

## Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en hiperfenilalaninemias

L.N.C.P. Sara Guillén-López, \* L.N. Romina Rodríguez-Schmidt, \*\* Dra. Marcela Vela-Amieva \*

### RESUMEN

Los pacientes con hiperfenilalaninemia (HFA) deben restringir el consumo de alimentos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI-CL) como los de origen animal, lo cual puede propiciar deficiencias causantes de trastornos neurológicos, que no se explican con las variaciones en las concentraciones de fenilalanina en sangre. Se ha demostrado que los pacientes con HFA se benefician con suplemento de ácido docosahexaenoico (DHA), ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPI-CL) esencial que cumple diversas funciones en el cerebro y la retina. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la dosis y las fuentes de DHA, en las distintas etapas de la vida.

**Palabras clave:** Hiperfenilalaninemias, ácidos grasos de cadena larga, ácido docosahexaenoico

### ABSTRACT

Patients with hyperphenylalaninemia (HFA) must follow a restricted protein diet, which deprives them of natural dietary sources of polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) that lead to neurological deficits, not related to high phenylalanine blood levels. There is strong evidence of the benefits of docosahexaenoic acid (DHA) supplement, a long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) that has several essential roles in the brain and in the retina. More studies are required to determine the DHA dosage and its sources at different stages of life in this HFA patients.

**Key words:** Hyperphenylalaninemia, long chain fatty acids, docosahexaenoic acid

**L**as hiperfenilalaninemias (HFA) son los errores innatos del metabolismo (EIM) de los aminoácidos más comunes, con una incidencia de 1 en 15,000 recién nacidos vivos en Norteamérica.<sup>1</sup> Tienen un patrón hereditario autosómico recesivo; se caracterizan por la imposibilidad que tienen los pacientes de metabolizar la fenilalanina (Phe).<sup>2</sup> La etiología de las HFA, se debe en 98% de los casos, a mutaciones en el gen que codifica la fenilalanina-hidroxilasa (FAH); en 1 a 2%, a defectos en las enzimas involucradas en la síntesis o regeneración del cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>),

tanto para la FAH como para la tirosina-3-hidroxilasa y triptófano-5 hidroxilasa.<sup>3-5</sup> Las HFA se clasifican según la concentración sérica de PHE, como sigue: fenilketonuria (PKU) clásica, concentraciones > 1200 µmol/L (>20 mg/dL); PKU leve, >600-1200 µmol/L (10-20 mg/dL); HFA no fenilketonúrica, 120-299 µmol/L (2-10mg/dL).<sup>1,6</sup>

La complicación principal de la PKU es el retraso mental, pero puede haber otros signos clínicos como hiperactividad, hipopigmentación, retraso del lenguaje, erupciones cutáneas, y convulsiones.<sup>7</sup>

El tratamiento principal consiste en la restricción dietética de la ingestión de Phe, además de un suplemento con fórmulas elementales exentas de PHE, adicionadas con vitaminas y nutrimentos inorgánicos. Éstas son la fuente proteica de mayor importancia.<sup>7</sup> Al ser los alimentos de origen animal las principales fuentes de ácido docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3) y estar prácticamente eliminados de la dieta, es común que haya deficiencia de ambos. El contenido elevado de DHA en los fosfolípidos de las membranas de la corteza cerebral y de la retina, podría explicar el papel esencial que juega este ácido graso en la función de estos órganos.<sup>8</sup>

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) son componentes indispensables de los lípi-

\* Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz

\*\* Licenciada en Nutrición y Ciencia de los Alimentos.  
Instituto Nacional de Pediatría.

Correspondencia: L.N.C.P. Sara Guillén-López, Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Av. IMAN # 1- 9° piso, Col. Insurgentes-Cuicuilco, Del. Coyoacán, C.P. 04530, México, D.F. (55)56-06-32-31. Correo electrónico: sara\_guillen@hotmail.com  
Recibido: julio, 2012. Aceptado: octubre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Guillén-López S, Rodríguez-Schmidt R, Vela-Amieva M. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en hiperfenilalaninemias. Acta Pediatr Mex 2012;33(6):335-339.

dos estructurales en todas las células y en las membranas celulares a las cuales confiere fluidez.<sup>9</sup> El DHA y el ácido araquidónico (AA, C20:4 n-6) son derivados de los ácidos grasos esenciales alfa-linolénico (ALA) y linoléico (LA), que pertenecen a la familia de los AGPI-CL. Los tejidos animales no pueden sintetizar AGPI-CL de las familias n-3 y 6 debido a la incapacidad enzimática para introducir dobles enlaces en posiciones proximales al carbono 9 de las estructuras lipídicas.<sup>10</sup>

Para la síntesis de DHA y AA, sus respectivos ácidos grasos precursores ALA y LA son transformados en una cadena hidrocarbonada de mayor longitud y con una cantidad más elevada de dobles enlaces, que se lleva a cabo a través de la elongación e insaturación enzimática.<sup>11</sup> El ALA es convertido en ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5 n-3) y posteriormente en ácido docosahexaenoico, por otra parte el ácido linoléico es convertido en ácido araquidónico.<sup>12-14</sup> En este proceso las enzimas responsables compiten por un mismo sustrato, que son los ácidos grasos n-3 y 6.<sup>15,16</sup> (Figura 1)

En el proceso enzimático de conversión de ALA y LA en DHA y AA, se ven implicados diversos aspectos que comprometen la eficiencia de estas reacciones. Las enzimas implicadas en estas reacciones, son la  $\Delta^5$  y  $\Delta^6$  desaturasas y la elongasa. Estas enzimas tienen mayor afinidad hacia los AGPI-CL de la familia n-3, pero debido a que los AGPI-CL n-6 se ingieren en mayor proporción, se promueve la síntesis de mayores cantidades de AA.<sup>15</sup>

Los pacientes con PKU ingieren grandes cantidades de LA. Cornejo y cols. observaron en niños chilenos que la ingestión de LA se eleva hasta un 13% de la calorías totales, siendo la recomendación de 3 a 8%.<sup>17</sup> También hallaron una relación de LA y ALA de 115:1. En población mexicana aún no existen datos respecto a esta proporción. La desproporción entre la ingestión de ALA y LA, inhibe la conversión endógena de ALA a DHA. Esto se debe al mecanismo de competencia de sustrato que presentan las  $\Delta^5$  y  $\Delta^6$  desaturasas. Las fuentes dietéticas de LA existen en una gran variedad de alimentos, que se incluyen frecuentemente en la dieta de los pacientes con HFA. Existe una relación óptima para la conversión de ALA en DHA, ésta se ha establecido en 1 ALA: 7 LA. También es de gran importancia mantener bajo el porcentaje del aporte calórico proveniente de LA en la dieta.<sup>18,19</sup>

Se ha sugerido que los metabolitos que se sintetizan a partir del exceso de PHE, como el ácido fenilpirúvico y el

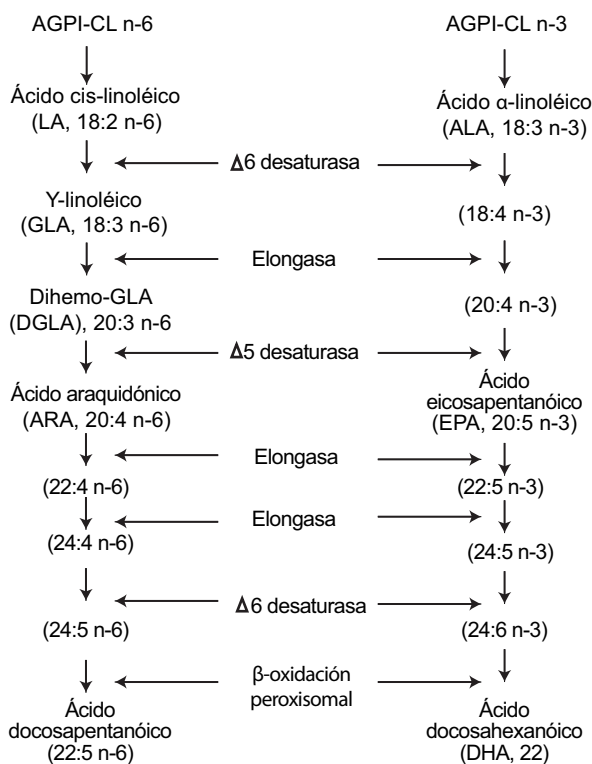
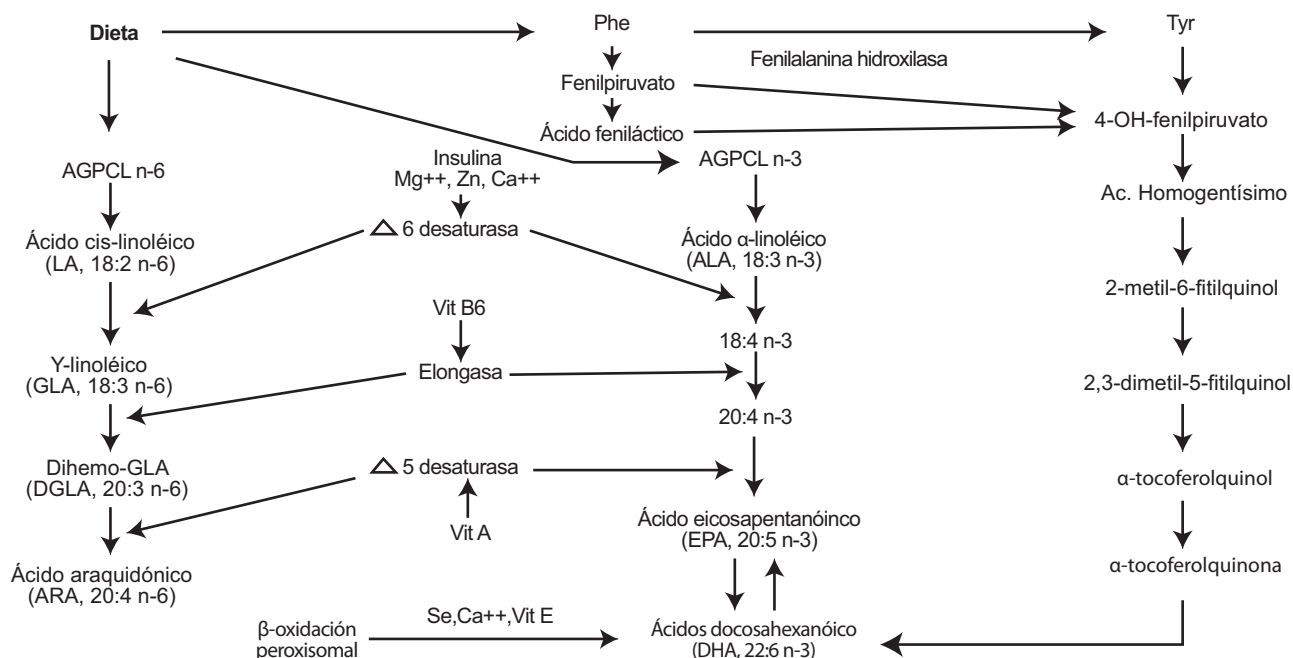


Figura 1.

ácido feniláctico, son inhibidores de la vía metabólica para la síntesis de DHA, que pueden contribuir a una reducción de los niveles de éste en el cerebro, y que probablemente tengan un papel importante en las complicaciones neurofisiopatológicas de la PKU. La hipótesis propuesta por Infante y cols,<sup>20</sup> (Figura 2) postula que la deficiencia de DHA de los pacientes con HFA, se basa en una inhibición de la síntesis de  $\alpha$ -tocoferolquinona ( $\alpha$ -TQ) y en las bajas concentraciones de carnitina. La misma hipótesis también sugiere que la síntesis de  $\alpha$ -TQ puede verse comprometida por los bajos niveles de tirosina que caracterizan a los pacientes con PKU. La Phe y la tirosina (Tyr) son aminoácidos que deben ser cuantificados, ya que un exceso de Phe produce metabolitos tóxicos que pueden interferir en la síntesis de DHA. Por otro lado la Tyr es un precursor del ácido homogentísico, indispensable en la vía de síntesis de la  $\alpha$ -TQ.

La Tyr se convierte en 4-hidroxifenilpiruvato, a través de la transaminación y éste, por medio de la dioxigenasa hepática, en ácido homogentísico (2,5-dihidroxifenilacetato). El ácido fenilpirúvico tiene una estructura similar al 4-hidroxifenilpiruvato por lo que existe una inhibición



**Figura 2.** Ruta bioquímica de la Phe y del DHA.

competitiva de la dioxigenasa. El ácido homogentísico es un intermediario fundamental en la vía de síntesis de la  $\alpha$ -TQ. El ácido homogentísico sufre una descarboxilación y prenilación para formar 2 metil-6-fitoquinol; posteriormente 2,3 dimetil-5-fetilquinol; este compuesto se transforma en  $\alpha$ -tocoferolquinol el cual se oxida para dar  $\alpha$ -TQ, y funciona como cofactor donando electrones a las enzimas desaturasas, que también se sabe son dependientes de las concentraciones de vitaminas como la E y nutrientes inorgánicos como el selenio.<sup>21</sup>

El selenio juega un papel importante en la desaturación de los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3, participando en el complejo de desaturasas peroxisomal. Por lo tanto el selenio es indispensable en la conversión de ácido eicosapentaenoico a DHA.<sup>21</sup> El 2-hidroxifenilacetato, un metabolito de la Phe se encuentra elevado inclusive en pacientes en tratamiento con restricción de Phe. Este metabolito, junto con el ácido fenilpirúvico, son potentes inhibidores por acción de competición de sustrato de la enzima dioxigenasa; la síntesis de  $\alpha$ -TQ se ve afectada por acción de estos metabolitos. La  $\alpha$ -TQ es necesaria como cofactor donador de electrones en el proceso de desaturación.<sup>20</sup>

Infante y cols. también proponen que el AA y el DHA son metabolizados por desaturasas mitocondriales depen-

dientes de carnitina. La carnitina es una proteína necesaria para transportar los precursores de los ácidos grasos esenciales: los grupos acetil del citoplasma y peroxisomas a la mitocondria, por lo cual los niveles adecuados de carnitina promueven una adecuada síntesis de novo de DHA. En diversos estudios<sup>22,23</sup> se ha comprobado que los pacientes con PKU tienen niveles más bajos de carnitina libre (C0) que sus controles sanos. Esto se debe a una ingestión dietética insuficiente, ya que inclusive los pacientes que consumen fórmulas libre de Phe adicionadas con carnitina, muestran valores significativamente menores que los controles sanos.

En la década de los años 90 surgieron las primeras investigaciones que mostraron reducción de los niveles plasmáticos y eritrocitarios de DHA en niños con PKU, comparados con controles sanos.<sup>24,25</sup> Moseley y cols. en 2002 estudiaron pacientes con PKU de edades entre los 10 y 50 años (dos adolescentes y 25 adultos) y los compararon con una población sana. Observaron una reducción moderada en los niveles de DHA y AA en los primeros.<sup>26</sup> Por otro lado Lage y cols. estudiaron tres grupos de seis a 42 años de edad. Concluyeron que los niveles de DHA, EPA y AGPI-CL n-3 se encuentran significativamente reducidos en los pacientes con PKU comparados con los controles sanos.<sup>27</sup>

Debido a esto se planteó la necesidad de suplementar con ácidos grasos esenciales a los pacientes con HFA, por lo que se realizó un estudio utilizando aceite de pescado en un grupo y aceite de semilla de grosella negra, en otro grupo durante seis meses. Compararon los niveles de ácidos grasos antes de dar el suplemento y encontraron un aumento generalizado de los AGPCL n-3, independientemente de la fuente empleada.<sup>24</sup> En dos estudios prospectivos aleatorizados de casos y testigos de pacientes fenilketonúricos con edades entre cero y diez años; se administró una fórmula libre de Phe adicionada con AGPI-CL y otra exenta de estos ácidos grasos. El resultado en ambos fue un aumento en las concentraciones de DHA en la población que recibió suplemento.<sup>28, 29</sup>

Pöge y cols., observaron bajas concentraciones de DHA únicamente en el grupo de edad de uno a seis años; concluyeron que las bajas concentraciones en dicho grupo se deben a un estricto control dietético, el cual se sabe es más frecuente en esta edad.<sup>30</sup> Existen evidencias que señalan que cuando se recurre al suplemento con DHA, mejora la función visual de los pacientes con PKU en comparación a la población que recibe placebo.<sup>31,32</sup> Además, Beblo y cols. observaron mejoría en las habilidades motoras finas.<sup>33</sup>

Yi y cols.<sup>34</sup> estudiaron una población de mujeres con PKU en edad reproductiva; incluyó pacientes desde los 12 años de edad. Se midieron niveles bajos de DHA en plasma y eritrocitos, en comparación a los controles. Estos resultados no se correlacionaron con los niveles séricos de PHE. Por otro lado los niveles controlados de PHE y los de DHA sí se correlacionaron de forma positiva con las habilidades verbales en estas pacientes.

Sin embargo, Acosta y cols. concluyeron que la reducción en los niveles de DHA y ácido eicosapentaenoico en pacientes con PKU es poco significativa comparados con los controles sanos, ya que no se presenta una deficiencia evidente de ácidos grasos esenciales.<sup>35</sup>

Otra investigación coincide en que los pacientes con PKU no muestran signos clínicos que evidencien una deficiencia de ácidos grasos esenciales, aunque señala que la baja en las concentraciones de AGPI-CL cuantificadas en estos pacientes, tiene una etiología aún no identificada por completo.<sup>36</sup> Un estudio realizado en pacientes de 9 a 14 años con PKU que reciben tratamiento dietético; un grupo de pacientes con HFA leve sin restricción dietética y otro de controles sanos. Los pacientes con HFA, tienen menores concentraciones de DHA que los individuos sanos,

aun cuando ambos grupos llevaron una dieta similar, lo que sugiere que existen otros factores además de la dieta, involucrados en la deficiencia de DHA como podría ser la inhibición en la síntesis de  $\alpha$ -TQ.<sup>37</sup>

En algunos estudios se ha observado que pacientes con HFA a pesar de recibir un tratamiento temprano basado en la restricción de Phe, siguen teniendo algunas deficiencias neurológicas funcionales que no pueden ser explicadas por las variaciones en las concentraciones de Phe séricas y que posiblemente sean resultado de una deficiencia de DHA.<sup>38,39</sup> Si bien la dosis óptima tanto de EPA como de DHA aún no han sido definidas para pacientes con HF existen diversos estudios que sugieren dosis hasta de 15 mg/kg/d en niños, sin embargo cabe precisar las recomendaciones y las fuentes de los suplementos en las diferentes etapas de la vida.<sup>10,31-33.</sup>

En conclusión es evidente la necesidad de suplementar fuentes de DHA en la dieta de los pacientes con HFA desde el principio del tratamiento. Actualmente existen fórmulas sin fenilalanina adicionadas con este ácido graso esencial, sin embargo son necesarios más estudios que proporcionen beneficios específicos, mecanismos de acción, dosis y fuentes de los suplementos, en las distintas edades de los pacientes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2001 p.1015-75.
2. Ramírez-Farías C, Pérez-Andrade ME, Ibarra-González I, Vela-Amieva M. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. *Acta Pediatr Mex* 2007;28(6):261-9.
3. Scriver C, Kaufmann S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1667-724.
4. Cornejo V, Raimann E. Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos: Hiperfenilalaninemias. En: Colombo M, Cornejo V, Raimann E. Errores innatos en el metabolismo del niño. 1ª edición, Santiago de Chile: 2009. p. 59-65.
5. Smith I, Phillip L. The hyperphenylalaninemias, In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G ed. Inborn Metabolic Diseases, diagnosis and treatment. 3rd edition. Germany: Springer-Verlag; 2000. p.172-83.
6. Acosta P, Michals Matalon K. Nutrition management of patients with inherited disorders of aromatic aminoacid metabolism. In: Acosta P. Nutrition Management of Patients with inherited metabolic disorders. Sudbury MA: Jones and Barlett Publishers; 2010: p.119-174.
7. van Spronsen FJ. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6:509-14.

8. Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* 1988;8:517-41.
9. Undurti N. Das. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 2006;1:420-39.
10. Koletzko B, Beblo S, Demmelmair H, Hannebutt FL. Omega-3 LC-PUFA Supply and Neurological Outcomes in Children with Phenylketonuria (PKU). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(1):S2-7.
11. Uauy R, Dangour AD. Fat and Fatty Acid Requirements and Recommendations for Infants of 0-2 Years and Children of 2-18 Years. *Ann Nutr Metab* 2009;55:76-96.
12. Koletzko B, Decsi T, Demmelmair H. Arachidonic acid supply and metabolism in human infants born at full term. *Lipids* 1996;31:79-83.
13. Uauy R, Hoffman DR. Essential fatty acid requirements for normal eye and brain development. *Semin Perinatol* 1991;15:449-55.
14. Salem N Jr, Wegher B, Mena P, Uauy R. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:49-54.
15. Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:581-97.
16. Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 2005;26:S70-5.
17. Cornejo V, Concha M, Cabello JF, Raimann E. Composición Lipídica de la Dieta de Niños Fenilketonúricos Diagnosticados Precozmente. *ALAN* 2005;55(4):332-5.
18. Goyens P, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP. Conversion of linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am J Clin Nutr* 2006;84:44-53.
19. Rose HJ, White F, MacDonald A, Rutherford PJ, Favre E. Fat intakes of children with PKU on low phenylalanine diets. *J Hum Nutr Dietet* 2005;18:395-400.
20. Infante JP, Huszagh V. Impaired arachidonic (20:4n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acid synthesis by phenylalanine metabolites as etiological factors in the neuropathology of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001;72:185-98.
21. Infante JP. Vitamin E and selenium participation in fatty acid desaturation: a proposal for an enzymatic function of these nutrients. *Mol Cell Biochem* 1986;69(2):93-108.
22. Weigel C, Kiener C, Meier N, Schmid P, Rauh M, Rascher W, Knerr I. Carnitine status in early-treated children, adolescents and young adults with phenylketonuria on low phenylalanine diets. *Ann Nutr Metab* 2008;53(2):91-5.
23. Vilaseca MA, Briones P, Ferrer I, Campistol J, Riverola A, Castillo P, Ramon F. Controlled diet in phenylketonuria may cause serum carnitine deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1993;16(1):101-4.
24. Galli C, Agostoni C, Mosconi C, Riva E, Salari, P, Giovannini M. Reduced plasma C-20 and C-22 polyunsaturated fatty acids in children with phenylketonuria during dietary intervention. *J Pediatr* 1991;119:562-7.
25. Sanjurjo P, Perteagudo L, Rodriguez Soriano J, Vilaseca A, Campistol J. Polyunsaturated fatty acid status in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 1994;17:704-9.
26. Moseley K, Koch R, Moser B. Lipid status and long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations in adults and adolescents with phenylketonuria on phenylalanine-restricted diet. *J Inherit Dis* 2002; 25:54-64.
27. Lage S, Bueno M, Andrade F, Prieto JA, Delgado C, Legarda M, et al. Fatty acid profile in patients with phenylketonuria and its relationship with bone mineral density. *J Inherit Metab Dis* 2010. DOI 10.1007/s10545-010-9189-0.
28. Cleary MA, Feillet F, White FJ, Vidailhet M, Macdonald A, Grimsley A, Maurin N, et al. Randomised controlled trial of essential fatty acid supplementation in phenylketonuria. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(7):915-20.
29. Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H, Herzog M, von Schenck U, Böhles H, et al. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants with phenylketonuria: a randomized controlled trial. *J Inherit Metab Dis* 2006;30(3):326-32.
30. Pöge A, Bäumann K, Müller E, Leichsenring M, Schmidt H, Bremer H. Long-chain polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocyte membrane lipids of children with phenylketonuria alter controlled linoleic acid intake. *J Inher Metab Dis* 1998;21:373-81.
31. Agostoni C, Massetto N, Biasucci G, Rottoli A, Bonvissuto M, Bruzzese MG, et al. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty acid status and visual function in treated children with hyperphenylalaninemia. *J Pediatr* 2000;137(4):504-9.
32. Agostoni C, Verduci E, Massetto N, Fiori L, Radaelli G, Riva E, et al. Long term effects of long chain polyunsaturated fats in hyperphenylalaninemic children. *Arch Dis Child* 2003;88(7):582-3.
33. Beblo S, Reinhardt H, Demmelmair H, Muntau AC, Koletzko B. Effect of fish oil supplementation on fatty acid status, coordination, and fine motor skills in children with phenylketonuria. *J Pediatr* 2007;150(5):479-84.
34. Yi SH, Kable JA, Evatt ML, Singh RH. A cross-sectional study of docosahexaenoic acid status and cognitive outcomes in females of reproductive age with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2011;34(2):455-63.
35. Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, Eisas II LJ, Kennedy MJ, Bernstein L, Rohr F, et al. Intake and Blood Levels of Fatty Acids in Treated Patients With Phenylketonuria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33(3):253-9.
36. LaVoie SM, Harding CO, Gillingham MB. Normal fatty acid concentrations in young children with phenylketonuria (PKU). *Top Clin Nutr* 2009;24(4):333-40.
37. Giovannini M, Verduci E, Radaelli G, Lammardo A, Minghetti D, Cagnoli G, Salvatici E, Riva E. Long chain polyunsaturated fatty acids profile in plasma phospholipids of hyperphenylalaninemic children on unrestricted diet, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2011;84(1-2):39-42.
38. Burgard P, Schmidt E, Rupp A, Schneider W, Bremer HJ. Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155(Suppl 1): S33-38.
39. Stermerdink BA, Kalverboer AF, van der Meere JJ, van der Molen MW, Huisman J, de Jong LW, Sliiper FM, Verker PH, van Spronsen FJ. Behaviour and school achievement in patients with early and continuously treated phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:548-562.