

## Aspectos generales y panorama actual del estudio molecular de la fenilcetonuria (PKU) en México

Dr. Miguel Ángel Alcántara-Ortigoza, Dra. Benilde García-de Teresa, M. en C. Rehotbevely Barrientos-Ríos, Dra. Ariadna González-del Ángel

### RESUMEN

La fenilcetonuria (PKU), un error innato del metabolismo con patrón de herencia autosómico recesivo, se debe a la deficiencia de la fenilalanina hidroxilasa, enzima codificada por el gen *PAH* ubicado en 12q22. El espectro mutacional de este gen es amplio, y se han identificado genotipos diversos. Existen distintas estrategias experimentales que permiten realizar diagnóstico molecular del gen *PAH* para determinar las mutaciones causales de la fenilcetonuria en los pacientes afectados. La identificación del genotipo de *PAH* en estos pacientes permite brindar un asesoramiento genético adecuado, realizar correlación genotipo-fenotipo y en algunos casos ajustar el tratamiento.

En México existen pocos estudios sobre la epidemiología de las mutaciones de *PAH*. Actualmente se lleva a cabo un proyecto para la genotipificación de pacientes mexicanos con fenilcetonuria. Por ahora sólo se presenten resultados preliminares, se espera que este esfuerzo permita aclarar el espectro mutacional de *PAH*, identificar posibles correlaciones genotipo-fenotipo y elucidar el origen ancestral de las mutaciones identificadas.

**Palabras clave:** Fenilcetonuria, fenilalanina hidroxilasa, genotipo, espectro mutacional de *PAH*.

### ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an autosomic recessive inborn errors of metabolism. It is caused by the deficiency of phenylalanine hydroxylase, an enzyme encoded by the *PAH* gene in 12q22. This gene has a wide mutation spectrum and several different genotypes have been identified. There are many experimental strategies that allow molecular diagnosis of *PAH* in order to identify causal mutations in patients with phenylketonuria. The identification of the *PAH* genotype in these patients allows genetic counseling, genotype-phenotype correlation and for some cases treatment adjustment.

There are few studies concerning the mutation spectrum of *PAH* in Mexican patients. Currently, a study to identify the genotypes of these patients is being done. Only preliminary results are presented, nevertheless results are expected to clarify the mutation spectrum, enable the identification of possible genotype-phenotype correlations and elucidate the ancestral origin of the mutations.

**Key words:** Phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase, genotype, mutation spectrum of *PAH*.

**L**a fenilcetonuria (PKU, por sus siglas en inglés) es un error innato del metabolismo autosómico recesivo atribuible a la deficiencia de la enzima fenilalanina-hidroxilasa (*PAH*). La prevalencia

de esta enfermedad difiere en las distintas poblaciones y va de 1:2,600 en población turca, 1:10,000 en población caucásica y hasta de 1:200,000 en judíos Ashkenazi. Desafortunadamente en México se desconocen la prevalencia y la incidencia exactas.

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Pediatría, México.

Correspondencia: Dr. Miguel Ángel Alcántara-Ortigoza, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Pediatría, Av. IMAN Núm. 1, piso 9, colonia Insurgentes-Cuicuilco, Coyoacán. CP 04530, D.F., México.

Recibido: julio, 2012. Aceptado: octubre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Alcántara-Ortigoza MA, García-de Teresa B, Barrientos-Ríos R, González-del Ángel A. Aspectos generales y panorama actual del estudio molecular de la fenilcetonuria (PKU) en México. *Acta Pediatr Mex* 2012;33(6):324-328.

### BASES GENÉTICAS DE LA FENILCETONURIA

#### Gen *PAH*

A pesar de que la PKU y su modo de herencia fueron reconocidos en la primera mitad del siglo XX, tuvieron que pasar cerca de 50 años para que en 1985, el cDNA del gen *PAH* fuera clonado a partir de una biblioteca de hígado fetal humano y asignado a 12q22-q24.2 por estudios de hibridación. Fue necesario un año más para que se describiera la primera mutación causal de PKU.

El gen *PAH* consta de 13 exones distribuidos en 90 kb. Su transcripción está regulada por elementos ricos en GC y secuencias ricas en citosina, adenina y timina (caja CAT); se expresa primordialmente en hígado y en menor proporción en riñón, páncreas y cerebro. El mRNA es de 2.4 kb con un marco de lectura abierto de 1,359 nucleótidos que son traducidos a una proteína de 452 aminoácidos.

En el gen *PAH* se han descrito 31 variantes polimórficas no patogénicas. A partir del análisis de 7-8 sitios bialélicos tipo fragmentos de restricción de longitud polimórfica o RFLP y dos secuencias con repeticiones organizadas en tándem (VNTR y STR) se integran más de 70 haplotipos. El análisis de haplotipos ha sido de utilidad para el asesoramiento genético de las familias o para inferir el origen y la distribución de alelos PKU en diferentes poblaciones.

### Mutaciones en el gen *PAH*

El 98% de las hiperfenilalaninurias se debe a mutaciones patogénicas en el gen *PAH*. A la fecha se han descrito más de 550 mutaciones patogénicas en el gen *PAH* responsables de PKU. Prácticamente el 80% de estas mutaciones son del tipo puntual que cambian el aminoácido (sentido erróneo), generan un codón de paro prematuro (sin sentido) o afectan a los sitios donador o aceptor de empalme ('splicing') ubicados en los intrones. Mutaciones menos frecuentes son del tipo microdelecciones (13%), microinserciones (2%) y deleciones o duplicaciones de exones completos (<1%). Este último tipo de mutación es más frecuente en población checa e italiana y representa hasta 2 al 3% de los alelos PKU.

Debido al carácter autosómico recesivo de la enfermedad, los dos alelos *PAH* del paciente deben estar mutados. A causa de la amplia heterogeneidad genética de alelos *PAH* mutados, es raro encontrar homocigotos para una misma mutación; de hecho, el 75% de los pacientes con fenilcetonuria son heterocigotos compuestos. Esto quiere decir que el paciente tiene ambos alelos de *PAH* mutados pero que cada alelo porta una mutación distinta. La amplia heterogeneidad alélica que se observa en PKU es la razón por la que la predicción del fenotipo metabólico o de respuesta al cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), es muy compleja.

La base de datos donde se concentran las mutaciones del gen *PAH*, se encuentra disponible en <http://www.pahdb.mcgill.ca/>. Esta página es una iniciativa de contribución internacional que compila información sobre las mutacio-

nes de *PAH* y sus asociaciones fenotípicas a nivel proteico, metabólico, clínico y poblacional.

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA PKU

Existen diferentes estrategias que permiten la identificación de mutaciones en el gen *PAH*. Entre las principales metodologías útiles para el diagnóstico molecular de la PKU destacan:

#### 1. Análisis dirigido de mutaciones específicas

Se refiere a la búsqueda directa de una mutación conocida, sin investigar el resto de la secuencia del gen. La información obtenida por este método se limita únicamente a una sola mutación o a un grupo de mutaciones.

Esta estrategia se prefiere en poblaciones en las que la heterogeneidad alélica es baja o existe un efecto de fundador. En estos casos, es posible identificar prácticamente todas las mutaciones de *PAH* responsables del cuadro clínico de PKU a través del estudio dirigido de 10 a 15 mutaciones comunes en vez de las más de 550 descritas hasta el momento. Obviamente esta estrategia debe diseñarse específicamente con base al espectro mutacional, las frecuencias alélicas y genotípicas de la población a estudiar. Este tipo de estrategia tiene una eficiencia variable, que puede ir del 30 a 50% hasta un 96% de alelos PKU identificados.

#### 2. Tamiz de mutaciones en los 13 exones del gen *PAH*

Cuando la población a estudiar es muy heterogénea, no existe alguna mutación predominante o no se identificaron ambas mutaciones después de una búsqueda dirigida, se puede utilizar una estrategia de tamizaje.

Existen varias estrategias para llevar a cabo el tamizaje de mutaciones; sin embargo, debido a su certeza y rapidez, el método preferido para hacer este tipo de análisis está basado en la cromatografía líquida desnaturalizante de alto desempeño (DHPLC) aplicada a cada uno de los amplicones correspondientes a los 13 exones del gen *PAH*. Esta metodología ha sido aplicada al tamiz neonatal con una eficiencia de 99% para la identificación de mutaciones. Una vez que se identifica un patrón de retención anómalo en la columna del DHPLC de alguno de los exones, es necesario realizar secuenciación automatizada de dicho fragmento con el fin de caracterizar a la mutación.

### 3. Secuenciación automatizada de los 13 exones del gen *PAH*

La simplificación y automatización del procedimiento de secuenciación, aunado a la reducción de los costos de operación, permite hoy en día omitir el paso de tamizaje y realizar la secuenciación automatizada directa de los 13 exones de *PAH*. Mediante esta estrategia se logra identificar al 99% de las mutaciones del gen *PAH* responsables de la PKU.

### 4. Análisis de deleciones o duplicaciones de exones completos del gen *PAH*

Las deleciones o duplicaciones de exones completos del gen *PAH* representan menos del 1% de las mutaciones causantes de PKU. Sin embargo, cuando a pesar de haber estudiado la secuencia completa del gen *PAH*, sólo se identifica una mutación en un paciente con diagnóstico bioquímico y clínico confirmado de PKU, puede utilizarse un ensayo de amplificación múltiple de sondas ligadas o MLPA.

### 5. Análisis de ligamiento con marcadores intra y extragénicos del gen *PAH*

Finalmente, cuando en un paciente en quien se estableció claramente el diagnóstico clínico, bioquímico o ambos de PKU, pero no fue posible identificar las mutaciones causales, es posible realizar análisis de ligamiento utilizando marcadores intra o extragénicos para integrar haplotipos que permitan realizar diagnóstico prenatal o identificación de portadores.

## UTILIDAD DEL ESTUDIO MOLECULAR

Es importante resaltar que el estudio molecular del gen *PAH* no es un estudio de primera línea para el diagnóstico o para establecer el tratamiento a seguir en un paciente con PKU. Sin embargo, es una herramienta de gran utilidad para brindar asesoramiento genético oportuno a la familia y puede predecir algunos aspectos del tratamiento dietético del paciente o de la respuesta al cofactor BH<sub>4</sub>.

#### a) Asesoramiento genético

El diagnóstico molecular del gen *PAH* permite brindar asesoramiento genético de certeza a la familia a través de la detección inequívoca de portadores asintomáticos, ya que a diferencia de la determinación bioquímica, ésta

puede tener resultados inciertos o incorrectos por efecto de factores circadianos, dietarios u hormonales. Además, el estudio molecular permite realizar el diagnóstico molecular prenatal en familias afectadas.

#### b) Correlación genotipo-fenotipo

A pesar del espectro mutacional amplio en la PKU que implica una complejidad en la descripción de la correlación genotipo-fenotipo, ha sido posible establecer algunos lineamientos generales. El genotipo de *PAH* es el mayor determinante del fenotipo metabólico en las hiperfenilalaninurias, aunque lo es en menor grado en el fenotipo clínico. Al igual que en otras enfermedades autosómicas recesivas, en heterocigotos compuestos que portan una mutación severa y una leve, en general se espera que la mutación leve domine sobre la grave y se manifieste con un fenotipo bioquímico atenuado.

#### c) Tratamiento

Una aplicación relativamente novedosa de caracterizar el genotipo de *PAH* en un paciente con fenilcetonuria, tiene que ver con la predicción de respuesta al tratamiento con la suplementación con el cofactor BH<sub>4</sub> de la enzima PAH. Se ha descrito que la mayoría de los pacientes respondedores a BH<sub>4</sub> presentan alelos *PAH* con mutaciones condicionantes de variantes leves o moderadas de PKU o hiperfenilalaninurias. Así, existen mutaciones que predicen una respuesta favorable a la administración del cofactor BH<sub>4</sub>, tales como la p.R261Q, p.A403V y la p.Y414C, las cuales se identifican hasta en el 5% de los pacientes respondedores al cofactor. Sin embargo, existen casos con mutaciones en el dominio regulador de PAH, en quienes se han observado inconsistencias en la respuesta al cofactor BH<sub>4</sub> de persona a persona, aún con genotipos idénticos. Es por esto que la decisión de hacer una prueba terapéutica con BH<sub>4</sub> deberá hacerse independientemente del resultado obtenido en el estudio molecular.

Conocer el espectro mutacional de *PAH* en una población determinada puede permitir estimar la proporción de pacientes respondedores a BH<sub>4</sub>. Así, asumiendo que las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos mutantes de *PAH* se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg, se podría estimar que la proporción de pacientes respondedores a BH<sub>4</sub> en población europea y asiática (por ejemplo: Corea del Sur y China) sería de 55 a 57%. En vista de que en México aún no se describe el espectro mutacional de

*PAH*, no es posible por el momento realizar una estimación similar.

### ANTECEDENTES DEL ESTUDIO MOLECULAR DE FENILCETONURIA EN MÉXICO

En México no se cuenta con información epidemiológica sobre la PKU, aunque se ha podido estimar su incidencia en diferentes estados de la República. Similar a lo observado en algunos países europeos, como España, la incidencia de esta enfermedad también parece variar dramáticamente de una región del país a otra, ya que existen informes que muestran una incidencia de 1:6,000 en Jalisco, 1:60,000 en el Distrito Federal y 1:90,000 en Tabasco y Yucatán.

La región de los Altos de Jalisco es la localidad mexicana que aparenta una mayor incidencia de PKU. Una hipótesis para explicar este fenómeno sugiere un efecto de fundador por inmigración y contribución genética de la población del sur de España, una de las regiones con mayor incidencia a nivel mundial de PKU (1:10,000).

A la fecha sólo se han publicado dos estudios de genotipificación de alelos PKU en pacientes mexicanos. El primero identificó la mutación "IVS10" (c.1066-11G>A) en cinco de 14 alelos PKU analizados. El segundo estudio, incluyó seis pacientes con diagnóstico de PKU no relacionados. Se encontró que 42% de los alelos (5/12) correspondían a la mutación "IVS10". Con estos datos se sugirió la presencia de un efecto de fundador de la "IVS10", posiblemente relacionada al hecho de la inmigración documentada de poblaciones mediterráneas provenientes del sur de España en la región de Jalisco y del Bajío mexicano. Cabe mencionar que la "IVS10" conforma hasta el 20% de los alelos PKU en el sur de España. Sin embargo, estos estudios han comprendido pocos pacientes y se han descrito haplotipos diversos que no apoyarían un origen común o efecto de fundador de la mutación "IVS10" en población mexicana.

### ESTRATEGIA INICIAL Y RESULTADOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO MOLECULAR DE *PAH* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON PKU/HPA

Las mutaciones que se han descrito en el gen *PAH* se distribuyen a lo largo de sus 13 exones. La estrategia del estudio molecular de *PAH* en pacientes mexicanos, contempla la amplificación y subsecuente secuenciación

automatizada bidireccional de los 13 exones. A nivel mundial se ha señalado que dentro del exón 7 ocurren 20 a 30% de las mutaciones condicionantes de fenilcetonuria. Debido ello, durante el año 2011 decidimos iniciar el estudio molecular de fenilcetonuria a través de la secuenciación de dicho exón. A la fecha, se han captado 28 casos índice no relacionados de nacionalidad mexicana con niveles séricos de fenilalanina mayores de 120  $\mu\text{M/L}$ , que cuentan con la secuenciación automatizada completa del exón 7, el cual reveló mutaciones patogénicas al menos en cinco de ellos (Cuadro 1). De éstos, solamente en uno fue posible caracterizar los dos alelos PKU. Este paciente es heterocigoto compuesto para dos mutaciones leves que correlacionan con el fenotipo bioquímico de hiperfenilalaninemia moderada y además predice la posibilidad de respuesta al cofactor BH<sub>4</sub>. Este hallazgo indica que el exón 7 contiene sólo el 10% de las mutaciones (6 de 56 alelos PKU) en la muestra de pacientes analizada, lo cual contrasta con el 20 a 30% en otras poblaciones. Destaca también el hecho de que en ninguno de estos 28 pacientes, se detectó la mutación p.R261Q del exón 7, la cual junto con otras dos mutaciones (p.A403V y p.Y414C) se identifican en el 5% de los pacientes con PKU/hiperfenilalaninemia respondedores a BH<sub>4</sub>. Una vez que se haya realizado la secuenciación automatizada completa del gen *PAH* en cada uno de los pacientes, se buscará correlacionar el genotipo con la severidad de la hiperfenilalaninemia y en su caso, con la respuesta terapéutica al cofactor enzimático sapropterina.

### PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO MOLECULAR DE FENILCETONURIA EN MÉXICO

Los resultados obtenidos hasta ahora son preliminares. Por un lado, se espera que la caracterización del espectro de mutaciones de *PAH* en población mexicana permita aportar argumentos a la correlación del genotipo con la respuesta a BH<sub>4</sub> y con el fenotipo metabólico en nuestra población de estudio, situación que hasta el momento no se ha explorado en nuestro país. Con lo anterior, además se espera contribuir a la base mundial de datos de mutaciones del gen *PAH*. Por otro lado, con la finalidad de sustentar o excluir un posible efecto de fundador correlacionado con la historia de inmigraciones a regiones particulares de México, tenemos contemplado realizar en los pacientes y sus familias un análisis de haplotipos del gen *PAH*, aunado a

**Cuadro 1.** Mutaciones en el exón 7 del gen *PAH* documentadas a la fecha en cinco pacientes mexicanos con fenilcetonuria (PKU)/hiperfenilalaninemia (HPA) no relacionados entre sí, con seguimiento y tratamiento dentro del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz del Instituto Nacional de Pediatría. Destaca la presencia de mutaciones ya señaladas en otras poblaciones y un paciente cuyo fenotipo metabólico (hiperfenilalaninemia moderada) correlaciona con la presencia de un genotipo heterocigoto compuesto para dos mutaciones "leves", que además predicen respuesta a  $BH_4$ .

Mutación / Dominio <i>PAH</i>	Tipo de HPA documentada en el paciente. Genotipo	Predicción fenotipo metabólico (% actividad <i>PAH</i> )	Predicción respuesta a $BH_4$	Regiones o países en las que la mutación ha sido reportada
p.Arg241His CATALÍTICO	1 paciente c/ HPA moderada [p.Arg241His] + [p.Arg243Gln]	PKU leve (23%)	PROBABLE	Americana Europa Oriental Mediterráneo Turquía
p.Arg243Gln CATALÍTICO		PKU moderada a clásica (23%)	PROBABLE	Europa (España) Asia (Corea)
p.Arg243X CATALÍTICO	1 paciente c/PKU clásica [p.Arg243X]+[?]	PKU clásica (1%)	IMPROBABLE	Europa (España) Australia Rusia, Irán
p.Arg261X CATALÍTICO	1 paciente c/PKU clásica [p.Arg261X]+[?]	PKU clásica (1%)	IMPROBABLE	Europa Oriental Mediterráneo
c.842+1G>A (IVS7+1G>A) Intrónica	2 pacientes c/ PKU clásica [IVS7+1G>A]+[?]:	PKU clásica (?)	NO DETERMINADA	Europa (España) Norteamérica Australia

un análisis de los ancestros con marcadores de ascendencia (AIM's). Este tipo de análisis junto con la identificación de mutaciones nuevas, podría apoyar la presencia de alelos PKU originados en poblaciones diferentes a la europea, tales como la nativa americana, situación que ya ha sido documentada para otras entidades metabólicas.

Finalmente, en los casos en que el curso clínico, bioquímico o ambos, basado en un análisis de pterinas, sugiera la presencia de una hiperfenilalaninemia no relacionada al gen *PAH*, se realizará la genotipificación de los genes codificantes de las enzimas responsables de la síntesis y el reciclaje del cofactor  $BH_4$  (guanosin-trifosfato ciclohidrolasa o GTPCH, 6-piruvilo tetrahydrobiopterina-sintetasa o PTPS, dihydrobiopterina reductasa o DHPR y 4-pterina acarbinolamina dehidratasa o PCD). Con este análisis se informará la proporción de hiperfenilalaninemias no rela-

cionadas al gen *PAH* en población mexicana, las cuales a nivel mundial condicionan cerca del 2% de todas las hiperfenilalaninemias.

#### LECTURAS RECOMENDADAS

- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. Lancet 2010;376(9750):1417-27.
- Mitchell JJ, Scriver CR. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. GeneReviews. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1504/>
- Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Monroy-Santoyo S, Fernández-Lainez C, Guillén-López S, Belmont-Martínez L y cols. Modelo de atención inicial de la fenilcetonuria y otras hiperfenilalaninemias en el Instituto Nacional de Pediatría. Acta Pediatr Mex 2010;31:297-303.
- Velázquez A, Bilbao G, González-Trujillo JL, Hernández D, Pérez-Andrade ME, Vela M, et al. Apparent higher frequency of phenylketonuria in the Mexican state of Jalisco. Hum Genet 1996;97:99-102.