

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Tesis presentada para optar por el grado de Licenciatura en
Biología con énfasis en Genética Humana

IDENTIFICACION Y DISTRIBUCION DE LAS MUTACIONES DEL GENE DE
LA FENILALANINA HIDROXILASA EN COSTA RICA, 2004-2006.

Rabeca Flores Fernández

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San Pedro

2006

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN
BIOLOGIA CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA

**IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCION DE LAS MUTACIONES DEL GENE DE LA
FENILALANINA HIDROXILASA EN COSTA RICA, 2004-2006.**

Rebeca Flores Fernández

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN PEDRO
2006

Tribunal examinador:

Dr. Ramiro Barrantes Mesén
Director de Tesis

R.B.M

Dr. Carlos de Céspedes Montealegre
Miembro del Tribunal

C. de Céspedes

Dr. Julio Cesar Rivera Madriz
Miembro del Tribunal

J.C.R.M.

Alejandro Leal
Miembro del Tribunal

A. Leal

Dra Virginia Solís Alvarado
Directora Escuela de Biología

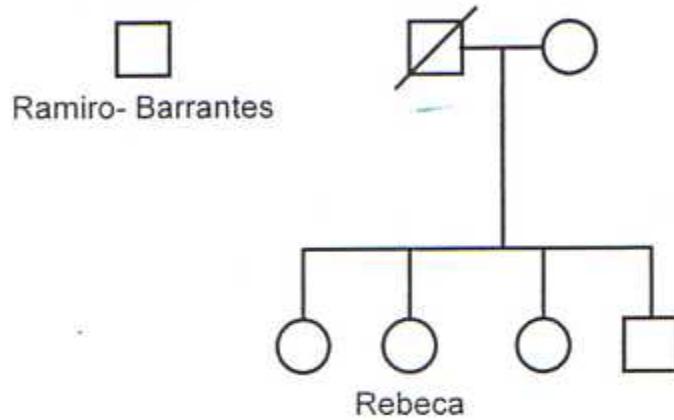
V. Solís A.

Rebeca Flores Fernández
Postulante

R.F.F.

Dedicación

Esta tesis se la dedico a las personas más especiales tanto en mi formación personal como académica.



Agradecimientos

Al comité de tesis que en todo momento me apoyaron y corrigieron el trabajo de investigación. Al Dr. de Céspedes quien me respaldó y supervisó en todo momento. A la Asociación Costarricense para el Tamizaje y la Prevención de Discapacidades en el Niño (ASTA) por su colaboración con el financiamiento del estudio. A los doctores Manuel Saborío y Rafael Trejos quienes permitieron que realizara la investigación en el Laboratorio de Biología Molecular, del Programa Nacional de Tamizaje, a Necxy Baltodano por su valiosa cooperación y su amistad. Mary Solano porque en todas las circunstancias estuvo a mi lado escuchándome y apoyándome, a mi novio quien con su cariño y conocimiento me ayudó en todo momento. A Federico Hernández por la colaboración con el analizador genético. Al equipo interdisciplinario que con su día a día hacen posible el Programa Nacional de Tamizaje

Indice

I INTRODUCCION	1
I.1 Manifestaciones clínicas	2
I.2 Fisiología.....	3
I.3 Bioquímica	5
I.4 Situación de la PKU en Costa Rica.....	9
I.5 Epidemiología de la PKU	10
I.6 Justificación	11
II. OBJETIVOS.....	12
II.1 Objetivo general.....	12
II.2 Objetivos específicos	12
III METODOLOGIA	13
III.1 Población estudiada.....	13
III.2 Recolección de las muestras de los pacientes	13
III.3 Análisis mutacional	14
III.4 Análisis de las secuencias de la PAH	17
III.5 Análisis poblacional	17
IV RESULTADOS Y DISCUSION	19
IV.1 Análisis de las secuencias.....	19
IV.2 Comportamiento poblacional de la PAH.....	24
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
VI BIBLIOGRAFIA.....	31
ANEXOS.....	34

RESUMEN

La deficiencia total o casi por completo de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) conduce a la acumulación de fenilalanina en los fluidos corporales, lo que produce un retardo mental severo, el cual se diagnostica como fenilcetonuria (PKU). Este padecimiento es un error innato del metabolismo de los aminoácidos y presenta una herencia monogénica autosómica recesiva. El gene que codifica para la proteína PAH se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 12, en la región 12q24.1. Este gene se expande aproximadamente 90kb y consta de 13 exones. La identificación temprana de esta enfermedad permite disminuir notablemente los efectos en las personas afectadas. El objetivo principal del presente estudio es identificar las mutaciones de la fenilalanina hidroxilasa y efectuar el correspondiente análisis genético poblacional de la PKU. Esto con el fin de poder contribuir a obtener un panorama más amplio sobre la verdadera situación de la población costarricense con relación a esta enfermedad.

El estudio se realizó en el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y de Alto Riesgo, entre setiembre del 2004 a mayo del 2006 e incluye todos los pacientes diagnosticados con PKU en el periodo comprendido entre 1993 y 2004. Las mutaciones se identificaron por medio de la técnica de la secuenciación directa de cada exón del gene de la PAH. Estas están representadas en un 72% principalmente por tres mutaciones: la L48S, IVS1 nt5 y la IVS7 nt3, solo la primera se encuentra en toda Europa mientras que las dos últimas sólo en la población española y con baja frecuencia. También se identificaron dos polimorfismos: el V245V y el L385L. Se concluye que no hay una relación directa entre el genotipo y el fenotipo dentro de los genotipos identificados. En las familias estudiadas existe endogamia para la mayoría de las parejas aunque sólo se observa consanguinidad hasta la tercera generación.

Los resultados obtenidos favorecen la presencia de un mejor servicio para la población mediante la detección temprana y seguimiento de pacientes con PKU, lo que permite agilizar el diagnóstico confirmatorio de las mutaciones presentes en el paciente, que facilita un consejo genético eficiente y establecer una mejor orientación y seguimiento tanto para el paciente como su familia. Se recomienda: 1) hacer únicamente los estudios para diagnóstico a portadores si existe un antecedente familiar de PKU en la familia y no generalizar en toda la región o país, 2) no realizar análisis de ADN a la población prenatal de alto riesgo y se discute la pertinencia de efectuar estudios de PKU en un contexto ético, moral y legal.

I INTRODUCCION

La fenilalanina (Fen) es un aminoácido esencial presente en todas las proteínas, cuya vía metabólica de mayor importancia fisiológica implica su conversión a tirosina mediante una reacción de hidroxilación catalizada por la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (PAH ó PheOH) (Guisar, 1994).

La deficiencia total o casi por completo de PAH conduce a la acumulación de Fen en los fluidos corporales, lo que produce un retardo mental severo, el cual se diagnostica como fenilcetonuria (PKU, por sus siglas en ingles). El nombre se deriva de la presencia detectable del ácido fenilpirúvico en la orina; producto secundario de la fenilalanina. (Behrman *et al.*, 1997)

La PKU es uno de los errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. Su herencia es monogénica y autosómica recesiva; las distintas mutaciones en el gen que codifica para la PAH tienen distinto impacto sobre la actividad enzimática, causando un rango de fenotipos clínicos desde PKU severa a hiperfenilalaninemia leve la cual no requiere tratamiento. (Fusetti *et. al.*, 1998) Mas de quinientas diferentes mutaciones han sido identificadas y anotadas para el gene de la PAH en la base de datos pahdb.mcgill.ca (Scriver *et. al.*, 2003)

El gene que codifica para la proteína PAH se encuentra localizado en el brazo 12 q24.1. Este se expande aproximadamente 90kb y consta de 13 exones.

L1 Manifestaciones clínicas

El niño afectado no tiene manifestaciones clínicas al nacer. El retardo mental se manifiesta lentamente, sin apreciarse durante unos meses, suele ser grave y la mayoría de los pacientes deben ser atendidos en centros especiales. Los vómitos, a veces lo suficientemente intensos como para diagnosticar erróneamente una estenosis pilórica, pueden ser un síntoma precoz. Los niños mayores no tratados presentan hiperactividad con movimientos sin finalidad, oscilaciones rítmicas y atetosis.

En la exploración física, los lactantes de origen caucásico, son más rubios que sus hermanos no afectados; tienen la piel blanca y los ojos azules. (Behrman *et. al.*, 1997). Esta falta de pigmentación se comprende en la vía metabólica de la melanina, la cual se encuentra bloqueada en el precursor, ya que este pigmento se da origen en el paso de L-tirosina a L-dopamina. Algunos presentan una erupción cutánea seborreica o eccematosa, que suele ser leve y que desaparece a medida que el niño se hace mayor (Behrman *et. al.*, 1997)

La correlación genotipo- fenotipo ha sido investigada *in vitro* e *in vivo* para varias mutaciones y el análisis de mutaciones en neonatos afectados puede ayudar a predecir la severidad de la enfermedad (Zschoke *et. al.* 1995; Gámez et al 2000).

Conociendo la severidad de la PKU se puede ayudar a identificar particularmente la intensidad de la ayuda a la familia especialmente las que presentan formas severas de la enfermedad y ofrecer el asesoramiento de una forma más racional.

I.2 Fisiología

En ausencia de una vía catabólica normal para la fenilalanina, varias reacciones que de otro modo tendrían importancia cuantitativa menor en el hígado normal, asumen un papel catabólico principal. En la PKU, la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa produce la acumulación de fenilalanina y de metabolitos que se derivan de una vía alterna de transaminación -a saber, ácido fenilpirúvico, ácido fenilacético producido por la descarboxilación y oxidación del ácido fenilpirúvico, ácido feniláctico producto de la reducción del ácido pirúvico y fenilacetilglutamina- en sangre y orina.

Una vieja hipótesis prácticamente abandonada, a favor de un desbalance de aminoácidos provocado por el exceso de Fen sugiere que las altas concentraciones de estos metabolitos interfieren en el desarrollo normal del encéfalo, provocando retardo mental. (de Céspedes *et. al.* 1989)

Los trastornos metabólicos principales, relacionados con el defecto en la capacidad para convertir a la fenilalanina en tirosina pueden clasificarse en tres amplios grupos: defectos en la fenilalanina hidroxilasa (hiperfenilalaninemia tipo I o PKU clásica), defectos en la dihidrobiopterinreductasa (hiperfenilalaninemia tipos II y III) y defectos en la biosíntesis de la dihidrobiopterina (hiperfenilalaninemia tipo IV y V). Cabe resaltar que los tipos I, II y III, no representan categorías claramente separadas, se han dado rangos que hasta cierto punto son arbitrarios; en todo caso cualquier paciente con Fen mayor de 7 mg/dl, debe tratarse con dieta y el tiempo dirá si la hiperfenilalaninemia fue persistente, o leve transitoria. No obstante existen otras clasificaciones, algunas de ellas ya desechadas por los expertos. (cuadro 1)

Las hiperfenilalaninemias producto de una deficiencia o defectos en la síntesis de la enzima dihidrobiopterina reductasa no conducen a una PKU clásica, pero sí tienen efectos en la PAH y en otras enzimas dependientes de la biopterina como cofactor. En contraste con la PKU clásica, los síntomas clínicos resultado de los defectos del metabolismo de la biopterina no son tratables con una simple dieta restringida de fenilalanina, sino que requieren la administración de la coenzima activada (BH4) (Murray *et. al.* 1988).

Cuadro 1: Tipo de Hiperfenilalaninemias

Tipo	Condición	Defecto	Tratamiento
I	Fenilcetonuria	Ausencia de fenilalaninahidroxilasa	Dieta escasa en fenilalanina
II	Hiperfenilalaninemia persistente	Disminución de la fenilalanina hidroxilasa	Ninguna o dieta terapéutica temporal
III	Hiperfenilalaninemia leve transitoria	Retraso en la maduración de la hidroxilasa	Igual que en el tipo II
IV	Deficiencia de dihidro-biopterinreductasa	Deficiencia o ausencia de dihidrobiopterinreductasa	Dopa, 5- OH- triptófano, carbidopa
V	Función anormal de la dihidrobiopterinreductasa	Defecto en la síntesis de la dihidrobiopterina	Dopa, 5- OH- triptófano, carbidopa
VI	Hiperfenilalaninemia persistente y tirosinemia	¿catabolismo de la tirosina?	Ingestión reducida de fenilalanina
VII	Tirosinemia neonatal transitoria	Inhibición de la p- hidroxifenil pirúvico- oxidasa	Vitamina C
VIII	Tirosinemia hereditaria	Deficiencia: <ol style="list-style-type: none"> 1. p-OH fenilpiruvato desoxigenasa 2. tirosinaminasatransferasa citoplasmática 3. fumarilacetoacetato 	Dieta escasa en tirosina Dieta escasa en tirosina más inyecciones de glutatión

Murray *et al* 1988

1.3 Bioquímica

La fenilalanina hidroxilasa (PAH) es un enzima metabólica que convierte la fenilalanina a tirosina, utilizando oxígeno, hierro y 6R-tetrahioterina (BH4) como cofactor (Kaufman et al citado por Horne, J 2002) (Figura 1). PAH es miembro de la familia de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos junto con la tirosina hidroxilasa (TH) y la triptófano hidroxilasa (TPH). TH y TPH están involucradas en la síntesis de neurotransmisores, dihidrofenilalanina (L-DOPA) y serotonina, respectivamente. Las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos tienen un mecanismo similar y tienen en común la estructura de tres dominios que consisten en: un dominio regulatorio N-terminal, un dominio catalítico y un dominio de tetramerización C-terminal (Horne, J. 2002).

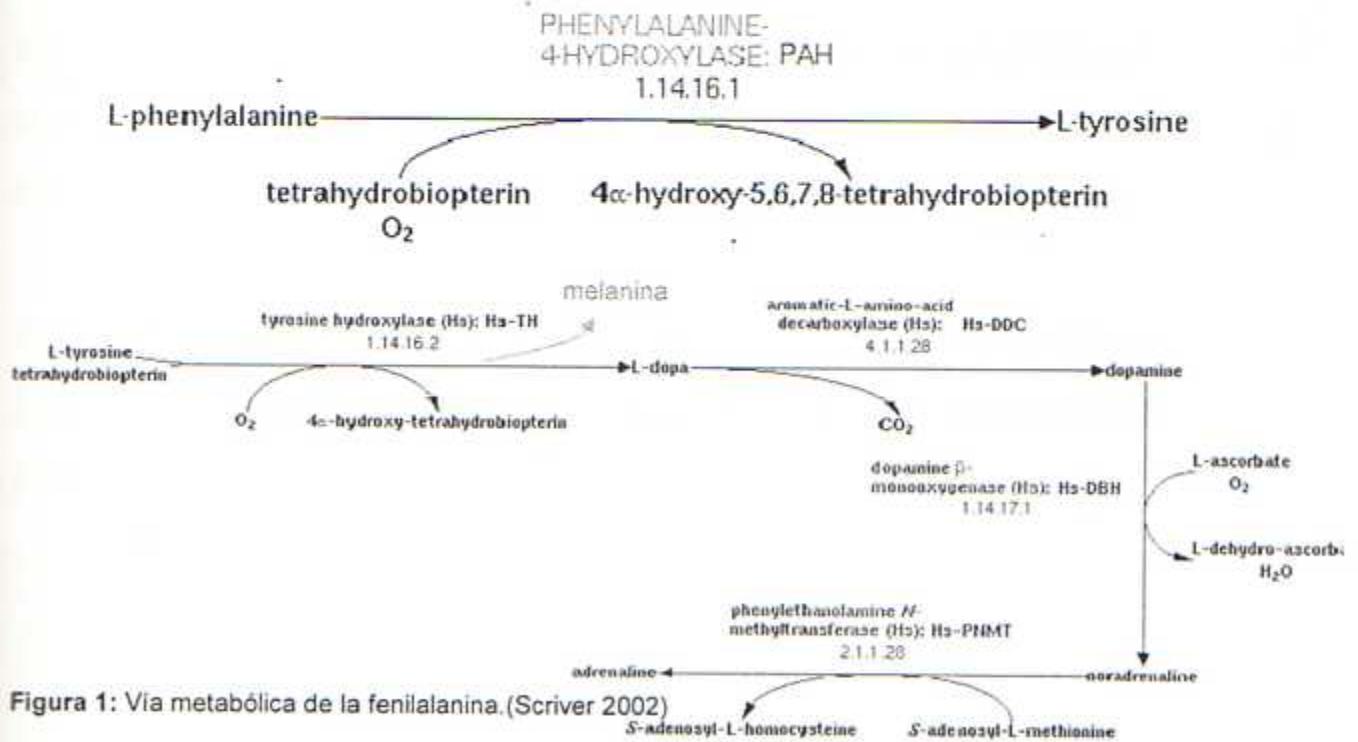


Figura 1: Vía metabólica de la fenilalanina. (Scriver 2002)

PAH controla los niveles de fenilalanina el cual es un aminoácido esencial y es sujeto de largas fluctuaciones debido a que se ingiere según la dieta.

Por un lado los niveles de PAH en el hígado son tales que si no se controlan, la enzima podría rápidamente consumir la fenilalanina almacenada y por otro lado los metabolitos de la fenilalanina son tóxicos para el desarrollo del cerebro. Por lo que la PAH es altamente controlada por una variedad de mecanismos. Algunos de ellos son: activación de sustrato por fenilalanina, inhibición por BH₄, como regulador negativo, este bloquea la activación de la fenilalanina y la activación por fosforilación (Horne, J. 2002).

Para Fusetti et. al., 1998 la estructura cristalina de la fenilalanina hidroxilasa es un tetrámero (figura 2), donde cada monómero contiene un dominio de tetramerización y otro catalítico. El dominio de tetramerización se caracteriza por la presencia de un brazo cambiante que interactúa con los otros monómeros formando un "coiled-coil" antiparalelo. Este dominio consiste en dos cadenas β .

Cada brazo se extiende sobre un monómero vecino formando las cuatro hélices (uno de cada monómero) fuertemente empaquetadas en el centro de la estructura.

(Figura 2)

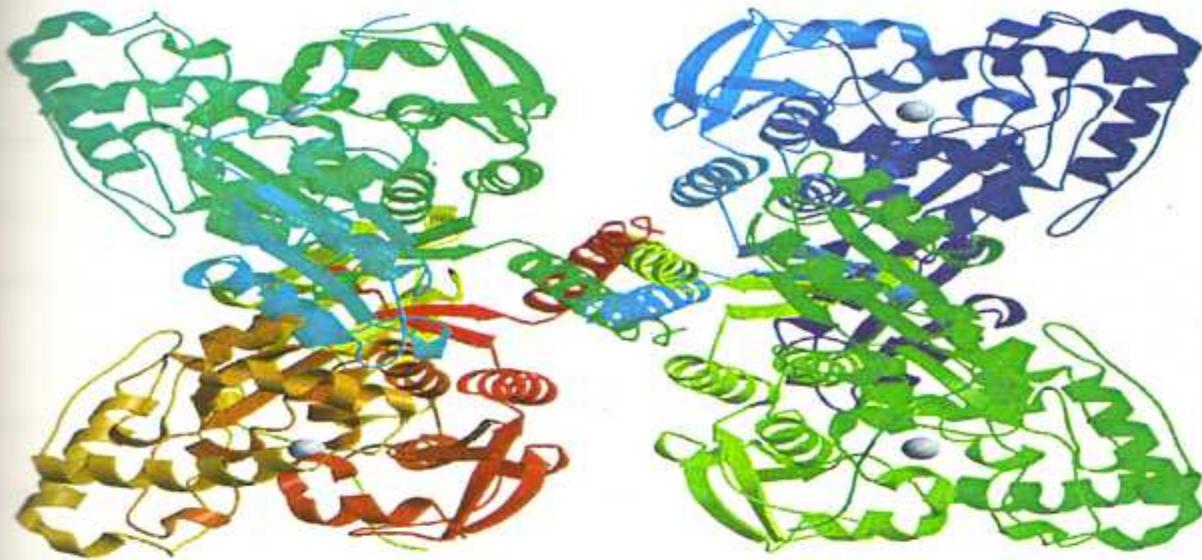


Figura 2 Estructura cristalina de la fenilalanina hidroxilasa (PhrOH) <http://www.pahdb.mcgill.ca>
(Scriver 2003)

La estructura tetramérica de la PheOH está formada por dos dímeros conformacionalmente diferentes, una superposición de estos dos monómeros muestran el dominio catalítico y el de tetramerización. Si los dos monómeros son tomados separadamente, son idénticos estructuralmente pero adoptan relativamente diferentes orientaciones.

Se cree que la activación de PAH se alcanza por la fosforilación específica del dominio regulatorio y/o por la activación del sustrato. Esta última activación ha sido objeto de intensos estudios bioquímicos y espectroscópicos los cuales han mostrado que es altamente cooperativa entre las cuatro subunidades y siempre es acompañado de cambios en la estructura terciaria lo que da como resultado una *modificación de la estructura del monómero* y promueve una fuerte asociación a la interface de dímero. Esto también se aprecia por los cambios en el volumen de la

proteína tetramérica, por el intercambio dímero- tetrámero el cual se une a la L-fenilalanina. La estructura asimétrica del tetrámero PheOH Cterm puede representar un estado intermedio y sugiere una alta flexibilidad en el dominio de tetramerización que es requerida para una óptima orientación del dominio para la catálisis (Fusetti *et. al.* 1998).

Además en un estudio de análisis de expresión en mutaciones de PAH, se observó que el mantenimiento del sitio de unión del hierro es crucial para la integridad del monómero, al igual que para el ensamblamiento para la oligomerización de la proteína. Estos resultados se obtuvieron luego de que se analizaran las mutaciones L348V y V388M . (Gamez, A. 2000).

En este mismo estudio se demostró que la proteína puede ser modulada por proteínas chaperonas y las condiciones de temperatura lo que puede ayudar a explicar las inconsistencias genotipo-fenotipo descritas para algunas mutaciones (Gamez, A. 2000).

Se ha observado que el dominio catalítico presenta el mayor número de mutaciones causantes de PKU (Fusetti *et. al.* 1998).

También es importante resaltar que los monómeros pueden estar formados por un alelo mutado 1 (M1) y un segundo alelo 2 (M2) y las posibles combinaciones como: (M1)₄ ó (M2)₄, homotetrámeros, así también las combinaciones (M1)₃ (M2)₁, (M1)₂ (M2)₂, (M1)₁ (M2)₃, heterotetrámeros. Así para mutaciones "severas", deleciones, inserciones, terminación prematura, mutaciones en intrones

(que lleven a defectos en el "splicing"), la actividad es muy poca o no hay. De esta manera los pacientes que tienen un alelo con una mutación severa podría tener una mayor actividad enzimática del segundo alelo (Erlandsen, H. 2001)

I.4 Situación de la PKU en Costa Rica

En 1982 se describieron los primeros casos de PKU en Costa Rica, en un estudio que de acuerdo a los autores, representa una etapa previa de interés al programa de detección masiva neonatal de errores congénitos del metabolismo (ECM) en Costa Rica (de Céspedes *et. al.* 1983; de Céspedes *et. al.* 1984)

En 1990 se inició oficialmente por Decreto Ejecutivo el Programa de Tamizaje Neonatal y de Alto Riesgo (PNT), el cual involucra actualmente diferentes instancias del sistema de salud incluyendo desde los equipos básicos de atención integral en salud (EBAIS) hasta los servicios mas especializados del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera" (de Céspedes *et. al.* 2003) El objetivo fundamental de este Programa Nacional de Tamizaje es el de prevenir el retardo mental y otras discapacidades provocadas por enfermedades metabólicas hereditarias y trastornos relacionados, por medio de su detección y tratamiento temprano. Además de iniciar el desarrollo de servicios de Medicina Predictiva dentro del Sistema de Salud de Costa Rica (de Céspedes *et. al.* 2003)

En la década del 90, De Céspedes et al (1994) y Santos *et al* (1996) realizaron un análisis genético- molecular en pacientes de PKU, diagnosticados previamente al Programa Nacional de Tamizaje Neonatal, con daño neurológico y con la PKU clásica. El análisis de las mutaciones se realizó en forma directa e indirecta (por medio de haplotipos). Sus resultados indicaron la exclusión de mutaciones presentes en poblaciones europeas y mediante la secuenciación directa se identificó una nueva mutación la IVS7 nt3, así como la presencia de polimorfismos silenciosos. Estos autores concluyeron que el estudio es parte de la contribución para la caracterización de la población costarricense; orienta el consejo genético y se considera que podría orientar otros estudios moleculares.

1.5 Epidemiología de la PKU

Estudios epidemiológicos muestran que el rango de la frecuencia de PKU es variable en distintas partes del mundo; así, en Turquía es aproximadamente de 1 en 2600, mientras que en Japón es de 1 en 12000. En general, en poblaciones de origen caucásico la PKU tiene una prevalencia global de 1 en 10 000 (Eisensmith 1992)

De acuerdo con las estadísticas del Programa de Tamizaje Neonatal en Costa Rica la incidencia es de 1 en 49 176

1.6 Justificación

Para llevar a cabo estudios como el presente, la biología molecular ofrece un amplio repertorio de técnicas para identificar las diferencias entre los distintos genomas: desde las muy generales hasta muy específicas como la secuenciación, y la utilización de gran cantidad de marcadores para ciertas regiones del genoma, los cuales proveen mucha información de sitios probablemente polimórficos.

En este contexto, se han identificado en el gen de la PAH alrededor de quinientas mutaciones y muchas de ellas responsables de la PKU; por lo tanto al estar disponible la tecnología adecuada se puede contribuir para obtener un panorama más amplio sobre la verdadera situación de la población costarricense con respecto a esta enfermedad.

El análisis genético-molecular ayudaría a brindar un mejor servicio a la población mediante la detección temprana del gene PKU y su posterior seguimiento, evitando o minimizando las consecuencias con un diagnóstico confirmatorio de las mutaciones presentes en el paciente y con esto se logra un perfil genético individual para la PKU y de esta manera personalizar el tratamiento para obtener una mayor efectividad. Al mismo tiempo permite ofrecer al paciente y su familia un consejo genético eficiente y establecer una mejor orientación en los pasos a seguir en todos los aspectos relacionados con la enfermedad.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Identificar a un nivel molecular las mutaciones de la fenilalanina hidroxilasa y efectuar el correspondiente análisis genético poblacional de la PKU, en niños afectados y detectados por el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y de Alto Riesgo de Costa Rica

II.2 Objetivos específicos

- 2.1 Realizar el tamizaje molecular de las mutaciones en la fenilalanina hidroxilasa en pacientes detectados y diagnosticados de PKU por tamizaje neonatal en la población costarricense en el período comprendido de enero de 1993 a diciembre del 2004.
- 2.2 Conocer algunos aspectos de la epidemiología genética de la PKU de Costa Rica mediante la recolecta de información de cada familia
- 2.3 Reconocer la localidad del espectro de mutaciones de PKU de la población costarricense estudiada.
- 2.4 Analizar correlaciones genotipo-fenotipo en los pacientes estudiados

III METODOLOGIA

III.1 Población estudiada

El análisis de mutaciones se desarrolló en todos los pacientes diagnosticados con PKU en el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y de Alto Riesgo en el período comprendido de enero 1993 a diciembre 2004

Se considera un resultado positivo por tamizaje cuando la concentración de fenilalanina en "la mancha seca de sangre" recolectada en el papel de filtro especial, está por arriba del punto de corte de 4mg/dl. Posteriormente se realiza un análisis más preciso desde el punto de vista cuantitativo en un analizador automático de aminoácidos; las concentraciones iniciales de Fen en los pacientes estudiados fueron de 19 a 40mg/dl. Para un total de 15 familias

III.2 Recolección de las muestras de los pacientes

Se tomó una muestra de sangre periférica del antebrazo de cada paciente que consiste en 1.5- 5cc de sangre en tubos con EDTA de acuerdo a los procedimientos del laboratorio establecidos, y previa firma del consentimiento informado una vez leído y explicada la naturaleza del estudio. La fórmula de consentimiento informado fue aprobada por el Comité Local de Bioética e Investigación del Hospital Nacional de Niños (CLOBI- HNN) en setiembre del 2004 (Ver anexo 1), los padres del paciente debieron completar el cuestionario diseñado para la recopilación de datos de la información epidemiológica de PKU. Una muestra de esta información se encuentra en el anexo 2

La extracción del ADN se realizó a partir del procedimiento "salting-out" suscrito por Miller y Polesky (1987).

III.3 Análisis mutacional

III.3.1 Los 13 exones del gen de la fenilalanina hidroxilasa se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con Gable *et. al.* 2003, y Zschocke *et. al.* 1995

Las secuencias de los imprimadores utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados se encuentran en el cuadro 2

III.3.2 Condiciones de reacción en la PCR

Las condiciones de la PCR se encuentran resumidas en el cuadro 3, y el perfil utilizado es igual para todos los exones

III.3.3 Electroforesis y tinción

Los productos finales obtenidos en la PCR, fueron separados en una electroforesis de geles de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio, para su confirmación, cuantificación y posterior purificación para efectuar la correspondiente reacción de secuenciación.

Cuadro 2: Secuencia de los imprimadores, concentraciones finales y tamaño del producto (Tanksley, 2003)

exones PAH	Nombre del imprimador	Secuencia	Tamaño producto aprox	Secuencia inicial del imprimador
Exón 1	1F-PKU 1R-PKU	TTAAAACCTTCAGCCCCACG TGGAGGCCCAAATTCCTAACTG	197 pb	1F- PKU
Exón 2	2F-PKU 2R-PKU	GAGGTTTAAACAGGAATGAATTGCT TCCTGTGTTCTTTTCATTGC	264 pb	2F- PKU
Exón 3	3F-PKU 3R-PKU	GCCTGCGTTAGTTCCTGTGA CTTATGTTGCAAATTCCTC	267 pb	3F- PKU
Exón 4	4F-PKU 4R-PKU	ATGTTCTGCCAATCTGTA CT CAGGA CAAGACATAGGCCATGGACT	159 pb	4F- PKU
Exón 5	5F-PKU 5R-PKU	TCATGGCTTTAGAGCCCCCA AGGCTAGGGGTGTGTTTTTC	213 pb	5F- PKU
Exón 6	6F-PKU 6R-PKU	CCGACTCCCTCTGCTAACCT CAATCCTCCCCCAACTTTCT	326 pb	6F- PKU
Exón 7	7F-PKU 7R-PKU	GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC AGCAAATGAACCCAAACCTC	263 pb	7F- PKU
Exón 8	8F-PKU 8R-PKU	TGGCTTAAACCTCCTCCCCT CTGGGCTCAACTCATTTGAG	190 pb	8F- PKU
Exón 9	9F-PKU 9R-PKU	ATGGCCAAGTACTAGGTTGG GAGGGCCATAGACTATAGCA	185 pb	9F- PKU
Exón 10	10F-PKU 10R-PKU	TTAACGATCATAGAGTGTGC ACAAATAGGGTTTCAACAAT	232 pb	10F- PKU
Exón 11	11F-PKU 11R-PKU	TGAGAGAAGGGGCACAAATG GCCAACCACCCACAGATGAG	301 pb	11F- PKU
Exón 12	12F-PKU 12R-PKU	ATGCCACTGAGAACTCTCTT GATTACTGAGAAAGTGGCCT	234 pb	12F- PKU
Exón 13	13F-PKU 13R-PKU	GACA CT TGAAGAGTTTTTGC TTTTCGGACTTTTTCTGATG	190 pb	13F- PKU

Cuadro 3 Perfiles de la PCR (Gable *et. al.* 2003), utilizados en este estudio. Programa Nacional de Tamizaje neonatal de Costa Rica. 2005-2006

Condiciones de reacción (para todos los sitios)		Condiciones de amplificación (para todos los sitios)	
ADN	10 µg	95°/3'	} 35X
Imprimadores	0.2- 1.2 pmol	95°/15''	
Taq polimerasa	0.05 U	56°/30''	
KCl	50 mM	72°/30''	
Tris- HCl	10 mM		
MgCl ₂	4 mM	72°/7'	
dNTPs	0.8 mM	4°/∞	

III.3.4 Purificación de los productos de la PCR

Cada exón amplificado se purificó siguiendo el procedimiento del Kit de purificación de Fermentas #K0513. En este estudio se efectuaron las siguientes modificaciones con resultados satisfactorios, dado que al realizar el procedimiento según el manual, no se obtenía una buena recuperación del ADN:

1_ Se eliminó el vortex y se agitó manualmente (con el dedo), ya que se evita que en el gel de prueba se observe una banda adicional de menor tamaño, la cual se concluyó que era un fragmento de la banda original por lo que se estaba quebrando el fragmento de ADN.

2_ Se disminuyeron las cantidades de buffer de lavado de 500µl a 150µl y las repeticiones de 3 a 2, obteniéndose buenos resultados.

III.3.5. Reacción de secuenciación

Una vez purificados los productos de la PCR, se lleva a cabo la reacción con el kit de secuenciación Big Dye terminador v1.1, según las recomendaciones del protocolo (Cuadro 4)

Cuadro 4. Condiciones para las reacciones de secuenciación utilizadas en la presente investigación. Programa Nacional de Tamizaje neonatal de Costa Rica. 2005-2006

Condiciones de reacción		Condiciones secuenciación (para todos los sitios)
Producto purificado	250ng	96°C 1min
Oligonucleotido	3.2pmol	96°C 10' } 25 ciclos
Big dye	2.0	50°C 5'' }
Buffer	2.0	60°C 4' }
Agua	llevar a 20 µl	4°C ∞

III.3.6 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación

Se utilizó la purificación con etanol/EDTA/ Acetato de Sodio, recomendado por el protocolo Big Dye Terminador v1.1 Cycle Sequencing kit

III.4 Análisis de las secuencias de la PAH

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Analizador Genético 310 de la Escuela de Biología con el capilar largo de secuenciación y los siguientes reactivos: POP 6, STR. Y las siguientes condiciones de corrida: Seq POP6 (1ml)E, DT POP6 DB

En este punto se disminuyó el tiempo de corrida de 120 minutos a 60 minutos, ya *que en los primeros electroferogramas de buena calidad se observó, que las secuencias se obtenían en una hora.*

Se utilizaron los programas requeridos por el analizador genético de acuerdo a las instrucciones del fabricante y también el programa Seqman, para el análisis de los exones de cada probando, comparándolos con la secuencia estándar del gene de la PAH según GeneBank: NM_000277.

III.5 Análisis poblacional

Se construyeron genealogías con la información descrita en el punto III.1 y se calculó con ellas el coeficiente de endocruzamiento. Los lugares donde se localizó la enfermedad se determinó por medio de los lugares de nacimiento de los niños. El efecto migratorio de cada uno de los alelos mutantes se determinó a partir del

lugar de nacimiento de cada uno de los padres o a partir del sitio de residencia en los primeros años de vida de cada uno de ellos.

Las genealogías se dibujaron con la ayuda del programa de computación Cyrilic 2.1 (Chapman, 1993).

IV RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 Análisis de las secuencias

En el análisis de electroferogramas (Fig. 3), se observan los picos de las diferentes bases nitrogenadas y dos secuencias, una de ellas es la de la muestra en análisis y la otra corresponde a la secuencia estándar. Por lo tanto, un cambio de una base en estado homocigota se observa como un pico simple y difiere con la secuencia de referencia, la cual indica la base nitrogenada a que corresponde (Fig. 3A), mientras que el cambio en estado heterocigota se percibe en el electroferograma como un doble pico debido a la presencia de ambas bases nitrogenadas y en la secuencia de la muestra cambia la letra (Fig. 3B).

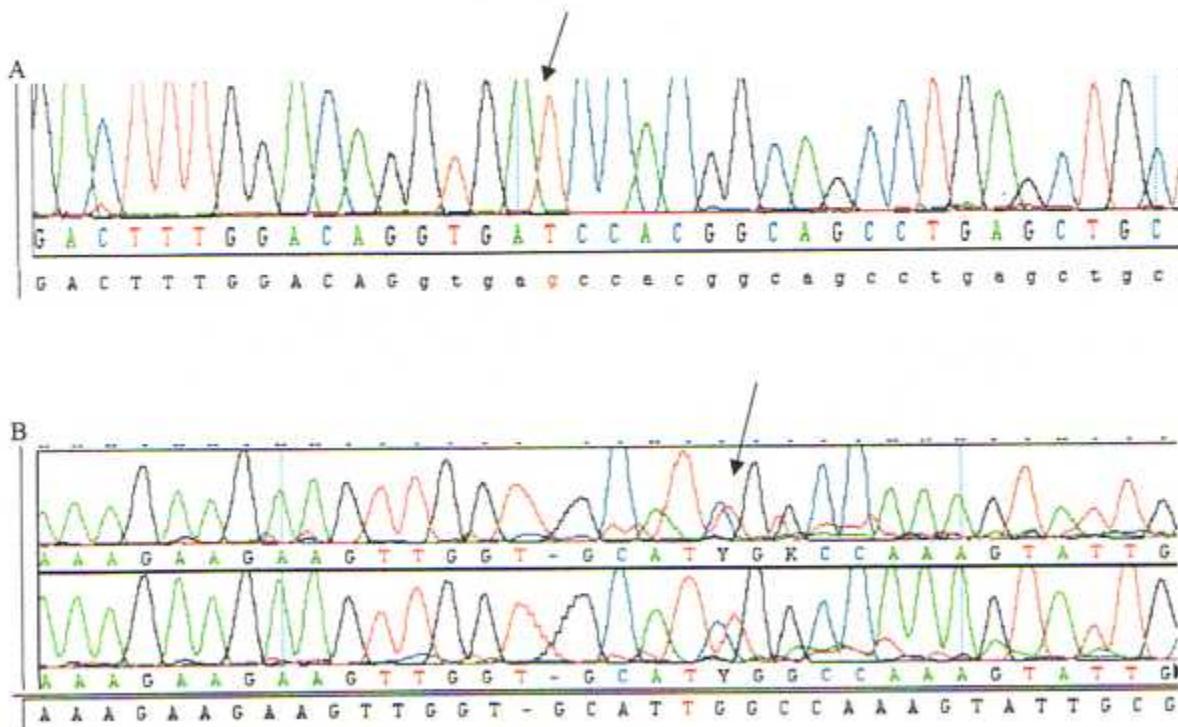


Figura 3 Análisis de los electroferogramas mostrando: A sustitución de G por T en estado homocigota, B sustitución T por G en estado heterocigota

Luego de un análisis exhaustivo de las secuencias, se lograron identificar un total de ocho cambios puntuales desglosados en el cuadro 5. No se observaron deleciones ni inserciones.

Cuadro 5: Mutaciones identificadas en los probandos PKU, Programa Nacional de Tamizaje neonatal de Costa Rica. 2005-2006.

Mutaciones	Número de alelos	%
L48S	10	31,25
Ivs1 nt5	7	21,88
Ivs7 nt3	6	18,75
R261Q	1	3,13
A309V	1	3,13
	1	3,13
ND	7	21,88
Polimorfismos		
V245V	5	
L385L	2	

ND no detectada

A partir del cuadro 5 se puede concluir que aproximadamente con tres mutaciones se cubre el 72% de los probandos caracterizados. Estas mutaciones son L48S, IVS1 nt5 y IVS7 nt3. El 18,73% no identificadas puede atribuirse a varios factores, a saber: 1 el diseño de los imprimadores; 2 la región del promotor no se tomó en cuenta; y 3 al ser la PAH una enzima que pertenece a las hidroxilasas y que junto con otras enzimas participa en las vías de síntesis de neurotransmisores comparte mecanismos reguladores como lo son las fosforilaciones, moléculas chaperonas y vías de degradación, lo cual lleva a pensar que no solo en el gene de la PAH se encuentran todas las mutaciones.

Por ejemplo, dos de las mutaciones identificadas en el presente estudio la R261Q y la A309V, fueron caracterizadas en el estudio de Pey et al (2003) con un análisis de expresión de mutaciones, mientras que la R261Q es caracterizada como una de las mutaciones que más responde en los sistemas eucariotas y procariotas cuando hay cambios de temperatura y chaperonas. Por otra parte, a la mutación A309V le ocurre todo lo contrario ya que se observó una mala oligomerización y una mala estabilidad térmica.

Las mutaciones identificadas se encuentran distribuidas en los genotipos que se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6: Genotipos de la PAH en los probandos con PKU de este estudio. Programa Nacional de Tamizaje Neonatal de Costa Rica, 2005-2006

Genotipo		Número de individuos	%
L48S	ivs7 nt3	4	25,00
L48S	ivs1 nt5	3	18,75
ivs1 nt5	ivs7 nt3	1	6,25
ivs1 nt5	ivs1 nt5	1	6,25
L48S	R261Q	1	6,25
L48S	ND	2	12,5
ivs1 nt5	ND	1	6,25
ivs7 nt3	ND	1	6,25
A309V	ND	1	6,25
ND	ND	1	6,25

En el cuadro 7, se presentan los niveles de fenilalanina en la sangre para un mismo genotipo mostrando diferentes concentraciones.

Cuadro 7 Niveles promedio de fenilalanina en sangre para el genotipo IVS1 nt5- L48S. Programa Nacional de Tamizaje Neonatal de Costa Rica, 2005-2006

Probando	Promedio	DST
40185	8,96	4,08
40114	5,10	4,07
40144	10,54	3,57

En un estudio de Horne (2002), se observó que no hay una relación directa entre genotipo y fenotipo al igual que en el presente estudio. Una de las razones por las que se justifica esta discrepancia es por la importancia de la vía metabólica a la que pertenece esta enzima y que a la vez posee una alta regulación por la acción de otras enzimas.

Pey y colaboradores (2003), demostraron en su estudio que muchas de las discordancias genotipo- fenotipo se deben, entre otras causas, a errores en empaquetamiento, propiedades regulatorias defectuosas y que pueden originar alteraciones en el sitio de unión de la fenilalanina. Además, es importante señalar que toda esta variación entre individuos también depende de la calidad del sistema de control de cada paciente, incluidas las enzimas chaperonas y las proteasas.

Recientemente se han encontrado mecanismos como el de la actividad de la BH4 como cofactor y chaperona, los cuales fueron sugeridos después de observar el cambio conformacional de la PheOH (Pérez et al 2005).

Uno de los casos analizados en este estudio fue el de una familia en la que dos hermanos afectados presentaron genotipos diferentes. Según Johnston, U (1994), fenotipos dispares pueden ocurrir en una misma familia por modificaciones en la expresión del gene de la PAH por otros loci o factores ambientales tales como la dieta.

Estas diferencias en cada sistema hacen que la fenilalanina se regule de forma independiente para cada caso lo que provoca las diferencias tan marcadas en un mismo genotipo, situación que sugiere estudiar no solo la PAH sino también las vías de regulación de la fenilalanina.

Las mutaciones que se encuentran en el sitio de editaje del ADN deben ser consideradas con precaución y sus efectos caracterizados detalladamente, tomando en cuenta resultados generados en otros estudios (Desviat et al 2004), donde se observó que se generaban algunos transcritos normales para la proteína

Otro de los resultados observados indican que, aún no existiendo una relación directa genotipo fenotipo, dos de los probandos presentaron genotipos en los cuales las mutaciones alteran el sitio de edición del ADN "splicing", lo que sugiere un mayor descontrol en los niveles de fenilalanina en la sangre, que se reflejan en los controles de laboratorio, en su mayoría mas elevados que los otros genotipos combinados con otras mutaciones dentro del exón.

IV.2 Comportamiento poblacional de la PAH

En el cuadro 8, se elaboró una comparación de diferentes estudios con respecto a la presencia o ausencia de las mutaciones en el continente europeo. Los resultados obtenidos muestran lo siguiente: 1_ que la mutación L48S esta muy distribuida en toda Europa, mientras que mutaciones como la IVS1 nt5 y la IVS7 nt3 están reportadas solo para la población española y muestran una baja frecuencia.

2_ En la población de Costa Rica incluida en este estudio, las mutaciones con mayor frecuencia son la L48S, la IVS1 nt5 y la IVS7 nt3 respectivamente.

Santos *et. al.*(1996), en un estudio previo en Costa Rica identificó cinco mutaciones a saber: IVS1nt5, L48S, IVS7nt3, E221G, e IVS12nt1. Los resultados obtenidos en la presente investigación confirman sólo la presencia de las tres primeras y muestra que las mutaciones más comunes en Costa Rica fueron la L48S, la IVS1nt5 y la IVS7 nt3. Además se detectó el polimorfismo silencioso L385L, no reportado por Santos *et. al.* (1996)

Según esta autora las mutaciones IVS1 nt5 e IVS12nt1 fueron originalmente observadas en Dinamarca, mientras que la L48S y la E221G en la población Turca.

Por otra parte, en poblaciones latinoamericanas, para Brasil se reportan las mutaciones IVS10 nt11 junto con la V388M, mientras que en Venezuela la A309V;

según la base de datos de la PAH, de estas solo la A309V se encuentra en la población costarricense estudiada.

El estudio de Morera *et al* (2003), sugiere que es un error asumir un origen europeo *a priori* para cada característica o enfermedad encontrada en la población costarricense, dado el gran aporte genético por parte de la población amerindia y en menor cantidad el africano. Si retomamos la historia de la colonización de Costa Rica podemos entender como es que la mutación L48S está presente en todo el territorio, mientras que la IVS7 nt3 reportada por primera vez en Costa Rica por Santos *et.al.* (1996) tiene una alta concentración en la región central del país lugar donde se encontraban los huetares.

En la figura 4 (mapa) puede observarse como las mutaciones identificadas en este estudio se distribuyen a lo largo del todo el país sin mostrar un patrón definido. La mutación L48S y la IVS1 nt5 se observan a lo largo de todo el territorio, mientras que la IVS7 nt3 muestra cierta agregación en la zona de Desamparados-Aserri y Alajuelita.

Cuadro 8: Presencia (P) o ausencia (A) de las mutaciones de PKU mas frecuentes en varios paises.

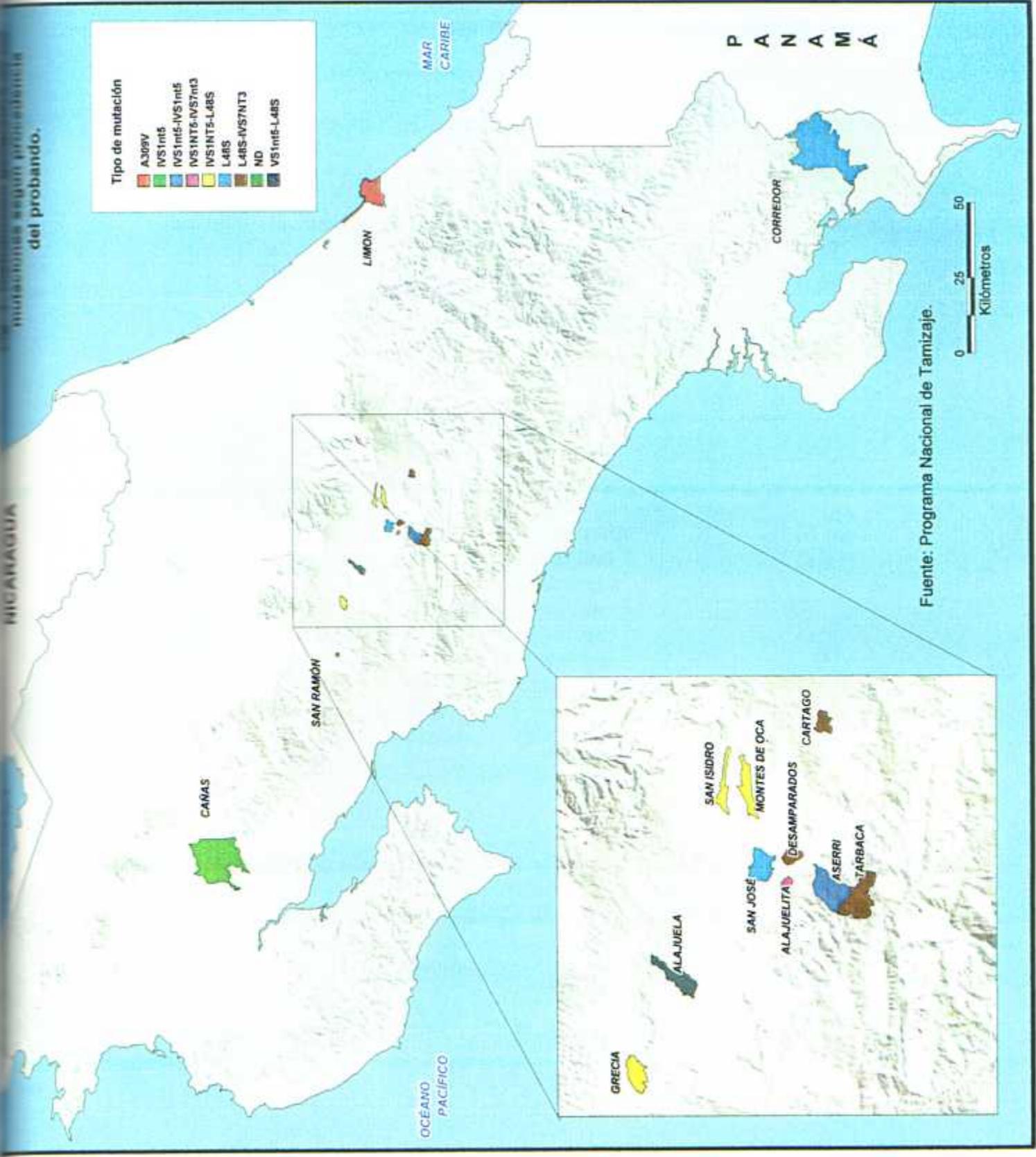
Pais	Mutaciones																				
	NS10 nt 1165T	V398M	R261Q	E280K	VS7ntE	A403V	R68S	R243X	R243Q	P281L	A309V	L311F	S349P	Y414P	L48S	VS7nt3	M1V	F299C	S349P	Referencia	
España	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Pérez, B 1997
Canada																					
Este Quebec	P	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Carter, K 1998
Oeste Quebec	P	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Carter, K 1998
Montreal	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Carter, K 1998
La Provincia	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Carter, K 1998
Inglaterra (suroeste)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Irlanda (Norte)	P	P																			Zchocke, J. 2000
Irlanda (ROI)	P	P																			Zchocke, J. 2000
Irlanda (Munster)	P	P																			Zchocke, J. 2000
Irlanda (Leinster)	P	P																			Zchocke, J. 2000
Alemania(2003)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Belgica	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Francia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Francia (Norte)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Croacia																					Zchocke, J. 2000
Bulgaria	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Italia (Sur)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Silicia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Venezuela																					Zchocke, J. 2000
Brasil	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Zchocke, J. 2000
Costa Rica																					Zchocke, J. 2000

Santos (1996)
Presente estudiado.
www.pahdb.com
www.pahdb.com

mutaciones según prevalencia del probando.

Tipo de mutación

A309V	IVS1nt5	IVS1nt5-IVS1nt5	IVS1nt5-IVS7nt3	IVS1nt5-L48S	L48S	L48S-IVS7nt3	ND	VS1nt5-L48S
[Red]	[Green]	[Blue]	[Yellow]	[Light Blue]	[Light Green]	[Dark Green]	[Dark Blue]	[Purple]



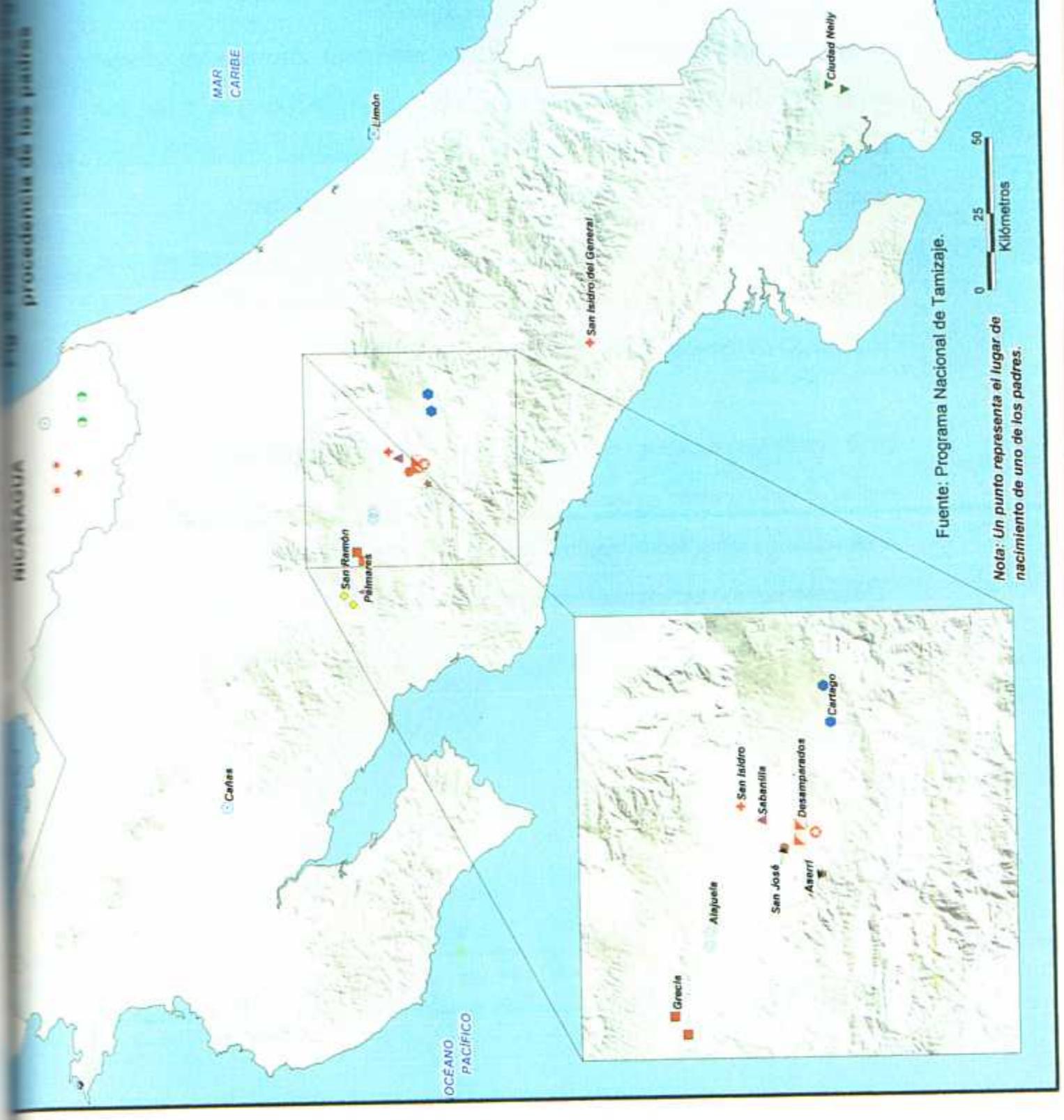
Fuente: Programa Nacional de Tamizaje.

Así como en el pasado hubo un flujo de la cultura Chorotega que llegó hasta Guanacaste y ciertas partes de Puntarenas, actualmente se presenta el aporte nicaragüense como otro más de esta cultura, el cual a su vez ha llegado más hacia el Valle Central e inclusive parte del Caribe ver cuadro 9 y figura 5. (mapa)

Cuadro 9: Distribución geográfica según la procedencia de los probandos y el lugar de nacimiento de sus padres. Programa Nacional de Tamizaje Neonatal, 2004-2006.

Procedencia probando	Procedencia padre	Procedencia madre
Grecia	Alajuela	Alajuela
San Ramon	Alajuela	Alajuela
Aserri	Nicaragua	San Jose
Sabanilla	San Jose	San Jose
Desamparados		San Jose
Limon		Limon
Zona Sur	Puntarenas	Puntarenas
Coronado	San Jose	San Jose
Aserri	Nicaragua	Nicaragua
Alajuelita	San Jose	San Jose
Desamparados		San Jose
Desamparados		San Jose
Cartago	Cartago	Cartago
Cañas	Nicaragua	Nicaragua
Alajuela	Alajuela	Alajuela
Pavas	Nicaragua	Guanacaste

Es importante también mencionar que parte de la población estudiada está constituida por pacientes de origen y descendencia nicaragüense, la cual mostró una alta frecuencia para la mutación IVS1nt5.



Fuente: Programa Nacional de Tamizaje.

Nota: Un punto representa el lugar de nacimiento de uno de los padres.

Además de toda esta distribución por parte de nuestros amerindios, se observa otro factor, el efecto migratorio. En el caso de los padres costarricenses de los probandos este es relativamente bajo ya que en su gran mayoría las parejas no se desplazaron grandes distancias, como se puede observar en el mapa, excepto para las parejas o individuos procedentes de Nicaragua. En el caso de los probandos suele coincidir con el sitio de procedencia de los padres también con la excepción de los provenientes de Nicaragua ya que estos nacieron en Costa Rica.

A pesar de que se da la endogamia en la muestra de la población estudiada, como se muestra en las genealogías (Anexo 2) no se observó consanguinidad, ya que en ninguna de las familias estudiadas se presentaron cruces entre parientes en la tercera generación, por lo que no se analizó la consanguinidad (Ver genealogías)

V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar este proyecto se originan varias conclusiones, entre ellas algunas con implicaciones éticas, a saber:

1. Estudios de los portadores del gene de la PKU en la población general. Si bien la enfermedad en nuestro país podría estar agregada en pequeños grupos poblacionales específicos para ciertas regiones, podría pensarse en la posibilidad de implementar un estudio sobre la genética de poblaciones en esas regiones. Sin embargo es recomendable hacer únicamente los estudios para diagnóstico a los portadores debidamente identificados, si existe un antecedente familiar de la PKU y no generalizar para toda la región o el país.
2. Relacionado con lo anterior, se recomienda no realizar los análisis de ADN para la PKU a la población prenatal de alto riesgo en nuestro país, a pesar de los antecedentes familiares de dicha enfermedad; ya que esto podría originar dilemas éticos, morales y legales, como llegar a contemplar el aborto y este procedimiento es contrario a la vida humana, las leyes de la república y de la mayoría de las religiones.
3. No realizar otros estudios basados en ADN a partir de las muestras obtenidas de las familias de PKU con otros propósitos que no fueron los originales a la hora de plantear esta investigación, sin el previo consentimiento de las familias. Para el estudio de heterocigotos portadores asintomáticos, se utilizaría una hoja de

consentimiento informado específica. Las muestras con el material genético de las familias originales serán resguardadas en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños, bajo la supervisión de algún investigador principal de este proyecto.

4. No realizar diagnóstico de la PKU utilizando ADN, sin antes haber realizado un diagnóstico al paciente desde varios puntos de vista que incluya el diagnóstico clínico y bioquímico.

5. La responsabilidad de dar un diagnóstico y la atención integral de la PKU a partir de pruebas de ADN, así como el consejo genético, deberá hacerse a través de un equipo multidisciplinario que incluya al menos a médicos especialistas en genética, biólogos moleculares con experiencia en trabajos de investigación con humanos, capaces de impartir parcial o totalmente el consejo genético y otros profesionales de campos como la microbiología, enfermería, trabajo social, psicología, un especialista en estadística demográfica o epidemiología y nutrición. Reforzando así el equipo de trabajo actualmente existente en el HNN.

6. Mantener en estricta confidencialidad la identidad de los pacientes y su familia en las publicaciones, y evitar discriminación laboral, social y de seguros de vida.

VI BIBLIOGRAFIA

- Behrman R, Kliegman R, Harbin A. 1997. Tratado de pediatría Vol I.15 ta edic Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España
- Carter, K; Byck, S; Waters, P; Richards, B; Nowacki, P; Laframboise,R; Lambert, B;Treacy, E; Scriver, Ch. 1998. Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation: the Quebec experience. *Eur. J. Hum. Genet.* 6:61-70
- Chapman C. 1993-1997. Cyrillic 2.10 Cherwell Scientific Publishing Ltd.
- Desviat, L; Pérez, B; Belanger- Quintana, A; Castro, M; Aguado, C; Sánchez, A; Garcia,M; Martínez-Pardo, M; Ugarte, M. 2004.Tetrahydrobiopterin responsiveness: Results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol. Genet. Metab.* 83:157-162
- de Céspedes C, Santiesteban I, Ortiz D, Rojas E. 1983 Patrones de excreción de aminoácidos urinarios en niños excepcionales y pacientes con trastornos mentales en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 31(1): 1-9
- de Céspedes C, Santiesteban I, Rojas E, Ortiz, D. 1984 Detección de fenilcetonuria y otros errores congénitos del metabolismo en centros de educación especial de Costa Rica. *Rev Costarr Cienc Med* 5 (1): 17-25
- de Céspedes C, Santos M, Barrantes R, Eisensmith R, Woo S. 1994. Aplicaciones de la biología molecular al tamizaje y diagnóstico de errores congénitos del metabolismo, con referencia particular a la fenilcetonuria. Congreso Latinoamericano de Genética, Puerto Vallarta, Jalisco, México
- de Céspedes C, Thoene JG, Lowler K, Christensen HN. 1989. Evidence for inhibition of exodus of small neutral amino acids in non brain tissues of hyperphenylalaninemic rats. *J Inher Met Dis*; 12: 166-180.
- de Céspedes C, Saborío M, Trejos R, Casco T. 2003. Memoria: Prevención del retardo mental y otras discapacidades por tamizaje neonatal masivo en Costa Rica. Premio Reina Sofía 2002 de prevención de discapacidades. Centro Español de documentación sobre discapacidad del Real Patronato Documentos 66/2003. Madrid España 47pp
- Eisensmith R, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Guttler F, Lou H, Guldberg P, Lichter-Konecki U, Konecki D, Svensson E, Hagenfeldt L, Rey F, Munich A, Lyonnet S, Cockburn F, CONNOR J, Pembrey M, Smith I, Gitzelman R, Steinmann B, ApoldJ, Eiken H, Giovannini M, Riva E, Longhi R, Romano C, Cerone R, Naughten E, Mullins C, Cahalane S, Ozalp I, Fekete G, SchulerD, Berencsi G, Nász I, Brdicka R,Kamaryt J, Pijackova A, Cabalska

- B, Boszkowa K, Schwartz E, Kalinin V, Jin L, Chakraborty R, Woo S. 1992. Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 51: 1355-1365
- Erlandesen, H; Stevens, R. 2001. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24: 213-230
- Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens R. 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *The journal of biological chemistry.* 273 (27):16962-16967
- Gable M, Williams M, Stephenson A, Okano Y, Ring S, Hurtubise M, Tyfield L. 2003. Comparative multiplex dosage analysis detects whole exon deletions at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum Mutat.* 21: 379- 386
- Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Desviat L. 2000. Expression analysis of phenylketonuria mutations. *The journal of biological chemistry* 275 (38): 29737- 29742
- Guizar-Vásquez J, 1994. *Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.* 2da edic. Editorial el Manual Moderno S.A. México D.F.
- Horne, J; Jennings, I; Teh, T; Gooley, P; Kobe, B. 2002. Structural characterization of the N- terminal autoregulatory sequence of phenylalanine hydroxylase. *Protein Sci* 11: 2041-2047
- Jennings I, Cotton R, Kobe B. 2000. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 8: 683-696
- Morera, B; Barrantes, R; Marín-Rojas, R. 2003. Gene admixture in the Costa Rican population. *Ann. Hum. Genet.* 67: 71-80.
- Murray, R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. 1988 *Bioquímica de Harper. El manual Moderno, S.A. México D.F.*
- Pérez, B; Desviat, L; Ugarte, M. 1997. Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the Spanish Populations: Mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 95-102
- Pérez, B; Desviat, L; Gómez-Puertas, P; Martínez, A; Stevens, R; Ugarte, M. 2005. Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH4- responsive patients. *Molec. Genet. Metab.*

Pey, A; Desviat, L; Gámez, A; Ugarte, M; Pérez, B. 2003. Phenylketonuria: Genotype- Phenotype Correlations based on expresión análisis of structural and functional mutations in PAH. Hum Mut 21:370- 378.

Santos M, Kuzmin A, Eisensmith R, Goltsov A, Woo S, Barrantes R, de Céspedes C. 1996. Phenylketonuria in Costa Rica: Preliminary spectrum of PAH mutations and their associations with highly polymorphic haplotypes. Hum Hered; 46:128-131

Scriver C, Hurtubise M, Konecki D, Phommavanh M, Prevost L, Erlandesen H, Stevens R, Waters P, Ryan S, McDonald D y Sarkissian C.2003. PAHdb 2003: What a locus-Specific knowledgebase can do. Hum mutat 21:333-344

Zschoke J.2003. Phenylketonuria Mutations in Europe. Hum Mut. 21: 345-356

Zschoke J, Graham C, Carson D, Nevin N. 1995. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. Am J Hum Genet. 57: 1311-1317

Bases de datos

Scriver C. 2002. *PAHdb* Knowledgebase. Copyright 2003 DeBelle Laboratory. (www.pahdb.mcgill.ca)

ANEXOS

1 Consentimiento informado

2 Genealogías

1. Consentimiento informado

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y/O SUS PADRES Y CONSENTIMIENTO
INFORMADO

PROYECTO: IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN DE LA
FENILALANINA HIDROXILASA EN LA POBLACIÓN COSTARRICENSE

Investigadores:

Dr. Carlos de Céspedes Montealegre PhD.
Asesor *ad honorem*, Servicio de Genética y
Metabolismo, Hospital Nacional de Niños "Dr.
Carlos Sáenz Herrera"
Teléfono: 256-4750
Dirección electrónica:
ccespedes@racsa.co.cr

Dr. Manuel Saborio Rocafort.
Jefe de Servicio de Genética y Metabolismo,
Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz
Herrera"
Teléfono: 256 4750.
Dirección electrónica: msaborior@hnn.sa.cr

Biol. Rebeca Flores Fernández, Bach
Universidad de Costa Rica
Teléfono: 812-1614
Dirección electrónica:
rebeca@biologia.ucr.ac.cr

Biol. Manfred Sandi Díaz, MSc.
Laboratorio de Citogenética y Biología
Molecular, Hospital Nacional de Niños "Dr.
Carlos Sáenz"
Teléfono: 222-0122 ext. 2419
Dirección electrónica: msandid@hnn.sa.cr

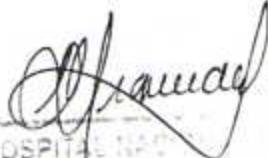
Biol. Ramiro Barrantes Mesén, PhD.
Universidad de Costa Rica
Teléfono: 207-5622
Dirección electrónica:
rabar@cariari.ucr.ac.cr

Dr. Julio César Rivera Madriz,
Jefe de servicio Laboratorio de Citogenética y
Biología Molecular, Hospital Nacional de
Niños "Dr. Carlos Sáenz"
Teléfono: 222-0122 ext. 2424
Dirección electrónica: jriveram@hnn.sa.cr

Dr. Rafael Trejos Montero,
Director Laboratorio Nacional de Tamizaje
Neonatal y de Alto Riesgo, Hospital Nacional
de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera"
Teléfono: 256-4578
Dirección electrónica: trejosr@racsa.cr

Dra. Gabriela Abarca Mora
Jefe Laboratorio de Aminoácidos y Azúcares,
Laboratorio Nacional de Tamizaje Neonatal y
de Alto Riesgo, Hospital Nacional de Niños
"Dr. Carlos Sáenz Herrera"
Teléfono: 222-0122 ext. 2305, 2307

Dpla Necxy Baltodano Vargas
Técnica en Ciencias Médicas Laboratorio
Nacional de Tamizaje Neonatal y de Alto
Riesgo, Hospital Nacional de Niños "Dr.
Carlos Sáenz Herrera"
Teléfono: 222-0122 ext. 2416
Dirección electrónica:
necxyb@costarricense.cr


HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS
DR. CARLOS SAENZ HERRERA
UNIDAD DE GENÉTICA
20-8-CH

INVITACION

Se le invita a usted y a su hijo/a a participar en un estudio de investigación. Es necesario que usted decida si desea participar o no en el estudio. Antes de que decida otorgar el permiso es importante que lea cuidadosamente este documento. Los encargados del estudio discutirán con usted el contenido de este informe y le explicarán todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber leído toda la información usted decide participar en el estudio, deberá firmar el consentimiento en el lugar indicado y devolverlo a los encargados del estudio. Usted recibirá una copia de este consentimiento informado.

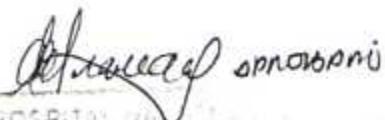
NATURALEZA Y PROPOSITO DEL ESTUDIO

La fenilcetonuria (PKU), consiste en un trastorno metabólico heredado de ambos progenitores, que lleva a una acumulación del aminoácido fenilalanina en la sangre y los tejidos del paciente, lo cual resulta en un retardo mental. Sin embargo, un tratamiento temprano, permite evitar este retardo, por lo que esta enfermedad se incluye en los programas de tamizaje neonatal.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo fundamental de este estudio es determinar el tipo de mutación/es de la PKU presente en su hijo/a u otros cambios en el ácido desoxirribonucleico (ADN) asociados a esa/s mutación/es, permitiendo con ello un diagnóstico más preciso, pronto y adecuado para el niño.

Además se logrará caracterizar a la población costarricense y conocer aspectos epidemiológicos con la finalidad de lograr un conocimiento más completo de esta enfermedad.


HOSPITAL
DR. CARLOS
9.0.8.04

¿COMO SE REALIZA EL ESTUDIO?

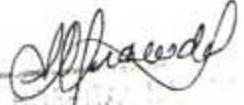
A ustedes se les realizará varias preguntas relacionadas con la enfermedad de su hijo/a, fecha y lugar de nacimiento del hijo/a, padres, número de hermanos/as del afectado/a así como la recopilación de datos de la genealogía de la familia (árbol genealógico).

Cuando su hijo/a viene a la consulta con el especialista, se le tomará una pequeña muestra de sangre (alrededor de una cucharadita), así como al padre y la madre del paciente. Este procedimiento se hace generalmente en una única ocasión, y la sangre se extraerá de una vena del brazo. Esto provoca molestias mínimas, existe el riesgo de un moretón en el lugar donde se punza. Si no se logran los resultados o si los mismos no fueran concluyentes, se repetirá la toma de la muestra con su previa autorización.

A la muestra se le asignará un código F-04 mas número de la familia y número del consecutivo. Así el probando F040103 indicará que la muestra se tomó en el 2004, pertenece a la familia 01 y es el tercer individuo dentro del proyecto.

A esta muestra se extraerá el material genético (ADN) y se realizará el tamizaje de las mutaciones que producen la fenilcetonuria. El ADN que sobre después de los análisis ya explicados se guardará en refrigeración por un máximo de 10 años y después será destruido. Las muestras serán almacenadas bajo supervisión del Laboratorio de Genética y Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños.

Es posible que después hagamos otros análisis respecto a las variantes genéticas de la PKU y no se utilizará para otros fines fuera de esta enfermedad. Si estos nuevos análisis se planifican, primero pedimos el permiso al Comité Local de Bioética (comité de ética e investigación independiente al grupo investigador) en Investigación del Hospital Nacional de Niños y a su persona.

 *aprobado*
DR. CARLOS
UNIDAD DE GENÉTICA
20-8-04

Este estudio se ha realizado extensamente en otros países, donde ya es prácticamente rutina en la valoración diagnóstica de la PKU, permitiendo en algunos casos determinar en forma más precisa el grado de severidad y el pronóstico de la enfermedad, así como su manejo. En prácticamente todos los casos es posible detectar la presencia de portadores de PKU entre los familiares. Todos estos beneficios los recibiría potencialmente su hijo/a y eventualmente asimismo sus familiares al participar en este estudio.

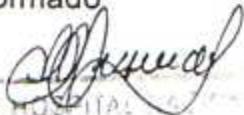
SECRETO PROFESIONAL

Si usted acepta formar parte de este estudio la totalidad de información sobre su hijo/a esta cubierta por la ley del secreto profesional, los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos además de las declaraciones y pautas éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos.

Las muestras serán marcadas con un código especial para que la persona que efectúa los análisis no tenga conocimiento del nombre del paciente. Las claves de los códigos serán archivadas bajo supervisión del investigador principal en el Hospital Nacional de Niños.

A menos que la ley lo exija, solo el investigador y los organismos regulatorios institucionales y gubernamentales tendrán acceso a los datos confidenciales que identifiquen a su hijo/a por su nombre.

En ningún caso se harán estudios en el ADN obtenido de su hijo/a ni la de ningún miembro de su familia, con fines ajenos al objetivo de este proyecto de investigación, sin su previo consentimiento informado.

 APROBADO
HOSPITAL
DR. CARLOS
1971

20-8-04

La duración del proyecto es aproximadamente de un año. La participación en este estudio es voluntaria, si usted decide que su hijo/a no participe, el manejo médico que requiera en hijo/a no sufrirá detrimento alguno.

Si usted decide aceptar la participación en este estudio, tendrá la oportunidad en cualquier momento de preguntar a los investigadores del proyecto, el estado en que se encuentra la investigación.

También podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto afecte la calidad del tratamiento dado a su hijo/a.

El Hospital Nacional de Niños, la Caja Costarricense de Seguro Social, la Universidad de Costa Rica y el Programa Nacional de Tamizaje no tienen programas de compensación económica si usted/es o su hijo/a sufren algún daño que no sea atribuible al proyecto de investigación durante la participación directa. Usted/es o su hijo/a no perderán ningún derecho legal por firmar este documento

 *Alfredo*

CONSENTIMIENTO

Yo he leído o se me ha leído toda la información descrita en las páginas previas antes de firmar esta fórmula de consentimiento. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y estas han sido contestadas en forma satisfactoria.

Acepto voluntariamente que mi niño niña participe en el estudio

Al firmar esta fórmula no estoy renunciando a los derechos legales que de todas maneras mi niño/a tiene como participante en un estudio de investigación. Soy consiente que la participación de mi hijo/a en este estudio es voluntaria y que podemos en cualquier momento interrumpir nuestra participación sin que esta decisión influya en la calidad de los cuidados médicos para mi hijo/hija

NOMBRE Y FIRMA DEL PARIENTE O REPRESENTANTE LEGAL NUMERO DE CEDULA

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL NUMERO DE CEDULA

FIRMA TESTIGO NUMERO DE CEDULA

FECHA HORA

NOMBRE DEL PACIENTE

CODIGO PACIENTE: F _____ CODIGO TAMIZAJE: _____

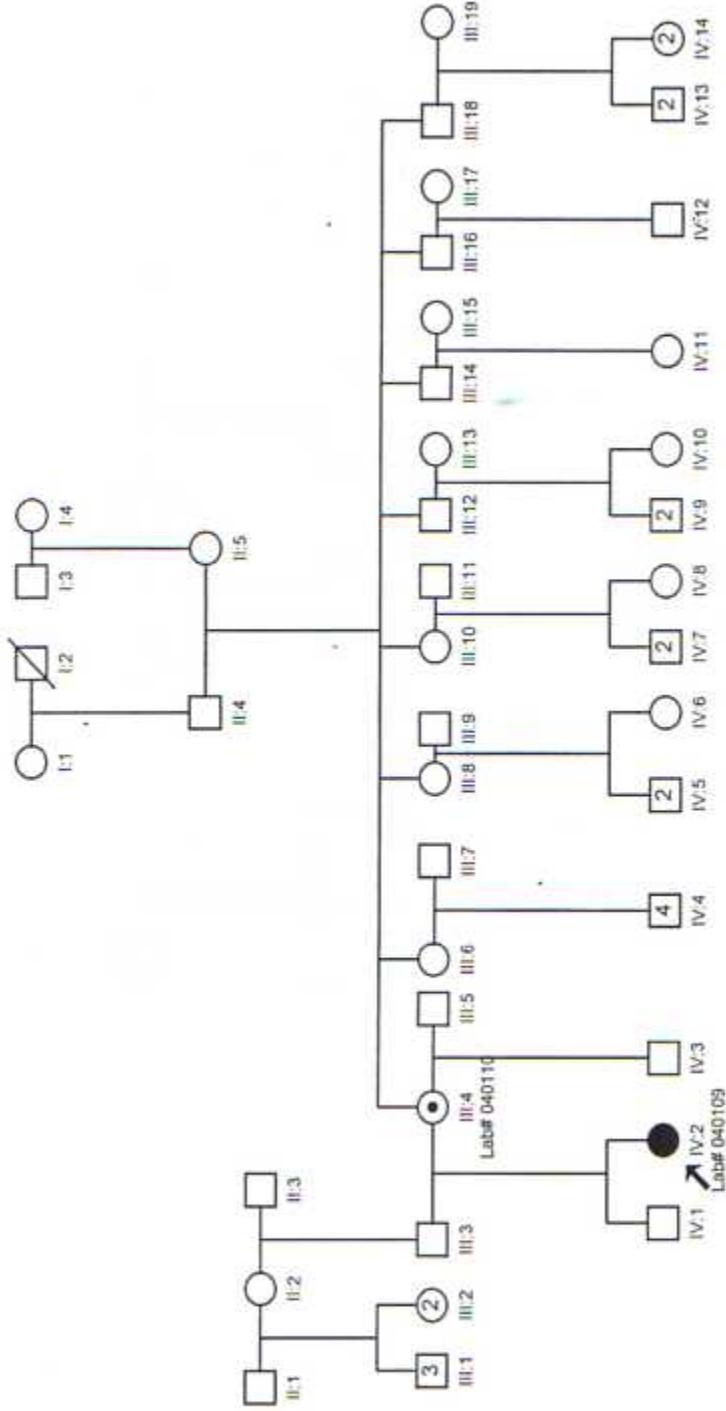
NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE NUMERO DE CÉDULA

NOMBRE Y FIRMA DE LA MADRE NUMERO DE CÉDULA

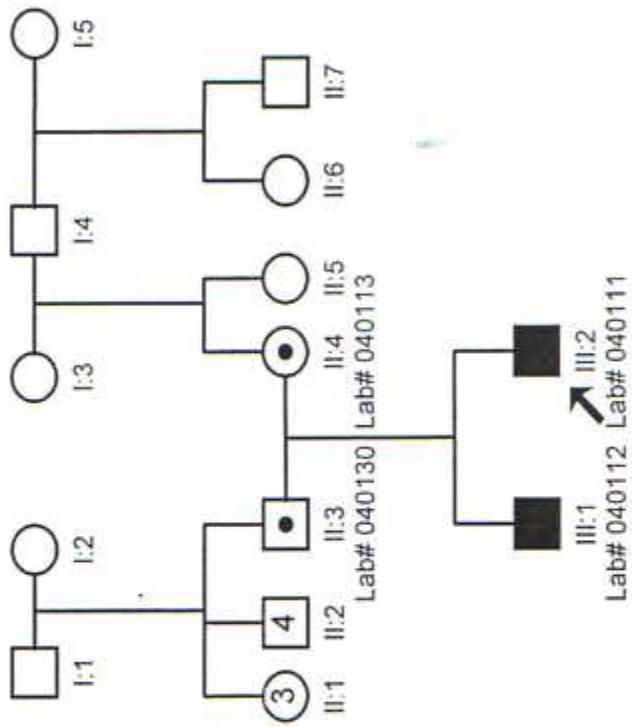
Miguel Arroyave
HOSPITAL
DR. CARLOS
UNIVERSIDAD

2. Genealogía

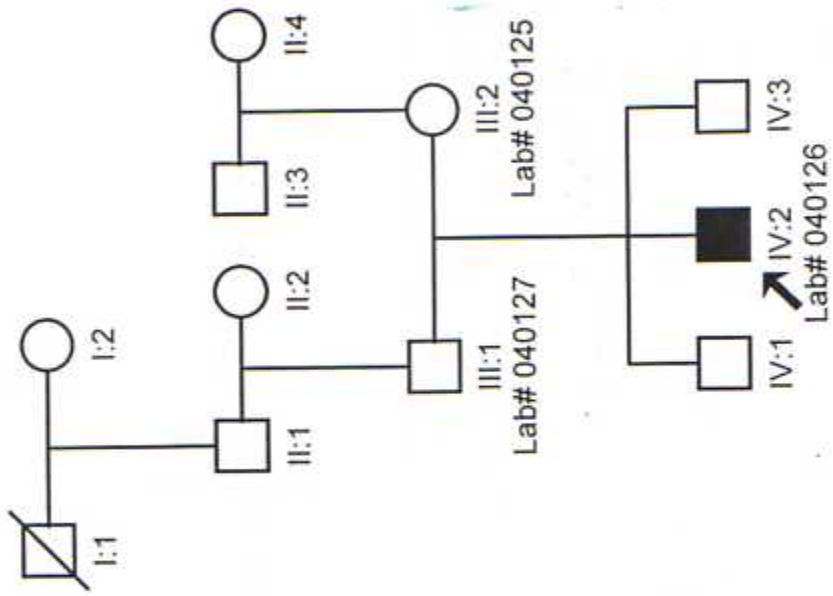
2 Genealogias



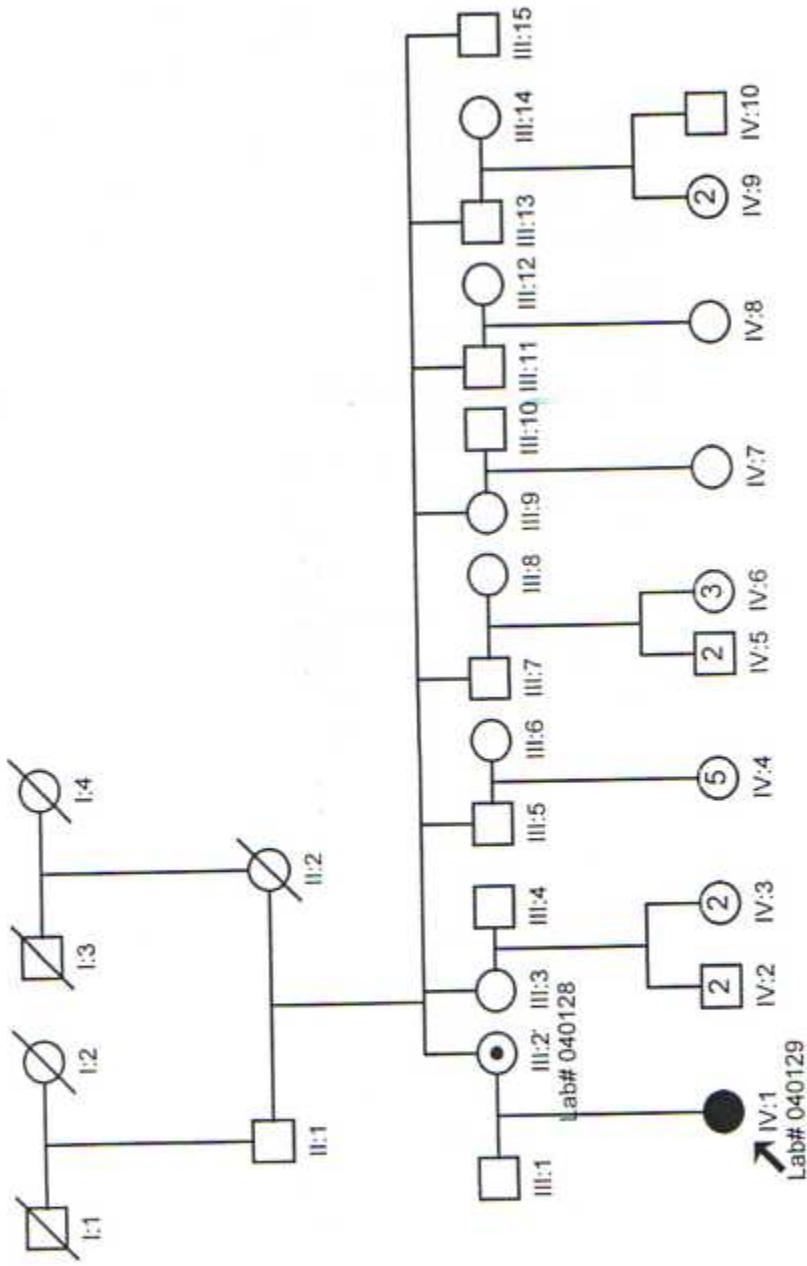
Familia 01



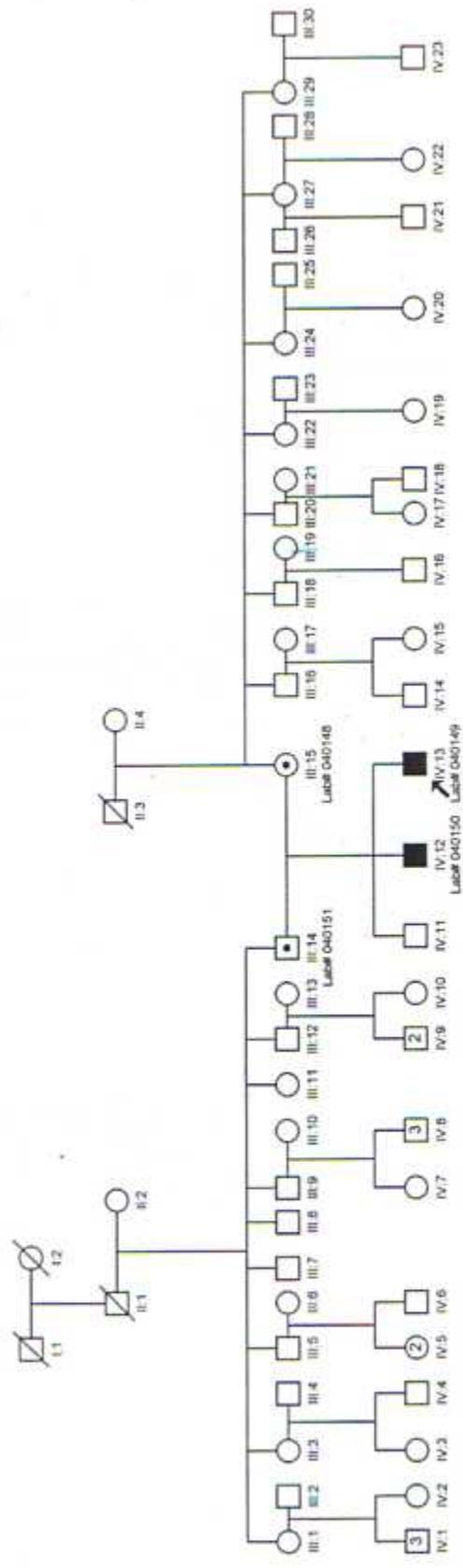
Famiglia 02



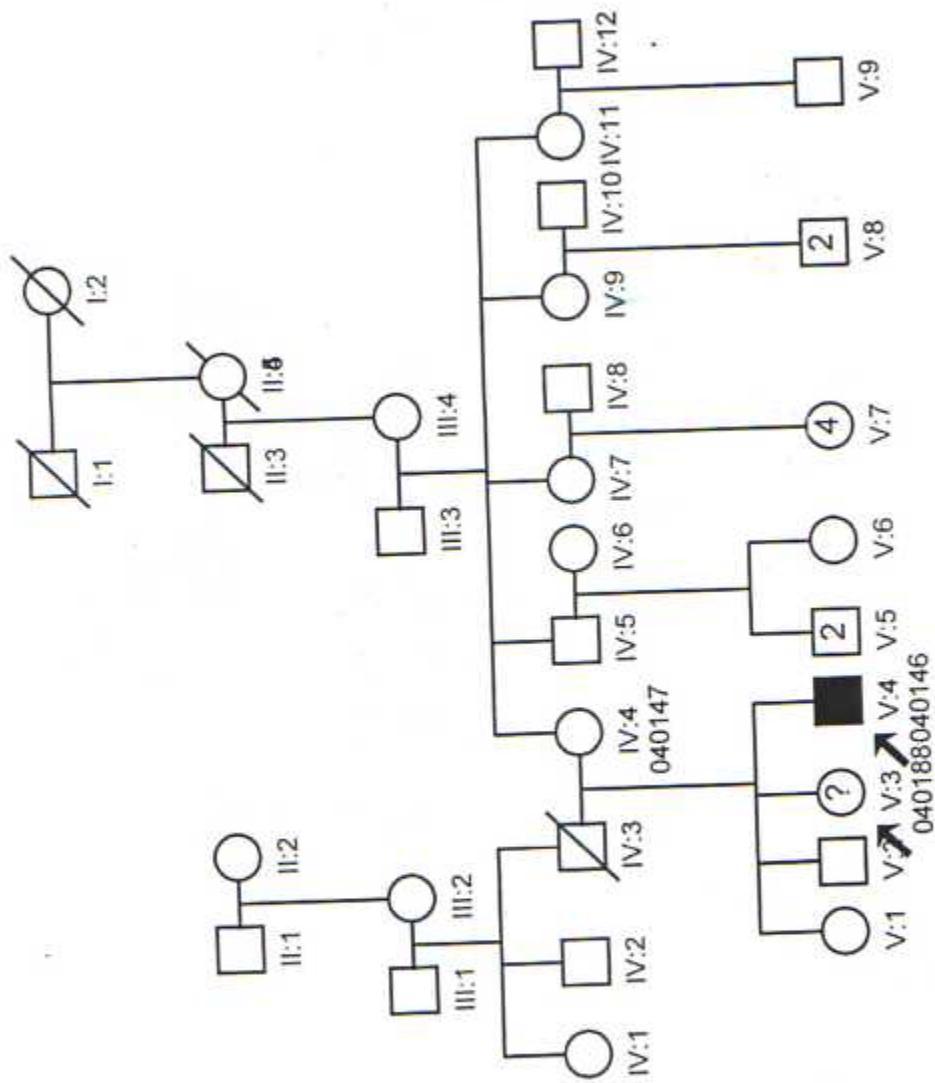
Familia 05



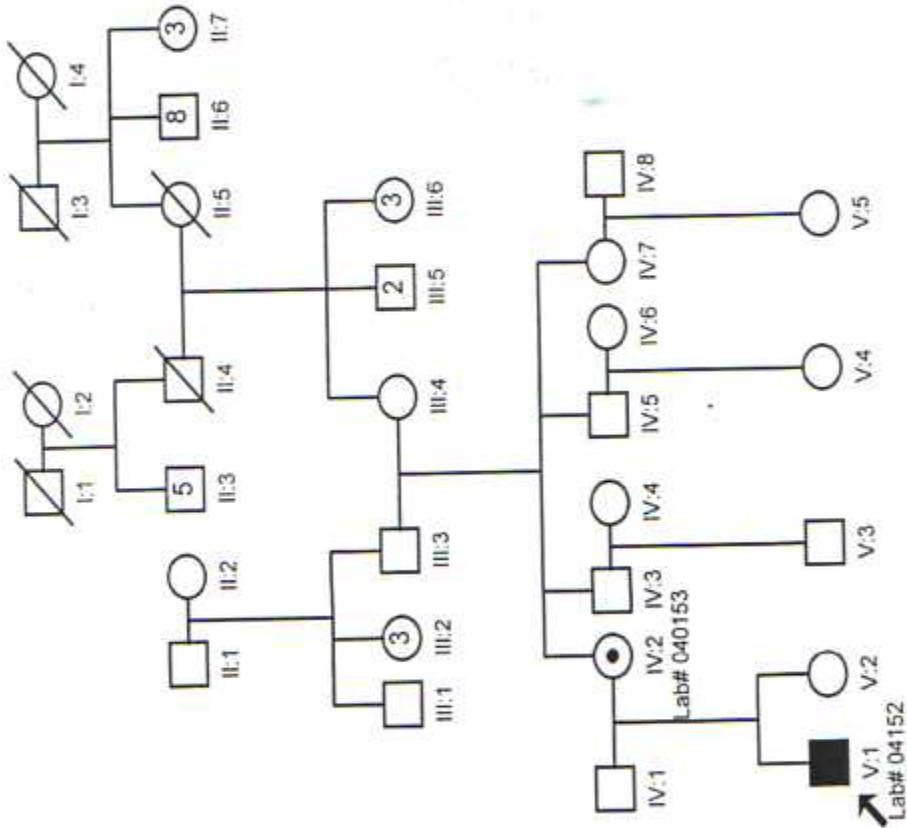
Familia 06



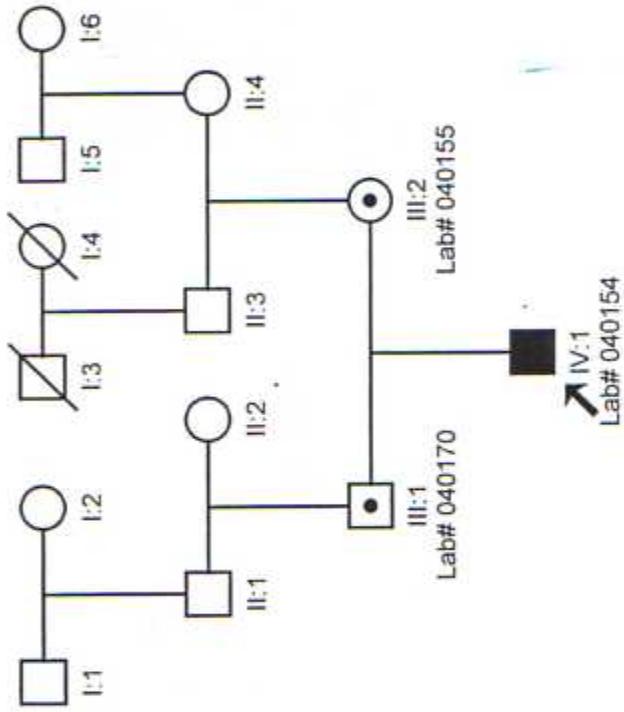
Familia 08



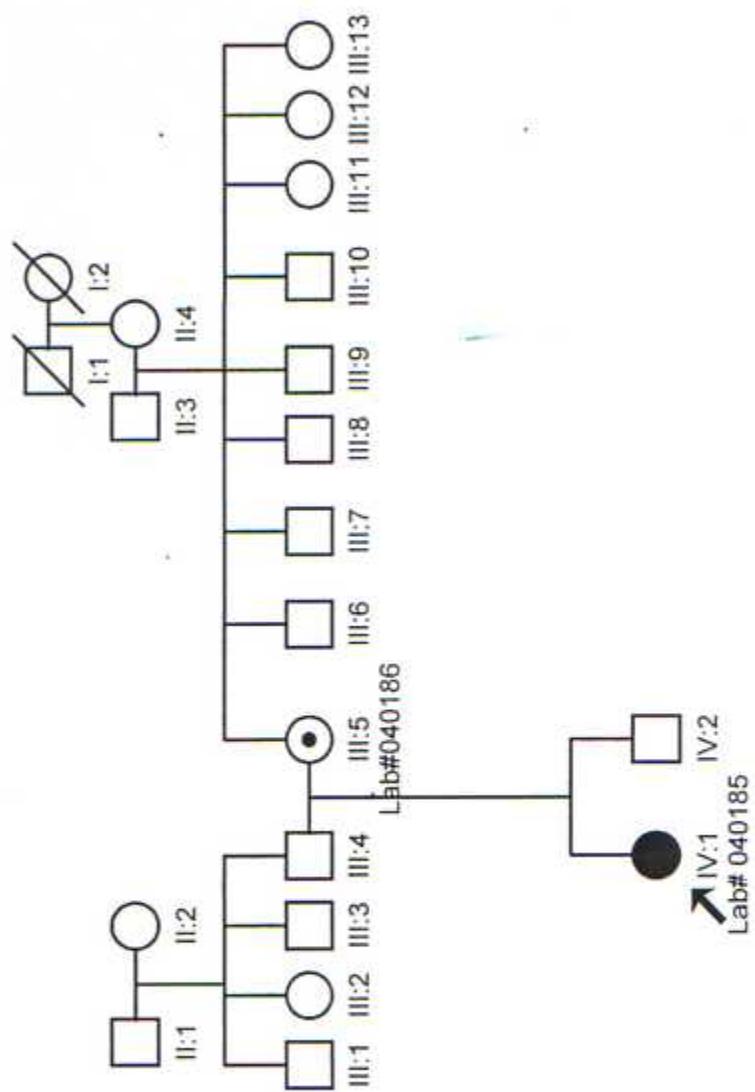
Familia 09



Familia 10



Familia 12



Familia 14