

Tioles plasmáticos y sus determinantes en la fenilcetonuria*

C. Colomé¹, R. Artuch¹, C. Sierra¹, N. Brandi¹, N. Lambruschini², J. Campistol³, M.A. Vilaseca¹.

Resumen

Objetivo: El tratamiento de los pacientes fenilcetonúricos consiste en una dieta restringida en fenilalanina y la administración de una fórmula especial constituida por una mezcla de aminoácidos (sin fenilalanina) suplementada con tirosina, vitaminas y oligoelementos. Los pacientes con una adherencia pobre al suplemento podrían presentar deficiencias de micronutrientes. Las concentraciones plasmáticas de tioles (principalmente de homocisteína) dependen fundamentalmente de la ingesta de vitaminas del grupo B. Nuestro objetivo fue evaluar las concentraciones de tioles plasmáticos (homocisteína, cisteína y glutatión) y sus determinantes (metionina, cobalamina y folato) en pacientes fenilcetonúricos en tratamiento comparados con controles de edades parecidas.

Diseño y localización: Estudio transversal caso-control realizado en un hospital de 3er nivel.

Pacientes: 42 pacientes fenilcetonúricos y 42 controles.

Métodos: Se analizaron en plasma: homocisteína, cisteína y glutatión totales mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección de fluorescencia; fenilalanina y metionina plasmáticas mediante cromatografía de intercambio iónico; folato y cobalamina séricos por radioinmunoanálisis.

Resultados: Las concentraciones de homocisteína total fueron significativamente menores en los pacientes fenilcetonúricos que en los controles (distribución *t* de Student; $P < 0,0001$). Las concentraciones de folato y cobalamina fueron significativamente más elevadas en los fenilcetonúricos que en los controles (distribución *t* de Student; $P < 0,0001$). Se observó una correlación negativa entre la homocisteína y el folato ($r = -0,378$; $P = 0,016$), y entre las concentraciones de cobalamina y fenilalanina ($r = -0,367$; $p = 0,022$) en los pacientes fenilcetonúricos.

Conclusiones: Las concentraciones de homocisteína total en plasma fueron menores en el grupo de fenilcetonúricos que en los controles, probablemente debido a las elevadas concentraciones de folato. Las elevadas concentraciones de fenilalanina, que indican una adherencia pobre a la dieta, presentan una asociación negativa con la cobalamina, la cual puede ser deficiente en algunos casos.

Palabras clave: fenilcetonuria, homocisteína, folato, cobalamina, glutatión, tratamiento dietético.

Summary. Plasma thiols and their determinants in phenylketonuria

Objective: Treatment of phenylketonuria (PKU) patients consists of a phenylalanine-restricted diet supplemented with a tyrosine-, vitamin- and oligoelement-enriched amino acid mixture. Vitamins and oligoelements may be deficient when compliance with the supplemented special formula is poor. Plasma thiol concentrations (especially homocysteine) depend mainly on B-vitamin intake. Our aim was to evaluate the plasma thiol concentrations (homocysteine, cysteine and glutathione) and their determinants (methionine, cobalamin and folate) in PKU patients under dietary treatment compared with age-matched controls.

Design and setting: Cross-sectional study performed in a tertiary care Hospital.

Subjects: 42 PKU patients under dietary treatment compared with 42 age-matched controls.

Interventions: Plasma total homocysteine, cysteine and glutathione were analyzed by HPLC with fluorescence detection. Plasma phenylalanine and methionine were analyzed by ion exchange chromatography. Serum folate and cobalamin were analysed by immunochemist luminescence procedures.

Results: Total homocysteine concentrations were significantly lower in the PKU patients compared with the control group (Student *t*-test; $P < 0,0001$). Serum folate and cobalamin were significantly higher in the PKU group (*t*-Student; $P < 0,0001$) compared with controls. A significantly negative correlation was observed between total homocysteine and folate ($r = -0,378$; $P = 0,016$), and between cobalamin and phenylalanine concentrations ($r = -0,367$; $P = 0,022$) in the PKU group.

Conclusions: Plasma total homocysteine values are lower in the PKU group than in the controls, probably due to high folate values. High phenylalanine values, an indicator of poor dietary compliance, are negatively associated with cobalamin, which might be deficient in some cases.

Key words: phenylketonuria, homocysteine, folate, cobalamin, glutathione, dietary treatment.

Servicios de Bioquímica¹, Pediatría² y Neurología³. Hospital Sant Joan de Déu. Universitat de Barcelona. Barcelona

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Gijón el 9, 10 y 11 de octubre de 2002.

† Previamente publicado en la revista European Journal of Clinical Nutrition, que ha permitido su reproducción en español en Química Clínica.

INTRODUCCIÓN

La fenilcetonuria (PKU; McKusick 261600) es un error congénito del metabolismo intermediario causado por una actividad deficiente de la L-fenilalanina-4-monooxigenasa (EC 1.14.16.1), enzima que cataliza la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina (1). El tratamiento de la fenilcetonuria está

basado en una dieta restringida en fenilalanina, que mantiene las concentraciones plasmáticas de este aminoácido en un rango no tóxico. La dieta consiste en reducir la ingesta de proteínas naturales (principalmente aquellas de origen animal), y en suplementar con una fórmula especial que contiene una mezcla de aminoácidos exenta de fenilalanina y suplementada con tirosina, vitaminas y otros micronutrientes. Esta suplementación parece necesaria para prevenir déficits en micronutrientes (2).

El estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de diversos errores congénitos del metabolismo (3). En la fenilcetonuria, se han descrito deficiencias en dos importantes antioxidantes: el selenio (4) y la ubiquinona-10 (5). Estas deficiencias estarían principalmente relacionadas con una adherencia pobre a la dieta, y podrían causar un aumento del daño peroxidativo reflejado como concentraciones elevadas de malondialdehído (MDA), concentraciones disminuidas de glutatión reducido o concentraciones en el límite inferior de referencia de tocoferol. El aumento del estrés oxidativo observado en los pacientes fenilcetonúricos nos condujo a investigar el estado de otros pro-oxidantes (homocisteína) y antioxidantes naturales (glutatión total).

La homocisteína es un aminoácido presente en plasma y diversos tejidos, y su concentración depende básicamente del equilibrio entre las vías de la remetilación y transulfuración, la primera de las cuales depende en parte de las concentraciones de folato y cobalamina, y la segunda de las de vitamina B₆ (6). Concentraciones subóptimas de estas vitaminas se relacionan con diferentes manifestaciones clínicas y metabólicas, como problemas neurológicos, anemia megaloblástica e hiperhomocisteinemia (7). La hiperhomocisteinemia se ha relacionado con un aumento del riesgo de enfermedad vascular y del daño oxidativo (8, 9). No obstante, a pesar del creciente interés acerca de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo cardiovascular, no se han realizado estudios sobre la cuantificación de este aminoácido en pacientes fenilcetonúricos.

A través de la vía de la transulfuración se sintetiza cisteína a partir de homocisteína. La cisteína también se ha relacionado recientemente con un aumento del riesgo de enfermedad vascular (10). Además, la cisteína es un precursor del glutatión, triptéptido esencial en la detoxificación de radicales libres (11).

Nuestro objetivo fue estudiar las concentraciones de homocisteína y otros tópicos plasmáticos (cisteína y glutatión) en pacientes fenilcetonúricos con tratamiento dietético y su posible relación con: 1) sus principales determinantes: metionina plasmática, cobalamina y folato séricos; 2) la adherencia de los pacientes al tratamiento dietético evaluado como la mediana de las concentraciones de fenilalanina plasmática durante los últimos 6 meses previos al análisis (índice de control de la dieta).

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 42 pacientes fenilcetonúricos (\bar{x} = 15,3; s = 9,5 años) en tratamiento dietético y 42 controles aparentemente sanos de edades similares (\bar{x} = 15,7; s = 9,7 años). Todos los pacientes estaban tratados con una dieta restringida en fenilalanina y suplementada con una fórmula especial compuesta por una mezcla de aminoácidos enriquecida con tirosina, vitaminas y otros micronutrientes (Analog XP en lactantes, Maxamaid XP en niños, y Maxamum XP en adolescentes y adultos; Scientific Hospital Supplies, Barcelona).

La fenilalanina y la metionina plasmáticas se analizaron por cromatografía de intercambio iónico con un autoanizador LKB Biochrom 20 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England). El índice de control de la dieta (ICD) se calculó como la mediana de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina de los últimos 6 meses. Todas las muestras se recogieron tras un ayuno de aproximadamente 10 horas.

La homocisteína total (tHcy), cisteína total y glutatión total (suma de las formas oxidada y reducida de estos metabolitos) en plasma, se determinaron por HPLC con detección de los derivados fluorescentes del 7-fluorobenzo-2oxa-1,3-diazol-4-sulfonato (12) con un cromatógrafo Perkin Elmer Serie 200 (Perkin Elmer, Norwalk, USA). El folato y la cobalamina séricos se determinaron por radioinmunoanálisis (Gamma LKB Wallac 1272).

Se obtuvo el consentimiento informado para el estudio de los pacientes fenilcetonúricos adultos, y de los padres de los niños fenilcetonúricos. Las muestras de los pacientes y controles se obtuvieron según la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en 1996. El Comité de Ética del Hospital Sant Joan de Déu aprobó el estudio.

Métodos estadísticos: Se aplicó la prueba t de Student para las comparaciones estadísticas y la de Pearson para las correlaciones. Para evitar los efectos de las variables de confusión en las concentraciones de homocisteína, se aplicó un análisis de regresión múltiple entre la homocisteína (variable dependiente), la edad de los pacientes, y las concentraciones de folato y cobalamina (variables independientes). Los estudios estadísticos se realizaron con el programa SPSS, versión 10.0.

RESULTADOS

Las concentraciones plasmáticas de homocisteína, metionina y cisteína total fueron significativamente menores en las pacientes comparadas con las del grupo control (tabla I), mientras que no se observaron diferencias significativas en las de glutatión total. Veinticuatro de 42 pacientes fenilcetonúricos (57%) mostraron concentraciones plasmáticas de homocisteína por debajo del límite inferior de referencia establecido en nuestra población control (4,6 $\mu\text{mol/L}$). Las concentraciones de folato y cobalamina resultaron significativamente elevadas respecto a las del grupo control (tabla I).

De los 42 pacientes fenilcetonúricos, 27 mostraron un índice de control de la dieta aceptable (con un ICD inferior a 600 $\mu\text{mol/L}$: \bar{x} = 335, s = 130 $\mu\text{mol/L}$) y 15 tenían una adherencia pobre a la dieta (ICD: \bar{x} = 817, s = 152 $\mu\text{mol/L}$). Las concentraciones de cobalamina en suero fueron significativamente inferiores en los pacientes fenilcetonúricos con un control pobre de la dieta respecto al grupo de pacientes con un buen control, mientras que no se observaron diferencias significativas respecto a las concentraciones de folato y homocisteína (tabla I). En el resto de variables estudiadas tampoco se observaron diferencias significativas. Sólo dos pacientes fenilcetonúricos, ambos con una adherencia pobre a la dieta, mostraron una ligera disminución de las concentraciones de cobalamina (129 y 136 pmol/L respectivamente) respecto a los valores de referencia.

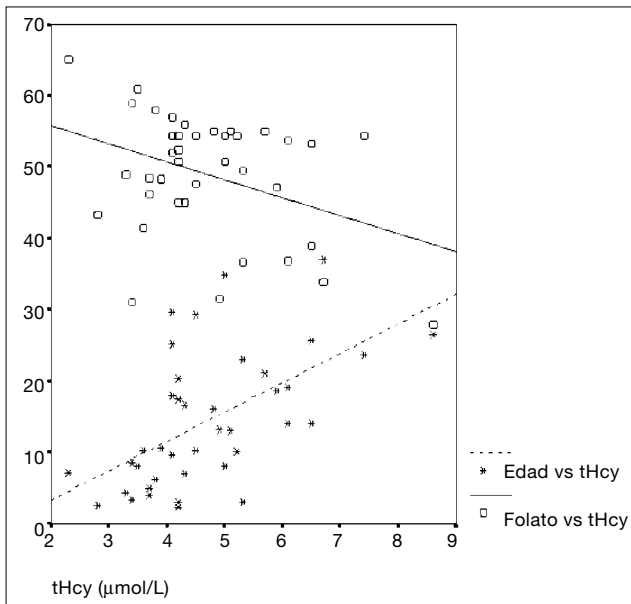
En el grupo de pacientes fenilcetonúricos se observó una correlación negativa significativa (Pearson, Figura 1) entre las concentraciones de folato y homocisteína (r = -0,378; P = 0,016), y una correlación positiva entre la homocisteína y la

Tabla I. Datos bioquímicos en pacientes fenilcetonúricos (PKU) y controles. Datos expresados como \bar{x} (s).

	PKU (n=42)	Controles (n=42)	Significación (t-Student)
Edad (años)	15,3 (9,5)	15,7 (9,7)	n.s.
ICD* ($\mu\text{mol/L}$)	477 (270)	51 (9,8)	$P<0,0001$
Metionina ($\mu\text{mol/L}$)	21,7 (4,1)	25,6 (6,1)	$P=0,004$
Cisteína total ($\mu\text{mol/L}$)	151 (21)	169 (29)	$P=0,001$
Homocisteína total ($\mu\text{mol/L}$)	4,8 (1,5)	8,25 (2,7)	$P<0,0001$
Glutación total ($\mu\text{mol/L}$)	6,1 (1,5)	6,0 (1,6)	n.s.
Folato (nmol/L)	49,1 (8,6)	19,1 (7,5)	$P<0,0001$
Cobalamina (pmol/L)	622 (253)	455 (161)	$P=0,0005$
	PKU** (n=27)	PKU*** (n=15)	
Folato (nmol/L)	50,6 (7,9)	47,1 (8,8)	n.s.
Homocisteína total ($\mu\text{mol/L}$)	4,4 (1,1)	5,4 (1,5)	n.s.
Cobalamina (pmol/L)	683 (215)	486 (277)	$P=0,024$

n.s. : no significativo

* ICD: índice de control de la dieta

** pacientes PKU con un ICD < 600 $\mu\text{mol/L}$ *** pacientes PKU con un ICD > 600 $\mu\text{mol/L}$ **Figura 1.** Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína (mmol/L) y la edad (años) y las concentraciones de folato (nmol/L) en 42 pacientes fenilcetonúricos. Las concentraciones de homocisteína total (tHcy) vs folato se representan con círculos y las concentraciones de homocisteína total (tHcy) vs edad con asteriscos.

edad ($r=0,564$; $P<0,0001$), y entre la homocisteína y la cisteína ($r=0,462$; $P=0,002$). No se observó correlación entre las concentraciones de cobalamina y homocisteína. El ICD correlacionó positivamente con la edad ($r=0,441$; $P=0,004$) y negativamente con las concentraciones de cobalamina ($r=-0,367$; $P=0,022$). Para determinar la influencia de la edad de los pacientes, de las concentraciones de folato y de cobalamina séricas sobre las concentraciones de homocisteína, se aplicó una regresión lineal múltiple (tabla II). La asociación entre la homocisteína plasmática y la edad o las concentraciones de

Tabla II. Resultados de la regresión lineal múltiple para las concentraciones de homocisteína (variable dependiente), la edad de los pacientes y las concentraciones de folato y cobalamina.

	Homocisteína total ($\mu\text{mol/L}$)		
	Coficiente (IC 95%)	pendiente	valor de P
Edad (años)	0,071 (0,036 0,107)	0,522	0,0001
Folato (nmol/L)	-0,045 (-0,084 -0,007)	-0,305	0,022
Cobalamina (pmol/L)	-0,001 (-0,002 - 0,0001)	-0,195	0,148

IC: intervalo de confianza

 $R^2= 0,410$

folato se confirmó tras este análisis, mientras que no se observó correlación entre las concentraciones de homocisteína y cobalamina.

DISCUSIÓN

La dieta restringida en proteínas naturales en los pacientes fenilcetonúricos puede provocar deficiencias en algunos micronutrientes esenciales, como el selenio (4) o la cobalamina (13). Para prevenir estas deficiencias, se han suplementado las fórmulas especiales con diversos micronutrientes. Uno de los problemas que existen en los tratamientos con dietas crónicas en los pacientes fenilcetonúricos es la falta de adherencia, sobre todo entre los adolescentes y adultos, que pueden causar deficiencias de algunos micronutrientes (14). Estas deficiencias podrían ocasionar alteraciones metabólicas, como disfunciones en alguna de las sustancias de defensa antioxidante, que causarían un aumento del estrés oxidativo (15, 16). Los tioles plasmáticos se han asociado tanto con un aumento del daño oxidativo (concentraciones elevadas de homocisteína en plasma y tejidos) como con funciones antioxidantes (glutación reducido).

Según nuestros resultados, las concentraciones de homocisteína fueron significativamente menores en nuestros pacientes fenilcetonúricos que en los controles. Estas concentraciones disminuidas estarían relacionadas con la restricción dietética o con la suplementación con vitaminas del grupo B. El folato es uno de los principales determinantes de las concentraciones plasmáticas de homocisteína (7), y sus concentraciones son significativamente superiores en los pacientes fenilcetonúricos que en los controles. Estos datos, junto con la correlación negativa observada entre el folato y la homocisteína refuerzan la importancia del folato en la reducción de las concentraciones de homocisteína en los pacientes fenilcetonúricos.

La deficiencia de cobalamina se ha descrito en adolescentes y adultos fenilcetonúricos (13) y por tanto la suplementación con esta vitamina se realiza rutinariamente en el tratamiento de estos pacientes. De hecho, se ha descrito un mayor riesgo de deficiencia de cobalamina en pacientes fenilcetonúricos con un seguimiento pobre de la dieta suplementada con cobalamina (17). Además, las concentraciones de cobalamina fueron significativamente menores en el grupo de pacientes fenilceto-

núricos con un seguimiento pobre de la dieta que en el grupo con un seguimiento estricto de la dieta, lo que concuerda con los datos aportados por otros autores (17). En cambio, las concentraciones séricas de folato y plasmáticas de homocisteína no fueron diferentes comparando ambos grupos de pacientes fenilcetonúricos, sugiriendo que el folato es un determinante más importante que la cobalamina de las concentraciones de homocisteína, al menos en nuestros pacientes fenilcetonúricos. Además, nuestros datos sugieren que la determinación de la homocisteína plasmática no sería útil para detectar una posible deficiencia de cobalamina en nuestros pacientes fenilcetonúricos, ya que las elevadas concentraciones de folato mantendrían los valores de homocisteína en el rango inferior de los controles. El ácido metilmalónico sería en estos casos el mejor marcador de deficiencia de cobalamina para los pacientes fenilcetonúricos.

Dos de nuestros pacientes presentaron una ligera deficiencia de cobalamina. Uno de ellos presentó una concentración de homocisteína disminuida (3,7 $\mu\text{mol/L}$), con una concentración elevada de folato (48,4 nmol/L). En cambio, el otro paciente presentaba la concentración más elevada de homocisteína (8,6 $\mu\text{mol/L}$), aunque dentro del intervalo de referencia, junto con la concentración de folato más reducida (27,9 nmol/L) de todos los pacientes fenilcetonúricos. Estos datos refuerzan la hipótesis de que las concentraciones séricas de folato son el principal determinante de las de homocisteína, las cuales se mantienen en el intervalo de referencia aunque existan concentraciones subóptimas de cobalamina.

La vitamina B₆ es otro determinante de las concentraciones plasmáticas de homocisteína (18). Desafortunadamente no la hemos podido cuantificar en este estudio, aunque esta vitamina está rutinariamente incluida en el suplemento dietético de los pacientes fenilcetonúricos. De hecho, la ingesta diaria de esta vitamina en nuestros pacientes fenilcetonúricos es ligeramente superior a las recomendaciones dietéticas sobre aportes nutricionales diarios (RDAs) (datos no presentados). La suplementación con vitamina B₆ en estos pacientes probablemente permite una rápida eliminación de homocisteína a través de la vía de la transulfuración. Además la correlación positiva observada entre las concentraciones de homocisteína y de cisteína total apoyaría esta hipótesis.

Otra explicación para las bajas concentraciones de homocisteína podría ser la reducida ingesta en proteínas naturales de nuestros pacientes fenilcetonúricos (19). De hecho, las concentraciones plasmáticas de metionina en los pacientes fenilcetonúricos fueron menores que en los controles, aunque las diferencias no fueron tan evidentes como las observadas para las concentraciones de homocisteína, y probablemente no tengan significación clínica. Además, no se observó correlación entre las concentraciones de metionina y homocisteína en nuestros pacientes fenilcetonúricos. La metionina es un aminoácido esencial que desarrolla una importante función en diversos procesos biológicos, como la síntesis de proteínas, acetyl-CoA y glutatión (11). En algunas enfermedades se ha demostrado que la deficiencia de metionina causa una disminución de la síntesis de glutatión (11), que causaría un aumento del estrés oxidativo. Las concentraciones de glutatión total normales observadas en los pacientes fenilcetonúricos apoyan la idea que esta disminución de las concentraciones de metionina podrían no tener significación clínica.

Las concentraciones de cisteína fueron también menores en los pacientes fenilcetonúricos que en los controles, aunque

(como ocurre con la metionina) las diferencias probablemente no tengan significación clínica. El hecho de que las concentraciones de glutatión total no fueran diferentes respecto a las de la población control apoyaría esta afirmación.

El glutatión es un antioxidante cuya fuente nutricional principal son los aminoácidos sulfurados cisteína y metionina (20). El glutatión desarrolla un papel importante en la detoxificación de radicales libres, y deficiencias de esta molécula se han asociado con un aumento del daño oxidativo implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades (20). Las concentraciones de glutatión observadas en este estudio, junto con las actividades normales de la glutatión peroxidasa observadas en estudios previos en pacientes fenilcetonúricos suplementados con selenio, (21), sugerirían que el sistema del glutatión funciona correctamente en esta enfermedad si existe un buen control metabólico.

El seguimiento de la dieta en los pacientes fenilcetonúricos es un factor clave, especialmente en adolescentes y adultos. Según nuestros resultados, las concentraciones disminuidas de homocisteína y cisteína en nuestros pacientes podrían estar asociadas con una disminución del riesgo a desarrollar enfermedad vascular. Aunque las concentraciones de homocisteína están disminuidas, incluso en los pacientes con un pobre control metabólico, hemos observado valores subóptimos de cobalamina en pacientes de este grupo, lo que sería un argumento a favor del mantenimiento del control dietético en la fenilcetonuria. Además, las concentraciones de glutatión observadas en nuestros pacientes reforzarían los efectos beneficiosos de las bajas concentraciones de cisteína y homocisteína. Pero esta hipótesis tendría que ser considerada con precaución ya que otros factores presentes en los pacientes fenilcetonúricos podrían aumentar el estrés oxidativo, como la deficiencia en selenio en pacientes con una adherencia pobre a la dieta (4), o una disminución de las concentraciones de ubiquinona observadas en suero (5) y células (22).

En conclusión, las concentraciones plasmáticas de homocisteína están disminuidas en la fenilcetonuria, probablemente como consecuencia de las altas concentraciones de folato, mientras que las de glutatión total se hallan dentro del intervalo de referencia. La adherencia a la fórmula especial parece importante para prevenir concentraciones subóptimas de cobalamina. Considerando estos datos conjuntamente, el estado de los tioles y vitaminas del grupo B en pacientes fenilcetonúricos podrían tener un efecto protector contra la enfermedad vascular y otras complicaciones probablemente derivadas del tratamiento dietético crónico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Julia Pineda, Rosa Maria Puig y Joan Moreno su excelente asistencia técnica. Este estudio se ha realizado gracias a las becas FIS: 00/1056 y Marató TV3: 99/3710. Además, C. Colomé recibió una beca del Hospital Sant Joan de Déu para realizar este estudio.

Correspondencia:
Rafael Artuch
Servei de Bioquímica. Hospital Sant Joan de Déu
Passeig Sant Joan de Déu, 2
08950 Barcelona
Teléfono: 93 280 40 00 Ext 2132
Fax: 93 280 26 36
rartuch@hsjdbcn.org

BIBLIOGRAFÍA

1. Scriver CR, Kaufman, Eisensmith RC, Woo SLC. The hyperphenylalaninurias. En: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th ed. McGraw Hill. New York: p 1015-1075, 1995.
2. Acosta PB, Yannicelli S. Plasma micronutrient concentrations in infants undergoing for phenylketonuria. *Biol Trace Elem Res* 1999; 67: 75-84.
3. Colome C, Sierra C and Vilaseca MA. Errores congénitos del metabolismo: ¿causa de estrés oxidativo?. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 111-7.
4. Van Bakel MM, Printzen G, Wermuth B, Wiesmann UN. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 976-81.
5. Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J. Decreased serum ubiquinone-10 concentration in phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 892-5.
6. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE *et al.* Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or =40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996; 98: 2174-83.
7. Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 8th ed. McGraw-Hill. New York: p 3897-3933; 2001.
8. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B *et al.* Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
9. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 98; 5-7.
10. El-Khairi L, Ueland PM, Refsum H, Graham MI, Vollset SE; European Concerted Action Project. Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *Circulation* 2001; 103: 2544-9.
11. Roediger WEW. New views on the pathogenesis of Kwashiorkor: methionine and other amino acids. *J Pediatr Gastroenterol* 1995; Nutr. 21, 130-6.
12. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total Homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997; 43: 690-2.
13. Hanley WB, Feigenbaum AS, Clarke JT, Schoonheydt WE, Austin V. Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with Phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; 155, S145-S147.
14. Brenton DP, Pietz J. Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur J Pediatr* 2000. 159 suppl, 2 S114-S120.
15. Darling G, Mathias P, O'Regan M, Naughten E. Serum selenium levels in individuals on PKU diets. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 769-73.
16. Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N *et al.* A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 1998; 276: 1-9.
17. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr* 2000; 136: 545-7.
18. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamins B6, B12 and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998; 17: 435-41.
19. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 263-79.
20. White AC, Thannickal VJ, Fanburg BL. Glutathione deficiency in human disease. *J Nutr Biochem* 1994; 5: 218-26.
21. Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, Guillemin C, Ducros V, Arnaud J *et al.* Selenium glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 137-42.
22. Colomé C, Artuch R, Vilaseca MA, Sierra C, Brandi N, Cambra FJ *et al.* Ubiquinone-10 content in lymphocytes of phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 2002; 35: 81-4.