

## Artículos originales

Centro Nacional de Genética Médica. Instituto Superior de Ciencias Médicas  
de La Habana

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FENILCETONÚRICOS CUBANOS

Lic. Enna Gutiérrez García,<sup>1</sup> Dra. Bárbara Barrios García,<sup>2</sup> Lic. Reinaldo Gutiérrez  
Gutiérrez<sup>3</sup> y Dra. Astrea Damiani Rossel.<sup>4</sup>

#### RESUMEN

Hasta el momento se han descrito más de 500 mutaciones en el gen de la fenilalanina hidroxilasa humana (PHA), distribuidas a lo largo de sus 13 exones, y es el 7 el que posee un número mayor. El hecho de que la fenilcetonuria sea causada por mutaciones puntuales, hace necesario la utilización de un método que permita el análisis rápido de cada individuo. En este estudio se analizó el ácido desoxinucleótico (DNA) genómico de 28 pacientes fenilcetonúricos (PKU) y a sus padres, provenientes de diferentes partes de Cuba. Se realizó amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los 13 exones, antes de efectuar el método de electroforesis en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE) y secuenciación. Se hallaron 16 mutaciones diferentes en el 91 % del total de cromosomas independientes de los pacientes, y fueron las mutaciones más frecuentes la E280K y la R261Q, que es originaria de Galicia. Se comprobó la herencia mendeliana en los padres. Las mutaciones más frecuentes en Cuba no coinciden con las de España y América Latina.

*DeCS:* FENILCETONURIAS/diagnóstico; FENILALANINA HIDROXILASA/  
análisis. FENILALANINA HIDROXILASA/genética; MUTACION; ADN;  
REACCION EN CADENA POR POLIMERASA; ENFERMEDADES  
HEREDITARIAS; BIOLOGIA MOLECULAR.

El gen de la PAH se encuentra  
localizado en la región q22-q-24.1 del  
cromosoma 12; tiene aproximadamente 90

kilobases (kb) de longitud y 13 exones, con  
intrones de tamaños entre 1 kb y 24 kb,  
exones entre 57 pares de bases (pb) y 197

<sup>1</sup> Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Agregada. Centro Nacional de Genética Médica.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular. Centro Nacional de Genética Médica.

<sup>3</sup> Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Aspirante. Centro Nacional de Genética Médica.

<sup>4</sup> Doctora en Medicina. Especialista de II Grado en Nutrición. Instituto de Nutrición.

pb. Los exones, del 6 al 13, están conformados también por aproximadamente 847 pb de ácido ribonucleico (ARN) mensajero, todo compactado en un fragmento de 16 kb del gen, mientras que los exones del 1 al 5 (509 pb) están separados de grandes intrones, el más pequeño de los cuales tiene 4,5 kb. El ARNm maduro tiene 2,4 kb de longitud. La región codificante tiene 22 sitios CPG, 5 de los cuales están ubicados en el exón.<sup>1</sup>

Hasta el momento se han descrito más de 500 mutaciones en el gen de la PHA, distribuidas a lo largo de los 13 exones, aun que es en el exón 7 donde se ha hallado un mayor número de ellas. Las más frecuentes son las 233, que producen sustitución de un aminoácido. Se han descrito 50 deleciones, 45 mutaciones que producen un procesamiento erróneo del pre ARNm, 22 además de la sustitución de un aminoácido por un codón de parada, y 5 inserciones, se han encontrado 24 polimorfismos, que no causan afección. Aproximadamente el 10 % de estas mutaciones han sido descritas en regiones llamadas "Islas CpG" (CpG Island), que son regiones altamente susceptibles de sufrir cambios por la presencia de dobletes CpG.<sup>2</sup>

Las hiperfenilalaninurias (HFA), se producen por mutaciones en el gen que codifica para la enzima fenilalanina hidroxilasa, que actúa sobre la conversión de fenilalanina a tirosina; como consecuencia se acumula la fenilalanina en el organismo y se produce, como signo clínico principal, retardo mental, el grado de retardo mental va a estar de acuerdo con la mutación que es la que define que la enzima tenga más o menos actividad; cuando los casos son más severos, se conocen como fenilcetonuria. Se pueden diagnosticar mediante pruebas que detecten la presencia de fenilalanina en la sangre, como el método microbiológico de Guthrie,<sup>3</sup> que consiste en

la toma de sangre capilar de los niños al nacimiento y se compara el nivel de crecimiento inducido por la muestra con los niveles estándar en una cepa de la bacteria *Bacillus subtilis* que requiere fenilalanina para su crecimiento.

El pesquiasaje neonatal es el mejor método para la detección temprana de las HFA. En Cuba, a partir de 1984 en el marco del programa de diagnóstico y prevención de enfermedades hereditarias, comienza a realizarse el pesquiasaje de PKU mediante la mencionada prueba.<sup>4</sup> Se han diagnosticados 28 niños con PKU y 56 con HFA persistente en toda Cuba.

Todos los casos detectados se encuentran bajo tratamiento dietético para evitar el retraso mental, aunque en la actualidad en muchos países desarrollados, el tratamiento se realiza de forma más individualizada, conociendo la mutación al nivel del gen y así poder correlacionar genotípo-fenotipo, para poder darle el tratamiento más acorde con la mutación que presenten los pacientes. Con este objetivo es que se decidió realizar este trabajo, para conocer las mutaciones de los casos de PKU y de HFA y así poder ofrecer una mejor atención a los pacientes detectados por el Programa Nacional de Detección Precoz de la Fenilcetonuria.

## MÉTODOS

En este estudio analizamos DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica de 28 PKU y 42 familiares de éstos procedentes de diferentes provincias de nuestro país, 20 de los cuales se detectaron neonatalmente por el Programa de Fenilcetonuria, el resto fueron casos que se diagnosticaron tardíamente, pues nacieron antes de existir dicho Programa.

Para realizar el DGGE se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena

de PCR, según *Pérez B* y otros los 13 exones de la PHA, con sus correspondientes secuencias intrónicas adyacentes, y posteriormente se aplicaron en geles desnaturalizantes de urea-formamida de 0 a 80 %, tras la generación de heteroduplex, lo que permitiría detectar todas las variaciones de secuencia presentes en estos fragmentos del gen de todas las variaciones de secuencia presentes en estos fragmentos del gen de la PHA. Tras el análisis por DGGE,<sup>6</sup> aquellos exones con patrones de bandas aberrantes se secuenciaron directamente en un secuenciador automático ALF express DNA. Sequencer, utilizando un kit de reactivos Promega. En algunos casos por la reproducibilidad del método, el patrón de bandas obtenido en la DGGE nos permitió determinar directamente la mutación, al comparar los patrones obtenidos con las mutaciones detectadas anteriormente, y no fue necesario secuenciar dicho exón.

## RESULTADOS

En la tabla 1, se puede observar el total de mutaciones por exones. En ésta se aprecia que el mayor número corresponde al exón 7.

TABLA 1. *Mutaciones por exones*

Exón	No. de mutaciones
7	28
10	6
11	4
12	1
3	7
5	1
6	2
2	1

Total de cromosomas independientes estudiados: 56.  
 Total de mutaciones identificadas: 51  
 % de mutaciones encontradas: 90

En la tabla 2, se pueden ver las 16 mutaciones diferentes encontradas en los diferentes exones del gen de la PHA. Se observa que las más frecuentes fueron la E280k y la R261Q.

TABLA 2. *Tipos de mutaciones hallados*

Mutación	Cantidad	Fenotipo
E280 K	11	Severo
R261 Q	9	Severo
I65T	3	Moderado
IVS-10	4	Severo
R252W	3	Severo
R68S	4	Moderado
R243X	2	Severo
IVS-12	1	Severo
F39L	1	Moderado
L248V	1	Moderado
S349	1	Severo
R15Q	1	Severo
V38M	4	Moderado
R76X	2	Severo
40SW	3	Severo
A403V	1	Benigno

Total de mutaciones diferentes: 16.  
 Resultaron ser las más frecuentes en Cuba la E280K(19,3 %) y la R261 Q(16 %).

## DISCUSIÓN

En el estudio se identificaron el 91 % de las mutaciones de los 28 PKU estudiados, para un total de 51 cromosomas independientes de un total de 56. La mayoría de las mutaciones se verificaron en el exón 7, con un total de 28 (tabla 1), para coincidir con lo que está reportado en la literatura médica.<sup>7</sup>

Se hallaron 16 mutaciones diferentes y fueron las más frecuentes la E280k y la R261 Q, la cual es originaria de Galicia (tabla 2), también se puede observar en la tabla, el fenotipo que producen estas mutaciones. En el estudio molecular, de 42 padres de los PKU se comprobó el carácter de la herencia mendeliana de las mutaciones encontradas. En la distribución de las mutaciones por provincias, se destacan. Holguín, y fue la

mutación más frecuente la E280K (45,4 %) y la Habana co la R261 Q (27,7 %).

De los PKU cubanos analizados (28), 20 de ellos fueron detectados por el Programa de Fenilcetonuria, neonatalmente, de un total de 23, con posibilidades de diagnóstico. Las mutaciones más frecuentes en Cuba (E280 K y R261Q) difieren de las de España (IVS-10, A403V, V388M, I65 T,<sup>8</sup> y América Latina (IVS10, V388, 165T, R243Q, R408W e IVS-12,<sup>9</sup> lo cual puede ser porque las migraciones hacia Cuba, se originaron de partes de España diferentes a las de América Latina. Se encontró el 20 % de consanguinidad en los padres de los casos analizados, lo cual también puede ser parte de la explicación de la alta frecuencia de las 2 mutaciones mencionadas anteriormente. Se demostró la herencia mendeliana de las mutaciones halladas en el estudio de 84 cromosomas de los 42 padres estudiados. Resultó interesante que una de las madres estudiadas, presenta fenilcetonuria atípica, y es homocigótica para la mutación V388M, que en homocigosis, produce un fenotipo

intermedio. También se halló que el caso número 33 era efectivamente portador de 2 mutaciones que producen hiperfenilalaninemia benigna (A403V/R68S), pues la primera se considera una mutación para HPA benigna, y la segunda como una mutación que produce un fenotipo suave que, sin embargo, al estar en heterocigosis compuesta produce HPA benigna, lo que coincide con el diagnóstico realizado al nacimiento por los niveles de fenilalanina en plasma (4,9 mg %). En estos momentos se está trabajando en la correlación genotipo-fenotipo, para ajustar el tratamiento y así mejorar la atención a estos pacientes.

#### AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por su colaboración y apoyo en la realización de este trabajo. Un agradecimiento especial para las doctoras *Magdalena Ugarte*, *Lourdes Desviat*, y *Belén Pérez*.

#### SUMMARY

---

Up to the present, over 500 mutations in human phenylalanine hydroxylase gene distributed along its 13 exons have been described, being exon 7 the one that has the highest number. The fact that phenylketonuria is caused by point mutations makes it necessary to use a method of rapid analysis of each individual. This study analyzes genomic DNA of 28 patients suffering from phenylketonuria and their parents from different regions of Cuba. Amplification by the polymerase chain reaction was made in the 13 exons before applying denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. Sixteen different mutations were found in 91% of patient's independent chromosomes and the most frequent mutations were E280K and R261Q that comes from Galicia. Mendel's inheritance was proved in the patients' parents. The most frequent mutations found in Cuba do not match with those in Spain and Latin America.

*Subject headings:* PHENYLKETONURIAS/diagnosis; PHENYLALANINE HYDROXYLASE/analysis; PHENYLALANINE HYDROXYLASE/genetics; MUTATION; DNA; POLYMERASE CHAIN REACTION; HEREDITARY DISEASES; MOLECULAR BIOLOGY.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nowacki P, Byck S, Prevost L, Scriver CR. The PAH mutation analysis consortium database: update 1996. *Nucleic Acids Res* 1997;25(1):139-42
2. Abadie V, Lyonnet S, Maurin N, Berthelon M, Caillaud C, Giraud F, et al. Gpg dinucleotides are mutations hot spot in phenylketonuria. *Genomics* 1989;5:935-9.
3. Guthrie R, Susie A. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
4. Heredero L, Atencio G, Vega JL, Gutiérrez E. Programa para el diagnóstico precoz de la fenilcetonuria en Cuba (informe preliminar). *Rev Cubana Pediatr* 1986;58:27-33.
5. Pérez B, Desviat L, Cornejo V, Ugarte M. Mutations and polymorphisms in phenylalanine hydroxylase gene in Chile. *Am J Hum Genet* 1995 (Suppl);57:A971.
6. Gulberg P, Guttler F. Broad range DGGE for single-step mutation scanning of entire gene: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(5):880-1.
7. Dworniczak B, Kalaydjieva L, Pankoke S, Aulehla-Scholz C, Allen G, Horst J. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot. *Hum Mut* 1992;1(2):138-46.
8. Eisensmith R, Okano Y, Dsovich M, Wang T, Guttler F, Lou. Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 1992;51:1355-65.
9. Pérez B, Desviat L, Cornejo V, Ugarte M. Mutations and polymorphisms in phenylalanine hydroxylase gene in Chile. *Am J Hum Genet* 1997(Suppl);57:A971.

Recibido: 21 de febrero de 2002. Aprobado: 19 de marzo de 2002.

Lic. *Enma Gutiérrez García*. Avenida 31, No. 3102, esquina a 146, municipio Playa. Ciudad de La Habana, Cuba. E.mail:rey@infomed.sld.cu Fax.7-53-33-1502