el origen del temblor en la PKU se encuentra a nivel de un generador en el sistema nervioso central, y no favorece la contribución de un componente mecánico periférico. Los temblores de elevada frecuencia (8-12 Hz) se han descrito como la consecuencia de múltiples circuitos neuronales oscilatorios en el sistema nervioso central, entre los que se encuentran la

oliva inferior, el tálamo y el córtex cerebral (Toro et al, 1993 y 1994).

Tal como han observado otros autores (Pietz et al, 1998), el temblor no se relacionó con variables relacionadas con el tratamiento en el grupo de pacientes de diagnóstico precoz. En nuestra experiencia, el temblor se asoció con una edad más tardía de inicio de la dieta restrictiva en Phe. Estos resultados indican que el efecto tóxico de la hiperfenilalaninemia en los primeros años de desarrollo neurológico produce un daño cerebral que afecta de forma específica a los circuitos implicados en el origen del temblor en los pacientes de diagnóstico tardío. No obstante, elevaciones de Phe en adultos que han abandonado la dieta se han asociado con la aparición de un deterioro neurológico y un temblor incapacitante (Villasana et al, 1989; Williams et al 1998), indicando que un mal control metabólico en la edad adulta también podría jugar un papel en el temblor de la fenilcetonuria.

El temblor es un signo neurológico que con frecuencia está presente en otros errores congénitos del metabolismo, especialmente en aquellos que cursan con un déficit dopaminérgico. En concreto, el temblor es un síntoma sensible al tratamiento con levodopa en el déficit de GTPCH (Nardocci et al, 2003) y en el déficit de tirosina hidroxilasa (Grattan Smith et al, 2002). Recientemente, ha sido descrita una paciente PKU con temblor postural y de acción asociado a un síndrome Parkinsoniano cuyos síntomas respondieron al tratamiento prolongado con levodopa (Evans et al, 2004). Se postula por tanto que el déficit dopaminérgico podría estar implicado en el origen del temblor, así como en otros trastornos neurológicos característicos de la PKU.

El origen del temblor en otros errores congénitos del metabolismo, en cambio, es mucho más confuso. En los pacientes con galactosemia el temblor, junto con otras complicaciones neurológicas, puede aparecer de forma tardía sin ninguna relación con el inicio de la enfermedad y pese a un adecuado cumplimiento dietético (Kaufman et al, 1995; Schweitzer et al, 1993). Estos síntomas neurológicos pueden asociarse a alteraciones en la señal de la sustancia blanca periventricular, de forma similar a lo que ocurre en la fenilcetonuria (Koch et al, 1992).

El temblor aparece con frecuencia asociado a otros trastornos del movimiento más severos en la enfermedad de Wilson (Sudmeyer et al, 2004) y en algunas aminoacidopatías como la homocistinuria (Ekinci et al, 2004). En todos los casos, los mecanismos fisiopatológicos que condicionan la aparición de estas anomalías neurológicas no han sido estudiados en profundidad y merecerían ser motivo de futuros estudios.

2. Temblor y déficit de coenzima Q10

En este trabajo hemos demostrado que el 100% de los pacientes PKU con temblor presentaban valores de CoQ10 en plasma inferiores al límite inferior del rango de referencia, un porcentaje significativamente superior al que presentaban los pacientes PKU sin temblor. Del mismo modo, hemos detectado que las concentraciones de CoQ10 eran significativamente inferiores en el grupo de pacientes con temblor comparado con el grupo sin temblor. Estos hallazgos establecen una clara relación entre la presencia de temblor y el déficit plasmático de CoQ10 en los pacientes PKU. Existen varias razones que nos han hecho postular que el déficit de CoQ10 podría estar implicado en el origen del temblor en la PKU.

En primer lugar, el déficit de CoQ10 se ha relacionado con un aumento de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes PKU (Colome et al, 2003). Kienzle-Hagen et al (2002) demostraron que el aumento del estrés oxidativo en ratones expuestos a hiperfenilalaninemia se asociaba a cambios neuropatológicos a nivel cerebral. Estos datos refuerzan la hipótesis de que el estrés oxidativo juega un papel importante en la fisiopatología del daño cerebral en la PKU. El déficit de CoQ10 podría producir un daño oxidativo en los circuitos involucrados en el origen del temblor en estos pacientes. Sin embargo, es posible que las concentraciones plasmáticas de CoQ10 no reflejen la distribución de la coenzima en células y tejidos del organismo, no pudiendo por tanto afirmar que exista un déficit de CoQ10 a nivel cerebral en los pacientes PKU.

En segundo lugar, el déficit primario de CoQ10 ha sido descrito recientemente como causante de un cuadro clínico muy severo en el que predomina la afectación del sistema nervioso central. El espectro clínico es muy amplio, y abarca desde casos con temblor y ataxia cerebelosa, hasta encefalopatías severas de debut neonatal (Di Giovanni et al, 2001; Musumeci et al, 2001; Lamperti et al, 2003; Salviati et al, 2005; Rahman et al, 2001; Van Maldergem et al, 2002). El tratamiento sustitutivo con CoQ10 produce una mejoría espectacular del cuadro clínico en muchos de estos enfermos. Pensamos, por tanto, que el déficit secundario de CoQ10 en los pacientes PKU podría asimismo producir un daño cerebral responsable del temblor y de otras manifestaciones neurológicas que presentan estos pacientes.

Sin embargo, no debemos considerar el déficit de CoQ10 como el único factor implicado en el origen del temblor en la PKU. De hecho, nuestros resultados indican que la edad al diagnóstico de la enfermedad también está relacionada con la aparición del temblor en estos enfermos. Por tanto, una conclusión que podemos deducir de este trabajo es que el origen del temblor en la PKU es muy probablemente multifactorial.

Los resultados descritos en este trabajo representan un primer paso en la investigación del estrés oxidativo como mecanismo patogénico en la PKU. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios para confirmar la relación del déficit de CoQ10 con las anomalías neurológicas que afectan a los pacientes PKU en tratamiento dietético. En este sentido, queremos plantear dos posibles trabajos para continuar en esta nueva línea de investigación en la PKU.

En primer lugar, los resultados obtenidos nos ofrecen la posibilidad de realizar un ensayo terapéutico con CoQ10 en aquellos pacientes con temblor y déficit de este cofactor. El temblor es un marcador de daño cerebral que puede ser cuantificable de forma objetiva mediante escalas clínicas y métodos neurofisiológicos. La realización de un ensayo clínico con CoQ10 con el objetivo de mejorar el temblor en los pacientes PKU permitiría confirmar la hipótesis que plantea nuestros resultados preliminares. Queremos destacar que el tratamiento con CoQ10 ha sido ensayado con éxito en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, en la que se ha confirmado que el estrés oxidativo es un mecanismo patogénico implicado en la degeneración neuronal de la pars compacta de la sustancia nigra (Müller et al, 2003).

En segundo lugar, sería muy interesante analizar la relación entre las concentraciones de CoQ10 y otros marcadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratones PKU. La administración de CoQ10 a los ratones PKU con la finalidad de prevenir el daño cerebral causado por el aumento del estrés oxidativo permitiría confirmar el papel del déficit de CoQ10 en la fisiopatología del daño cerebral en la PKU.

3. Estudio volumétrico cerebral en la fenilcetonuria

Los estudios neuropatológicos y de neuroimagen han descrito previamente la presencia de signos de atrofia cortical en pacientes PKU de diagnóstico tardío (Leuzzi et al, 1995; Pearson et al, 1990; Poser et al, 1959). En nuestro estudio, los volúmenes de sustancia gris se correlacionaron de forma inversa con la edad al diagnóstico. De

hecho, pudimos comprobar una disminución significativa del volumen de sustancia gris en pacientes PKU de diagnóstico tardío comparados con los controles sanos. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el efecto tóxico de la hiperfenilalaninemia durante los primeros años de desarrollo neurológico podría inhibir el crecimiento cerebral en los pacientes PKU con un mal control metabólico en estadios precoces de la vida (Huttenlocher et al, 2000).

En este trabajo hemos localizado las alteraciones de volumen a nivel de sustancia blanca y sustancia gris con un método de análisis vóxel a vóxel, lo cual representa una nueva aproximación al análisis de las anomalías de la anatomía cerebral en la PKU. Hasta el momento, los estudios en la PKU se habían centrado en el análisis de las alteraciones de la sustancia blanca presentes en secuencias T2 (Thompson et al, 1993; Bick et al, 1993; Leuzzi et al, 1993; Ullrich et al, 1994; Cleary et al, 1994), en estudios de difusión (Dezortova et al, 2001; Phillips et al, 2001; Sener et al, 2004), de espectroscopia (Kreis et al, 1995; Pietz et al, 1996) o en el análisis volumétrico de regiones de interés (Pfaendner et al, 2005).

El análisis vóxel a vóxel evidenció una distribución específica de pérdida de sustancia gris a nivel del córtex motor y premotor, sin que estos hallazgos guardaran ninguna asociación con las anomalías neurológicas que presentaban los pacientes (p.e. temblor, hiperreflexia o cociente intelectual). Los estudios de RM funcional indican que el córtex premotor y área motora suplementaria actúan como una unidad funcional en el control secuencial de los movimientos de los dedos. Por tanto, es posible que las dificultades en la motricidad fina que se han descrito en pacientes PKU en tratamiento (Weglage et al, 1995) sean consecuencia de una alteración en el desarrollo neuronal de las áreas motoras corticales.

Los volúmenes globales de sustancia blanca en los pacientes PKU no mostraron diferencias respecto al grupo control. No obstante, en los pacientes de diagnóstico precoz elevaciones recientes de Phe se asociaron con volúmenes globales mayores de sustancia blanca, sin que los mapas paramétricos mostraran una distribución anatómica específica de este aumento de sustancia blanca. Con los datos de que disponemos actualmente, no podemos descartar que la hiperfenilalaninemia provoque un efecto edema o una alteración de los procesos osmóticos que justifiquen esta correlación positiva. Alternativamente, el efecto tóxico de Phe sobre el cerebro podría desencadenar una activación de los procesos de regeneración de las vainas mielínicas responsable de estos cambios.

Los análisis vóxel a vóxel mostraron reducciones regionales de volumen en la sustancia blanca periventricular con extensión a los fórceps del cuerpo caloso, regiones donde es frecuente observar cambios de señal en secuencias T2 en pacientes PKU con descompensaciones metabólicas (Thompson et al, 1993; Bick et al, 1993; Leuzzi et al, 1993; Ullrich et al, 1994; Cleary et al 1994).

Los cambios observados a nivel de la sustancia blanca son en apariencia dispares. Por un lado, encontramos una asociación entre concentraciones elevadas de Phe y mayores volúmenes globales de sustancia blanca, y por otro, observamos reducciones focales de parénquima cerebral en las regiones de sustancia blanca que se muestran sensibles a las descompensaciones metabólicas de la PKU. Esta combinación de resultados, sin embargo, puede indicar que las descompensaciones metabólicas repetitivas pueden producir un cierto grado de daño cerebral que se traduce en atrofia tisular en las regiones más vulnerables. Estos hallazgos tienen implicaciones en la práctica clínica, y señalan la necesidad de un estricto control metabólico de por vida para prevenir el daño cerebral a largo plazo.

Por último, hemos demostrado la presencia de cambios volumétricos en la sustancia blanca y sustancia gris a nivel del tálamo y los núcleos estriados. Estas alteraciones a nivel de los ganglios basales podrían justificar la aparición de algunas manifestaciones neurológicas en la PKU, como el Parkinsonismo y los trastornos del movimiento (Pietz et al, 1998). Sin embargo, los pacientes PKU en tratamiento presentan con mucha mayor frecuencia una alteración de las funciones ejecutivas, las cuales se ha relacionado con una disfunción a nivel del córtex prefrontal (Arnold et al, 1998; Diamond et al, 1997; Gassió et al, 2005; Leuzzi et al, 2004). Según nuestros resultados, las alteraciones a nivel de los núcleos subcorticales junto a las anomalías de sustancia blanca en el lóbulo frontal podrían ser responsables de una alteración de los circuitos fronto-subcorticales necesarios para el apropiado funcionamiento de las funciones ejecutivas.

4. Respuesta a la prueba de sobrecarga con tetrahidrobiopterina

En este trabajo hemos demostrado que el 44% de pacientes PKU respondieron a la prueba de sobrecarga con BH4. No obstante, los resultados fueron diferentes en función de los fenotipos metabólicos analizados. El grupo de pacientes con fenotipo leve presentó una excelente respuesta a la sobrecarga, y las cifras de Phe

descendieron hasta los valores recomendados. En cambio, el porcentaje de pacientes que respondieron a la BH4 fue inferior en el grupo de pacientes con fenotipos moderados y clásicos, siendo las cifras finales de Phe superiores a los valores considerados seguros. La selección de pacientes candidatos al tratamiento con BH4 debe realizarse, por tanto, evaluando no solo el porcentaje de descenso de las cifras de Phe, sino también los valores absolutos de Phe a las 21 horas de la sobrecarga. Finalmente, solo el tratamiento a largo plazo con BH4 confirmará el grado de respuesta a este cofactor en los pacientes seleccionados.

Nuestros resultados confirmaron la utilidad de la prueba de sobrecarga combinada con Phe y BH4 en pacientes PKU en tratamiento dietético (Blau et al, 2004). La sobrecarga con 100mg/kg de Phe previa a la administración de BH4 permitió alcanzar valores de Phe en plasma que se correlacionaron con los valores de Phe al diagnóstico, lo cual permitió realizar un cálculo fiable de la respuesta. Como alternativa a esta prueba combinada, existe la posibilidad de realizar una dieta libre en Phe los 3 días previos a la sobrecarga con BH4, pero en nuestra experiencia la dieta libre en proteínas es muy difícil de cumplimentar por la gran mayoría de pacientes (Vilaseca et al, 2002). Por otro lado, el análisis de los valores de Phe a lo largo de 24 horas permitió identificar un grupo de 12 pacientes respondedores lentos, que se hubieran considerado como no respondedores si se hubiera aplicado el protocolo de 11 horas recomendado por otros autores (Belanger-Quintana et al, 2005).

Los mecanismos de respuesta de algunas mutaciones a la BH4 son desconocidos. Basados en el conocimiento actual de las propiedades reguladoras del cofactor BH4 y del sustrato Phe (Erlandsen et al, 2003; Blau et al, 2004) se han postulado los siguientes mecanismos como causas posibles de la respuesta a la BH4: (1) mutantes del enzima PAH con variantes K_m responsables de una menor afinidad para la unión a la BH4, (2) estabilizando el enzima PAH mediante la acción chaperona de la BH4, p.e., la BH4 puede actuar como chaperona química protegiendo las formas dímeros/tetrámeros activas de la degradación proteolítica, (3) induciendo o autorregulando la expresión enzimática del gen *PAH* (Muntau et al, 2002; Erlandsen et al, 2001; Blau et al, 2002), y (5) estabilizando el RNAm de la PAH.

Nuestros resultados muestran la dificultad de predecir la respuesta a la BH4 basándonos exclusivamente en el genotipo de los pacientes. Hemos demostrado que es necesaria la presencia de un cierto grado de actividad enzimática residual en los pacientes con fenotipos más leves para que se obtenga una respuesta satisfactoria a

la sobrecarga con BH4. Sin embargo, la presencia de dos mutaciones leves con actividad enzimática residual reconocida no es suficiente para garantizar una respuesta a la BH4. Existe una interacción entre las mutaciones presentes en cada paciente que determina el grado de respuesta al cofactor. Por tanto, recomendamos la realización de la prueba de sobrecarga con Phe/BH4 a todos los pacientes PKU, excepto aquellos que presenten mutaciones nulas en ambos alelos.

5. Evaluación clínica y nutricional del tratamiento con tetrahidrobiopterina

La estrategia terapéutica utilizada en este trabajo fue la introducción del tratamiento con BH4 a bajas dosis (5 mg/kg/día) y el incremento progresivo de la ingesta de Phe en función de la tolerancia y de los requerimientos proteicos de cada paciente. Cuando la tolerancia de Phe no pudo incrementarse de forma significativa, el tratamiento con BH4 se consideró ineficaz y fue retirado. De este modo confirmamos el beneficio del tratamiento a largo plazo con BH4 en 9 pacientes con fenotipos leves y en 2 con fenotipos moderados.

El tratamiento a largo plazo con BH4 confirmó la importancia que tienen los valores plasmáticos de Phe a las 21 horas de la administración de BH4 para la evaluación de la respuesta a la BH4. Mientras que los pacientes con valores absolutos de Phe inferiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ presentaron una buena respuesta al tratamiento prolongado con BH4, tres pacientes con fenotipos más severos y valores de Phe superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ mostraron una respuesta ineficaz al tratamiento prolongado.

Las dosis de BH4 utilizadas previamente varían entre 5 y 20 mg/kg/día (Trefz et al, 2000; Shintaku et al, 2004; Steinfeld et al, 2004). En nuestra experiencia, el tratamiento con dosis bajas de 5 mg/kg/día fue suficiente en la mayoría de pacientes para mantener las cifras de Phe dentro de los valores recomendados, y solo en una paciente se tuvieron que administrar dosis superiores de 7 mg/kg/día. Pese a ello, durante el tratamiento con BH4 se observaron frecuentes descompensaciones metabólicas puntuales coincidiendo con cuadros febriles, sobre todo en los lactantes. Estos datos plantean la posibilidad de reducir los aportes proteicos de forma puntual durante las infecciones intercurrentes en los pacientes en monoterapia con BH4.

Teniendo en cuenta el genotipo de los pacientes en tratamiento, este trabajo confirma la respuesta de las mutaciones presentes en los 11 pacientes tratados con BH4 durante un total de 24 meses en la actualidad.

El tratamiento con BH4 ha permitido un desarrollo nutricional favorable. Todos los micronutrientes analizados se mantuvieron dentro de los valores de normalidad. Asimismo, el estudio nutricional mediante la determinación del peso, talla y el análisis del área braquial muscular y adiposa confirmó un desarrollo normal durante el tratamiento con BH4.

Merece consideración aparte el aumento de las concentraciones plasmáticas de selenio durante el tratamiento con BH4 pese a no haberse modificado las concentraciones totales de selenio ingeridas. Estos resultados sugieren que el selenio ingerido de la dieta presenta una mayor biodisponibilidad que el selenio ingerido a partir de la fórmula especial. De hecho, se han descrito déficits de selenio en pacientes PKU en tratamiento dietético (Wilke et al, 1992), lo cual podría provocar una disfunción de las selenoproteínas (Van Bakel et al, 2000).

El estudio neuropsicológico ha permitido confirmar que el tratamiento con BH4 permite un desarrollo cognitivo normal, no habiéndose observado otros síntomas neurológicos durante el tratamiento.

A pesar de todas las ventajas que representa el tratamiento con BH4, éste solo resulta útil en un limitado número de pacientes PKU con fenotipos metabólicos leves y moderados. Para la gran mayoría, en cambio, la dieta restrictiva en Phe continúa siendo la única opción de tratamiento en la actualidad. Por ello, la investigación de otras opciones terapéuticas sigue siendo un objetivo prioritario en el campo de la fenilcetonuria. En concreto, recientes estudios han demostrado que la administración del enzima recombinante fenilalanina amonio-liasas (PAL, EC 4.3.1.5) a animales de experimentación produce una disminución de los niveles plasmáticos de Phe con escasos efectos secundarios (Wang et al, 2005).

Conclusiones

1. El temblor en la fenilcetonuria es un trastorno del movimiento muy prevalente entre pacientes de diagnóstico precoz y tardío. Se trata de un temblor rápido y muy regular, localizado fundamentalmente en extremidades superiores, cuya amplitud aumenta con el movimiento sobre todo en los pacientes de diagnóstico tardío, en quienes puede causar una discapacidad para las tareas cotidianas. Los datos neurofisiológicos sugieren que el temblor está causado por una disfunción de circuitos neuronales a nivel del sistema nervioso central, pudiendo ser considerado como un indicador de daño cerebral.
2. El temblor en la PKU se asocia a un descenso en las concentraciones plasmáticas de CoQ10 en los pacientes con un adecuado control metabólico, así como a una edad tardía de diagnóstico de la enfermedad. Debido a la asociación descrita entre el déficit de CoQ10 y el aumento del estrés oxidativo en la PKU, nuestros resultados sugieren que el déficit de coenzima Q10 podría actuar induciendo un daño oxidativo a nivel de los circuitos implicados en la fisiopatología del temblor en estos enfermos.
3. Los pacientes fenilcetonúricos en tratamiento dietético presentan alteraciones significativas en el volumen de la sustancia blanca y sustancia gris, cuya aparición está relacionada con la duración y el adecuado cumplimiento del tratamiento dietético. Existe una distribución específica de esta pérdida de volumen a nivel de las áreas motoras corticales, ganglios basales y sustancia blanca periventricular, cuyo significado clínico deberá ser ampliado en futuros trabajos.
4. La prueba de sobrecarga combinada con Phe/BH4 es una herramienta muy útil para la selección de los pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con BH4. Considerando lo difícil que resulta predecir la respuesta a la BH4 a partir del genotipo, recomendamos realizar la prueba de sobrecarga a todos los pacientes PKU, exceptuando solo aquellos pacientes con mutaciones nulas en ambos alelos.

5. Consideramos que el tratamiento con BH4 es seguro y eficaz en un grupo seleccionado de pacientes PKU con fenotipos leves y moderados. La utilización de dosis bajas de BH4 permite liberalizar la dieta y retirar la fórmula especial, garantizando un desarrollo nutricional y cognitivo adecuados sin que se hayan observado efectos indeseados.

Conclusión global

Pese a un adecuado control metabólico, los pacientes fenilcetonúricos en tratamiento dietético presentan signos clínicos de disfunción neurológica así como anomalías estructurales en el parénquima cerebral. En su origen están implicados múltiples factores; en primer lugar relacionados con el inicio, la duración y el adecuado cumplimiento dietético, pero también alteraciones metabólicas secundarias como el déficit de CoQ10 y el aumento del estrés oxidativo. El tratamiento con tetrahidrobiopterina representa una alternativa terapéutica a la dieta restrictiva en Phe en un grupo seleccionado de pacientes con fenotipos leves y moderados, en quienes permite optimizar el control metabólico y garantizar un adecuado desarrollo cognitivo y nutricional.

Estudios futuros

- Cuantificación de las alteraciones de la señal en secuencias T2 y FLAIR a nivel de la sustancia blanca y su correlación con los volúmenes regionales de sustancia blanca. Aplicación de técnicas de difusión con la finalidad de esclarecer los cambios tisulares que condicionan el aumento de volumen de la sustancia blanca que presentan los pacientes con descompensaciones metabólicas.
- Ensayo terapéutico con CoQ10 en aquellos pacientes con temblor y déficit de este cofactor. Evaluación bioquímica de la respuesta mediante estudio del estrés oxidativo en plasma. Evaluación del temblor mediante la aplicación de una escala clínica de gradación del temblor y mediante estudios neurofisiológicos.
- Estudio experimental del estrés oxidativo en el cerebro de ratones PKU y su correlación con las concentraciones tisulares de CoQ10. Evaluación de la respuesta terapéutica con CoQ10.
- Evaluación del impacto de la terapia con BH4 en el sistema antioxidante y en las concentraciones plasmáticas de neurotransmisores (serotonina, dopamina). Estudio comparativo con el grupo de pacientes en tratamiento clásico con dieta restrictiva en Phe.

Bibliografía

Arnold GL, Kramer BM, Kirby RS et al. Factors affecting cognitive, motor, behavioral and executive functioning in children with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1998; 87: 565-570.

Artuch R, Colome C, Vilaseca MA et al. Plasma phenylalanine is associated with decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 359-366.

Bardelli T, Donati MA, Gasperini S et al. Two novel genetic lesions and a common BH4-responsive mutation of the PAH gene in Italian patients with hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 260-6.

Bauman ML, Kemper TL. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta neuropathol (Berl)* 1982; 58: 55-63.

Belanger-Quintana A, Garcia MJ, Castro M et al. Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab* 2005; 86: S61-6.

Bick U, Fahrendorf G, Ludolph AC et al. Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 185-189.

Bick U, Ullrich K, Stober U et al. White matter abnormalities in patients with treated hyperphenylalaninaemia: magnetic resonance relaxometry and proton spectroscopy findings. *Eur J Pediatr* 1993; 152:1012-1020.

Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 2: 812-813.

Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2004; 82: 101-11.

Blau N, Fiege B, Trefz FK. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis, treatment, genetics and international BIOPKU database. In: Blau N, Thony B, editors. *Pterins, Folates and Neurotransmitters in Molecular Medicine*. Heilbronn, Germany: SPS Verlagsgesellschaft mbH; 2004. p. 132-42.

Blau N, Trefz FK. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: possible regulation of gene expression in a patient with the homozygous L48S mutation. *Mol Genet Metab* 2002; 75: 186-7.

Brandt U. The chemistry and mechanics of ubihydroquinone oxidation at center P (Qo) of the cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1365:261-268.

Brenton DP, Pietz J. Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur J Pediatr* 2000; 159: S114-S120.

Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 46-54

Burlina AB, Bonafé L, Ferrari V et al. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 313-316.

Campistol J, Lambruschini N, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Fusté E, Gómez L. Hiperfenilalaninemia. En: Sanjurjo P, Baldellou A. *Enfermedades metabólicas*. Ed. Ergan. Madrid 2006.

Castillo M, Zafra MF, García-Peregrín E. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 1988; 13: 551-5.

Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of Phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children and a scientist. *Pediatrics* 2000; 105: 89-103.

Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR et al. Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2004; 81: 137-139.

Cleary MA, Walter JH, Wraith JE et al. Magnetic resonance imaging of the brain in phenylketonuria. *Lancet* 1994; 344: 87-90.

Colome C, Artuch R, Vilaseca MA et al. Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 185-8.

Cordero ME, Trejo M, Colombo M et al. Histological maturation of the neocortex in phenylketonuric rats. *Early Hum Dev* 1983; 8: 157-173.

Dezortova M, Hajek M, Tintera J et al. MR in phenylketonuria-related brain lesions. *Acta Radiol* 2001; 42: 459-466.

Diamond A, Ciaramitaro V, Donner E et al. An animal model of early-treated PKU. *J Neurosci* 1994; 14: 3072-82.

Diamond A, Prevor MB, Callender G et al. Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monogr Soc Res Child Dev* 1997; 62: 1-208.

Dyer CA, Kendler A, Philibotte T et al. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 795-814.

Dyer CA. Pathophysiology of phenylketonuria. *MRDD Research Reviews* 1999; 5: 104-112.

Ekinci B, Apaydin H, Vural M et al. Two siblings with homocystinuria presenting with dystonia and parkinsonism. *Mov Disord* 2004; 19: 962-4.

Erlandsen H, Stevens RC. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 213-30.

Erlandsen H, Patch MG, Gamez A et al. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics* 2003; 112: 1557-65.

Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1271: 195-204.

Evans AH, Costa DC, Gacinovic S et al. L-Dopa-responsive Parkinson's syndrome in association with phenylketonuria: in vivo dopamine transporter and D2 receptor findings. *Mov Disord* 2004; 19: 1232-1236.

Ferré J, Bel Y, García AM et al. Análisis del patrón de pteridinas en orina y sangre de enfermos hiperfenilalaninémicos. *Rev Diagn Biol* 1988; 37: 272-7.

Fölling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1994; Suppl 407: 4-10.

Frisancho AR. New norms of upper limb fat, and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 2540-2545.

Gassio R, Artuch R, Vilaseca MA et al. Cognitive functions in classic phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia: experience in a paediatric population. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 443-8.

Di Giovanni S, Mirabella M, Spinazzola A et al. Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 2001; 57: 515-518.

Grattan-Smith PJ, Wevers RA, Steenbergen-Spanjers GC et al. Tyrosine hydroxylase deficiency: clinical manifestations of catecholamine insufficiency in infancy. *Mov Disord* 2002; 17: 354-9.

Güttler F, Lou H: Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. En: Fernandes J, Saudubray JM, Tada K. (ed) *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 1990; pp 161-174.

Huttenlocher PR. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr* 2000; 159: S102-S106.

Joseph B, Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem*. 2003; 86: 615-26.

Kaufman FR, McBride-Chang C, Manis FR et al. Cognitive functioning, neurologic status and brain imaging in classical galactosemia. *Eur J Pediatr* 1995; 154: S2-5.

Kienzle-Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586: 344-52.

Knox WE. Phenylketonuria. In: The metabolic basis of inherited disease. 3rd ed. Standbury JB, Wyngarden JB, Frederickson DS (editors). New York: McGraw-Hill: 1972. pp. 266-295.

Koch R, Guttler F, Blau N. Mental illness in mild PKU responds to biopterin. *Mol Genet Metab* 2002; 75: 284-286.

Koch TK, Schmidt KA, Wagstaff JE et al. Neurologic complications in galactosemia. *Pediatr Neurol* 1992; 8: 217-20.

Kreis R, Pietz J, Penzien J et al. Identification and quantification of phenylalanine in the brain of patients with phenylketonuria by means of localized in vivo ¹H magnetic-resonance. *J Magn Reson B* 1995; 107: 242-251.

Kroger A, Klingenberg M. Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin. *Eur J Biochem* 1973; 39: 313-23.

Kure S, Hou D-C, Ohura T et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 375-378

Lacey DJ. Hippocampal dendritic abnormalities in a rat model of phenylketonuria. *Ann Neurol* 1984 ; 16: 577-580.

Lacey DJ. Cortical dendritic spine loss in rat pups whose mothers were prenatally injected with phenylacetate ('maternal PKU model'). *Brain Res* 1986; 27: 283-285.

Lamperti C, Naini A, Hirano M et al. Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*. 2003; 60: 1206-8.

Lässker U, Zschocke J, Blau N et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetic findings. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25: 65-70.

Leuzzi V, Gualdi GF, Fabbrizi F et al. Neuroradiological (MRI) abnormalities in phenylketonuric subjects: clinical and biochemical correlations. *Neuropediatrics* 1993; 24: 302-306.

Leuzzi V, Pansini M, Sechi E et al. Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 115-125.

Leuzzi V, Trasimeni G, Gualdi GF et al. Biochemical, clinical and neuroradiological (MRI) correlations in late-detected PKU patients. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 624-634.

Lindner M, Haas D, Mayatepek E et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Mol Genet Metab* 2001; 73: 104-6.

Lindner M, Steinfeld R, Burgard P et al. Tetrahydrobiopterin sensitivity in German patients with mild phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2003 (Mutation in Brief # 588, Online).

Louis ED, Ottman RA, Ford B et al. The Washington Heights essential tremor study: methodologic issues in essential-tremor research. *Neuroepidemiology* 1997; 16: 124-133.

Louis ED, Barnes L, Wendt KJ et al. A teaching videotape for the assessment of essential tremor. *Mov Disord* 2001; 16: 89-93.

Lücke T, Illsinger S, Aulehla-Scholz C et al. BH4-sensitive hyperphenylalaninemia: new case and review of literature. *Pediatr Neurol* 2003; 28: 228-230.

Malamud N. Neuropathology of phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1966; 25: 254-268.

Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C et al. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J Neurosci Res* 2002; 69: 550-8.

Matalon R, Koch R, Michaels-Matalon K et al. Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med* 2004; 6: 27-32.

Muller T, Buttner T, Gholipour AF et al. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003; 341: 201-4.

Muntau AC, Roschinger W, Habich M et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J med* 2002; 347: 2122-32.

Musumeci O, Naini A, Slonim AE et al. Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 2001; 56: 849-855.

Nardocci N, Zorzi G, Blau N et al. Neonatal dopa-responsive extrapyramidal syndrome in twins with recessive GTPCH deficiency. *Neurology* 2003; 60: 335-7.

Pearson KD, Gean-Marton AD, Levy HL et al. Phenylketonuria: MR-imaging of the brain with clinical correlation. *Radiology* 1990; 177: 437-440.

Pfaendner NH, Reuner G, Pietz J et al. MR imaging-based volumetry in patients with early-treated phenylketonuria. *Am J Neuroradiol* 2005; 26: 1681-1685.

Phillips MD, McGraw P, Lowe MJ et al. Diffusion-Weighted Imaging of white matter abnormalities in patients with phenylketonuria. *Am J Neuroradiol* 2001; 22: 1583-1586.

Pietz J. Neurological aspects of adult phenylketonuria. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 679-688.

Pietz J, Dunkelmann R, Rupp A et al. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 824-830.

Pietz J, Kreis R, Schmidt H et al. Phenylketonuria: findings at MR imaging and localized in vivo H-1 MR spectroscopy of the brain in patients with early treatment. *Radiology* 1996; 201: 413-420.

Poser CM, van Bogaert L. Neuropathologic observations in phenylketonuria. *Brain* 1959; 82: 1-9.

Pujol J, López-Sala A, Sebastián-Galles N et al. Delayed myelination in children with developmental delay detected by volumetric MRI. *Neuroimage* 2004; 22: 897-903.

Pujol J, Soriano-Mas C, Alonso P et al. Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61: 720-730.

Raethjen J, Lauk M, Köster B et al. Tremor analysis in two normal cohorts. *Clin Neurophysiol* 2004; 115: 2151-2156.

Rahman S, Hargreaves I, Clayton P et al. Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediatr*. 2001; 139: 456-8.

Robain D, Wen GY, Wisniewski HM et al. Purkinje cell dendritic development in experimental phenylketonuria. *Acta Neuropathol (Berl)* 1981; 53: 107-112.

Salviati L, Sacconi S, Murer L et al. Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology*. 2005; 65: 606-8.

Schnitzler A. Postural tremor in Wilson's disease: a magnetoencephalographic study. *Mov Disord*. 2004; 19: 1476-82.

Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C et al. Long-term outcome in 134 patients with galactosaemia. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 36-43.

Sener RN. Diffusion magnetic resonance imaging patterns in metabolic and toxic brain disorders. *Acta Radiologica* 2004; 5: 561-570.

Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia. Phenylalanine hydroxylase deficiency, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw Hill, New York, 8th ed, 2001, pp. 1667-1724.

Shefer S, Tint S, Jean-Guillaume D et al. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 2000; 61: 549-563.

Shintaku H, Kure S, Ohura T et al. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Pediatr Res* 2004; 55: 425-430.

Spaapen LJM, Bakker JA, Velter C et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Dutch neonates. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 325-58.

Spaapen LJ, Rubio Gozalbo ME. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab* 2003; 78: 93-9.

Steinfeld R, Kohlschütter A, Zschocke J et al. Tetrahydrobiopterin monotherapy for phenylketonuria patients with common mild mutations. *Eur J Pediatr* 2002; 403-405.

Steinfeld R, Kohlschutter A, Ullrich K et al. Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2004; 37: 1083-1090.

Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:1646-50.

Sudmeyer M, Pollok B, Hefter H et al. Postural tremor in Wilson's disease: a magnetoencephalographic study. *Mov Disord* 2004; 19: 1476-82.

Thompson AJ, Smith I, Brenton D et al. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1990; 336: 602-605.

Thompson AJ, Tillotson S, Smith I et al. Brain MRI changes in phenylketonuria. Associations with dietary status. *Brain* 1993; 116: 811-21.

Topcu M, Aydin OF, Yalcinkaya C et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria: a report of 29 patients. *Turk J Pediatr* 2005; 47: 1-7.

Toro C, Cox C, Friehs G et al. 8-12 Hz rhythmic oscillations in human motor cortex during two dimensional arm movements: Evidence for representation of kinematic parameters. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994; 93: 390-403.

Toro C, Pascual-Leone A, Deuschl G et al. Cortical tremor: A common manifestation of cortical myoclonus. *Neurology* 1993; 43:2346-2353.

Trefz F, Aulehla-Scholz C, Blau N. Successful treatment of phenylketonuria with tetrahydrobiopterin. *Eur J Pediatr* 2000; 160: 315.

Turunen M, Swiezewska E, Chojnacki T et al. Regulatory aspects of coenzyme Q metabolism. *Free Radic Res* 2002; 36: 437-43.

Ullrich K, Moller H, Weglage J et al. White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 78-82.

Van Bakel MM, Printzen G, Wermuth B et al. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 976-81.

Van Maldergem L, Trijbels F, DiMauro S et al. Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Ann Neurol*. 2002; 52: 750-4.

Vilaseca MA, Artuch R, Pineda J et al. Respuesta a tetrahidrobiopterina en pacientes con fenilcetonuria clásica. *Quím Clín* 2002; 21: 355.

Villasana D, Buthler IJ, Williams JC et al. Neurological deterioration in adult phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 1989; 12: 451-57.

Wang L, Gamez A, Sarkissian CN et al. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 134-40.

Wappner R, Cho S, Kronmal RA et al. Management of phenylketonuria for optimal outcome: a review of guidelines for phenylketonuria management and a report of surveys of parents, patients, and clinic directors. *Pediatrics* 1999; 104: e68.

Weber C, Bysted A, Holmer G. Coenzyme Q10 in the diet-daily intake and relative bioavailability. *Mol Aspects Med* 1997; 18: S251-4.

Weglage J, Grenzebach M, von Teeffelen-Heithoff A et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in a large series of phenylketonuria patients. *J Inher Metab* 2002; 25: 321-2.

Weglage J, Pietsch M, Fünders B et al. Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1995; 84: 411-15.

Weglage J, Pietsch M, Funders B et al. Deficits in selective and sustained attention processes in early treated children with phenylketonuria; result of impaired lobe functions. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 200-204.

Wilke BC, Vidailhet M, Favier A et al. Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 137-42.

Williams K. Benefits of normalizing plasma phenylalanine: Impact on behaviour and health. A case report. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 785-790.

Williams RS, Hauser SL, Purpura DP et al. Autism and mental retardation. Neuropathologic studies performed in four retarded persons with autistic features. *Arch Neurol* 1980; 37: 749-753.

Anexo

***(Otras Publicaciones relacionadas con el tema,
Comunicaciones Científicas a Congresos)***

Otras publicaciones relacionadas con el tema

1. **Pérez-Dueñas B**, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho JA. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 2002; 91: 899-904.
2. Millet P, Vilaseca MA, Valls C, **Perez-Duenas B**, Artuch R, Gomez L, Lambruschini N, Campistol J. Is deoxypyridinoline a good resorption marker to detect osteopenia in phenylketonuria? *Clin Biochem*. 2005 Dec; 38(12):1127-32.
3. Ormazabal A, Vilaseca MA, **Perez-Duenas B**, Lambruschini N, Gomez L, Campistol J, Artuch R. Platelet serotonin concentrations in PKU patients under dietary control and tetrahydrobiopterin treatment. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 863-70.

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Belén Pérez Dueñas, Universitat de Barcelona

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Alteraciones neurológicas en la fenilcetonuria y nuevas opciones terapéuticas

Comunicaciones a congresos relacionadas con el tema

15th Meeting of the European Neurological Society, Vienna 18 - 22 June 2005.

CHARACTERISATION OF TREMOR IN PHENYLKETONURIC PATIENTS
B. Perez Dueñas, J. Valls-Solé, E. Fernández-Alvarez, J. Conill, M. Vilaseca, R. Artuch, J. Campistol; Hospital San Joan de Deu, Hospital Clinic (Barcelona, E)

42nd Annual Symposium of the SSIEM, Paris 6 – 9 September 2005.

HYPOMYELINATION OF THE CORPUS CALLOSUM AND GRAY MATTER LOSS IN PREMOTOR CORTEX ARE SPECIFIC FINDINGS OF PHENYLKETONURIC TREATED PATIENTS Campistol J, Pérez-Dueñas B, *Soriano-Mas C, *Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, *Pujol J. Neurology and Biochemistry Department. Hospital Sant Joan de Déu. Universitat de Barcelona. *Institut d'Alta Tecnologia (IAT)-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Spain.

42nd Annual Symposium of the SSIEM, Paris 6 – 9 September 2005.

EFFICACY OF BH4 THERAPY IS CONFIRMED IN ELEVEN PKU PATIENTS AFTER ONE-YEAR FOLLOW UP Lambruschini N, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Gutiérrez A, Gómez L, Campistol J. PKU Follow-up Unit. Hospital Sant Joan de Déu. Universitat de Barcelona.

VI Congreso de AECOM sobre errores congénitos del metabolismo, Palma de Mallorca 5-7 de Octubre de 2005.

ANOMALÍAS ESTRUCTURALES GLOBALES Y REGIONALES EN EL CÓRTEX Y SUSTANCIA BLANCA DE PACIENTES FENILCETONÚRICOS Pérez-Dueñas B, *Pujol J. *Soriano-Mas C, *Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J.

VI Congreso de AECOM sobre errores congénitos del metabolismo, Palma de Mallorca 5-7 de Octubre de 2005.

EVALUACIÓN CLÍNICA Y NUTRICIONAL DE PACIENTES PKU EN MONOTERAPIA CON TETRAHIDROBIOPTERINA. Lambruschini N, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Gutiérrez A, Gómez L, Campistol J.

Unidad de Seguimiento PKU. Centro de Referencia para la PKU en Cataluña. Hospital Sant Joan de Déu. Universidad de Barcelona.

VI Congreso de AECOM sobre errores congénitos del metabolismo, Palma de Mallorca 5-7 de Octubre de 2005. ASPECTOS DIETÉTICOS DEL TRATAMIENTO CON TETRAHIDROBIOPTERINA EN PACIENTES FENILCETONÚRICOS. Gutiérrez A, Lambruschini N, Gómez L, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Fusté E, Campistol J. Unidad de Seguimiento PKU. Hospital Sant Joan de Déu. Universidad de Barcelona.

VI Congreso de AECOM sobre errores congénitos del metabolismo, Palma de Mallorca 5-7 de Octubre de 2005. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE OSTEOPENIA EN LA FENILCETONURIA. Millet P, Vilaseca MA, Pérez-Dueñas B, Gómez L, Lambruschini N, Artuch R, Valls C, Campistol J. Unidad de Seguimiento de la PKU. Bioquímica, Neuropediatría, Gastroenterología y Nutrición. Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.

International Symposium on Paediatric Movement Disorders, Barcelona, 20-21 February 2004. CHARACTERISTICS OF TREMOR IN PHENYLKETONURIC PATIENTS. Pérez-Dueñas B, Fernández-Álvarez E, Conill J, Vilaseca MA, Valls-Solé J, Campistol J.

SSIEM 41st Annual Symposium, Amsterdam, the Netherlands August 31 – September 3, 2004. CLINICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL STUDY OF TREMOR IN PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA Pérez-Dueñas B1, Fernández E1, Conill J1, Vilaseca MA2, Artuch R2, Valls J3, Campistol J1. 1Neurology and 2Biochemistry Departments Hospital Sant Joan de Déu. 3Neurology Department Hospital Clínic. University of Barcelona.

SSIEM 41st Annual Symposium, Amsterdam, the Netherlands August 31 – September 3, 2004. LIPOPHILIC ANTIOXIDANTS IN PKU PATIENTS ON BH4 THERAPY. Pineda J, Ormazabal A, Artuch R, Pérez-Dueñas B, Lambruschini N, Gómez L, Vilaseca MA, Campistol J. Hospita. Hospital Sant Joan de Déu. Clinical Chemistry Department. Pediatrics and Neurology. Barcelona. Spain.

V Congreso de AECOM sobre errores Congénitos del Metabolismo, Madrid del 5 al 7 de Noviembre, 2003. EL TEST DE SOBRECARGA DE TETRAHIDROBIOPTERINA COMO MÉTODO DE SELECCIÓN DE PACIENTES CON RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ESTE COFACTOR. Vilaseca Busca A, Pérez Dueñas B, Pineda Gálvez J, Artuch-Irriberri R, Lambruschini Ferri N, Gómez López L, Milá Recasens M, Campistol Plana J. Unidad de Seguimiento de la PKU. Universidad de Barcelona.