

TERAPIAS NUTRICIONALES NOVEDOSAS Y OTROS ENFOQUES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON FENILCETONURIA.

NOVEL NUTRITIONAL THERAPIES AND OTHER APPROACHES USED IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA.

YUNIESKY GONZÁLEZ MUÑOZ^{1,A}, CAROLINA PALOMINO CAMARGO^{1,B},
ELEVINA PÉREZ SIRA^{1,C}, ANTONIETA MAHFOUD HAWILOU^{2,D}.

Enviar correspondencia a:

Lic. Yuniesky González Muñoz.

Dirección física: Ave. Suapure, Colinas de Bello Monte, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Email: yunieskygm@yahoo.es

1-Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas-Venezuela.

2-Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas-Venezuela.

a-Candidato a Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA-UCV). Licenciado en Ciencias de los Alimentos, Universidad de la Habana-Cuba.

b-Doctorando en Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA-UCV). Magíster Scientiarum en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA-UCV). Licenciada en Biología-Mención Tecnología de los Alimentos (UCV).

c-Dra. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA-UCV). Master of Science, Major: Food Science and Nutrition, University of Wisconsin-Stout US. Licenciada en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV).

d-Directora de Salud del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Investigadora de la Unidad de Estudio de Errores Innatos del Metabolismo (IDEA). Especialista en Pediatría y Neurología Infantil. Médico – Facultad de Medicina de la UCV. Caracas, Venezuela.

RESUMEN

El tratamiento dietético tradicional de los pacientes con fenilcetonuria (PKU) ha constituido, desde sus inicios, un gran éxito para la prevención del retraso mental generado por la acumulación de fenilalanina en la sangre. Sin embargo, la dieta baja en fenilalanina representa una carga que muchas veces dificulta su seguimiento y, a su vez, se le atribuye a estos pacientes cierta deficiencia nutricional. Todo ello constituye uno de los motivos por los cuales se hace necesaria la búsqueda de terapias alternativas que mejoren el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con PKU. Se han desarrollado actualmente diversos enfoques novedosos, tanto desde el punto de vista nutricional como no nutricional. Un ejemplo de ello lo constituye la suplementación de la dieta con aminoácidos neutros grandes y la utilización de glicomacropéptidos en el desarrollo de alimentos nutricionalmente completos, por el rol que desempeñan en el restablecimiento de los niveles de fenilalanina. Asimismo, la implementación de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga tiene un papel importante en el desarrollo neurológico de los pacientes. Adicionalmente, se han desarrollado terapias encaminadas a aumentar o suplantar la actividad de la fenilalanina hidroxilasa, como es el caso de la administración de tetrabiopterina o fenilalanina amonioliasa que representan, para algunos pacientes, una solución alejada de una dieta estricta. Además, investigaciones preclínicas de terapias génicas y celulares para PKU están en curso. El presente trabajo tiene la finalidad de revisar el conocimiento actual sobre las terapias nutricionales novedosas y otros enfoques utilizados en el tratamiento de pacientes con PKU.

Palabras Clave: Fenilcetonuria, terapias nutricionales novedosas, tratamientos farmacológicos novedosos.

English

Português

NOVEL NUTRITIONAL THERAPIES AND OTHER APPROACHES USED IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA.

SUMMARY

The traditional dietary treatment of Phenylketonuria (PKU) has resulted in great success in the prevention of mental retardation caused by the accumulation of Phenylalanine in the blood. However, patients often find it difficult to follow the low-Phenylalanine diet, which still carries risk of associated nutritional deficiencies. This is one of the reasons why it is necessary to seek alternative therapies that improve the prognosis and quality of life of PKU patients. Several new approaches have recently been developed, both from a dietary and no-dietary point of view. An example of these is the dietary supplementation of large neutral amino acids and the use of glycomacropptide in the production of nutritionally complete foods, because of the role they play in the restoration of Phenylalanine levels. Furthermore, the introduction of long-chain polyunsaturated fatty acids plays an important role in the patients' neurological development. Further therapies have been developed that increase or replace the activity of Phenylalanine hydroxylase, such as the administration of Phenylalanine ammonia-lyase or tetrabiopterin, which may offer some patients a solution to a strict diet. In addition, preclinical research of gene and cell-based therapies for the treatment of PKU are underway. The aim of this paper is to review current knowledge about new nutritional therapies and other new approaches used in the treatment of PKU patients.

Keywords: Phenylketonuria, new nutritional therapies, new drug therapies

TERAPIAS NUTRICIONAIS INOVADORAS E OUTROS ENFOQUES UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM FENILCETONÚRIA

RESUMO

O tratamento dietético tradicional dos pacientes com fenilcetonúria (PKU) tem constituído, desde o seu começo, um grande sucesso para a prevenção do atraso mental gerado pela acumulação de fenilalanina no sangue. No entanto, a dieta baixa em fenilalanina representa uma carga que muitas vezes dificulta o seu acompanhamento, e por sua vez, atribui-se a estes pacientes certa deficiência nutricional. Tudo isto constitui um dos motivos pelos quais se faz necessária a busca de terapias alternativas que melhorem o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com PKU. Foram desenvolvidos atualmente diversos enfoques inovadores, tanto a partir do ponto de vista nutricional quanto não nutricional. Um exemplo disso é suplementação da dieta com aminoácidos neuro grandes e a utilização de glicomacropéptidos no desenvolvimento de alimentos nutricionalmente completos, pela função que desempenham no restabelecimento dos níveis de fenilalanina. Além disso, a implementação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa tem um papel importante no desenvolvimento neurológico dos pacientes. Adicionalmente, foram desenvolvidas terapias encaminhadas para aumentar ou substituir a atividade da fenilalanina hidroxilase, como é o caso da administração de tetrabiopterina ou fenilalanina amonioliase que representam, para alguns pacientes, uma solução distante de uma dieta estrita. Além disso, pesquisas pré-clínicas de terapias gênicas e celulares para PKU estão em curso. O presente trabalho tem a finalidade de revisar o conhecimento atual sobre as terapias nutricionais inovadoras e outros enfoques utilizados no tratamento de pacientes com PKU.

Palavras-chave: Fenilcetonúria, terapias nutricionais inovadoras, tratamentos farmacológicos inovadores

1. INTRODUCCIÓN

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) incluyen trastornos bioquímicos hereditarios, en los cuales un defecto en una enzima específica interfiere con el metabolismo normal de las proteínas, grasas, o de los carbohidratos. Como resultado de la ausencia o disminución de la actividad enzimática, ciertos componentes se acumulan en el cuerpo alcanzando niveles tóxicos que, de no ser tratados, pueden conducir al desarrollo de consecuencias que oscilan entre el deterioro intelectual a daños cognitivos diversos e incluso la muerte. Mediante la identificación temprana y la iniciación del tratamien-

to, muchos de estos errores pueden ser mitigados o prevenidos. Para numerosos EIM la estrategia del tratamiento subyace en la provisión de alimentos médicos especializados y suplementos dietarios.¹⁻⁴

La fenilcetonuria es un EIM de las proteínas, las cuales están compuestas de diversos aminoácidos, y uno de ellos es la fenilalanina (Phe, por sus siglas en ingles). Este aminoácido es un nutriente esencial utilizado por el organismo para formar las proteínas de los músculos, neurotransmisores, hormonas, enzimas digestivas, anticuerpos, etcétera. Por consiguiente, es importante

que el organismo tenga una cierta cantidad de Phe, aunque es significativo que no exista un exceso de este aminoácido.^{5,6}

La nutrición juega un papel importante en el manejo de los EIM^{1,7,8}. En el caso específico de la fenilcetonuria (PKU, por sus siglas en inglés), el principal tratamiento que se ha llevado a cabo, por años, está basado en la introducción de una dieta baja en fenilalanina.^{5,9} Esta dieta, que tiene el fin de mantener niveles de Phe en límites seguros, se inicia en el periodo neonatal mediante el suministro de fórmulas especiales sin Phe o una mezcla de aminoácidos, que aporten las necesidades requeridas de proteínas y energía.^{1,5} Sin embargo, para los pacientes con PKU, en la mayoría de los casos, los productos desarrollados no son lo apropiadamente palatables. Esto constituye una de las tantas razones por las cuales se buscan nuevos sustitutos proteicos bajos en fenilalanina.^{1,10} Adicionalmente, el hecho de disponer de tratamientos que permitan el uso de una dieta sin restricciones en Phe o que, al menos, se aproxime a la dieta generalmente utilizada por las personas libres de PKU, representa una solución ideal en estos pacientes.^{10,11} Por ello, investigar sobre las nuevas alternativas al tratamiento dietario y mejorar la composición y presentación de los productos dietéticos ha sido el objetivo de diversas investigaciones en los últimos años.¹⁰⁻¹² En este sentido, el presente trabajo tiene el propósito de presentar información actualizada sobre las diversas terapias nutricionales y no nutricionales utilizadas en el tratamiento de los pacientes PKU.

2. GENERALIDADES DE LA FENILCETONURIA (PKU)

2.1. Descubrimiento de la PKU

En la primavera de 1934, la señora Borgny Egeland, madre de dos hijos de 4 y 6 ½ años, muy preocupada por el retraso mental que ambos presentaban, asociado a un intenso olor peculiar, había consultado en diversas instituciones sin obtener la ayuda o solución esperada. El padre (Harry Egeland) era dentista y padecía de asma grave; no podía entrar en la habitación de los niños debido a que el fuerte olor le provocaba una reacción asmática. Le sugirieron que se pusiera en contacto con el Dr. Ivar Asbjørn Følling (Fisiólogo Noruego, 1888–1973), profesor de Investigaciones Nutricionales de la Escuela de Medicina (Universidad de Oslo, Noruega).^{13,14}

El propio Følling ha recogido por escrito sus recuerdos de la visita de esta madre con sus dos hijos: "No tenía esperanza alguna de poder ayudarlo realmente, y examiné a los niños principalmente porque no quería ser hostil hacia la madre. En la exploración clínica de los pacientes no encontré signos significativos salvo que, ambos tenían un retraso mental. Los análisis ordinarios de orina fueron normales, pero tras añadir cloruro

férrico a la orina, en busca de cetonas, apareció una coloración verdosa, que desapareció minutos después. Nunca había visto una reacción de ese tipo y tampoco estaba descrita en la literatura. La orina recogida unos días más tarde, tras retirar toda la medicación que recibían, se comportaba de manera similar. Probablemente había una sustancia desconocida en la orina, y el problema principal me pareció que era aislar e identificar esta sustancia". Decididos a resolver el misterio, Følling solicitó a la madre que le proporcionara muestras de orina cada dos días durante un periodo de dos meses. Følling trabajó diligentemente durante dos meses y medio para aislar la sustancia responsable de la reacción química extraña en la orina.^{13,14}

"El método que se mostró eficaz fue el siguiente: la orina era saturada con cloruro sódico, acidificada con ácido clorhídrico, seguida de una extracción con éter. A continuación, extracción con carbonato sódico, acidificación y re-extracción con éter. Ahora la sustancia podía ser recristalizada a partir de una mezcla de cloroformo/benceno. Durante las extracciones, la prueba del cloruro férrico indicaba la presencia de la sustancia. Después de esta purificación comenzó la identificación de la estructura química de la sustancia... que sugería una estructura de un anillo bencénico con una cadena lateral de tres átomos de carbono. La configuración más probable era la del ácido fenilpirúvico. La sustancia se mezcló con ácido fenilpirúvico de síntesis, lo que no alteró el punto de fusión, probando por tanto la identidad de la sustancia." Følling la denominó "*Imbecillitas Phenylpyruvica*", también conocida como enfermedad de Følling, que cursaba con un grave daño cerebral, en la que estaba implicada una sustancia que se originaba como producto del metabolismo de las proteínas, denominada Fenilalanina.^{13,14}

En su escrito, continúa el Dr. Asbjørn Følling, "Aparentemente, existía la posibilidad de una asociación entre el retraso mental y la excreción de ácido fenilpirúvico. Por esto busqué casos similares. Entre 430 niños internados en instituciones para retrasados mentales en Oslo, se encontraron ocho enfermos más con la misma reacción al cloruro férrico. Los dos rasgos distintivos fundamentales eran el retraso mental y la excreción de ácido fenilpirúvico en la orina".^{13,15}

Tres años más tarde, en 1937, Penrose y Quastel¹⁶ sugirieron que se denominara a esta enfermedad Fenilcetonuria, nombre con el que se le conoce hoy en día. En el año 1944, Bernheim demostró que la principal vía catabólica de la Fenilalanina es la transformación por parahidroxilación en Tirosina.¹³

En 1947, Jervis¹⁷ observó que cuando se administraba fenilalanina a individuos sanos, en éstos se producía un aumento de otra sustancia denominada tirosina. Pero cuando administraba fenilalanina a individuos con Fenilcetonuria, no presentaban tal elevación. Tras

varios años de investigación, Jervis concluyó finalmente que en la enfermedad, conocida como Fenilcetonuria, se producía una falta en la transformación de fenilalanina a tirosina. Los avances en el tratamiento de la enfermedad no se iniciaron hasta 1953, cuando Bickel (Médico Alemán 1918–2000), publicó sus primeros trabajos, en los que demostraba la efectividad de una dieta especial restringida en fenilalanina.¹³

En 1961, Guthrie creó el método de inhibición bacteriana, para medir la fenilalanina en sangre. Entre 1957 y 1963 Kaufman y su grupo, demostraron la complejidad del sistema Fenilalaninhidroxilasa, en el que están implicados varios sistemas enzimáticos y cofactores, de los que los principales componentes son la BH4 (tetrahidrobiopterina) y la DHPR (dihidropteridina reductasa), y que estos componentes forman parte de otros sistemas de hidroxilación.¹³

Finalmente, en 1983, los doctores Li Chen y Savio L. C. Woo, ambos del Departamento de Medicina Celular y Genética (Escuela de Medicina Mount Sinai), aislaron e identificaron por primera vez el gen donde se dan las instrucciones para la síntesis de la enzima fenilalanina hidroxilasa, cuya deficiencia es la responsable, principalmente, de la enfermedad.¹³

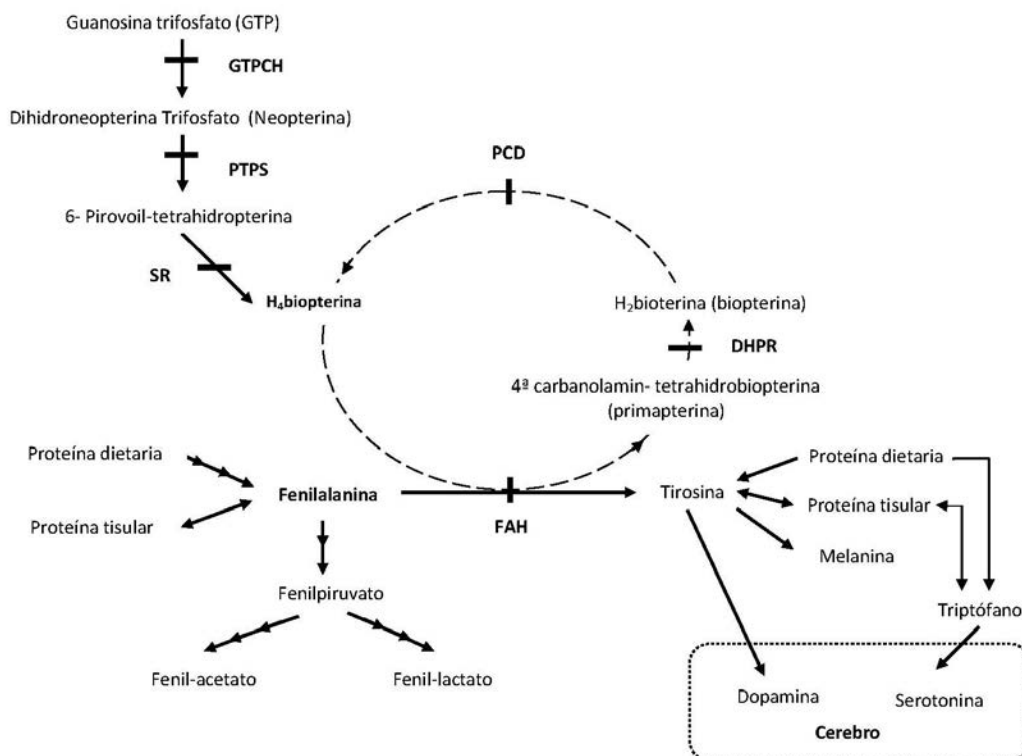
2.2. Definición

La PKU es un error congénito del metabolismo, que se hereda con carácter autosómico recesivo, causado por la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (FAH), la cual convierte la Phe dietaria (aminoácido esencial: aa.e.) a tirosina (aminoácido no esencial). La ausencia de esta enzima causa acumulación plasmática y tisular de fenilalanina, que tiene efecto tóxico. El exceso de este aminoácido, se convierte por acción de una transaminasa en ácido fenilpirúvico que es eliminado por la orina. Esta alteración lesiona el Sistema Nervioso Central, originando un grave trastorno del desarrollo mental en niños afectados, dejando graves secuelas neurológicas y diferentes grados de discapacidad mental (retraso mental, convulsiones, comportamiento similar al autismo) si no es detectada a tiempo, y una menor producción de melanina, lo que genera una ausencia relativa del pigmento en piel, ojos y cabello. Además, es característico de este fenotipo el olor peculiar causado por la elevada concentración de fenilamina en plasma y/o sus metabolitos principales (fenilpiruvato, fenilactato y fenilacetato de metilo)^{9,15,18-21} (figura 1). El mecanismo exacto sobre el daño neurológico permanece sin aclararse, aunque se han sugerido una pobre mielin-

FIGURA 1

Esquema del metabolismo de la fenilalanina en PKU

Las siguientes siglas hacen alusión a las diferentes enzimas que participan en el esquema metabólico de la phe, y que son responsables en muchos casos de la PKU. FAH: L-fenilalanina-hidroxilasa; GTPCH: GTP-ciclohidrolasa; PTPS: 6-piruviltetrahydropterina sintetasa; SR: sepiapterina reductasa; DHPR: dihidropteridina reductasa; PCD: pterin-4- α -carbinolamina deshidratasa.



Fuente: Elaborado con modificaciones realizadas a partir de los esquemas propuestos por Van Calcar y Ney (2012)²²; y Ramirez et al., (2007)²³.

zación durante el desarrollo del sistema nervioso central y trastornos en la producción de neurotransmisores.²² La hiperfenilalaninemia (HFA) también puede ser causada por la deficiencia de Tetrahidrobiopterina (BH4), coenzima de la fenilalanina hidroxilasa, la tirosina-3-hidroxilasa y la triptófano-5-hidroxilasa, estas dos últimas enzimas son necesarias para la síntesis de neurotransmisores L-Dopa y Serotonina.^{11,18-20}

Es necesario aclarar además, que la HFA ocurre en más del 98% de los casos por mutaciones en el gen que codifica la L-fenilalanina hidroxilasa; 1 a 2% se debe a defectos en otras enzimas involucradas en la síntesis o regeneración de la BH4. Las enzimas involucradas en la síntesis de BH4 son la GTP-ciclohidrolasa I (GTPCH), la 6-piruvil-tetrahidropterina sintetasa (PTPS), y la sepiapterina reductasa (SR); y las enzimas para su regeneración: dihidropteridina reductasa (DHPR) y la pterin-4- α -carbinolaminadehidratasa (PCD) (figura 1 y tabla 1).²³

La fenilcetonuria tiene una incidencia en los E.U.A de entre 1:10.000 a 1:15.000 nacidos en aquellos descendientes europeos, asiáticos y amerindios, aunque se puede diagnosticar en otros grupos étnicos y raciales. Existe un estimado de alrededor de 50.000 individuos con PKU tratados en todo el mundo.^{21,22} En Chile se ha determinado una incidencia de 1:14.000 recién nacidos vivos, en Japón es 1:10.000 y en Venezuela, a través del Programa de Pesquisa Neonatal realizado desde 1985 en el Instituto de Estudios Avanzados, se han analizado 506.385 neonatos, encontrando una incidencia de 1:27.989 nacidos vivos.^{24,25}

2.3. Categorías de la PKU

Luego de efectuar una búsqueda sobre la terminología

relacionada con la clasificación PKU se pudo observar que existían ciertas diferencias en cuanto a los términos y criterios manejados para efectuar su clasificación.

Ramírez *et al.* (2007)²³ en el trabajo titulado: "Controversias en la clasificación de las hiperfenilalanemias. Propuesta de Unificación" también plantean que existe una gran disparidad en la nomenclatura de esta enfermedad, por ejemplo, HFA, HFA benigna, HFA persistente, atípica, media y moderada, HFA forma no-PKU, PKU moderada, PKU leve, PKU clásica, entre otras denominaciones. Estos investigadores encontraron 28 clasificaciones para HFA y 23 para PKU. El criterio principal para clasificar esta enfermedad fue la concentración sanguínea basal de Phe; sin embargo, no hubo un criterio unificado para las unidades en las que se expresa la concentración de dicho aminoácido. Por otro lado, diversos autores utilizan miligramos por decilitro (mg/dL) y otros micromoles por litro (μ mol/L) o micromolar (μ M). Después de la Phe, el nivel sérico de tirosina (Tyr) y su cociente, son los criterios más frecuentemente utilizados para tipificar la enfermedad; sin embargo, también existen diferencias en los valores normales del cociente Phe/Tyr, pues algunos autores consideran patológico un cociente de 1,5 y otros hasta de 3,0. Diversos investigadores también incluyen como criterio la tolerancia dietética a la Phe, cuantificada mediante una prueba específica de reto. Prácticamente en todos los artículos, se estudian las biopterinas para asegurar que la HFA se debe a defectos en la FAH y no a otras enzimas de la misma ruta metabólica.

Basándose en lo planteado anteriormente por Ramírez *et al.* (2007)²³, los mismos proponen una clasificación de los trastornos de la fenilalanina por defecto de la FAH como se cita a continuación (Tabla 2):

TABLA 1

Enzimas involucradas en el metabolismo de la fenilalanina.

Enzima	Número E.C.	OMIM	Locación del cromosoma
1.1 FAH	1.14.16.1	261600	12q22-q24.1
1.2 GTPCH	3.5.4.16	233910;600225	14q22.1-q22.2
1.3 PTPS	4.6.1.10	261640	11q22.3-q23.3
1.4 SR	1.1.1.153	182125	2p13
1.5 PCD	4.2.1.96	264070;126090	10q22
1.6 DHPR	1.6.99.7	261630	4p15.3

Fuente: Ramírez *et al.*, 2007²³.

TABLA 2

Diferencias existentes en la clasificación abordada por varios autores para pacientes con HFA por deficiencia de FAH.

Clasificación	Belmont <i>et al.</i> , 2012 ²⁷		Feillet <i>et al.</i> , 2010 ²⁶		Ramírez <i>et al.</i> , 2007 ²³	
	mg/dL	μ M	mg/dL	μ M	mg/dL	μ M
HFA benigna	2-6	120-360	2-10*	120-600	2-4	120-240
HFA clínicamente significativa	>6-10	>360-600			>4-10	>240-600
PKU moderada	>10-16.6	>600-1.000	>10-20	600-1.200	>10-16.6	>600-1.000
PKU clásica	>16.6	>1.000	>20	>1.200	>16.6	>1.000

Fuente: Elaboración propia.

*Los autores hacen referencia a hiperfenilalanemia leve (no PKU) y no establecen distinciones entre HFA benigna e HFA clínicamente significativa.

HFA benigna: Pacientes con niveles séricos de Phe entre 2-4mg/dL (120-240µM) sin restricción dietética, es decir, que toman leche materna, sucedáneo o de soya. Debe hacerse una segunda prueba y si es <4mg/dL (240µM) 2 horas después del alimento, los pacientes deben ser monitoreados. Si se eleva la fenilalanina, se iniciará tratamiento dietético congruente con la edad, el peso y la tolerancia.

Es importante recordar que la HFA materna durante el embarazo puede ser causa de cardiopatías y otras malformaciones. Por lo tanto, toda paciente con HFA que desee embarazarse debe medir sus niveles de Phe y controlarse antes de iniciar el embarazo. Si se encuentran elevados se debe dar tratamiento nutricional durante la gestación.

HFA leve, clínicamente significativa: Los pacientes cuyas concentraciones de Phe se encuentran entre 4-10mg/dL (240-600µM), requieren restricción de Phe, suplemento de Tyr y fórmula nutricional especial en forma permanente. Sin embargo, toleran mayor cantidad de Phe por kg de peso e inclusive, dependiendo de su evolución, podrán llegar a incluir algunos alimentos de origen animal en su dieta.

PKU moderada: Pacientes con Phe entre 10-16,6mg/dL (600-1.000µM). Requieren restricción estricta de Phe, suplemento de Tyr y fórmula nutricional especial. Deben ser vigilados igual que los pacientes con HFA leve o clínicamente significativa.

PKU clásica: Niños cuyas concentraciones de Phe son >16,6mg/dL (1.000µM), con baja tolerancia a la Phe. Debe medirse su concentración sérica con la misma frecuencia que los pacientes con HFA leve, clínicamente significativa. Si están enfermos o si se sospecha que tienen elevaciones de Phe, se les debe vigilar con la frecuencia necesaria.

Afortunadamente, en la actualidad existen nuevas pruebas bioquímicas para diferenciar a los enfermos de HFA, como las curvas de tolerancia a la Phe dietética, la respuesta a la BH4, y la biología molecular. El objetivo terapéutico es mantener a todos los pacientes con HFA o PKU en niveles séricos de Phe <4mg/dL (240µM) hasta los 10 años de edad.²³

En cuanto a esta clasificación, otros autores (Cueto D, 201124; Feillet *et al.*, 201026; Pereda *et al.*, 200815) manejan un límite de 20mg/dL de Phe, entre la PKU moderada y PKU clásica. Lo mismo ocurre para el límite entre HFA benigna y HFA clínicamente significativa donde otros especialistas en el área como Belmont *et al.*, (2012)²⁷ establecen el valor de 6 mg/dL (Tabla 2). A pesar de estas discrepancias, la gran mayoría concuerda en que las concentraciones de fenilalanina en la sangre deben permanecer muy próximas o por debajo de los valores normales con la finalidad de evitar poner en riesgo al paciente.

2.4. Diagnóstico y control de la PKU

Se ha demostrado ampliamente que el diagnóstico neonatal, la instauración precoz del tratamiento nutricional y la vigilancia estricta, permite que los niños PKU tengan crecimiento y desarrollo normal.⁵ El diagnóstico de la enfermedad debe ser precoz, por lo que es necesario realizar un tamiz neonatal entre las 48h y los 10 primeros días posteriores al nacimiento, que consiste en identificar a los pacientes (recién nacidos aparentemente sanos) mediante la cuantificación sanguínea de fenilalanina. Para ello es suficiente una pequeña muestra de sangre del bebé (obtenida al pinchar el talón); posteriormente las gotas de sangre capilar se impregnan en un papel de filtro específico (tarjeta de Guthrie).²⁸ El test de cribado, a través de la técnica de fluorimetría, tiene una sensibilidad y una especificidad cercanas al 99%. Para un diagnóstico definitivo y más específico de la enfermedad, se requiere un análisis cuantitativo de la concentración de Phe y de Tyr en la sangre, usualmente determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas en tándem (MS/MS) o ambos métodos (figura 2).^{15,27,29}

FIGURA 2
Esquema general para el diagnóstico de la fenilcetonuria



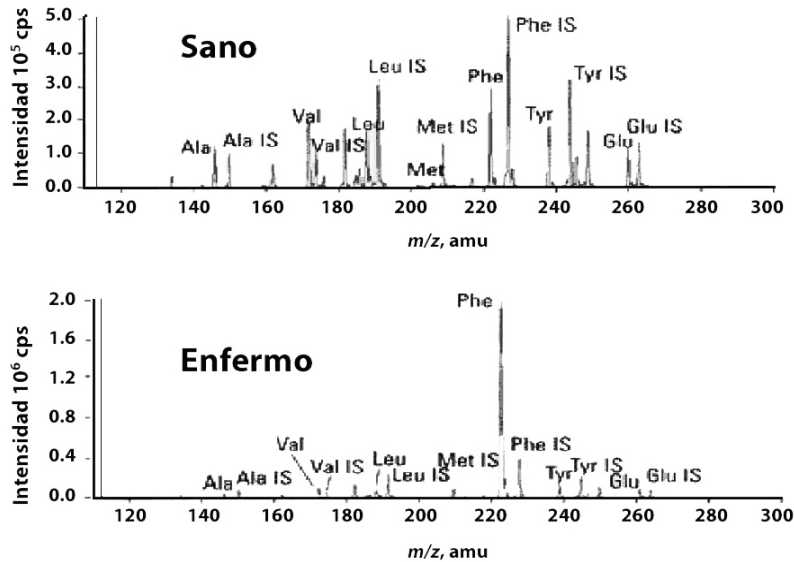
Fuente:
<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>

En los programas de Tamizado Neonatal PKU, los valores de corte para distinguir entre sanos y enfermos varían dependiendo del método analítico empleado; el criterio más unificado es un valor de Phe >2mg/dL (>120µmol/L); por lo tanto todo neonato cuya Phe se encuentre en dicho valor, debe ser considerado como caso probable de PKU y sometido a estudios que confirmen o descarten la enfermedad. Este es el patrón de todas las formas de hiperfenilalaninemia/fenilcetonuria. Si los niveles de Phe son >120µM, la concentración sérica de Tyr es normal o <118µM, con concentraciones normales de los aminoácidos restantes, y la relación Phe/Tyr es >2, se confirma el diagnóstico de HFA (figura 3).^{27,30}

En estos pacientes deben realizarse dos evaluaciones diagnósticas. En primer lugar, debe aclararse si el paciente tiene un defecto en la síntesis o reciclaje de BH4 (figura 4). En segundo lugar, si no tiene tales

FIGURA 3
Perfil aminoácido obtenido a partir de las pruebas de pesquisaje masa/masa en tándem.

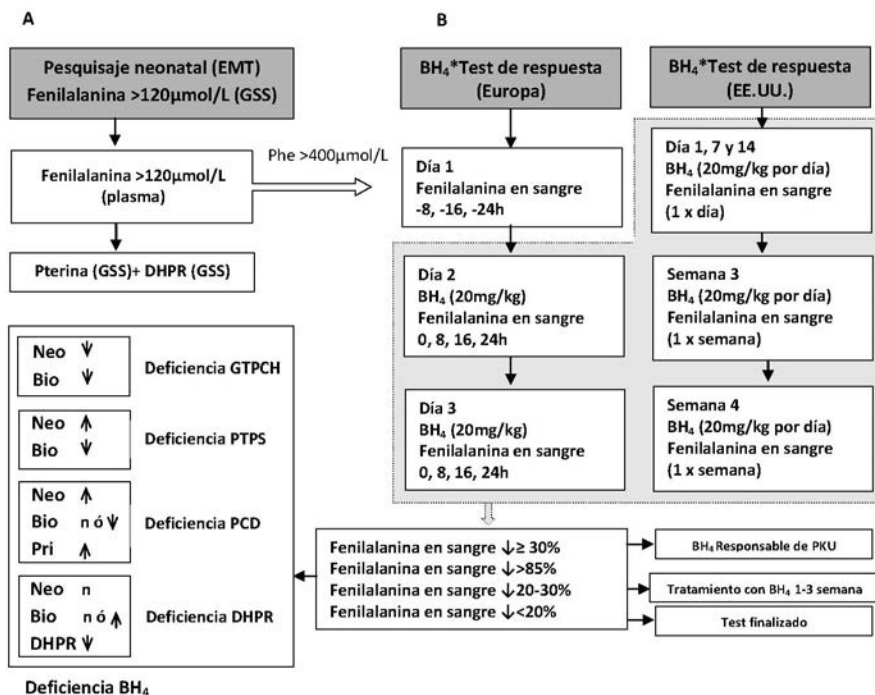
Arriba: Niveles estándar de aminoácidos en un bebé sano.
Debajo: Niveles alterados de aminoácidos en un bebé con PKU



Fuente: <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>

FIGURA 4
Diferencias en el diagnóstico para PKU

(A) Diagrama de flujo del diagnóstico diferencial para hiperfenilalaninemia con relación a la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa y la tetrahydrobiopterina. (B) Prueba de carga (respuesta) a la tetrahydrobiopterina en los EEUU y Europa. EMT= Espectrometría de masa de Tándem; GSS= Gota de sangre secada; DHPR= dihidropterina reductasa; Neo= neopterina; Bio= biopterina; Pri= primapterina; GTPCH= GTP ciclohrolasa I; PTPS= 6-piruviloil-tetrahydropterina sintetasa; PCD= pterina 4a-carbinolaminadehidratasa; BH4= tetrahydrobiopterina; PKU= fenilcetonuria; N=normal. * Tetrahydrobiopterina o sapropterina.



Fuente: Blau et al 2010³⁰

defectos, se debe evaluar si el paciente con hiperfenilalaninemia/fenilcetonuria se puede tratar solo con restricciones en la dieta, o puede ser ayudado en parte solo con BH4 o con la combinación de este y una dieta restringida.³⁰

En los países europeos, según Van Rijn (2007)³¹, el niño es tratado en el hospital y se le da una carga de BH4 (20mg/kg de peso corporal por vía oral). Su concentración de fenilalanina sanguínea se mide antes, a las 8, 16, y 24h después de suministrada la carga de BH4. La normalización destacada (dentro de las 8h) en las concentraciones de fenilalanina indican deficiencia de BH4, mientras que muy poca o ninguna reducción en fenilalanina demuestra que la fenilcetonuria no responde al BH4.^{12,30} En los EE.UU. no se suministra BH4 a los bebés recién nacidos. En su lugar, muestras de sangre secas en papel de filtro y orina se obtienen para las mediciones de pterinas urinarias (neopterina y biopterina) y dihidropteridina reductasa en glóbulos rojos para evaluar la posibilidad de un defecto asociado con deficiencia de BH4. Los siguientes patrones anormales de pterina en sangre u orina son diagnósticos para los diferentes tipos de deficiencia de BH4: en la deficiencia de GTP-ciclohidrolasa-I ambas neopterina y biopterina son muy bajas o no detectables; en la deficiencia de la 6-piruviltetrahydropterina sintetasa (PTPS), la neopterina es muy alta y la biopterina es muy baja o no detectable; en la deficiencia de la pterin-4- α -carbinolaminadehidratasa (PCD), la neopterina es alta, la biopterina es baja o marginal, y la primapterina es alta; y en la deficiencia de la dihidropteridina reductasa (DHPR), la actividad de la dihidropteridina reductasa (DHPR) es baja, la neopterina es normal, y biopterina es alta (figura 4).

La prueba de carga de BH4 también puede identificar la sensibilidad de la fenilcetonuria al BH4. Varias pruebas de carga se han propuesto para el diagnóstico de la sensibilidad a la BH4 después del período neonatal. Estas pruebas usualmente implican una sola dosis o en dosis repetidas, con o sin suministro de fenilalanina concomitante.^{12,30,32-34}

La definición ampliamente citada de la respuesta al BH4 es una reducción de la Phe en sangre de al menos 30%, pero diferentes metas pueden fijarse para pacientes individuales y no se han establecido valores de corte consensuados para la prueba de carga (figura 4). Existen diferentes políticas para las pruebas de sensibilidad al BH4 entre Europa y los EE.UU. En Europa, las pruebas que se efectuaban a las 24h se extendieron a los 3 días en el 2008. La prueba consiste en un seguimiento de Phe en el primer día; reto con BH4 (dosis: 20mg/kg/día) y medición de las concentraciones de Phe en sangre antes, a las 8, 16, y 24h después del suministro de la BH4 en el segundo día, más un segundo reto con la misma dosis de BH4 y el mismo

régimen de muestreo sanguíneo en el tercer día. Una reducción de las concentraciones de fenilalanina en sangre >85% es indicativa de deficiencia de BH4, mientras que una reducción <20% significa que el paciente no responde (no sensible). Si se observa una respuesta satisfactoria del tratamiento (concentraciones de Phe en sangre reducidas en < 30%), la dosis se ajusta (rango recomendado 5-20mg/kg) de acuerdo con la respuesta obtenida. Si no se nota una respuesta adecuada (Phe sanguínea reducida en un 20-30%), el tratamiento a una dosis de 20 mg/kg/día se continúa por 1-3 semanas más, con monitoreo diario de la fenilalanina en sangre, momento en el que el paciente es declarado ser sensible o no sensible (suspender el tratamiento). En pacientes con deficiencia de BH4, las concentraciones de fenilalanina sanguínea retornan a su normalidad después de 4-8 horas de suministrado el BH4. En los EE.UU., la BH4 se administra diariamente, y los pacientes proporcionan muestras de sangre en el hogar en el día 1, 7, y 14. Si es necesario, el BH4 se da durante 2 semanas más y las concentraciones de Phe en sangre se controlan una vez por semana (figura 4).^{12,30}

Es muy importante hacer el diagnóstico diferencial del tipo de HFA (de ello depende el tipo de tratamiento correcto). Un paciente con PKU se considera controlado si la Phe se encuentra entre 120-360 μ mol/L. Sin embargo, existe controversia para definir cuáles son los niveles de Phe deseables (Tabla 3). En Europa los niveles óptimos de control van de 42 a 400 μ mol/L para pacientes de 1-3 años de edad; en España, hasta 480 μ mol/L en niños de 4-16 años y en algunos centros médicos de Alemania, de 42 a 1.200 μ mol/L en pacientes >16 años. En EE.UU. (Hellekson K, 2001)³⁵ los niveles óptimos para pacientes de 1-12 años de edad son de 2-6mg/dL (120-360 μ mol/L) y en los >12 años, 2-15mg/dL (120-900 μ mol/L). Sin embargo, autores, como es el caso de Bermont *et al.*, (2012)²⁷ establecen concentraciones terapéuticas de Phe para el primer año de vida de 360 μ mol/L con un control bioquímico semanal, desde el año de edad hasta la adolescencia 600 μ mol/L (con diferencias en la frecuencia del control: mensual, hasta el final de la niñez, y semanal en la adolescencia) y en los adultos 900 μ mol/L, mensual. Pereda *et al.*, (2008)¹⁵ hace mención a niveles de 120-300 μ mol/L desde el año de vida hasta fin de la niñez, <900 μ mol/L y 1.200 μ mol/L en la adolescencia y adultez respectivamente, sin establecer frecuencia del control bioquímico.

Un aspecto importante en la actualidad es determinar los niveles óptimos de control para mujeres en edad reproductiva (antes y durante el embarazo). Países como Alemania y Reino Unido señalan de 1-4mg/dL (60-240 μ mol/L).²⁷ Sin embargo, en la tabla 3 se muestran otras consideraciones según varios autores. Independientemente de las recomendaciones existen-

TABLA 3

Concentraciones terapéuticas de phe y frecuencia del control bioquímico por edad abordado por diversos autores.

Etapa	Belmont et al., 2012 ²⁷		Pereda et al., 2008 ¹⁵		Hellekson K, 2001 ³⁵	
	Concentraciones terapéutica de Phe (µM)	Frecuencia del control bioquímico	Concentraciones terapéutica de Phe (µM)	Frecuencia del control bioquímico	Concentraciones terapéutica de Phe (µM)	Frecuencia del control bioquímico
Primer año de vida	360	Semanalmente	-	No establece frecuencia		Semanalmente
1 año – fin de la infancia	600	Mensualmente	120-300		120-360*	2 veces al mes
Adolescencia	600	Semanalmente	<900			
Adultez	900	Mensualmente	<1.200		120-910**	Mensualmente
Mujeres antes y durante el embarazo	<360	2 veces por semana	-		120-360	2 veces por semana

Fuente: Elaboración propia.

* La guía establece el rango de edad hasta los 12 años y no realiza distinción para las concentraciones terapéuticas de Phe entre el primer año de vida y fin de la infancia. ** En este caso, la guía establece este rango para los individuos mayores a 12 años, sin hacer distinción entre adolescentes y adultos.

tes en los diferentes países, lo más importante es evitar valores altos de Phe, y tener presente que un paciente con valores por debajo de lo normal, también es indicio de descontrol nutricional. En la práctica cotidiana es difícil lograr que los pacientes siempre estén en niveles óptimos y a medida que crecen, suele disminuir el apego al tratamiento, lo cual constituye un gran reto.²⁷

2.5. Novedosas terapias nutricionales

Concentraciones constantes de Phe en sangre por debajo de los límites de riesgo puede lograrse con la introducción de una dieta pobre en este aminoácido.⁹ Esta dieta específica tiene la finalidad de proporcionar todos los nutrientes esenciales en cantidades adecuadas para promover el óptimo desarrollo físico y mental y, a su vez, suplir la cantidad óptima del nutriente que es restringido, mientras se prevé o se corrige el desbalance metabólico.^{7,36}

La dieta clásica PKU provee cantidades mínimas de productos de origen animal dirigidas a garantizar la cantidad de Phe necesaria en el proceso de crecimiento y está principalmente basada en hortalizas y frutas (pobres o libres en Phe) y productos sintéticos libres de Phe que suministran aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas.⁵ Sin embargo, la poca aceptación de las propiedades organolépticas (sabor, olor) de la dieta comercial baja en fenilalanina, afecta su cabal cumplimiento. Además, estos productos producen una baja saciedad y en muchos casos, si no se realiza un control y seguimiento nutricional del paciente, se puede generar un desequilibrio nutricional, afectando su salud. Por esta razón, la búsqueda constante de nuevas alternativas (nutricionales y no nutricionales) representa una meta en constante desarrollo.^{7,9,36}

2.5.1 - Terapia con Aminoácidos neutros grandes

Entre las estrategias para el tratamiento PKU se encuentra la suplementación dietética de aminoácidos neutros grandes (LNAA, por su siglas en inglés), con o sin la dieta tradicional.^{9,10,22,26,30,37} Además de la

Phe, los LNAAs incluyen tirosina, triptófano, treonina, metionina, valina, isoleucina, leucina e histidina. En individuos sanos, todos ellos excepto la tirosina, son aminoácidos esenciales. Particularmente en pacientes PKU, la tirosina se ha convertido en un aminoácido esencial.^{10,22,37}

En este tratamiento, el mecanismo sugerido se basa en la competencia de la fenilalanina con otros LNAA por proteínas transportadoras específicas que trasladan los LNAA a través de la mucosa intestinal a la sangre y de la barrera hematoencefálica a la corteza cerebral. La proteína transportadora responsable del traslado de estos aminoácidos en el cerebro se caracteriza por su alta afinidad por la Phe. Esto, en combinación con altas concentraciones plasmáticas de Phe, respecto de otros aminoácidos presentes en una PKU pobremente controlada, permite un transporte excesivo de fenilalanina al cerebro.²²

El tratamiento con LNAA como alternativa a la restricción dietética de fenilalanina fue sugerido desde 1953. A partir de entonces, diferentes combinaciones de LNAAs han sido diseñadas en base a diversas razones y objetivos del tratamiento. En forma reciente, el uso de LNAAs como tratamiento alternativo en PKU ha sido revisado. Los suplementos de LNAA pueden tener múltiples objetivos tales como: reducción específica de las concentraciones de Phe cerebrales, reducción en la sangre de las concentraciones de Phe, aumento en las concentraciones de neurotransmisores cerebrales, y un incremento de las concentraciones de aminoácidos esenciales en el cerebro.^{10,22,37} Específicamente Pietz *et al.* (1999)³⁸ confirmaron en sus estudios que los LNAAs bloquean el transporte de fenilalanina al cerebro, al suministrar un "reto de fenilalanina" con y sin LNAA y midiendo la afluencia de fenilalanina al cerebro. El uso de la terapia de LNAA ha demostrado mejorar los perfiles de aminoácidos, así como aumentar las concentraciones de tirosina y triptófano en la sangre^{9,10}, y producir un efecto beneficioso sobre el funcionamiento ejecutivo.¹⁰

En un estudio doble ciego de corto plazo, controlado con placebo, desarrollado por Matalon *et. al* (2007)³⁹, la utilización de LNAs en pacientes PKU logró una disminución de la fenilalanina en la sangre en un promedio del 39% respecto del valor basal.¹⁰ Sin embargo, en otro trabajo realizado por Matalon *et. al* (2006)⁴⁰, se evidenció una disminución de la fenilalanina en la sangre en un 55%, efecto relacionado con la dosis utilizada de LNA.³⁷

Vale destacar que la suplementación con LNA no es un sustituto del alimento médico y de la dieta baja en fenilalanina. Sin embargo, para las personas que tienen dificultades para cumplir con la dieta y muestran elevadas concentraciones de Phe en el plasma, los LNAs pueden ofrecer una opción rentable en la mejora del control metabólico de la PKU.²²

Todo lo planteado propone al tratamiento de LNA como una alternativa a la terapéutica convencional de la dieta PKU. Este abordaje alternativo puede aludir por lo menos a dos estrategias diferentes, es decir, la ingesta de proteína natural con el permiso dietético recomendado más la suplementación de LNA, y la terapia convencional (libre de Phe) combinada con la suplementación dietética de LNA. Además, el tratamiento con LNA puede referirse a la suplementación de aminoácidos individuales, tales como tirosina, triptófano y treonina. Asimismo, es preciso resaltar que se necesitan más estudios que investiguen el papel potencial, la dosis y la composición de LNA en el tratamiento PKU, así como mostrar su eficacia en el largo plazo.¹⁰

2.5.2- Glicomacropéptidos: un nuevo enfoque dietético necesario en PKU

Aunque ha sido reconocida la implementación de una dieta PKU (basada en aminoácidos) desde el nacimiento, actualmente es evidente el desprendimiento de los pacientes de las dietas bajas en Phe. Estas dietas producen en la mayoría de los casos, al ser utilizadas como único tratamiento, un crecimiento y resultados nutricionales sub-óptimos.^{22,42} Por ello, es necesario desarrollar nuevos enfoques para el manejo en la dieta PKU.

Las dietas ideales bajas en fenilalanina serían aquellas que contengan, al menos, una fuente libre de fenilalanina o una proteína intacta baja en fenilalanina, que constituya una fuente completa en aminoácidos esenciales, y en la que las proteínas posean propiedades funcionales adecuadas para fabricar una gran variedad de alimentos, que muestren a su vez, poseer propiedades sensoriales aceptables (sabor, textura y olor).^{22,42}

Una alternativa, apoyada por la investigación en el corto plazo en pacientes PKU, son los glicomacropéptidos (GMP), péptido de 64 aminoácidos glicosilados que contiene un mínimo de fenilalanina. A partir de los GMP se pueden elaborar alimentos nutricionalmente completos, aceptables y bajos en fenilalanina para las

personas PKU.^{22,26,43-46}

En comparación con la proteína ideal para la dieta PKU, los GMP no están libres de fenilalanina y requieren de la suplementación de cinco aminoácidos limitantes para proporcionar una fuente de completa de proteínas. Además, no son óptimos para su uso en productos horneados.²²

El GMP se produce naturalmente en la leche bovina dentro de la fracción de suero, cuando la *K*-caseína de la leche de bovino es fraccionada por la acción de la quimiosina.^{26,44,45,47} Es especialmente adecuado para la dieta PKU como alternativa a las fórmulas de aminoácidos, debido a que los concentrados puros de GMP no contienen aminoácidos aromáticos, incluyendo fenilalanina. Aislados de GMP a partir del suero del queso contienen otras proteínas contaminantes del suero, tales como β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, que sí contienen fenilalanina.⁴⁶ Por lo tanto, el GMP disponible comercialmente contiene entre 2,0-5,0 mg de fenilalanina por gramo de proteínas.^{22,47,48} Además, contiene de 2 a 3 veces la cantidad de LNA como isoleucina, treonina y valina respecto de otras proteínas dietéticas y se debe complementar con aminoácidos esenciales para proporcionar una fuente proteica completa en individuos con PKU.^{22,47}

Una dieta basada en aminoácidos -baja en fenilalanina- proporciona aproximadamente el 80% de las proteínas necesarias a partir de aminoácidos sintéticos y el 20% restante se encuentra en las proteínas intactas provenientes principalmente de frutas y verduras. En contraste, una dieta basada en GMP, baja en fenilalanina, proporciona aproximadamente el 70% de las necesidades proteicas a partir de las proteínas intactas encontradas en GMP, frutas y verduras, y aproximadamente el 30% de las necesidades proteicas cubiertas con aminoácidos sintéticos.²²

En un estudio realizado por Veldhorst *et. al*, (2007)⁴⁹, los sujetos sin PKU consumieron aproximadamente un 10% menos en el almuerzo después de un desayuno con suero de leche que incluía GMP en comparación con un desayuno con suero de leche que no incluía GMP.⁴⁹ Adicionalmente, las personas con PKU a menudo experimentan hambre como resultado de la inadecuada distribución de equivalentes proteicos durante el día y la rápida absorción de los aminoácidos provenientes de los alimentos médicos. Estudios efectuados por Van Calcar *et. al*, (2009)⁴⁴ evidencian que al consumir GMP en comparación con los aminoácidos, los sujetos con PKU se sienten satisfechos por más tiempo.^{22,50,51}

En un ensayo ambulatorio efectuado por Macleod *et. al*, (2010)⁴⁶, un hombre de 29 años de edad con PKU clásica reemplazó su habitual fórmula prescrita de aminoácidos con productos de GMP durante 10 semanas. El promedio de las concentraciones de fenilalanina en este individuo, medidas en muestras de sangre,

fue un 14% inferior con la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos. Una explicación de esta respuesta es que el paciente disfrutó de alimentos con GMP y fue capaz de apreciar a lo largo de los días que bebía todo de una vez en la mañana.

Debido a que los productos de GMP mejoran el sabor, la conveniencia y la variedad de opciones en la dieta PKU, los pacientes pueden estar más dispuestos a consumir estas fuentes durante el día y, por lo tanto, mejorar la distribución diaria de proteínas.^{22,50,51} Así, los alimentos médicos basados en GMP representan un nuevo paradigma, al direccionar las dietas PKU de aminoácidos sintéticos a una dieta más fisiológica a base de proteínas intactas (GMP), promotoras de la saciedad.^{22,26,44,45}

2.5.3 -Terapia de implementación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

En una dieta baja en fenilalanina se deben evitar los alimentos ricos en proteínas (carne, pescado, huevos, hígado y productos lácteos). Estos productos restringidos constituyen la fuente dietaria predominante de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), tales como ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA). La evidencia disponible sugiere que los niños con PKU tienen una concentración reducida de AA y de DHA en los fosfolípidos del plasma, eritrocitos y en las membranas en comparación con los controles, debido a los planes dietarios estrictos que deben cumplir. Una dieta estricta baja en fenilalanina también es baja en grasa, ácido α -linolénico, y está desprovista de cualquier fuente de ácido eicosapentaenoico (EPA).^{4,37,52-55}

Varios estudios han demostrado que la función neural en los niños con PKU mejora con la administración de altas dosis de complementos LC-PUFA^{37,53,55,56}, poniendo en evidencia una mejoría significativa visual de las latencias potenciales evocadas, de la motricidad fina y de la coordinación.^{37,53,55,57}

Los LC-PUFAs preformados, en particular el AA (C20: 4 n-6) y el DHA (C22: 6 n-3), tienen papeles importantes en el desarrollo neurológico.^{53,58} Estudios previos han demostrado que la alimentación con leche materna produce mejores resultados neurológicos, en el largo plazo, que la alimentación con fórmulas, y esto se ha atribuido, en parte, a la presencia de LC-PUFA preformados en la leche materna, introducidos recientemente en las fórmulas infantiles. Los pacientes con PKU representan un grupo vulnerable, para quienes la suplementación con LC-PUFA durante la infancia puede ser especialmente beneficiosa.⁵³

Estos niños con PKU se encuentran más expuestos al daño neuronal debido a los altos picos de Phe en la sangre, que es en donde los LC-PUFAs ejercen efectos neuroprotectores. Las dietas vegetarianas generalmente prescritas tienden a ser muy pobres en LC-PUFAs pre-

formados. La adición de DHA, ya sea en preparados especiales de LC-PUFA o en forma de aceite de pescado, para las dietas de los niños mayores con PKU, aumentan los niveles plasmáticos de estos ácidos grasos.⁵³

Dado que los déficits funcionales reportados en niños con PKU bajo tratamiento no pueden ser completamente explicados por las variaciones de la Phe en el plasma, éstos pueden deberse, en muchos casos, a la falta de DHA en la dieta. En un estudio doble ciego realizado por Agostoni *et. al*, (2000)⁵⁷, controlado con placebo, 20 niños con PKU (edad promedio 10 años) recibieron 500mg/día de LC-PUFA (ambos DHA y ARA) o placebo (aceite de oliva) durante 12 meses. Estos autores demostraron una mejoría en los potenciales visuales evocados con la introducción de los LC-PUFA y concluyeron que se requiere un suministro de LC-PUFA pre-formados para conseguir una función neuronal normal en esta población.⁵⁵ Por todo lo planteado, la introducción de LC-PUFA es considerado como tratamiento promisorio en el manejo de la dieta PKU.⁵²

2.6. Otros enfoques para el tratamiento de la PKU

Tener alternativas al tratamiento dietético ha sido el objetivo de múltiples investigaciones que se han visto impulsadas en los últimos 10 años. Si bien a nivel dietético se han producido importantes innovaciones, también se han realizado investigaciones en el tratamiento farmacológico de la fenilcetonuria. En algunos casos, los frutos de estas investigaciones ya se recogen en la práctica clínica, como es el caso de la tetrahydrobiopterina (BH4); en otros estudios se están realizando ensayos clínicos en humanos, como es en la fenilcetonuria amonio liasa (PAL), e investigaciones adicionales permanecen todavía en el ámbito de laboratorio.^{25,26}

2.6.1-Terapia encaminada a aumentar la actividad de la FAH: tetrahydrobiopterina (BH4)

Partiendo de que existen algunas mutaciones en la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) asociadas con un fenotipo (paciente) sensible a la BH4 de la PKU, se han desarrollado dosis exógenas farmacológicas de BH4 que han dado como resultado un incremento en la actividad de la FAH, suficiente para reducir la circulación de fenilalanina en un nivel terapéuticamente relevante.^{10,30}

Estas mutaciones se suelen presentar con actividad residual sustancial de la FAH.¹⁰ Sin embargo, cuando las mutaciones en la FAH es diferente, la BH4 puede no ejercer su acción sobre ella. Por este motivo, algunos pacientes responden a la BH4 y otros no responden. En general, es más probable que un paciente responda a la BH4 cuando sus mutaciones dan lugar a proteínas que ya de por sí conservan cierto grado de función residual, es decir, aquellos pacientes con mutaciones que dan lugar a fenotipos suaves o moderados de PKU.¹²

Se han descrito pacientes con respuesta positiva al BH4 de todos los fenotipos, y discrepancias entre el genotipo y la respuesta (o su ausencia) al BH4, por lo que actualmente la única forma de asegurar que un paciente se puede beneficiar o no con el tratamiento con BH4 es hacer una prueba terapéutica.¹² De hecho, desde 1999 un número creciente de pacientes con PKU leve o moderada fueron capaces de disminuir sus concentraciones de fenilalanina plasmática después de un ensayo reto a la BH4.³⁷ En efecto, la respuesta a la BH4 es generalmente más pronunciada en los casos de PKU leve o moderada.^{10,59}

Dos formulaciones de BH4 se han estudiado clínicamente: el 6R-dihidrocloruro de BH4 (Laboratorios Schircks, Jona, Suiza) y el dihidrocloruro de sapropterina (Bio Marin Pharmaceutical Inc), pero sólo el dihidrocloruro de sapropterina está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration* de los Estados Unidos) para su uso terapéutico. En algunos pacientes, una dosis diaria única (10-20mg/kg de peso corporal) de este compuesto es suficiente para mantener una concentración de fenilalanina en sangre estable durante las 24h.³⁰ El escenario ideal es que la BH4 sea capaz de mantener un excelente control de fenilalanina sanguínea sin ningún tratamiento dietético. Sin embargo, si la BH4 se usa en combinación con dieta, hay muchas preguntas sin respuesta que requieren direccionamiento y, por otro lado, la disponibilidad de una formulación registrada de BH4 ha planteado diversas cuestiones prácticas y nuevos interrogantes en el tratamiento dietético de estos pacientes.

Aproximadamente entre el 20-60% de los pacientes han mostrado una reducción >30% en los niveles de Phe en la sangre con sapropterina o la formulación anterior no registrada de BH4.¹⁰

Debido a la falta de estudios, se desaconseja el uso de sapropterina en mujeres embarazadas o durante el periodo de lactancia, aunque las publicaciones hechas hasta el momento apuntan que se trata de un medicamento seguro.¹² Estudios realizados sobre posibles efectos secundarios del tratamiento con sapropterina han detectado mayor frecuencia de cefalea, rinorrea y trastornos gastrointestinales, en los pacientes tratados respecto de la población normal. Estos efectos han sido leves y nunca han requerido la suspensión del tratamiento.^{12,37}

La BH4 ha supuesto un antes y un después para muchos pacientes. Por desgracia, también ha supuesto una enorme decepción para todos aquellos pacientes que no son respondedores y que precisamente son los que necesitan dietas más restrictivas. El éxito conseguido con algunos pacientes, y también la falta de respuesta en otros, ha incentivado la investigación de nuevas terapias para la fenilcetonuria en la última década.¹²

2.6.2-Terapia encaminada a suplantar la actividad de la FAH: Fenilalanina amonioliasa

La fenilalanina amonioliasa (PAL, por sus siglas en inglés) es una enzima de origen vegetal, que degrada la fenilalanina (sin síntesis de tirosina) a amonio y ácido transcinámico, productos que pueden ser eliminados por la orina. En comparación con la FAH humana, la PAL es estructural y catalíticamente menos compleja, físicamente más estable, y no requiere una coenzima (figura 5).^{10-12,60,61} Hasta el momento, su uso no había sido posible por su alta capacidad inmunogénica, pero en los nuevos estudios se utiliza una presentación en la que la proteína ha sido recubierta por una capa glucídica (pegilada, peg-PAL) que reduce la formación de anticuerpos. Con esta nueva presentación se han obtenido estudios muy prometedores.^{10,12,62} La formulación (PEG-PAL) de la PAL se encuentra actualmente en investigación clínica intensiva como un posible tratamiento clínico alternativo para los pacientes con PKU.^{10,26}

En un estudio realizado por Kang et. al, (2010)⁶¹ dirigido al desarrollo de una forma oral de esta enzima, la estabilidad de la PAL mejoró ligeramente frente a la digestión proteolítica intestinal, por lo que es potencialmente útil para la aplicación oral.¹¹ En forma reciente, Sarkissian et. al, (2011)⁶³, en un estudio modelo en ratones con PKU, destaca que la PEG-PAL administrada por vía oral, mostró resultados prometedores con una reducción media del nivel de Phe sanguínea de alrededor del 40% y sin reacciones adversas graves.^{10,63}

Otra forma creada para el suministro de la PAL es mediante la implantación subcutánea.^{10-12,60} En estudios modelo con ratones con PKU, la inyección subcutánea de la enzima PAL produjo una completa corrección de las concentraciones de fenilalanina en la sangre, y este efecto se mantuvo durante un máximo de un año con la administración semanal de inyecciones con enzimas.¹¹ Sin embargo, se deben investigar todavía las posibles reacciones adversas y, sobre todo, la respuesta inmune en el largo plazo. Estos estudios son muy esperanzadores y este tratamiento podría ser útil para todos los pacientes, independientemente de su genotipo/fenotipo.³⁰

2.6.3-Terapia encaminada al restablecimiento de la actividad FAH: Terapia génica

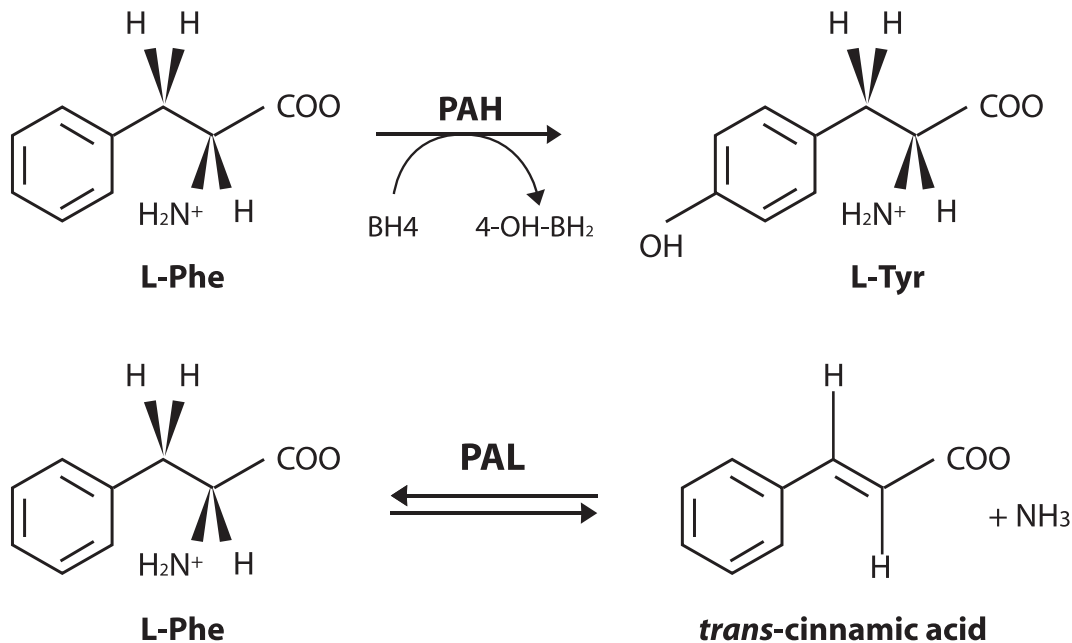
Dado que la fenilcetonuria es una enfermedad genética debido a mutaciones en el gen que codifica la FAH, en teoría, si se consiguiese introducir en el cuerpo un gen normal, se podría restablecer la actividad de la FAH y literalmente curar la enfermedad. En los últimos años esta idea ha dejado de ser una posibilidad remota.¹² Un estudio realizado por Rebuffat et. al, (2010)⁶⁴ reportó la restauración de la actividad hepática de la FAH después de la inyección intramuscular de vecto-

FIGURA 5

Diferencias entre fenilalanina hidroxilasa y fenilalanina amonio liasa.

Arriba: Esquema de la reacción química de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) dependiente de la BH₄.

Abajo: Esquema de la reacción química de la fenilalanina amonio liasa (PAL) sin necesidad de una coenzima, resultando en metabolitos eliminados por la orina.



Fuente: Bélanger *et al.*, 2011¹¹

res de genes de FAH en ratones deficientes en esta enzima. Un enfoque similar efectuado por Jung *et al.* (2008)⁶⁵ protegió a la descendencia de ratones deficientes en FAH de los efectos teratogénicos de la PKU. Otro estudio en animales (Ding *et al.*, 2008)⁶⁶, mostró efectos benéficos de la expresión simultánea de la FAH junto con otras dos enzimas de la ruta biosintética del BH₄. El trasplante de células con funcionamiento pleno del metabolismo FAH/BH₄ o incluso el trasplante hepático son enfoques alternativos.³⁰

Además, se han utilizado vectores de adenovirus en estudios murinos con resultados muy esperanzadores. En un ratón modelo (Harding *et al.*, 2006)⁶⁷, la terapia génica dirigida al hígado permitió la corrección durante un año de hiperfenilalaninemia. Sin embargo, esta terapia génica dirigida al hígado no conduce a una corrección permanente de la actividad de la FAH. El genoma del vector no se integra en el ADN del hepatocito y la gradual, pero continua, regeneración hepática hace que la actividad de la FAH se pierda progresivamente y que las reinyecciones del mismo vector serotipo no sean efectivas ya que éste es destruido por reacción inmune.^{11,12}

El músculo esquelético es un órgano diana atractivo para la terapia génica, ya que no sufre una división

celular continua y es más fácilmente accesible. Esta aproximación es complicada ya que no sólo hay que incluir el gen de la FAH sino todo el sistema enzimático de producción de su cofactor, la BH₄. No obstante, este tratamiento ha sido probado con resultados prometedores en ratones, por lo que resulta muy prometedor en un futuro no muy lejano.^{11,12}

2.6.4- La encapsulación de células como terapia potencial

En un trabajo realizado por Santillan *et al.* (2009)⁶⁸ titulado: "La encapsulación de células como una potencial terapia no dietética para la fenilketonuria materna", se propusieron determinar si las células que sobre-expresan la FAH podrían disminuir significativamente la fenilalanina *in vitro*. Para ello, los investigadores probaron el efecto de la encapsulación de estas células dentro de microesferas de alginato para evaluar su capacidad de expresar la FAH y metabolizar la Phe *in vitro*. Con tal propósito, los autores trabajaron con líneas de células humanas 293T y WRL68, las cuales fueron transitoriamente y de forma estable transfectadas para sobre-expresar la FAH. Posteriormente, las células fueron encapsuladas dentro de microesferas de alginato sódico

co y se efectuaron mediciones cronometradas de la Phe en los medios. Ambas células con sobre- expresión de la FAH (encapsuladas y no encapsuladas) redujeron en forma significativa la concentración de Phe in vitro.

Estos resultados se perfilan para el uso de una terapia alternativa, pues las células encapsuladas dentro de microesferas de alginato podrían ser implantadas, en un futuro no muy lejano, en la cavidad peritoneal. Las microesferas actuarían para aislar células del sistema inmune y las células encapsuladas permitirían el paso de sustancias de bajo peso molecular, tales como nutrientes, oxígeno, electrolitos, y aminoácidos, pero físicamente impedirían la difusión o el transporte activo de moléculas más grandes, tales como anticuerpos o células del sistema inmune.

3. Conclusiones

El desafío más grande para vivir con PKU es el cumplimiento durante toda la vida de una dieta que sólo permite un consumo reducido de alimentos naturales y requiere una ingesta suficiente de fórmulas basadas en aminoácidos para proporcionar una nutrición adecuada. Sin embargo, la comprensión de la base genética de la fisiopatología y el manejo de la fenilcetonuria se han incrementado sustancialmente en los últimos años. Esto ayudó en la comprensión de la necesidad de mantener el control de las concentraciones de fenilalanina en sangre, durante y después de la infancia, para lograr los mejores resultados neuropsicológicos, y la búsqueda de terapias alternativas, tanto nutricionales como no nutricionales.

Desde el punto de vista nutricional, las terapias novedosas constituyen una solución alternativa a la estricta dieta aplicada de manera tradicional. Específicamente,

los glicomacropéptidos prometen mejorar el sabor, la variedad y la aceptabilidad de la dieta baja en Phe. La suplementación con LNNA representa una terapia nutricional prometedora pero debe ser estudiada en forma detallada. La administración de LC-PUFA ayuda a enfrentar el daño neuronal generado por las altas concentraciones de Phe en la sangre.

En cuanto a los nuevos enfoques terapéuticos no nutricionales, como la reciente introducción de dihidrocloruro de sapropterina (formulación de BH4) es probable que el mismo contribuya a la gestión de la fenilcetonuria en un subconjunto de pacientes que responden bien a este tratamiento. En un futuro próximo, los nuevos tratamientos como fenilalanina amonio liasa y, más adelante, la terapia génica, podrían aliviar la carga considerable de la restricción dietética de fenilalanina en pacientes PKU y sus familiares. La historia de la PKU es rica en logros y el futuro de las personas que viven con PKU avizora venideros años alentadores.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Camp K, Lloyd-Puryear M, Huntington K. Nutritional treatment for inborn errors of metabolism: Indications, regulations, and availability of medical foods and dietary supplements using Phenylketonuria as an example. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012; 107: 3–9.
- 2- Acosta PB, Yanicelli S. The Ross Metabolic Formula System, Nutrition Support Protocols, Ross Products Division, Division of Abbott Laboratories, Columbus, Ohio. 2001.
- 3- Weaver MA, Johnson A, Singh RH, Wilcox WR, Lloyd-Puryear MA, Watson MS. Medical foods: inborn errors of metabolism and the reimbursement dilemma. *Genet. Med.* 2010;12:364-369.
- 4- Fekete K, Decsi T. Long-Chain Polyunsaturated fatty acids in inborn errors of metabolism. *Nutrients* 2010; 2:965-974.
- 5- Cornejo V, Manríquez V, Colombo M, et al. Fenilketonuria de diagnóstico neonatal y lactancia materna. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1280-1287.
- 6- Equip de Seguiment de PKU Hospital Sant Joan de Déu. PKU? Editorial-Gráficas Signo, S.A., Barcelona, España. 1997.
- 7- Thureen P, Hay W. Neonatal Nutrition and Metabolism. Second Edition. Cambridge University Press. New York. 2006.
- 8- Ruiz M, Sánchez F, Dalmau J. Nutritional treatment of inborn errors of metabolism. Editorial: ERGON, Madrid; España. 2007.
- 9- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30:145–152.

- 10- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutrition and Metabolism* 2012; 9:7.
- 11- Bélanger A, Burlina A, Harding C, Muntau A. Up to date knowledge on different treatment strategies for Phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 2011; 104:19–25.
- 12- Bélanger A, Ramírez M. Nuevos tratamientos en PKU. Hospital Ramón y Cajal. (Portal web). 2012.
- 13- Alfonso, J. B. Historia de la PKU. *Metabólico* 2009; 44.
- 14- Shawn, C. E. Asbjørn Følling and the Discovery of Phenylketonuria. *Journal of the history of the neurosciences S.f.*;1-10.
- 15- Pereda TL, Calcáneo GJ, Enríquez TR, Badillo BE, Soler HE. Identificación de un caso de fenilcetonuria a través del tamizaje neonatal. *Bol. Med. Hosp. Mex.* 2008; 65 (Julio-Agosto), 290-296.
- 16- Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in Phenylketonuria. *XXXVIII* 1937; 266-274.
- 17- Jervis JA. Studies on Phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. 1947, 651-656.
- 18- Ziesch B, Weigel J, Thiele A, et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) in PKU: effect on dietary treatment, metabolic control, and quality of life. *J Inherit Metab Dis.* 2012; 35:983–992.
- 19- Singh J, Yung S, Shi P. Clinical therapeuties for Phenylketonuria. *Drug Deliv. and Trans. Res.* (Springer). 2012.
- 20- Marjorie Y. Manejo nutricional en pacientes con fenilcetonuria. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo I.E.I.M. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia (Portal web). 2012.
- 21- Fundación Ahdonay. La Fenilcetonuria (PKU). Argentina. (Portal web). 2012.
- 22- Van Calcar S, Ney D. Food Products Made with Glycomacropeptide, a Low-Phenylalanine Whey Protein, Provide a New Alternative to Amino Acid-Based Medical Foods for Nutrition Management of Phenylketonuria. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2012; August 112(8):1201-1210.
- 23- Ramírez C, Pérez E, Ibarra I, Vela M. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. Propuesta de unificación. *Acta Pediatr Mex.* 2007; 28(6):261-9.
- 24- Cueto D, Pérez E. Formulación de mezclas para torta y panqueca a base de harina de yuca enriquecida para dietas con regímenes especiales. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 2011.
- 25- González YM, Palomino CC, Pérez ES. Fórmulas infantiles para fenilcetonúricos (PKU). Seminario II del Postgrado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 2012.
- 26- Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, et al. Challenges and Pitfalls in the Management of Phenylketonuria. *Pediatrics* 2010; 126(2):333-341.
- 27- Belmont L, Fernández C, Ibarra I, Guillén S, Monroy S, Vela M. Evaluación bioquímica de la fenilcetonuria (PKU): del diagnóstico al tratamiento. *Acta Pediatr Mex.* 2012; 33(6):296-300.
- 28- Guthrie R, Susi A. A simple Phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in a large population of newborn infants. *Pediatrics.* 1963; 32:702-6.
- 29- Vela M, Cicerón I, Pérez M, et al. Interpretación del tamiz metabólico. Análisis de aminoácidos. *Acta Pediatr Mex.* 2002; 23: 21-7.
- 30- Blau N, Van Spronsen F, Levy H. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376:1417–27.
- 31- Van Rijn M. Dietary treatment in Pku from experience to evidence. Trabajo de Tesis Doctoral. 136 p. 2007.
- 32- Levy H, Burton B, Cederbaum S, Scriver C. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in Phenylketonuria and its use in treatment. *Mol Genet Metab* 2007; 92: 287–91.
- 33- Blau N, Belanger QA, Demirkol M, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of Phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009; 96: 158–63.
- 34- Blau N. Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU. *J Inherit Metab. Dis.* 2008; 31: 2–3.
- 35- Hellekson K. Practice Guidelines NIH Consensus Statement on Phenylketonuria. *Am Fam Physician.* 2001 Apr 1; 63(7):1430-1432.
- 36- Ahring K, Belánger A, Dokoupil K, et al. Dietary management practices in Phenylketonuria across European centres. *Clinical Nutrition* 2009; 28:231–236.
- 37- MacDonald A, Gökmen H, Daly A. Changing dietary practices in Phenylketonuria. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2009; 51: 409-415.
- 38- Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: Revisiting the evidence. *Mol Genet Metab.* 2010; 101(2-3):99-109.
- 39- Pietz J, Kreis R, Rupp A, et al. Large neutral amino acids block Phenylketonuria transport into brain tissue in

- patients with Phenylketonuria. *J Clin Invest* 1999; 103:1169-1178.
- 40- Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood Phenylalanine. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:153-158.
- 41- Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Large neutral amino acids in the treatment of Phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:732-738.
- 42- Li XM, Srivastova K, Grishin A et al. Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(1):159-167.
- 43- Lim K, Van Calcar SC, Nelson KL, Gleason ST, Ney DM. Acceptable low-Phenylalanine foods and beverages can be made from glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Mol Genet Metab*. 2007; 92(1-2):176-178.
- 44- van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, et al. Improved nutritional management of Phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(4):1068-1077.
- 45- Laclair CE, Ney DM, MacLeod EL, Etzel MR. Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of Phenylketonuria. *J Food Sci* 2009; 74:199-206.
- 46- MacLeod EL, Clayton M, van Calcar SC, Ney DM. Breakfast with glycomacropeptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with Phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2010; 100(4):303-308.
- 47- Etzel MR. Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr*. 2004;134 (suppl 4):996-1002.
- 48- MacDonald A, Evans S, Cochrane B, Wildgoose J. Weaning infants with Phenylketonuria: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 2012; 25:103-110.
- 49- Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, et al. Effects of complete whey-protein breakfasts versus whey without GMP-breakfast on energy intake and satiety. *Appetite* 2009; 52(2):388-395.
- 50- Hall WL, Mullward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr*. 2003; 89(2):239-248.
- 51- Ney DM, Gleason ST, van Calcar SC, et al. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis*. 2009; 32(1):32-39.
- 52- Cleary MA, Feillet F, White FJ, et al. Rutherford PJ. Randomised controlled trial of essential fatty acid supplementation in Phenylketonuria. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2006; 60:915-920.
- 53- Feillet F, Agostoni C. Nutritional issues in treating Phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 33:659-664.
- 54- Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H, et al. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants with Phenylketonuria: a randomized controlled trial. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:326-332.
- 55- Ryan S, Astwood J, Gautier S, Kuratko C, Nelson E, Salem N. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment in childhood: A review of human studies. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2010; 82:305-314.
- 56- Koletzko B, Beblo S, Demmelmair H, Hanebutt FL. Omega-3 LC-PUFA supply and neurological outcomes in children with Phenylketonuria (PKU), *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2009; 48:2-7.
- 57- Agostoni C, Massetto N, Biasucci G, 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; 137:504-509.
- 58- Belkind GJ, Carreón RA, Contreras OC, Estrada MS, Parra CM, Fatty acids and neurodevelopment, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2008; 47:7-9.
- 59- Burton BK, Bausell H, Katz R, Laduca H, Sullivan C. Sapropterin therapy increases stability of blood Phenylalanine levels in patients with BH4-responsive Phenylketonuria (PKU), *Mol. Genet. Metab*. 2010; 101:110-114.
- 60- Sarkissian C, Gámez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for Phenylketonuria, where are we now? *Molecular Genetics and Metabolism* 2005; 86:22-26.
- 61- Kang TS, Wang L, Sarkissian CN, Gámez A, Scriver CR, Stevens RC. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: Phenylalanine ammonia lyase for Phenylketonuria, *Mol. Genet. Metab*. 2010; 99:4-9.
- 62- Gamez A, Sarkissian C, Wang L, et al. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* Phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical Phenylketonuria, *Mol. Ther*. 2005; 11:986-989.
- 63- Sarkissian CN, Kang TS, Gámez A, Scriver CR, Stevens RC. Evaluation of orally administered PEGylated Phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2011; 104:249-254.
- 64- Rebuffat A, Harding CO, Ding Z, Thony B. Comparison of AAV pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine Phenylketonuria. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 463-77.

- 65- Jung SC, Park JW, Oh HJ, et al. Protective effect of recombinant adeno-associated virus 2/8-mediated gene therapy from the maternal hyperphenylalaninemia in offspring of a mouse model of phenylketonuria. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 877–83.
- 66- Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thony B. Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther* 2008; 16: 673–81.
- 67- Harding CO, Gillingham MB, Hamman K, et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* 13 (2006) 457–462.
- 68- Santillan D; Santillan M, Hunter S. Cell encapsulation as a potential nondietary therapy for maternal phenylketonuria. *Am J Obstet Gynecol.* 2009:201-289.