



**Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud**

**“AVANCES EN EL TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE  
LOS PACIENTES CON ACIDEMIA PROPIÓNICA”**

**Tesis Doctoral presentada por**

**Sinziana Mihaela Stanescu**

**Directora:**

**DRA. AMAYA BELANGER QUINTANA**

**Codirectora:**

**DRA. MERCEDES MARTÍNEZ-PARDO CASANOVA**

**Alcalá de Henares, 2021**

**A Theo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis primeros agradecimientos son para las familias y los pacientes con Acidemia propiónica, que me ha dado su apoyo incondicional para llevar a cabo mis estudios.

A mi marido Dennis, mi firme compañero, que siempre ha estado a mi lado en todas nuestras aventuras.

A mis padres que me han apoyado incondicionalmente y que son mis grandes ejemplos de honestidad, profesionalidad, integridad y sacrificio. A mi hermano Ionut que siempre encuentra las mejores palabras para animarme en momentos difíciles. A Babu que me ha enseñado lo que es el gran amor de abuelo. ¡Babu, te echo enormemente de menos!

¡A toda mi familia de Rumania! ¡Somos pocos, pero somos grandes!

A Sylvana, por su optimismo y alegría de vivir.

A mi gran familia adoptiva de Madrid. Gracias por acogerme, por enseñarme, ¡por quererme!

A mis amigas-hermanas, Carmen Vázquez, María Toledano y Ana de Blas, personas especiales y excelentes profesionales.

A Amaya Belanger y Merche Martínez-Pardo, que han confiado en mi y que son más que mis compañeras, ¡son grandes amigas! Han sabido seducirme para entrar en este mundo tan fascinante del metabolismo.

A todos mis compañeros del Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal. A Enrique Otheo que me ha abierto la puerta de la Pediatría y que siempre será un ejemplo de profesionalidad. A mis compañeros de la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos, gracias por vuestra confianza y apoyo en momentos difíciles. A Cristina Camarero, que ha aceptado ser tutora de mi tesis.

A los compañeros del CEDEM, especialmente a Celia Pérez-Cerdá, Begoña Merinero, Pedro Ruiz-Sala, Patricia Alcaide. ¡Sois un ejemplo de profesionalidad y trabajo en equipo!

A los compañeros de la Unidad de Bioestadística, especialmente a Borja Manuel Fernández. Gracias, Borja, por tu paciencia y tu imprescindible ayuda en interpretar los datos.

No podría olvidar la importante ayuda de la Enfermería del Servicio de Pediatría (Planta de Hospitalización y Hospital de Día Pediátrico). Vuestra contribución es esencial e imprescindible para nuestro trabajo.

A mis compañeros de grupo HM Hospitales, con los que tantos momentos buenos y malos he compartido.

Mis agradecimientos a la Fundación Ramón Areces y Fundación SEUR que han financiado nuestros estudios.

# ÍNDICE

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	1
1. Estructura de la propionil CoA carboxilasa	3
2. Sustratos de la propionil CoA carboxilasa	5
2.1 Aminoácidos ramificados: particularidades de su metabolismo	6
2.2 Metionina y su papel en la defensa antioxidante	10
2.3 Treonina y sus funciones biológicas	14
2.4 OLCFAs	14
2.5 Microbiota	15
3. Vías metabólicas alteradas en la deficiencia de propionil CoA carboxilasa	16
3.1 Ruta metabólica en Acidemia propiónica	16
3.2 Disfunción del ciclo de la urea	19
A. Fisiología de la producción y detoxificación del amonio	19
B. Disfunción del ciclo de la urea en Acidemia propiónica	23
3.3 Anaplerosis deficiente	27
3.4 Disfunción mitocondrial	34
A. Toxicidad directa sobre el aparato energético celular	39
B. Anaplerosis deficiente	41
C. Aumento del estrés oxidativo	42
D. Disminución de la capacidad antioxidante	45

4. Manifestaciones clínicas de la deficiencia de propionil CoA carboxilasa	53
4.1 Descompensación metabólica aguda	53
4.2 Complicaciones crónicas	54
5. Tratamiento de los pacientes con Acidemia propiónica. Situación actual	59
5.1 Tratamiento dietético	60
5.2 Tratamiento farmacológico	62
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	65
<b><u>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	68
<b><u>RESULTADOS</u></b>	79
I. Caracterización del perfil metabólico de los pacientes durante un episodio de descompensación aguda. Perfil de aminoácidos plasmáticos	81
II. Caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de las complicaciones crónicas	89
II.1 Complicaciones hematológicas. Anemia severa	90
II.2 Complicaciones gastrointestinales. Pancreatitis	95
III.3 Complicaciones cardiológicas	99
III.4 Complicaciones neurológicas	101
III. Seguimiento a largo plazo con muestras papel	104



IV.	Detección del estado plasmático de CoQ10 y el posible beneficio del tratamiento con ubiquinol en los pacientes con Acidemia propiónica	111
-----	--	-----

## **DISCUSIÓN**

I.	Discusión sobre caracterización del perfil de los aminoácidos plasmáticos durante un episodio de descompensación aguda	119
	I.1 Consideraciones sobre el papel central del músculo y la anaplerosis deficiente en la fisiopatología de la Acidemia propiónica	120
	I.2 Consideraciones sobre las alteraciones en el perfil de aminoácidos sustrato del ciclo de la urea	127
	I.3 Alteraciones en el perfil de aminoácidos aromáticos	132
II.	Discusión sobre caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de las complicaciones crónicas	134
	II.1 Consideraciones sobre el perfil metabólico de los pacientes con anemia severa persistente	135
	II.2 Consideraciones sobre el perfil metabólico de los pacientes con pancreatitis	139
	II.3 Consideraciones sobre otras complicaciones neurológicas	146
	II.4 Consideraciones sobre complicaciones cardiológicas	152
III.	Discusión sobre el seguimiento a largo plazo con muestras papel	155
IV.	Discusión sobre la deficiencia de CoQ10 en Acidemia propiónica y suplementación con ubiquinol	160

<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	165
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	170
<b><u>ANEXOS</u></b>	198

# **INTRODUCCIÓN**

La acidemia propiónica (AP; OMIM #606054) es un error innato del metabolismo intermediario de los aminoácidos de herencia autosómica recesiva secundario a la deficiencia de la propionil CoA carboxilasa (PCC, E.C. 6.4.1.3), enzima mitocondrial que cataliza la transformación de propionil CoA en metilmalonil CoA con la ayuda del cofactor biotina. La incidencia global de la AP se estima en 1:50.000 recién nacidos vivos. Sin embargo, hay grandes variaciones en distintas poblaciones, desde 1:17.400 en Japón a 1:250.000 en Alemania<sup>1</sup>.

Los pacientes con AP suelen debutar a los pocos días o semanas después del nacimiento con un episodio de acidosis metabólica grave junto con hiperamonemia, cetosis, hiperlactacidemia, hipo/hiperglucemia y afectación multiorgánica. El debut fuera del periodo neonatal es menos frecuente e incluye un variado conjunto de síntomas mayoritariamente gastrointestinales o neurológicos<sup>2</sup>. La implantación de la detección de esta enfermedad en los paneles de cribado permite diagnosticar a los pacientes cuando todavía están paucisintomáticos, pero esta determinación no es universal por lo que muchos pacientes a día de hoy se siguen diagnosticando tras una primera descompensación metabólica. Esta descompensación se suele atribuir al efecto tóxico producido por la acumulación de una serie de metabolitos, tiene una alta morbimortalidad y suele dejar secuelas neurológicas irreversibles.

El diagnóstico precoz y tratamiento han aumentado la esperanza de vida de los pacientes con AP. Sin embargo, quedan muchos aspectos que mejorar. Por un lado, los tratamientos habituales no consiguen evitar completamente nuevas descompensaciones metabólicas, que se producen en el contexto de infecciones intercurrentes y ayunos prolongados, pero también a veces sin un desencadenante claro. Además, la mayor esperanza de vida ha permitido observar

la aparición de las complicaciones a largo plazo, incluso en sujetos con buen control metabólico<sup>3</sup>. Las complicaciones a largo plazo pueden afectar a cualquier órgano o sistema (gastrointestinales, neurológicas, cardíacas, hepáticas etc). La aparición de las complicaciones crónicas incluso en los pacientes con aceptable control metabólico hace sospechar la implicación de otros mecanismos de patogenicidad diferentes a la teoría clásica del acúmulo de metabolitos tóxicos.

Por lo tanto, para conseguir mejorar el tratamiento y la evolución de los pacientes es preciso entender la fisiopatología de la enfermedad.

## 1. Estructura proteica y genética de la propionil CoA carboxilasa

La PCC es un heterododecámero de 750 kDa que consiste en 6 subunidades alfa (*PCCA*, MIM 232000) y 6 subunidades beta (*PCCB*, MIM 232050)<sup>4,5,6</sup>, ver Figura 1. La PCC es parte de un grupo de carboxilasas, como la 3 metil crotonil carboxilasa, acetil CoA carboxilasa, piruvato carboxilasa o urea carboxilasa, que requieren biotina activada como cofactor obligatorio. Las carboxilasas biotin dependientes tienen una estructura común consistente en un dominio biotin carboxilasa (BC), dominio de la proteína transportadora de biotin-carboxil (*biotin-carboxyl carrier protein BCCP*) y el dominio carboxitransferasa (CT)<sup>7</sup>. Sin embargo, la estructura de la PCC es distinta de las demás enzimas de su grupo al tener un dominio de transferencia de biotina (BT) localizado en la subunidad alfa y que es imprescindible para su activación e interacción con la subunidad beta<sup>4</sup>. El precursor de la subunidad PCCA no contiene biotina hasta entrar en la mitocondria. La subunidad PCCB requiere de la subunidad PCCA para su estabilidad molecular y está ausente en individuos con deficiencias en la subunidad PCCA<sup>5</sup>.

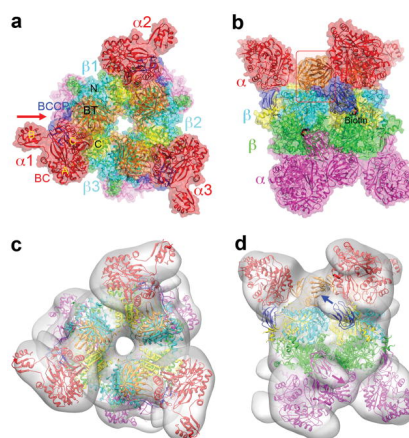


Figura 1. a y b: Estructura cristalina de la PCC (*Ruegeria pomeroyi* PCCA y *Roseobacter denitrificans* PCCB). c y d: reconstrucción de la PCC humana. (Huang, et al., 2010).

La deficiencia enzimática de la PCC puede ser el resultado de mutaciones en los genes codificantes de la subunidad alfa o beta, ver Figura 2. El gen *PCCA* está localizado en el cromosoma 13q32 y codifica un polipéptido de 703 aminoácidos, mientras que el gen *PCCB* se localiza en el cromosoma 3q13.3-q22 y codifica un polipéptido de 539 aminoácidos<sup>8,9</sup>. Se han identificado 44 variantes alélicas en el gen *PCCA* y 55 en el gen *PCCB*. En ambos genes, las mutaciones *missense* son los más frecuentes, seguidas de pequeñas inserciones o deleciones y mutaciones *splicing*<sup>1</sup>.

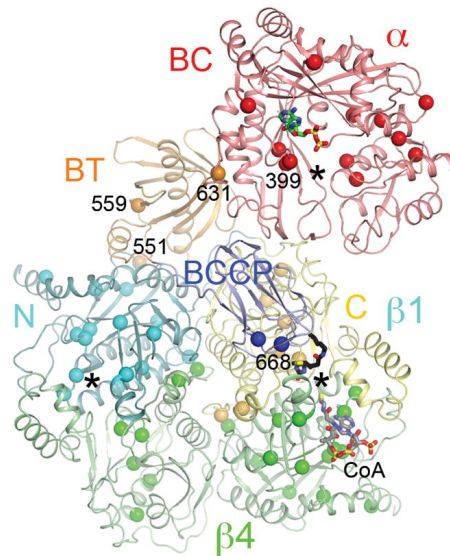


Figura 2. Localización de las mutaciones *missense* de la PCC representadas con esferas; con las estrellas se identifican los sitios activos de la proteína (Huang, et al., 2010).

Las mutaciones se concentran en el exón 13 para el gen *PCCA* y en los exones 12 y 15 en el gen *PCCB*, lo que sugiere que estas zonas pueden ser puntos importantes para los dominios funcionales. No hay una clara relación genotipo-fenotipo, aunque, como es de esperar, las mutaciones que resultan en alelos nulos se asocian a un fenotipo más grave<sup>1</sup>.

## 2. Sustratos de la propionil CoA carboxilasa y sus funciones biológicas

El metabolismo de los aminoácidos propiogénicos (valina, isoleucina, metionina y treonina) se considera la fuente principal de propionil CoA en el organismo, con una contribución media de 50% del pool de propionato<sup>10</sup>. Por otro lado, el metabolismo de las bacterias intestinales (fermentación de las bacterias anaerobias) y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena impar (*odd-numbered long chain fatty acids*; OLCFAs) contribuyen con el resto de 50%<sup>2,11,12</sup>, ver Figura 3.

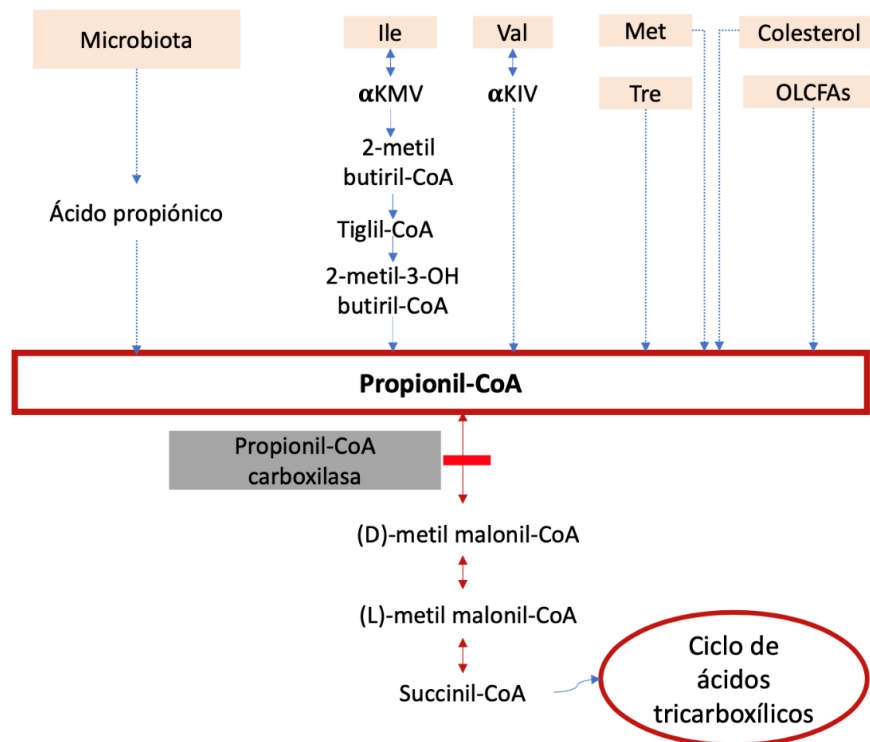


Figura 3: Sustratos de la propionil CoA carboxilasa. Val: valina, Ile: isoleucina, Met: metionina, Tre: treonina, OLCFAs: odd-numbered long-chain fatty acids,  $\alpha$ KMV: ácido  $\alpha$  ceto-metil valérico,  $\alpha$ KIV: ácido  $\alpha$  ceto-isovalérico



## 1.1. Aminoácidos ramificados propiogénicos: particularidades de su metabolismo

**Metabolismo y regulación enzimática de los aminoácidos ramificados** Los aminoácidos ramificados (AARR), valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu) son aminoácidos esenciales, aportados exclusivamente por la dieta, ver Figura 4. De los tres, solamente la Val y la Ile son sustratos para la propionil CoA carboxilasa. En el siguiente apartado se detallan las particularidades del metabolismo de los AARR presentados en su conjunto, que consideramos imprescindible para entender la fisiopatología de la AP.

El metabolismo de los aminoácidos ramificados tiene varias peculiaridades:

- El catabolismo u oxidación de los AARR se realiza principalmente en el músculo esquelético.
- Los niveles plasmáticos de los AARR, sobre todo los de la leucina, pueden influir en los niveles plasmáticos y en la circulación a través de la barrera hemato-encefálica de otros aminoácidos.
- Los AARR pueden regular la síntesis de proteínas en varios tejidos.

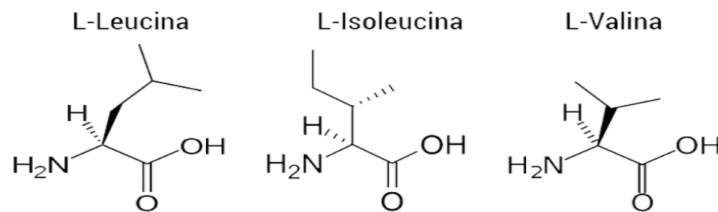


Figura 4. Estructura química de los aminoácidos ramificados

Los AARR (Leu, Val e Ile) son aminoácidos que contienen grupos R no polares o hidrofóbicos; de hecho, son de los aminoácidos más hidrofóbicos<sup>13</sup>. Esta característica es determinante por su papel en las estructuras proteicas globulares, puesto que el núcleo de estas proteínas está constituido de aminoácidos hidrofóbicos principalmente Leu, Ile, Val, fenilalanina (Phe) y metionina (Met). El núcleo proteico hidrofóbico no solamente es importante para la estabilidad de las proteínas<sup>14</sup>, sino también para sus funciones; por ejemplo, los residuos hidrofóbicos participan en la unión enzima-sustrato y apoyan la unión del oxígeno con mioglobina o hemoglobina, entre otros<sup>15</sup>. Por eso, el porcentaje de AARR es relativamente alto en muchas estructuras proteicas, hasta un 20-25%<sup>16</sup>.

El catabolismo de los AARR se realiza principalmente en el músculo esquelético y no en el hígado como ocurre en la mayoría de los aminoácidos de la dieta; también un componente significativo de su oxidación tiene lugar en el tejido adiposo<sup>16,17</sup>, ver Figura 5. La Leu es cetogénica, la Val es gluconeogénica, mientras que la Ile es cetogénica y gluconeogénica a la vez<sup>16</sup>. Sin embargo, el músculo no es un tejido gluconeogénico. Por lo tanto, varios trabajos han concluido que los productos finales del catabolismo muscular de los AARR son la glutamina (Gln) y alanina (Ala), siendo Val e Ile los principales donantes de átomos de carbono<sup>18,19,20,21</sup>.

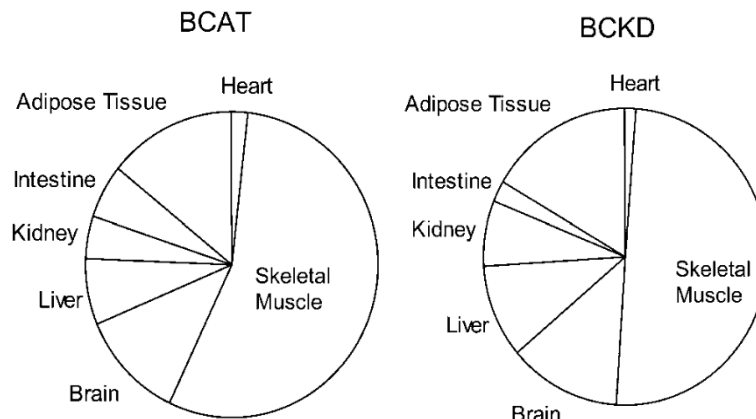


Figura 5.: distribución tisular de las enzimas claves en el metabolismo de los AARR (Brosnan & Brosnan, 2006). BCAT: transaminasa de los AARR, BCKD: deshidrogenasa de los keto-ácidos de cadena ramificada

¿Por qué el catabolismo de los AARR se realiza en tejidos extrahepáticos, mientras que los demás aminoácidos de la dieta se metabolizan en el hígado? Durante el ejercicio físico el músculo aumenta el consumo energético y promueve la oxidación de los AARR<sup>22</sup>, ver Figura 6. Se ha propuesto, por lo tanto, que los AARR contribuyen al metabolismo energético como precursores de moléculas anapleróticas y de síntesis de alanina para utilizarla en la gluconeogénesis<sup>16</sup>. Por estos motivos el “cocktail” de AARR resulta interesante y se utiliza en la nutrición de los deportistas profesionales.

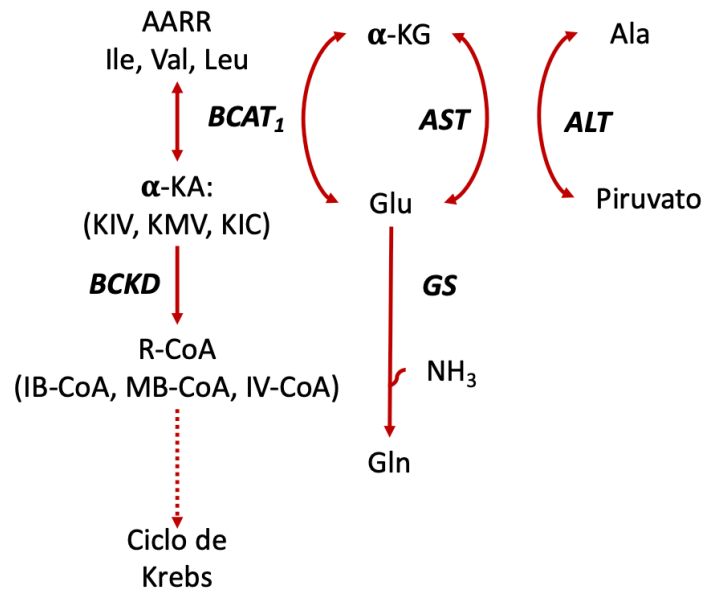


Figura 6.: Metabolismo muscular de los AARR. AARR: aminoácidos ramificados, Ile: isoleucina, Leu: Leucina, Val: valina, Ala: alanina, Gln: Glutamina, Glu: glutamato, **BCAT<sub>1</sub>** : transaminasa de los aminoácidos ramificados 1, **BCKD**: deshidrogenasa de los cetoácidos, **AST**: aspartato aminotransferasa, **ALT**: alanin aminotransferasa, **GS**: glutamina sintetasa, α-KA: α-cetoácidos, KIV: ceto-isovalérico, KMV: ceto-metilvalérico, KIC: ceto-isocaproico, α-KG: α-cetoglutarato, IB-CoA: isobutiril CoA, MB-CoA: metilbutiril CoA, IV-CoA: isovaleril CoA.

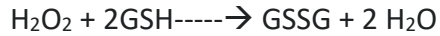
Estudios recientes han demostrado el importante efecto anabolizante de la Leu. La ingesta de Leu estimula la síntesis y liberación de insulina, actuando directamente en las células β pancreáticas. Se ha descrito el efecto de la SIRT4, una lisina-deacilasa que controla la secreción de insulina y el catabolismo de la Leu, aportando nuevos datos sobre la conexión entre el metabolismo de los AARR y glucosa<sup>23</sup>. Además, se ha visto que la Leu activa directamente el

receptor m-TORC1 de los ribosomas, aumentando así la síntesis proteica<sup>24</sup>. Además, se ha demostrado que en el músculo algunos de los metabolitos de los AARR, especialmente los  $\alpha$  ceto-ácidos y el  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil butirato, inhiben la proteólisis, aumentando así la masa muscular<sup>25,26</sup>.

## **1.2. Metionina y su papel en la defensa antioxidante**

En los últimos años varios autores han demostrado el papel de los aminoácidos sulfurados metionina (Met) y cisteína (Cys) en distintas funciones celulares, entre ellas la defensa antioxidante. La Met es uno de los aminoácidos esenciales, imprescindible para la síntesis de proteínas, tanto por su incorporación en estructuras celulares, como a través de la regulación translacional del ARN<sup>27</sup>. En aves, la Met es el aminoácido limitante para el crecimiento, como se ha demostrado en pollos con dieta exenta de Met<sup>28,29</sup>.

La Met, como precursor de la Cys, interviene directamente en la síntesis de glutathion (GSH), ver Figura 7. GSH es un tripéptido (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) y representa el antioxidante intracelular más potente. La GSH peroxidasa cataliza la oxidación del GSH a su dímero en presencia de  $H_2O_2$ <sup>30</sup>. Más adelante, el dímero del GSH (GSSG) es reducido de nuevo a GSH a través de la GSSD reductasa o se elimina de la célula. La ratio celular de la forma oxidada (GSSG) y reducida GSH/GSSG se utiliza para valorar el estado del estrés oxidativo celular y tiene un papel fundamental en la regulación de varios procesos metabólicos, como la transcripción genética.



Varios estudios en modelos animales han demostrado el papel de la Met en la síntesis de GSH y la repercusión sobre la capacidad antioxidante en las dietas restringidas en aminoácidos sulfurados:

- En cerdos alimentados con proteínas de soja versus caseína se ha demostrado una disminución de los niveles hepáticos de GSH en la rama de soja. Este efecto se ha explicado por el contenido disminuído en los aminoácidos sulfurados en el caso de las proteínas de soja<sup>31</sup>.
- En ratones con dieta limitada en metionina y colina se ha demostrado un aumento significativo de los lípidos peroxidados en hígado a través de la activación del citocromo P450 E1, efecto similar al observado en la esteatosis hepática<sup>32,33</sup>.
- En ratones suplementados con Met se ha observado aumento de niveles de varias enzimas implicadas en la defensa antioxidante en el músculo cardíaco: glutathion peroxidasa (GSHP), superoxid dismutasa (SOD) y catalasa<sup>34</sup>.

Además de su papel como precursor de la síntesis de GSH, se ha demostrado que los residuos de Met dentro de las proteínas pueden tener una función antioxidante a través del sistema metionina-sulfoxido reductasa. Los residuos proteicos de Met son susceptibles a la oxidación por las especies reactivas de oxígeno (ERO) convirtiéndose en metionina sulfóxido (MetO), que tiene dos esteroisomeros MetO-S y MetO-R. Las formas S y R se reducen de nuevo a Met a través de la metionin sulfóxido reductasa A y B (Msr-A y Msr-B). Cada ciclo de oxidación-reducción de los residuos de Met neutralizan un equivalente de ERO, lo que podría representar

uno de los principales mecanismos antioxidantes proteicos<sup>35</sup>. Muchas proteínas utilizan los residuos de Met como “guardianes” antioxidantes, pero las más estudiadas han sido la  $\alpha$ 2 macroglobulina y la glutamina sintetasa. En estos casos se ha demostrado que la oxidación de los residuos de Met protege el núcleo activo proteico y la capacidad catalítica. En el caso de la glutamina sintetasa (GS), se ha demostrado en cepas de *E. coli* que incluso después de la oxidación de los 16 residuos de Met la enzima mantiene su capacidad catalítica<sup>36</sup>. Recordamos que la disfunción/inhibición de la GS en los pacientes con AP se ha propuesto como mecanismo para justificar los niveles disminuidos de Gln durante los episodios de hiperamonemia<sup>37</sup>.

Oxidación:  $\text{Proteína}_{\text{Met}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Proteína}_{\text{MetSO}} + \text{H}_2\text{O}$

Reducción:  $\text{Proteína}_{\text{MetSO}} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Proteína}_{\text{Met}} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Según el modelo anterior, se describen cómo el ciclo de oxidación/reducción de los residuos proteicos de Met eliminan  $\text{H}_2\text{O}_2$  con oxidación secundaria de una molécula de NAD(P)H. Se propone un modelo de protección de las proteínas, en las que los residuos de Met más expuestas estructuralmente neutralizan los radicales libres, protegiendo de esta manera la actividad catalítica enzimática<sup>38</sup>.

Muy escasos estudios han investigado el estado del glutatión en los pacientes con errores innatos de metabolismo y menos todavía en acidemias orgánicas. Salmi et al han determinado los niveles de GSH y el estado del tiol redox en fibroblatos de pacientes con acidemias orgánicas (AP, acidemia metilmalónica y acidemia isovalérica) comparando con controles<sup>39</sup>. Los autores demuestran una disminución de los niveles de GSH en los pacientes con acidemias orgánicas, y

lo atribuyen al aumento de su consumo. A pesar de tener unos resultados interesantes, el estudio tiene varias limitaciones, siendo las más relevantes el escaso número de pacientes y su heterogeneidad, al incluir pacientes con distintas acidemias orgánicas. Es posible que la reducción en las concentraciones de GSH en AP puedan deberse no sólo a su consumo sino también a la deficiencia de Met secundaria a su restricción dietética y que esta medida tenga implicaciones en la síntesis de GSH (ver Figura 7). Esta hipótesis merecería futuros estudios, por las posibles consecuencias que las restricciones dietéticas podrían tener en los pacientes con AP.

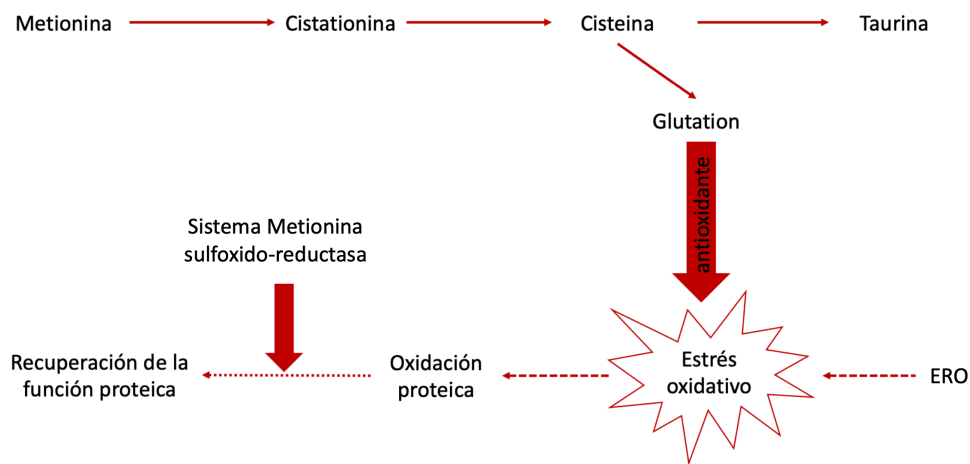


Figura 7: Papel de la metionina en los mecanismos antioxidantes. ERO: especies reactivas de oxígeno.



### **1.3. Treonina y sus funciones biológicas**

La treonina (Tre) es el aminoácido propiogénico cuyo papel es menos conocido. A pesar de ser uno de los aminoácidos esenciales, una proporción importante (hasta 60%) de lo que se ingiere no se absorbe, sino que se queda a nivel intestinal<sup>40,41</sup>. Se sabe que participa en la síntesis de mucina y por tanto interviene en la integridad de la barrera mucosa intestinal<sup>42</sup>. Aunque no está demostrado, alteraciones en la permeabilidad intestinal secundaria a una dieta restringida en Tre podrían tener relevancia en los pacientes con AP.

### **1.4. Ácidos grasos de cadena larga impar (odd-numbered long-chain fatty acids, OLCFAs)**

La utilización del propionil CoA en lugar del acetil CoA en la síntesis de los ácidos grasos conlleva al acúmulo de OLCFAs, tales como los C15 o C17 (Wendel, Baumgartner, van der Meer, & Spaapen, 1991). Se ha estudiado la utilidad de la determinación del contenido de OLCFAs en distintos tejidos como marcador para la monitorización de los pacientes con AP, siendo un dato indirecto del *pool* de propionil CoA intracelular<sup>43,44</sup>. La suma de los OLCFAs (C15:0, C17:0, C17:1) se expresa como porcentaje del total de los ácidos grasos C14-C22. La técnica se describió por primera vez en eritrocitos, pero se puede realizar la determinación también en plasma. Además, sabemos que la producción de OLCFAs se activa desde el periodo prenatal y se han detectado cantidades significativas en fetos con trastornos del metabolismo del propionato, aunque no parece tener repercusión en el embarazo o el momento del parto. En el periodo postnatal

inmediato, se produce catabolismo proteico, pero también un aumento de la lipólisis que puede ser una fuente significativa de propionil CoA y puede favorecer la descompensación metabólica que se produce típicamente a esta edad<sup>45</sup>. Varios estudios han demostrado la utilidad de la determinación de la heptanoil carnitina (C17) junto con la C3 en el cribado neonatal como marcador de trastornos de metabolismo del propionato<sup>46</sup>.

### **1.5. Microbiota**

La flora intestinal juega un papel activo en la fisiopatología de la AP por la síntesis de ácido propiónico por parte sobre todo de las bacterias anaerobias. Se estima que hasta un 25% del *pool* del ácido propiónico del organismo proviene de los procesos de fermentación intestinal<sup>47</sup>. Además, aparte de la producción de ácido propiónico, la microbiota produce también amonio, que entrará en la circulación portal para ser detoxificado en el hígado, contribuyendo también al *pool* de amonio en el organismo y favoreciendo la aparición de hiperamoniemia. Por esta razón y a pesar de tener una evidencia científica baja, las guías recomiendan el tratamiento con metronidazol para la detoxificación intestinal y un tratamiento agresivo del estreñimiento<sup>2</sup>. Es curioso que, a pesar de tener un papel tan importante en la fisiopatología de la AP, la microbiota es un tema insuficientemente investigado. Se desconoce la composición real de la misma en estos pacientes, si repercute en su inmunidad o si el uso de probióticos pudiera tener algún beneficio frente al tratamiento crónico con el metronidazol.

## **2. Vías metabólicas alteradas en la deficiencia de propionil CoA carboxilasa**

### **2.1. Ruta metabólica en acidemia propiónica**

La disfunción de la propionil CoA carboxilasa conlleva el aumento de varios metabolitos debidos al acúmulo de propionil CoA (ver Figura 8): propionil carnitina (C3, por su unión a carnitina), metilcitrato (resultado de la combinación con oxaloacetato) y ácido 3 hidroxipropiónico. También se observan aumento de los metabolitos precursores o sus derivados (OLCFAs, aminoácidos, tigilil glicina o ácido 2 metil 3 hidroxibutírico). La aparición de estos metabolitos permite el diagnóstico de la enfermedad y/o su detección precoz mediante el cribado neonatal.

El acúmulo de la propionil CoA y de otros metabolitos tóxicos como el metilcitrato interfiere en una serie de mecanismos y sistemas celulares como el ciclo de la urea, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) y la cadena respiratoria mitocondrial, entre otros. Por lo tanto, el déficit enzimático en AP afecta de forma secundaria a múltiples rutas metabólicas, que finalmente derivan en graves trastornos bioquímicos y metabólicos tal y como demuestran la presencia de hiperamonemia, cetoacidosis, lactacidosis e hiperglicinemia.

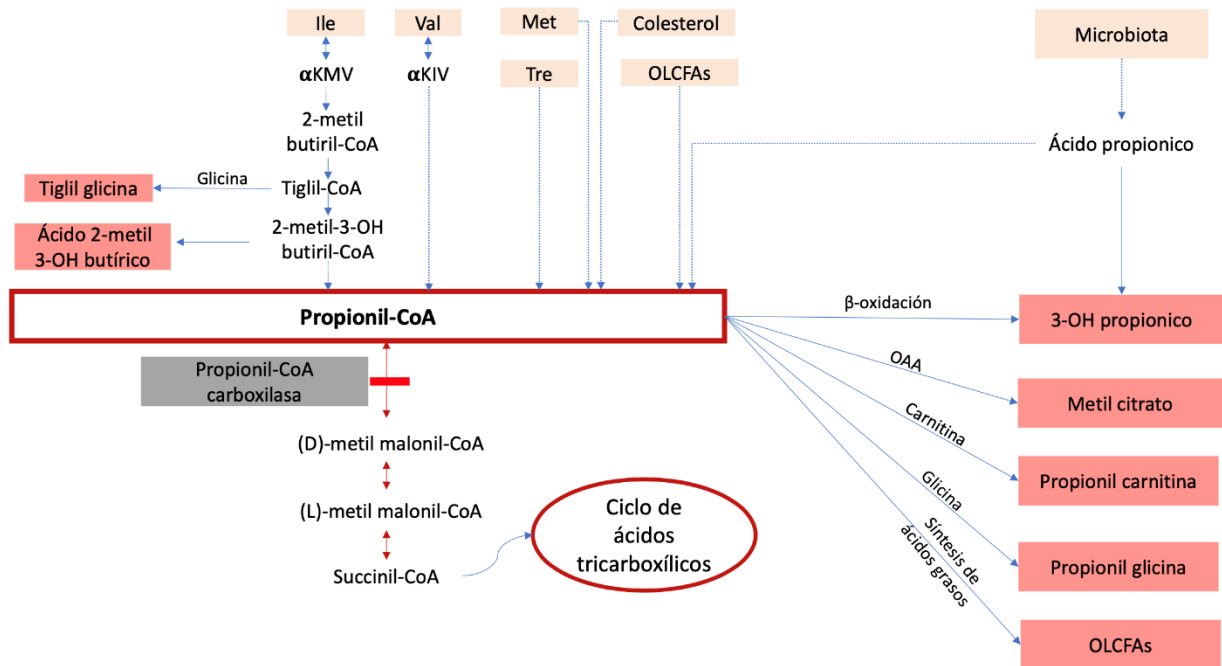


Figura 8: rutas metabólicas implicadas en la fisiopatología de la acidemia propiónica. Ile: isoleucina, Val: valina, Met: metionina, Tre: treonina,  $\alpha$ KIV:  $\alpha$  ceto-isovalérico,  $\alpha$ KMV:  $\alpha$  ceto-metilvalérico, OLCFAs: odd-numbered long-chain fatty acids, OAA: oxaloacetato.

La hiperglicinemia es un marcador bioquímico típico de la AP, que llegó a conocerse como hiperglicinemia cetósica. Aunque algunos autores lo proponen como marcador de seguimiento al asociarse las formas más graves con niveles más altos<sup>48,49</sup>, su papel no está del todo aclarado. La presencia de la hiperglicinemia se debe a la inhibición por el propionil CoA del sistema de segmentación de la glicina a nivel hepático<sup>50</sup>.

Además de su importante papel en la patología aguda, se ha propuesto el mecanismo de la toxicidad directa de varios productos metabólicos, como el metil citrato o el ácido 3 hidrox

propiónico, en la aparición de algunas complicaciones crónicas como las neurológicas, hematológicas o las gastrointestinales<sup>51</sup>. Tanto el propionato, como el metilcitrato han sido propuestos y estudiados como tóxicos cerebrales importantes. El propionato se ha relacionado con la presencia de autismo en varios modelos animales<sup>52</sup> e inhibe la GABA-transaminasa con aumento secundario de los niveles de GABA cerebrales, induciendo letargia y coma<sup>53</sup>. El metilcitrato también se ha estudiado por su toxicidad neuronal<sup>54</sup>.

## 2.2. Disfunción del ciclo de la urea

Una de las características fundamentales de las crisis metabólicas agudas es la hiperamoniemia, que posteriormente marcará el pronóstico del paciente por su alto índice de toxicidad neurológica. La hiperamoniemia grave en AP es secundaria a la inhibición del ciclo de la urea en distintos puntos, como comentaremos seguidamente.

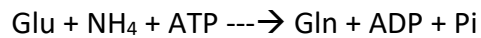
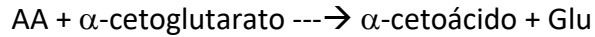
### A. Fisiología de la producción y detoxificación del amonio

El amonio ( $\text{NH}_4$ ) es el producto final del catabolismo proteico. Las principales fuentes de  $\text{NH}_4$  son el intestino, durante el proceso de digestión y absorción proteica, y el músculo esquelético en periodos de ayuno o estrés metabólico (cirugías, infecciones, etc). La eliminación de  $\text{NH}_4$  se produce en dos etapas. El primer paso tiene lugar en el músculo con la síntesis de glutamina (Gln), un aminoácido neutro no tóxico que **transporta** la molécula de  $\text{NH}_4$  al intestino y de allí al hígado por la circulación portal. La segunda etapa, consiste en la transformación final del  $\text{NH}_4$  en urea, un compuesto no tóxico que puede ser eliminado por orina. La síntesis de urea se produce exclusivamente en el hígado en una cadena de reacciones que forman el ciclo de la urea.

#### Producción de $\text{NH}_4$ .

- **El músculo.** Durante los estados catabólicos (ejercicio físico, ayuno etc) aumenta la proteólisis muscular, con la formación de aminoácidos (AA) y  $\text{NH}_4$ . Los aminoácidos participan en las reacciones de transaminación, utilizando el  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptor de nitrógeno y produciendo glutamato (Glu) y  $\alpha$ -ketoácidos. Posteriormente el

glutamato se une con el  $\text{NH}_4$  produciendo la glutamina (Gln) por la acción de la glutamina sintetasa.



- **El intestino.** El intestino tiene tres fuentes de amonio: la digestión de las proteínas de la dieta, la glutamina (Gln) plasmática y la urea. La Gln plasmática entra masivamente en el enterocito en donde ejerce varios efectos metabólicos, entre ellos la síntesis de Glu y de Ornitina (Orn)/Prolina (Pro) por la vía de la  $\Delta^1$ -pirolin-carboxilato sintetasa (P5CS). La urea es otra fuente importante de amonio intestinal. Se estima que aproximadamente un 20% de la cantidad total de urea se recicla en el intestino a través de la microbiota; las bacterias urealíticas rompen la urea con la producción de  $\text{NH}_4 + \text{CO}_2$ . Hasta un 75% de la producción intestinal de  $\text{NH}_4$  vuelve al hígado mediante la circulación portal para una nueva producción de urea<sup>55</sup>.

#### Detoxificación del $\text{NH}_4$

- **Síntesis muscular de glutamina (Gln).**
- **Ciclo de la urea** (ver Figura 9). Las vías metabólicas del ciclo de la urea se localizan exclusivamente en los hepatocitos periportales que tienen una alta afinidad para la Gln, que constituye la fuente principal de amonio para el ciclo de la urea<sup>55</sup>. La síntesis de urea, el producto final no tóxico del metabolismo proteico supone un ciclo de 6 reacciones

enzimáticas, con alto consumo energético teniendo en cuenta que por cada mol de urea se necesitan 4 moléculas de ATP.

### Regulación del ciclo de la urea

El ciclo de la urea está regulado en dos puntos clave: el primero es el N-acetil glutamato (NAG) que controla y activa alostericamente la actividad de la enzima carbamoil-fostato sintetasa 1 (CPS1); el segundo es la biodisponibilidad de la ornitina<sup>55</sup>.

- El NAG se produce por la acetilación del Glu con el acetil CoA (ver Figura 9), reacción catalizada por la N-acetil glutamato sintetasa (NAGS). La NAGS es una enzima activada por la arginina (Arg) y que se inhibe, por inhibición competitiva con el acetil CoA sustrato natural de la NAGS, por los ésteres de acetil CoA de cadena corta, como el propionil CoA o el valproil CoA. La inhibición de la NAGS, como veremos más adelante, se propone como principal mecanismo para la hiperamoniemia en las acidemias orgánicas y en la intoxicación con ácido valproico<sup>55</sup>. Las dos fuentes principales del acetil CoA para la síntesis de NAG son la glucólisis postingesta o la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos durante el ayuno.
- El segundo punto de la regulación del ciclo de la urea es la disponibilidad de ornitina (Orn). La Orn es sustrato para la ornitín transcarbamilasa (OTC), enzima considerada el punto de partida del ciclo de la urea<sup>55</sup>. Después de la ingesta, la Orn se sintetiza a partir de la Arg procedente de las proteínas alimentarias en el hígado (a través de la arginasa I) o en el enterocito (a través de la arginasa II). Durante el ayuno, al no haber Arg disponible, la síntesis de Orn se realiza en el enterocito a partir de Gln procedente del músculo, reacción



catalizada por la  $\Delta^1$ -pirolin-carboxilato sintetasa (P5CS). La deficiencia de la P5CS descrita hace relativamente poco tiempo, se caracteriza por hiperamonemia paradójica preprandial, con niveles plasmáticos disminuidos de Orn, Cit, Arg y Pro<sup>56</sup>.

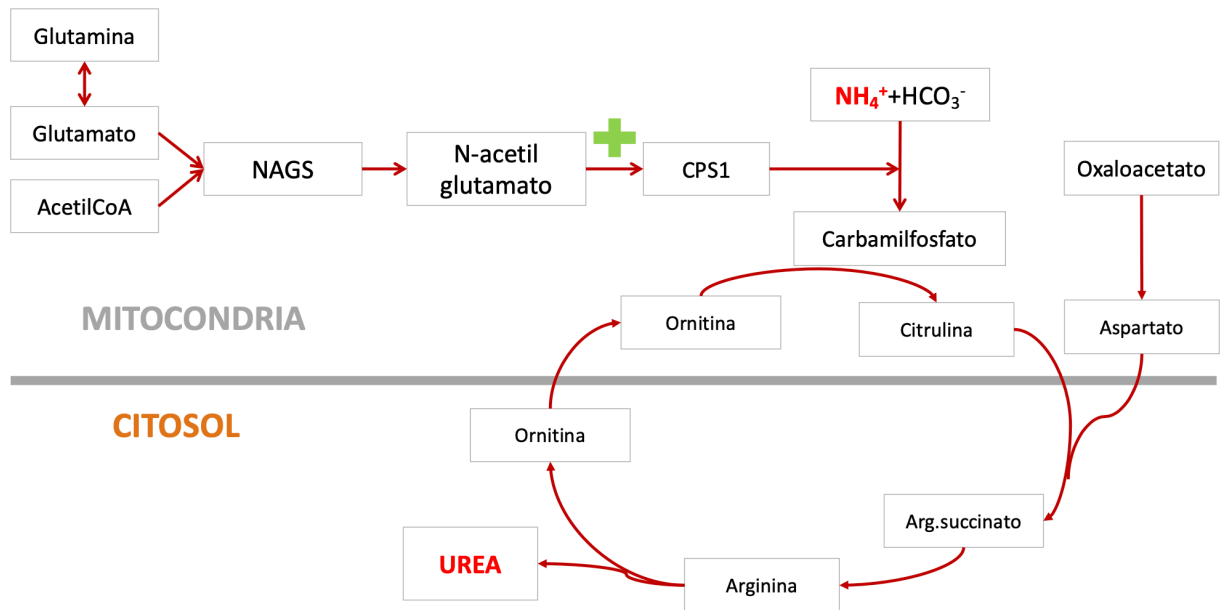


Figura 9. Ciclo de la urea. NAGS: N-acetil glutamato sintetasa, CPS1: carbamoil-fosfato sintetasa

1.

## B. Disfunción del ciclo de la urea en Acidemia propiónica

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar aparición de episodios de hiperamoniemia en los pacientes con AP y que exhiben varias características distintas a los observados en pacientes con defectos enzimáticos primarios en el ciclo de la urea (ver Figura 10).

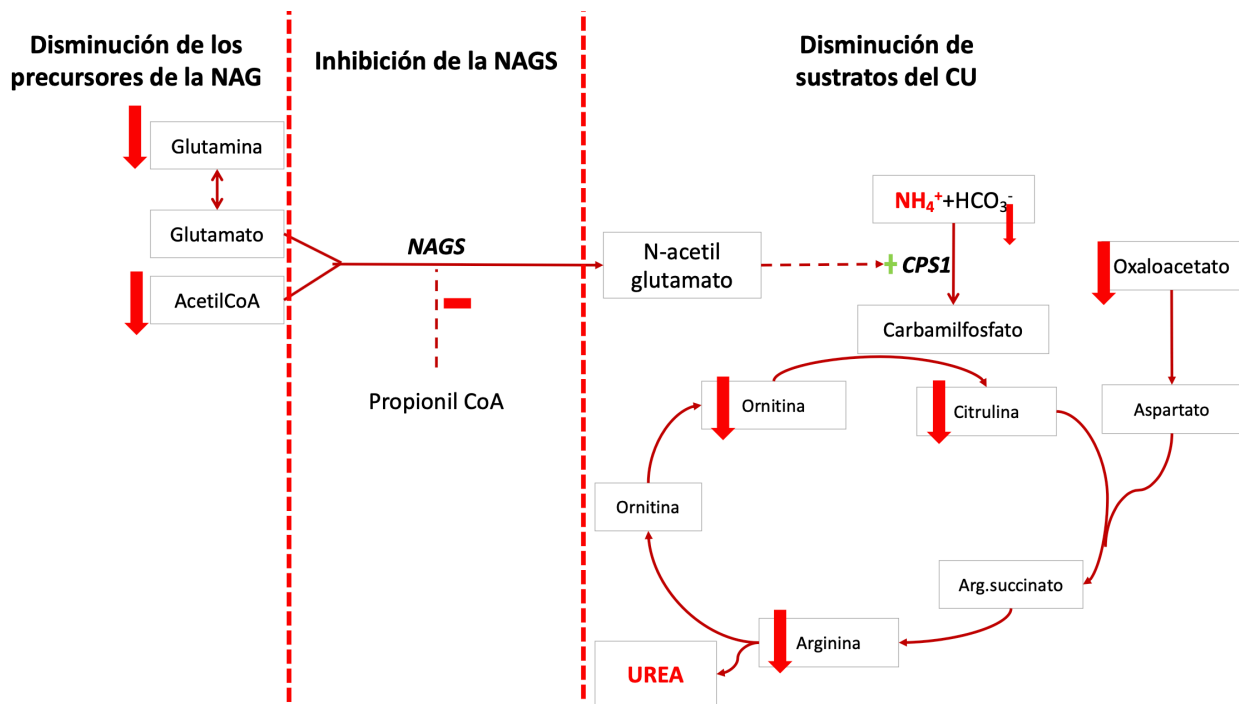


Figura 10: mecanismos propuestos para la disfunción del ciclo de la urea en AP. NAGS: N-acetil glutamato sintetasa, CPS1: carbamoil-fosfato sintetasa

- **Inhibición de la N-acetil glutamato sintetasa (NAGS)**

Los ésteres de CoA de cadena corta que se acumulan en las principales acidemias orgánicas (propionilCoA, metilmalonilCoA e isovalerilCoA) inhiben, compitiendo con el acetil CoA la NAGS<sup>55</sup>. La NAGS cataliza la formación de la N-acetil glutamato (NAG) necesario para activar la carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), enzima mitocondrial clave que pone en marcha el ciclo de la urea. Cabe destacar que, en la AP, la NAGS se inhibe también por falta de sustrato por depleción de Glu/Gln y de la acetilCoA.

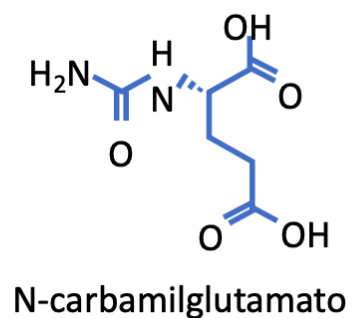
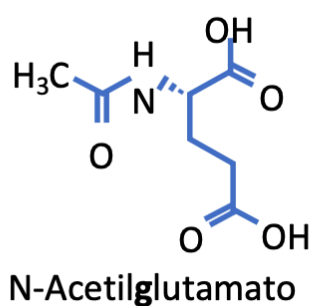


Figura 11. Estructura química del N-carbamilglutamato (NCG o ácido carglúmico)

El ácido carglúmico es un análogo estructural sintético del NAG (ver Figura 11) que acelera la detoxificación del amonio simulando el efecto del NAG sobre la CPS1 (ver Figura 12). Supone una intervención específica para el tratamiento de la hiperamoniemia en acidemias orgánicas y su eficacia corrobora la sospecha de una inhibición de la NAGS como uno de los factores principales en la etiopatogenia de la hiperamoniemia en AP. Varios estudios avalan el perfil de seguridad y la eficacia del ácido carglúmico en los episodios de hiperamoniemia aguda en AP<sup>57,58</sup>.

La dosis recomendada en la fase aguda varia entre 100-250 mg/kg/día. Actualmente hay varios ensayos en marcha para establecer la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido carglúmico en las acidemias orgánicas.

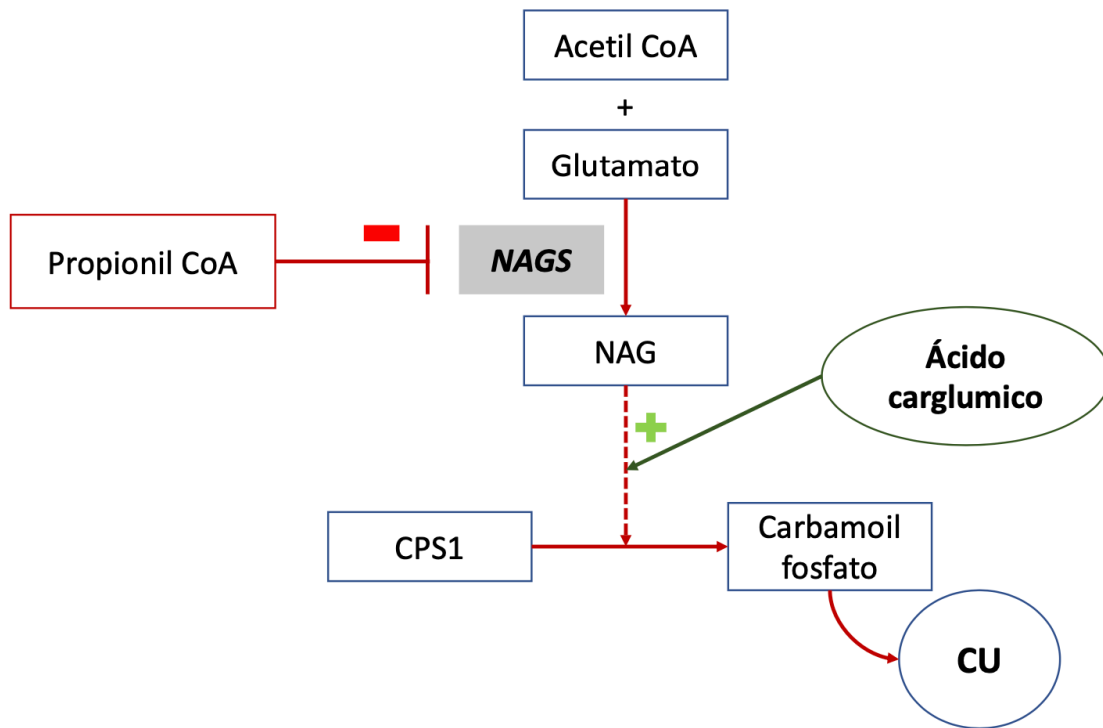


Figura 12: Mecanismo de acción del ácido carglúmico. NAGS: N-acetil glutamato sintetasa, CPS1: carbamoil-fosfato sintetasa, NAG: N-acetil glutamato, CU: ciclo de la urea. Adaptado de Valayannopoulos et al, 2016.

- **Otros mecanismos de disfunción del ciclo de la urea en acidemia propiónica**

Entre las causas de disfunción del ciclo de la urea en AP, se ha propuesto el nivel disminuido de los aminoácidos sustrato arginina (Arg), ornitina (Orn) y citrulina (Cit)<sup>37,59,60</sup>. Aunque hay pocos estudios y tienen una escasa muestra de pacientes, se han descrito niveles disminuidos de Arg, con niveles normales de Cit y Orn<sup>59</sup>. Filipowicz et al han encontrado en una muestra de 3 pacientes que los niveles de Gln/Glu durante los episodios de hiperamoniemia se relacionan con los niveles de Arg y Orn, sin correlación con la Cit<sup>37</sup>. La causa de estos hallazgos no queda clara.

### 2.3. Anaplerosis deficiente del ciclo de Krebs

La oxidación de los grupos acetilo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), también conocido como ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, implica ocho reacciones que convierten los dos átomos del acetil CoA a  $\text{CO}_2$  y regeneran los receptores de los grupos acetilo, como el oxaloacetato. El NADH y el  $\text{FADH}_2$  generados por el ciclo son a su vez utilizados por la vía de la fosforilación oxidativa para sintetizar trifosfato de adenosina (ATP). A pesar de que el CAT regenera los sustratos, hay una pérdida fisiológica de los intermediarios denominada cataplerosis que se tiene que mantener en equilibrio con el "relleno" de los metabolitos, la anaplerosis. Por lo tanto, el mantenimiento del *pool* adecuado de los intermediarios del CAT es una condición fundamental para la homeostasis celular y el metabolismo energético.

Los sustratos anapleróticos más importantes son (ver Figura 13): el piruvato, la Gln/Glu y el propionilCoA y sus precursores. En este apartado presentaremos las vías metabólicas de cada uno de los sustratos anapleróticos y los posibles mecanismos propuestos que demuestran la profunda repercusión que la deficiencia de la propionil CoA carboxilasa tiene sobre el funcionamiento del CAT.

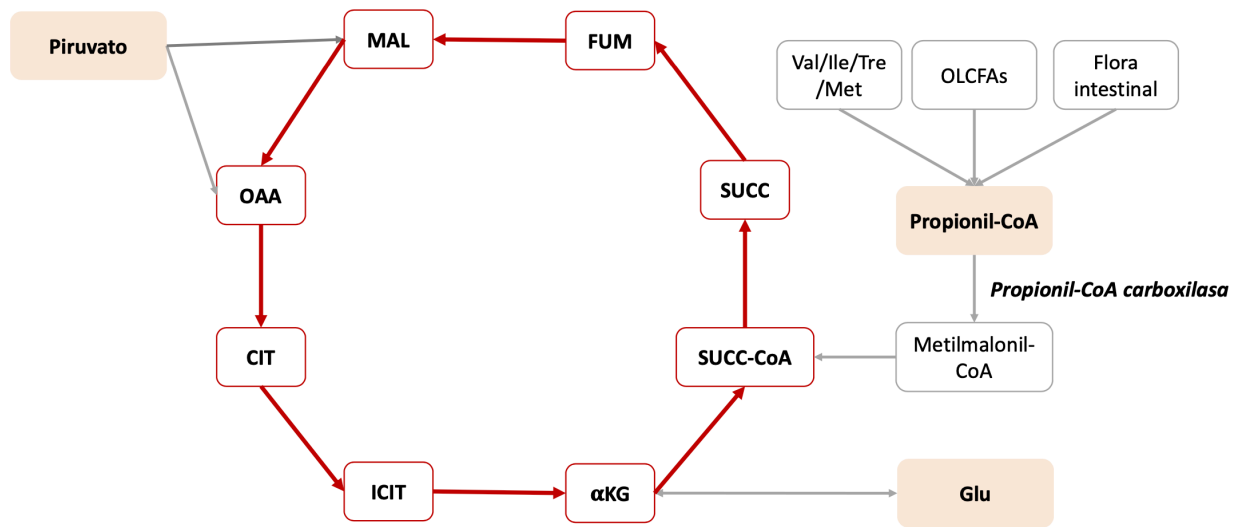


Figura 13. Sustratos anapleróticos (adaptado de Brunengraber, 2006). MAL: malato, FUM: fumarato, SUCC: succinato, SUCC-CoA: succinil CoA, αKG: α-cetoglutarato, ICIT: isocitrato, CIT: citrato, OAA: oxaloacetato, Val: valina, Ile: isoleucina, Tre: treonina, Met: metionina, OLCFAs: odd-numbered long chain fatt acids, Glu: glutamato

### Piruvato

El piruvato es anaplerótico por dos vías metabólicas: o bien a través de la piruvato carboxilasa (PC) o por las enzimas málicas<sup>61,62</sup> (ver Figura 14). Las enzimas málicas utilizan la alanina (Ala) como sustrato para la formación de piruvato. Tanto la piruvato deshidrogenasa (PDH), como la piruvato carboxilasa pueden estar inhibidas en AP<sup>63</sup>.

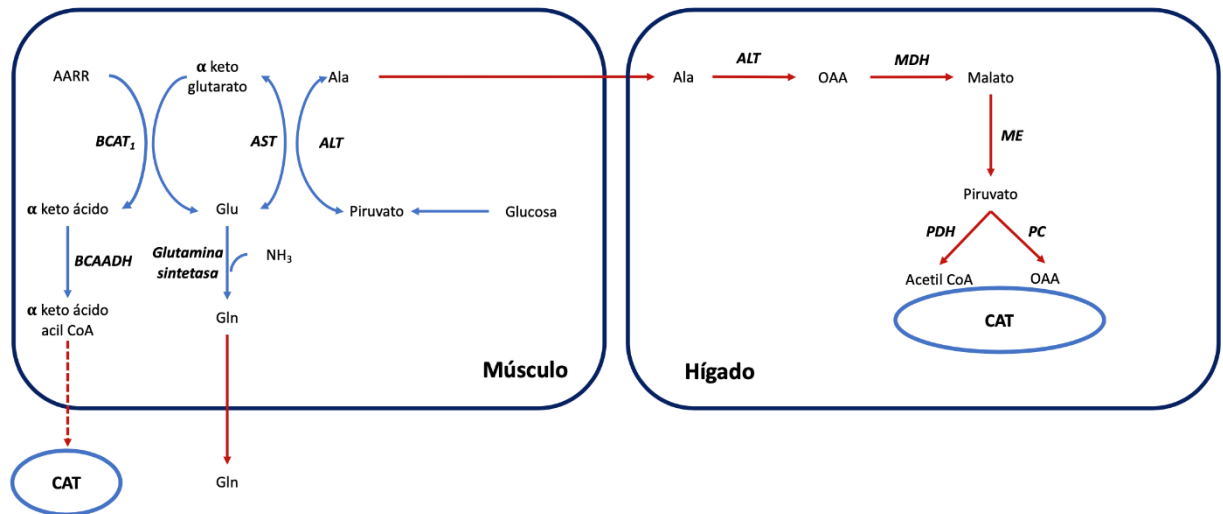


Figura 14. Anaplerosis a través de alanina y piruvato. AARR: aminoácidos ramificados, BCAT<sub>1</sub>: transaminasa de los AARR, BCAADH: deshidrogenasa de los AARR, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, OAA: oxaloacetato, MDH: malato deshidrogenasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PC: piruvato carboxilasa, ME: enzima mállica, Glu: glutamato, Gln: glutamina, CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. (Adaptado de Roe CR, 2006)

### Glutamina/Glutamato

La glutamina sintetasa (GS) cataliza la formación de Gln a partir del Glu. La GS se expresa principalmente en tres tejidos: músculo esquelético, hígado y cerebro. La síntesis de Gln depende por lo tanto de la disponibilidad de Glu, que a su vez depende del *pool* de  $\alpha$ -cetoglutarato a través de la glutamato deshidrogenasa (GDH) (ver Figura 15). Se han demostrado alteraciones de la anaplerosis a partir del sustrato Gln/Glu en otros errores innatos de metabolismo. Por ejemplo, en pacientes con deficiencia de piruvato carboxilasa hay una disminución significativa de los



niveles de Gln en plasma y líquido cefaloraquídeo (LCR) y el funcionamiento del CAT está alterado por déficit de oxaloacetato, a su vez fuente de  $\alpha$ -cetoglutarato; con el tratamiento anaplerótico, los niveles de Gln tienden a normalizarse en estos pacientes<sup>64</sup>. Por otro lado, los niveles plasmáticos de lisina (Lys) están aumentados en muchos pacientes con episodios de hiperamoniemia (trastornos del ciclo de la urea, deficiencia de la piruvato carboxilasa, AP y acidemia metilmalónica). Este último hallazgo sugiere una deficiencia en la vía de síntesis de sacaropinas por falta del sustrato  $\alpha$ -ketoglutarato<sup>37,59</sup>.

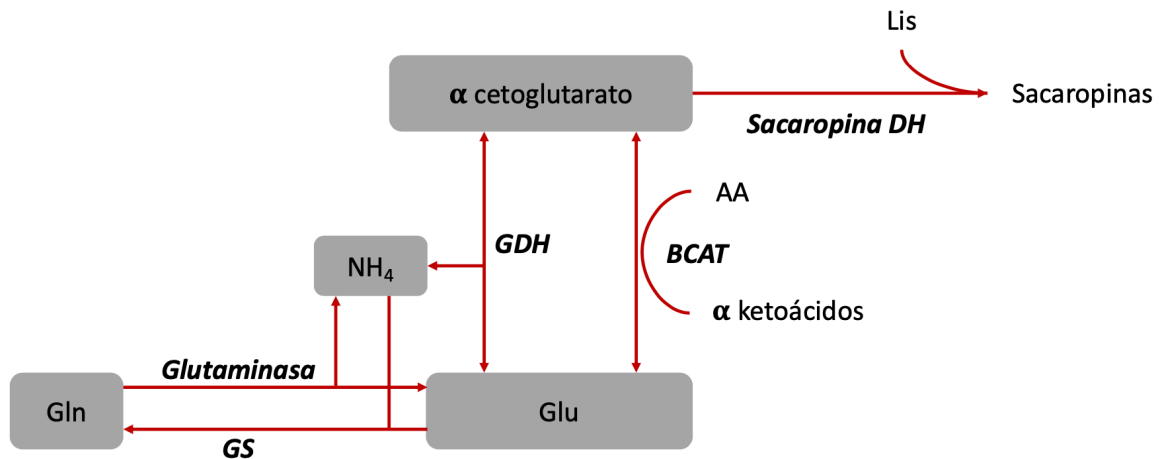


Figura 15. Glu/Gln como sustratos anapleróticos (adaptado de Häberle, 2015). Glu: glutamato, Gln: Glutamina, GS: glutamina sintetasa, GDH: glutamato deshidrogenasa, sacaropina DH: sacaropina deshidrogenasa, Lis: lisina, BCAT: transaminasas de los aminoácidos ramificados.

En la AP, la disminución del *pool* de  $\alpha$ -cetoglutarato podría ser uno de los mecanismos principales de anaplerosis deficiente<sup>65</sup>. Las causas de la disminución del  $\alpha$ -cetoglutarato no están todavía aclaradas, proponiéndose las siguientes hipótesis:

- Baja disponibilidad de los aminoácidos ramificados en el músculo esquelético, con disminución de las reacciones de transaminación.
- Disminución de los niveles de succinil CoA secundarios a la deficiencia de la propionilCoA.
- Deficiencia de oxaloacetato por su unión con el ácido propiónico para formar el metilcitrato.

#### Propionil CoA

El propionil CoA sintetizado a través de los aminoácidos propiogénicos (Val, Ile, Met, Tre) es anaplerótica por la formación de succinil CoA a través del metilmalonil CoA y tiene una especial importancia sobre todo para el músculo cardiaco<sup>61</sup>.

En los pacientes con AP varias vías metabólicas convergen para explicar la anaplerosis deficiente (ver Figura 16):

- El exceso de propionil CoA secundario a la deficiencia de propionilCoA carboxilasa se une con el oxaloacetato para formar metilcitrato, uno de los metabolitos más tóxicos.
- Deficiencia directa de succinil CoA por falta de metilmalonilCoA
- Depleción de oxaloacetato por la deficiencia de succinil CoA y por su unión con el propionil CoA para formar metil citrato.

- Depleción de  $\alpha$ -cetoglutarato por los mecanismos descritos anteriormente y por la probable deficiencia de aminoácidos ramificados, sus “compañeros” en las reacciones de transaminación.

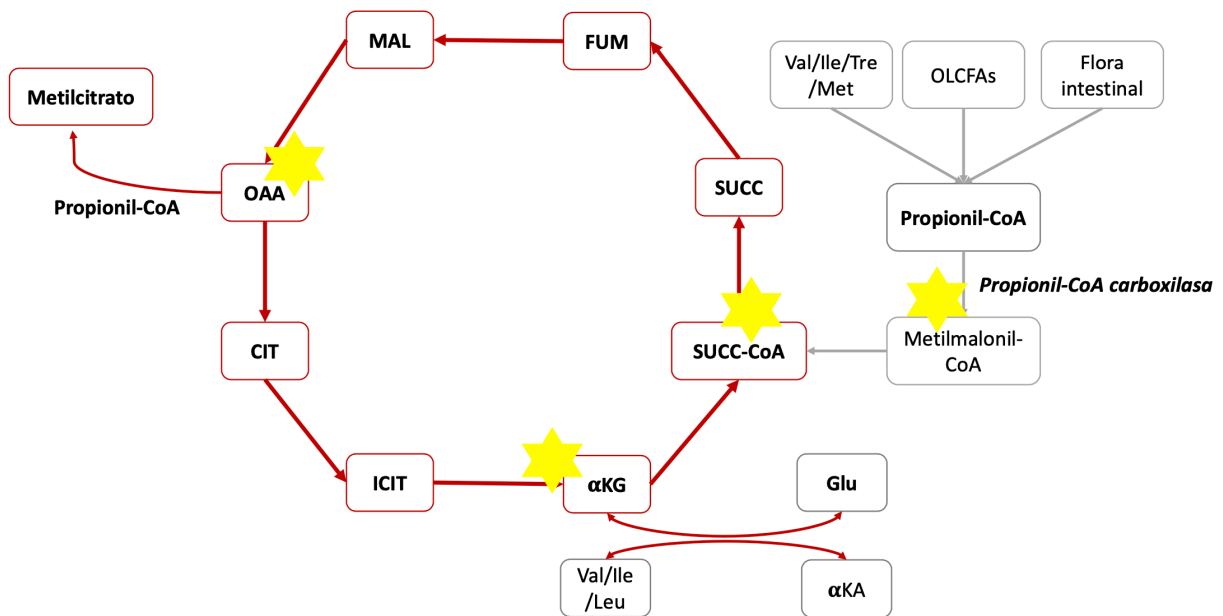


Figura 16. Anaplerosis a través del metabolismo del propionil-CoA (adaptado de Brunengraber, 2006). Las estrellas señalan los puntos en los que se altera la anaplerosis en la AP. MAL: malato, FUM: fumarato, SUCC: succinato, SUCC-CoA: succinil CoA,  $\alpha$ KG:  $\alpha$ -cetoglutarato, ICIT: isocitrato, CIT: citrato, OAA: oxaloacetato, Val: valina, Ile: isoleucina, Tre: treonina, Met: metionina, OLCFAs: odd-numbered long chain fatty acids, Glu: glutamato,  $\alpha$ KA:  $\alpha$ -cetoácidos

Hemos demostrado la profunda disfunción de anaplerosis en los pacientes con AP a todos los niveles. El mal funcionamiento del CAT puede provocar una disfunción mitocondrial secundaria por falta de síntesis de los compuestos NADH y FADH<sub>2</sub>. Estos hallazgos pueden estar implicados en la fisiopatología de las complicaciones a largo plazo en los pacientes con AP. Sin embargo, es muy difícil demostrar la disfunción de la anaplerosis *in vivo*, puesto que los compuestos pueden tener concentraciones intracelulares muy distintas de las que podemos objetivar en los líquidos que nos son accesibles para su estudio (plasma, orina o líquido cefalorraquídeo). A pesar de que, en este momento, la terapia con sustratos anapleróticos no ha demostrado un claro beneficio<sup>65</sup>, es importante entender la fisiopatología de la deficiencia de propionil CoA carboxilasa para poder ofrecer a los pacientes nuevas opciones terapéuticas<sup>62</sup>.

## 2.4. Disfunción mitocondrial en acidemia propiónica

La mayoría de los pacientes con AP debutan en el periodo neonatal y presentan descompensaciones metabólicas agudas desencadenadas principalmente por situaciones clínicas de aumento del catabolismo (infecciones, ayuno prolongado etc). Las descompensaciones agudas se deben a un cuadro tipo "intoxicación" y se caracterizan por hipoglucemia, cetosis, hiperlactacidemia, hiperamonemia y fallo multiorgánico<sup>5</sup> que pueden explicarse por los mecanismos fisiopatológicos descritos anteriormente pero que también sugieren un posible mecanismo de fallo mitocondrial<sup>66</sup>.

Además de las descompensaciones agudas, los pacientes con AP presentan una serie de complicaciones crónicas, que no siempre se pueden atribuir a secuelas de las descompensaciones y que pueden aparecer incluso en los sujetos con buen control metabólico. La patogenia de estas complicaciones crónicas no está completamente elucidada, pero se propone la disfunción mitocondrial secundaria como posible mecanismo<sup>3</sup>. Las complicaciones crónicas afectan distintos órganos con alta demanda energética: sistema nervioso central (encefalopatía, movimientos anómalos, epilepsia, retraso psico-motor, ataxia, afectación de ganglios basales similar al síndrome de Leigh, atrofia del nervio óptico), corazón (cardiomiopatía dilatada, arritmias), musculo esquelético (miopatía), medula ósea (aplasia medular, citopenias), tracto gastro-intestinal (pancreatitis, hepatitis) etc<sup>2</sup>. Gracias a las mejoras en el manejo de las descompensaciones, a día de hoy las complicaciones a largo plazo son las que marcan el pronóstico del paciente, aumentando la morbi-mortalidad. La aparición de estas complicaciones

crónicas en los pacientes con buen control metabólico apoya una hipótesis alternativa a la teoría clásica de la “intoxicación”.

Una de las hipótesis que más relevancia ha cobrado últimamente en la fisiopatología de la AP se refiere al fallo energético celular por disfunción mitocondrial secundaria. Los pacientes con AP comparten rasgos clínico-metabólicos con las enfermedades mitocondriales<sup>3</sup>. Las alteraciones neurológicas incluyen afectación de los ganglios basales, y pueden tener picos de lactato objetivados mediante espectroscopia similar a los observados en los pacientes con síndrome de Leigh<sup>67</sup>. La cardiomiopatía, otra complicación muy frecuente en AP, está presente en casi todos los defectos de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>68</sup>. La atrofia óptica de los pacientes con AP comparte rasgos clínicos y patológicos con la neuropatía hereditaria óptica de Leber<sup>69,70</sup>.

Dado el escaso número de pacientes y las enormes dificultades técnicas y éticas para conseguir muestras de tejidos (músculo, hígado, etc) para valorar la función mitocondrial hay pocos estudios de estas características en los pacientes con AP. La disfunción mitocondrial en AP se ha estudiado con más frecuencia como alteración de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Las publicaciones hasta la fecha incluyen las siguientes:

- De Keyzer et al describen una importante deficiencia de las enzimas OXPHOS en músculo esquelético, corazón e hígado de los pacientes con AP<sup>71</sup>. Los autores objetivaron deficiencias de los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en muestras de hígado, músculo esquelético y cardiaco, sin alteraciones en fibroblastos o células sanguíneas mononucleares; este estudio no objetivó disminución de las enzimas del CAT.

Además, en uno de los pacientes encontraron una disminución del 50% del ADN mitocondrial (mtDNA).

- Schwab et al demuestra la inhibición no competitiva *in vivo* de la PDH por el propionil CoA en un purificado porcino, con un efecto similar al acetil CoA, su sustrato natural<sup>72</sup>. Demuestran además una disminución de la actividad de los complejos I-IV de la cadena respiratoria mitocondrial en muestras de músculo esquelético de dos pacientes con PA. Adicionalmente, el análisis histopatológico del musculo objetiva múltiples alteraciones morfológicas mitocondriales (inclusiones lipídicas y cristalinas, aumento de volumen mitocondrial), junto con una disminución importante del 50% en el mtDNA. También objetivan una inhibición de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, enzima limitante del ciclo de Krebs.
- Gallego-Villar et al presentan alteraciones del metabolismo energético y redox *in vivo* en distintos tejidos de ratones con AP<sup>73</sup>. Se objetiva disminución de la actividad del complejo III en músculo y cerebro de los ratones (decilubiquinol-citocrom C oxidoreductase) y del complejo I (NADH-decilubiquinone oxidoreductase) en el músculo cardiaco. La depleción del mtDNA se objetiva en todos los tejidos menos el hígado.
- La disfunción mitocondrial en AP se ha puesta de manifiesto también en varios estudios en pacientes con cardiomiopatía, complicación crónica que aparece en hasta un 23% en algunas series<sup>74</sup>. A pesar de que en la inmensa mayoría de los casos se trata de cardiomiopatía dilatada, se describen también pacientes con cardiomiopatía hipertrófica. Mardach et al presenta el caso de una niña con AP y buen control metabólico que presenta una forma rápidamente fatal de cardiomiopatía hipertrófica<sup>75</sup>. En la autopsia,

objetivan una disminución de los niveles cardiacos y musculares de carnitina, además de una ausencia de actividad de la NADH citocrom C oxidasa (complejo I + III de la cadena respiratoria mitocondrial). En otro artículo, Fragaki et al describen el caso de un paciente AP con una cardiomiopatía dilatada rápidamente progresiva y desenlace fatal en el que estudian muestras de hígado y músculo esquelético; objetivan una disminución marcada de los complejos I, III y V en músculo y de los complejos I, I+III y II+III en el hígado. La actividad de los complejos II+III se restableció a niveles óptimos al añadir ubiquinona exógena, lo que sugiere una deficiencia de CoQ10<sup>76</sup>. Los autores no describen sin embargo alteraciones del mtDNA y tampoco cuantifican los niveles de CoQ10 en los tejidos dada la escasa muestra de que disponen. La deficiencia de los complejos I+III y II+III es altamente sugestiva de deficiencia de CoQ10, lo que se confirma por la normalización de la actividad de estos complejos al añadir ubiquinona exógena<sup>77</sup>.

- Baruteau et al presentan en un trabajo reciente dos hermanos con PA que desarrollan cardiomiopatía dilatada y en los que encuentran evidencias de niveles disminuidos de CoQ10 en el músculo cardiaco tras biopsia y en células periféricas mononucleares<sup>78</sup>. En ambos casos el cuadro fue reversible con dosis altas de CoQ10 (hasta 25 mg/kg/día). En uno de ellos describen importantes alteraciones mitocondriales estructurales en la biopsia miocárdica como aumento de tamaño o inclusiones de cristales atípicos junto con niveles muy disminuidos de CoQ10 y disminución de complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.



Los mecanismos propuestos para explicar la probable la disfunción mitocondrial secundaria en AP pueden resumirse en los siguientes puntos (ver Figura 17):

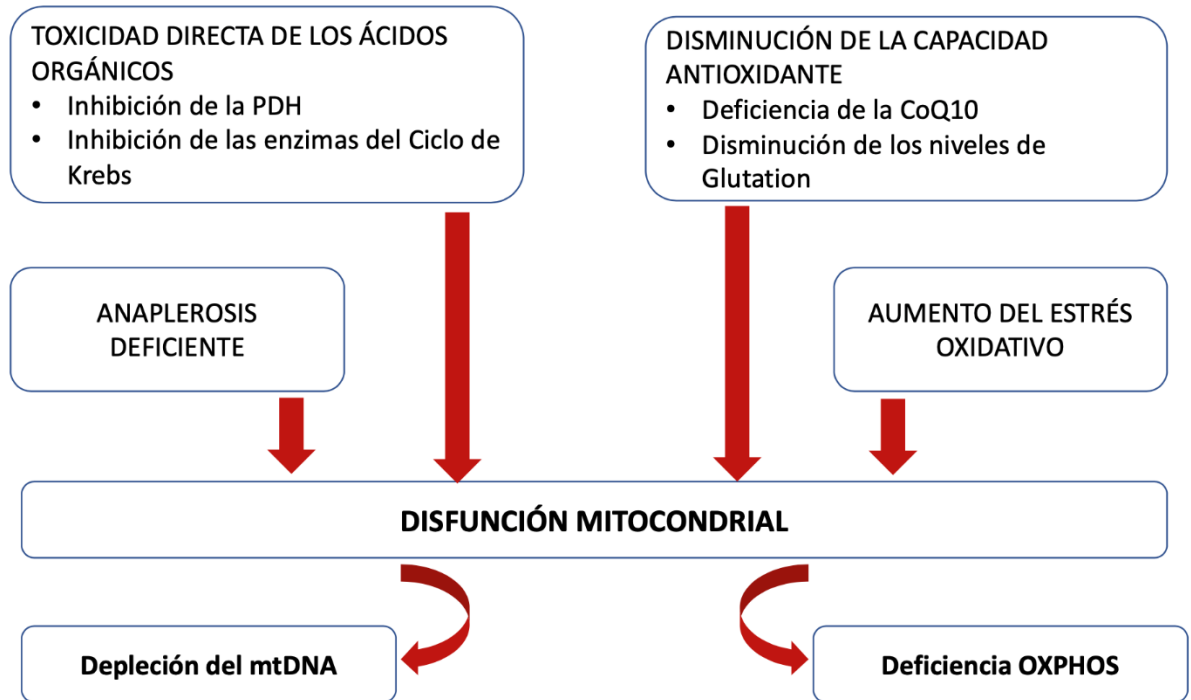


Figura 17. Propuesta de mecanismos para la disfunción mitocondrial secundaria en Acidemia propiónica

- a) Toxicidad directa de algunos metabolitos específicos, como el propionil CoA, 3 hidroxipropionico o el metilcitrato sobre las enzimas del aparato energético celular.

- b) Anaplerosis deficiente. El CAT es proveedor de NADH y FADH<sub>2</sub> para la fosforilación oxidativa y la formación de ATP. La anaplerosis deficiente provoca una disfunción del CAT que influye directamente en la producción de ATP mitocondrial.
- c) Aumento de las especies reactivas de oxígeno y disminución de la capacidad antioxidativa.
- d) Deficiencia de antioxidantes:
  - Déficit de CoQ10
  - Déficit de glutatión secundario a dieta restringida en metionina

A) Toxicidad directa sobre el aparato energético celular

Varios estudios han demostrado la inhibición directa de la piruvato deshidrogenasa (PDH) por el propionil CoA. En hongos y bacterias se ha objetivado la toxicidad del propionato sobre el crecimiento celular, con múltiples utilidades en la industria alimentaria. En *Aspergillus nidulans*, Brock y Buckel demuestran que el mecanismo antifúngico del propionato se debe a una importante inhibición de la PDH por el propionil CoA<sup>63</sup>; el propionil CoA inhibe también de manera secundaria otras enzimas CoA dependientes como la succinil CoA sintetasa y la ATP citrato liasa. El *A. nidulans* dispone, a diferencia de las células humanas, de un aparato enzimático especial (ciclo del ácido metilcátrico) que transforma el propionato en succinato y piruvato vía metilcitrato (que se forma por la condensación de propionil CoA con oxaloacetato); las cepas de *A. nidulans* con alteraciones en el ciclo del metilcitrato (deficiencia en metilcitrato sintetasa) son más sensibles a la acción tóxica del propionato<sup>63</sup>. A pesar de las diferencias en las vías metabólicas del propionato (metabolismo vía metilmalónico en células humanas versus ciclo del metilcitrato

en los hongos), la fuerte inhibición de la PDH demostrada por los autores puede cobrar una relevancia especial en la fisiopatología de la disfunción mitocondrial en pacientes con AP. La PDH es una enzima crucial en el metabolismo energético que conecta la glicolisis con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la OXPHOS. No es sorprendente, por lo tanto, que la deficiencia primaria de la PDH resulta en un cuadro clínico que cursa con un severo fallo energético y desenlace fatal. De manera similar, podemos deducir que la inhibición secundaria de la PDH por el propionil CoA produce alteraciones en la síntesis de ATP celular<sup>72</sup>.

Otros estudios que apoyan estos hallazgos se han desarrollado en bacterias como *Rodopseudomonas sphaeroides*; el mecanismo que se propone es la inhibición competitiva con la CoASH de la PDH<sup>79</sup>. Igualmente, en estudios más antiguos realizados en hepatocitos de ratón, se ha demostrado la inhibición de la PDH por el propionil CoA, por el efecto competitivo con el CoASH<sup>80</sup>.

Además del ácido propiónico, otros autores demuestran la toxicidad del metilcitrato. En cepas de *Salmonella entérica* expuestas a niveles altos de propionato, Horswill et al identifican el metilcitrato como el principal inhibidor del crecimiento celular<sup>81</sup>. Estudios más antiguos, también apuntan en la toxicidad directa del metilcitrato sobre varias enzimas del CAT, como la aconitasa, citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, PDH entre otras<sup>82</sup>.

## B) Anaplerosis deficiente

En el caso de la AP, el grave disfuncionamiento en el CAT, tanto por la anaplerosis deficiente<sup>65</sup>, como por inhibición directa de las enzimas integrantes<sup>3</sup>, implica una importante deficiencia en la homeostasis mitocondrial observada en las muestras de tejidos, como alteraciones morfológicas mitocondriales (aumento de volumen, inclusiones de cristales anómalos) y disminución de la actividad de los complejos integrantes de la cadena respiratoria<sup>71,72</sup>.

Varios de estos autores han descrito depleción de mtDNA en biopsias de músculo o hígado de pacientes con AP<sup>71,72</sup>, cuyo mecanismo no está completamente aclarado. El síndrome de depleción del ADN mitocondrial es un defecto cuantitativo del mtDNA secundario a la disfunción de los factores nucleares responsables del mantenimiento del pool mitocondrial de deoxiribonucleosido trifosfato (dNTP) necesario para la replicación del mtDNA. La disminución marcada de la actividad de la succinil CoA sintetasa secundaria a mutaciones en el gen SUCLA2 es responsable de un cuadro clínico grave de encefalomiopatía y depleción del mtDNA<sup>83</sup>. En este trabajo, los autores estudian también la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y encuentran disminución significativa de los complejos I y IV, mientras que la actividad de los complejos III y V está menos afectada; la actividad del complejo II, el único que no depende del mtDNA estaba dentro de la normalidad. En otro trabajo en hongos, Chen et al demuestran el papel de la aconitasa, otra enzima del CAT, en la regulación y mantenimiento del mtDNA<sup>84</sup>. Tanto la aconitasa como la succinil CoA sintetasa son enzimas esenciales en el funcionamiento del CAT e intervienen en el mantenimiento del mtDNA independiente de la actividad catalítica que

ejercen en el ciclo de Krebs, a través de factores reguladores de la homeostasis de los nucleótidos como la enzima nucleosido difosfato kinasa (NDPK)<sup>83</sup>. Se demuestra de esta manera otra vía en la que las enzimas del CAT intervienen en la homeostasis mitocondrial, más allá de la formación de NADH y FADH<sub>2</sub> como donantes de electrones para la cadena respiratoria mitocondrial.

### C) Aumento del estrés oxidativo

Cada vez más evidencias relacionan la fisiopatología de los errores innatos de metabolismo (EIM) con alteraciones del estrés oxidativo, incluyendo las acidemias orgánicas, homocistinuria, fenilcetonuria o trastornos de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial<sup>85</sup>. Para varios EIM se han propuesto las alteraciones redox como parte de los mecanismos para explicar la aparición de las complicaciones a largo plazo, que aparecen en órganos con alta demanda energética como el sistema nervioso central o el músculo cardíaco<sup>3</sup>. En el caso concreto de la AP, la toxicidad directa de los ácidos orgánicos productos del metabolismo alterativo del propionato sobre el aparato energético celular y la anaplerosis deficiente resultaría en una disfunción mitocondrial secundaria que provoca el aumento de las especies reactivas de oxígeno, disminución de la producción de ATP y de la capacidad antioxidativa, con aumento del estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas u átomos con electrones libres en sus orbitales, lo que les hace extremadamente reactivas con otras macromoléculas como las proteínas, los lípidos o el ADN. Los radicales libres se forman en la mitocondria por la fuga de los electrones de la cadena respiratoria, como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que se convierte en peróxido de

hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa (MnSOD). El  $H_2O_2$  en presencia de metales como el hierro, cobre o manganeso se convierte en el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), uno de los más potentes ERO *in vivo*. Otras especies reactivas que se forman de manera fisiológica en la célula son el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $ONOO^\cdot$ ). Las ERO o radicales libres son productos normales de metabolismo y son necesarios en cierta cantidad para mantener la homeostasis. Sin embargo, cuando se producen en exceso, el estrés oxidativo puede provocar un daño irreversible en la estructura y funcionamiento de la célula e induce la apoptosis.

Se han descrito alteraciones redox y disminución de la capacidad antioxidante en un gran número de EIM<sup>85</sup>; entre ellas, los defectos del metabolismo de la cobalamina, la AP y los defectos del ciclo de la urea son los trastornos que más parámetros de estrés oxidativo expresan en orina, junto con la disminución de la capacidad antioxidante<sup>49</sup>. Los que de forma más relevante se centran en AP son:

- Dos publicaciones que analizan el aumento de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con EIM, se ha demostrado el aumento en orina de F-2 isoprostano y di-tirosina, como datos peroxidación de lípidos y proteínas, respectivamente<sup>49,86</sup>. Hay un aumento de los marcadores de estrés oxidativo y disminución de la capacidad antioxidante en pacientes con IEM, sobre todo en trastornos metabólicos de la cobalamina y acidemia propiónica. También relacionan el estrés oxidativo con un peor control metabólico en los pacientes con AP, valorado por los niveles de glicina  $>800 \mu M$ , con mayores niveles de isoprostano en orina<sup>49</sup>.
- Varios trabajos han estudiado los efectos del ácido propiónico sobre la producción de las ERO. Se ha demostrado que el ácido propiónico aumenta la producción de superóxido ( $O^\cdot$

) en presencia de los activadores de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en neutrófilos<sup>87</sup>. Inyectado en el núcleo estriado de los ratones, el ácido propiónico induce convulsiones mediante el receptor NMDA y aumenta la carbonilación de las proteínas considerado un marcador de estrés oxidativo proteico<sup>88</sup>. Además, los ácidos propiónico y metilmalónico aumentan la peroxidación de los lípidos en el cerebro de los ratones<sup>89</sup>.

Probablemente las publicaciones más recientes y específicas con respecto a acidemia propiónica son las realizadas por el grupo del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares con el que colaboramos:

- En un primer trabajo demuestran en una serie de pacientes con AP aumento de los niveles de ERO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en fibroblastos y de la apoptosis celular cuantificada por el porcentaje de las células anexin-V positivas<sup>90</sup>. Los autores analizaron también la actividad de dos proteínas de la familia MAPK, la p38 y la JNK implicadas en la respuesta celular al estrés a través de la modulación de los factores de transcripción; los resultados objetivaron un aumento importante en la actividad de la p38 y leve-moderado de la JNK, lo que sugiere la posible implicación del daño por estrés oxidativo en la fisiopatología de la AP.
- Los mismos autores demuestran la disminución de los niveles de ERO en fibroblastos de pacientes con AP tratados con varios antioxidantes (Tiron, MitoQ, trolox y resveratrol), lo que puede tener importantes implicaciones terapéuticas<sup>91</sup>.
- De nuevo, Gallego-Villar et al. presentan los hallazgos sobre el metabolismo energético y redox en distintos tejidos de ratones con AP<sup>73</sup>. Se objetiva disminución de la actividad del complejo III en músculo y cerebro de los ratones (decilubiquinol-citocrom C

oxidoreductase) y del complejo I (NADH-decilubiquinone oxidoreductase) en el músculo cardiaco. La depleción del mtDNA se objetiva en todos los tejidos menos el hígado. En relación con el estrés oxidativo *in vivo*, los autores demuestran un aumento en la producción de  $O^{\cdot -}$  y de la  $H_2O_2$  reflejado en la relación MitoP/MitoB en el hígado de los ratones con AP.

#### D) Disminución de la capacidad antioxidante: papel de la coenzima Q10 (CoQ10)

Se han descrito niveles disminuidos de CoQ10 en plasma o fibroblatos también en otros EIM:

- Se ha reportado una disminución de los niveles plasmáticos de CoQ10 de pacientes con EIM, especialmente en fenilcetonuria y enfermedades de depósito lisosomal<sup>92</sup>. Los autores resaltan un posible beneficio en prevenir el déficit crónico en pacientes con EIM y niveles disminuidos de CoQ10 en plasma.
- En otro trabajo reciente, Yubero et al analizan los niveles de CoQ10 en fibroblastos y músculo de pacientes con trastornos OXPHOS y nonOXPHOS (incluyen un grupo heterogéneo de otras enfermedades metabólicas como los defectos de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, enfermedades de depósito lisosomal etc) y encuentran hasta un 50% de pacientes con niveles disminuidos, sin diferencia estadística entre los dos grupos<sup>93</sup>.
- Haas et al describen niveles disminuidos de CoQ10 en fibroblastos de pacientes con acidemia metilmalónica<sup>94</sup>, enfermedad muy relacionada en su fisiopatología con la AP.



En cuanto a los estudios para demostrar una deficiencia de CoQ10 en pacientes con AP y el posible beneficio de su suplementación, son escasos pero relevantes. Varios trabajos en pacientes con AP y cardiomiopatía han puesto de manifiesto deficiencias de CoQ10 y de los complejos I+III y II+III de la cadena respiratoria mitocondrial dependientes de ubiquinona en biopsias musculares, hepáticas o cardíacas; en pacientes AP con formas graves de cardiomiopatía dilatada, el tratamiento con CoQ10 ha demostrado resultados beneficiosos. Baruteau et al describen dos pacientes con AP y cardiomiopatía dilatada reversible tras el tratamiento con dosis altas de CoQ10 hasta 25 mg/kg/día; anteriormente, con dosis más bajas de 1,5 mg/kg/día no se había objetivado respuesta<sup>78</sup>. Fragaki et al describen en muestras de hígado y músculo esquelético de un paciente con AP y cardiomiopatía dilatada deficiencia múltiple de OXPHOS y CoQ10; los autores objetivan disminución significativa de la actividad de los complejos I+III y II+III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo e hígado, con normalización al añadir ubiquinona exógena, lo que sugiere una deficiencia de CoQ10<sup>76</sup>.

La atrofia óptica es otra de las complicaciones a largo plazo cuyo mecanismo posible es una disfunción mitocondrial y disminución de la capacidad antioxidante, al compartir rasgos clínicos y patológicos con la neuropatía hereditaria óptica de Leber<sup>69,70</sup>: pérdida relativamente simétrica de la agudeza visual, pérdida precoz de la visión del color, defectos visuales centrocecales, palidez temporal de los discos ópticos y pérdida preferencial de las fibras papilomaculares de la capa retiniana del nervio óptico<sup>95</sup>. La atrofia óptica se ha descrito tanto en pacientes con AP, como en casos con acidemia metilmalónica (AMM). Hay varios trabajos que describen pacientes con AP o AMM y atrofia de nervio óptico que han recibido tratamiento con CoQ10, con dosis variables y resultados inconstantes. Pinar-Sueiro et al describen un paciente

con AMM y atrofia de nervio óptico diagnosticado a los 15 años que recibe tratamiento con CoQ10 (200mg/día) y vitamina E (200mg/día) con buenos resultados<sup>96</sup>. Sin embargo, otros autores reportan ausencia de beneficio en otros dos pacientes con AMM con dosis de CoQ10 entre 60-180 mg/día <sup>70,97</sup>.

### **Biosíntesis y funciones fisiológicas de la CoQ10**

Desde su descripción en los años '50, se han descrito distintas funciones fisiológicas de la CoQ10:

- Participa en la síntesis de ATP, transportando electrones entre los complejos I-II-III de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Es un antioxidante liposoluble altamente eficaz que previene la oxidación de los lípidos, proteínas y del ADN. La explicación del fuerte y eficaz efecto antioxidante de la CoQ10 se debe a varios factores. Su localización intramembranaria cobra una especial relevancia, dado que las especies reactivas de oxígeno generadas en la membrana celular reaccionan con los lípidos y las proteínas que se encuentran en su composición. Por eso, a diferencia de otros antioxidantes, la CoQ10 inhibe tanto el inicio, como la propagación de la oxidación lipo-proteica membranaria<sup>98</sup>. Además de su efecto directo, se ha demostrado que el ubiquinol, la forma reducida de CoQ10, participa en el reciclaje de  $\alpha$ -tocoferol, la forma más activa de vitamina E, potenciando el efecto antioxidante de la misma<sup>98</sup>.
- La membrana plasmática contiene una NADH-oxidasa CoQ10 dependiente que regula la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y los niveles del ácido ascórbico en el citosol, con implicaciones en el crecimiento y diferenciación celular<sup>99</sup>.

- Regula la permeabilidad mitocondrial, contrarrestando eventos implicados en la apoptosis celular como la depleción del ATP, activación de la caspasa-9, liberación del citocromo C en el citosol o la fragmentación del ADN, entre otros<sup>100</sup>.
- Tiene efectos antiinflamatorios en varios tejidos a través de la regulación de genes dependientes de NFkB1<sup>101</sup>.
- Tiene un efecto protector cardio-vascular: disminuye el efecto aterosclerótico al prevenir la oxidación de las partículas LDL<sup>102</sup> y regula la disfunción endotelial a través de la liberación de óxido nítrico<sup>103</sup>.

Determinadas condiciones pueden provocar una disminución de la síntesis de CoQ10, lo que resulta en disminución de los niveles plasmáticos y alteraciones en su función<sup>98</sup>. La síntesis celular de la CoQ10 se realiza a través de la vía del mevalonato. Esta vía produce farnesil-PP a partir del acetyl CoA, que más adelante servirá para la síntesis de varios lípidos como el colesterol o la CoQ10. La enzima HMG CoA reductasa es una enzima regulatoria clave en la vía del mevalonato. Las estatinas, unos de los fármacos más utilizados actualmente, inhiben la HMG CoA reductasa y disminuyen así los niveles plasmáticos del colesterol. La disminución de la síntesis de otros lípidos de la vía del mevalonato aparte del colesterol se ha propuesto como principal hipótesis para los efectos adversos observados en los pacientes en tratamiento con estatinas. En concreto, la deficiencia muscular de la CoQ10 podría ser responsable de la miopatía asociada a las estatinas. Sin embargo, estudios en pacientes no han demostrado una reducción en los niveles musculares de CoQ10 durante el tratamiento con estatinas<sup>104</sup>, aunque podría haber una relación dosis-efecto que merecería ser estudiada en series más largas<sup>105</sup>. Varios estudios recientes sí han objetivado disminución de los niveles plasmáticos de CoQ10 en pacientes en tratamiento con

inhibidores de HMG CoA reductasa<sup>106</sup>, pero su significación no está del todo aclarada y parece que no se debe a un problema de síntesis sino a la disminución de los niveles de LDL, dado que la CoQ10 es transportada en plasma en las partículas LDL, HDL o VLDL+IDL<sup>107</sup>.

En cuanto al tratamiento, la suplementación con ubiquinona en pacientes con EIM ha demostrado un claro beneficio en el caso de las deficiencias primaria de CoQ10<sup>108</sup>. En otras enfermedades mitocondriales distintas a la deficiencia primaria de CoQ10, por ejemplo, no se ha demostrado ningún beneficio claro con la suplementación. El músculo cardiaco parece especialmente sensible los niveles de CoQ10. La CoQ10 en su forma oxidada (ubiquinona) y reducida (ubiquinol) mejora la función diastólica en niños con cardiomiopatía dilatada en un estudio placebo-control<sup>109</sup>.

En AP y como se ha descrito previamente, algunos trabajos describen un beneficio del tratamiento en pacientes con cardiopatía o atrofia óptica<sup>71,76,78,96</sup>.

### **Efectividad y biodisponibilidad de las distintas formas de presentación de la CoQ10**

Es posible que las diferencias en cuanto a su efectividad se deban a las diferentes formas de presentación del CoQ10, lo que implica importantes variaciones en su biodisponibilidad. Un 95% de la CoQ10 plasmática se encuentra en forma reducida de ubiquinol. El hígado libera en la circulación CoQ10 que va unida con las partículas lipídicas ofreciendo un efecto antioxidante circulante, pero este *pool* no se distribuye a los tejidos; por lo tanto, los niveles plasmáticos de CoQ10 no son un reflejo de su actividad tisular. El método considerado *gold standard* para medir los niveles de CoQ10 y detectar una posible deficiencia es el músculo esquelético, pero la utilización de esta técnica está muy limitada por ser muy invasiva. También se realizan

determinaciones en fibroblastos y en linfocitos<sup>110</sup>. Sin embargo, estudios en adultos utilizan determinaciones en plasma para investigar la biodisponibilidad de las distintas formas de presentación de la CoQ10.

En cuanto a la efectividad de la suplementación, hay dudas sobre si las distintas presentaciones de CoQ10 exógena tienen la capacidad de incorporarse adecuadamente en los tejidos y más específicamente dentro de la mitocondria, que es donde desempeña la gran mayoría de sus efectos conocidos. Por ejemplo, en el caso de las deficiencias primarias de CoQ10 en donde el efecto de la suplementación es marcado en términos de la mejoría clínica, la idebenona, análogo sintético de la ubiquinona que cruza la barrera hematoencefálica, no ha demostrado beneficio<sup>111,112</sup>. Varios trabajos han objetivado la mejor biodisponibilidad del ubiquinol sobre otras formas de presentación<sup>113,114</sup>. En relación con los EIM, se ha resaltado la superioridad del ubiquinol en varios aspectos:

- En un paciente con deficiencia primaria de CoQ10 secundaria a haploinsuficiencia de CoQ4 y en el que el tratamiento sustitutivo objetivó una importante mejoría, la dosis de ubiquinona de 30 mg/kg/día fue equivalente a 15 mg/kg/día de ubiquinol en el control de los síntomas<sup>115</sup>.
- En ratones con encefalopatía mitocondrial secundaria a deficiencia primaria de CoQ10, la suplementación con la forma reducida de CoQ10 (ubiquinol) fue superior a la ubiquinona en mejorar las lesiones histopatológicas y la actividad de los complejos I-III de la cadena respiratoria mitocondrial. Los autores demostraron mejor biodisponibilidad y absorción del ubiquinol; el aumento de los niveles tisulares en los ratones tratados con ubiquinol, se tradujo en elevación mitocondrial a nivel cerebral. La mejoría de la cadena respiratoria

mitocondrial, a pesar de no ser completa, se objetivó en todos los tejidos incluido el cerebro y el musculo cardiaco<sup>116</sup>.

Además del tipo de presentación y la dosis utilizada, otro aspecto a tener en cuenta a la hora de valorar la respuesta a la suplementación es el momento de iniciar el tratamiento: sería imprescindible empezar antes de que se produzcan daños tisulares permanentes. Es probable que un inicio de la intervención tardío no obtenga beneficios o sean menos evidentes.

El daño tisular a largo plazo en AP se debería al efecto sinérgico del efecto directo de los metabolitos tóxicos como el propionil CoA o el metilcitrato sobre el aparato energético celular y el aumento del estrés oxidativo. En este contexto, la deficiencia de la CoQ10 podría empeorar todavía más la disfunción mitocondrial y la producción de ATP aumentando el estrés oxidativo, tal y como se ha demostrado en los casos de deficiencia primaria de CoQ10<sup>117</sup>. Hasta la fecha no hay ningún ensayo clínico sobre la utilidad de la suplementación con CoQ10 en pacientes con AP, a pesar de varios trabajos que resaltan su posible beneficio<sup>78</sup>. La falta de estudios corresponde a varias dificultades para el diseño e inclusión de pacientes. Una de ellas es la heterogeneidad de la aparición de las complicaciones a largo plazo, siendo la afectación cardiaca (cardiomiopatía, QT largo) o neurológica (epilepsia, trastornos de movimiento, epilepsia) entre las más precozmente descritas<sup>118</sup>. Otra dificultad añadida en interpretar los datos de los pocos pacientes descritos en la literatura tratados con CoQ10 es la gran variabilidad de las dosis utilizadas. Por otro lado, la falta de marcadores metabólicos de fácil alcance para el seguimiento de la disfunción mitocondrial hace muy difícil establecer los objetivos del tratamiento teniendo en cuenta que las

complicaciones crónicas presentan una importante variable temporal en su aparición y desarrollo.

### **3. Manifestaciones clínicas de la deficiencia de propionil CoA carboxilasa**

#### **4.1.- DESCOMPENSACIONES METABOLICAS AGUDAS**

Generalmente, los pacientes con AP debutan en el periodo neonatal o a las pocas semanas de vida tras un embarazo, parto y periodo perinatal inmediato normales. Los episodios iniciales y posteriormente los que se producen por una descompensación incluyen acidosis metabólica grave junto con hiperamonemia, cetosis, hiperlactacidemia, hipo/hiperglucemia, afectación multiorgánica (citólisis hepática, pancitopenia, rabdomiolisis etc).

El debut fuera del periodo neonatal es menos frecuente. Puede ser un episodio agudo similar al que se produce en periodo neonatal, pero también puede ser un cuadro más insidioso que incluye un variado conjunto de síntomas mayoritariamente gastrointestinales (fallo de medro, vómitos recurrentes con cetoacidosis, pancreatitis) o neurológicos (epilepsia, hipotonía, retraso psicomotor, trastorno de espectro autista, afectación de ganglios basales con o sin trastorno de movimiento (disonias), letargia, coma); a veces se añade la afectación de otros órganos (pancitopenia, neutropenia, cardiomiopatía, etc)<sup>2</sup>. Estas manifestaciones se asemejan más a las complicaciones crónicas descritas a continuación y es probable que compartan sus mecanismos fisiopatológicos.



#### 4.2.- MANIFESTACIONES CRONICAS

Varios factores, como la detección a través del cribado neonatal, el tratamiento y la mejoría en el seguimiento, han aumentado la esperanza de vida en los pacientes con AP. Con la mayor esperanza de vida se observan con mayor frecuencia las complicaciones a largo plazo, que se recogen en la Tabla 1.

Las complicaciones crónicas pueden afectar a todos los órganos y sistemas. Los pacientes con AP presentan una gran variabilidad en relación con la aparición y la evolución de las complicaciones crónicas a lo largo de la vida<sup>118</sup>. Mientras que durante la infancia predominan los problemas de tolerancia digestiva y los síntomas neurológicos (trastorno de movimiento, retraso psicomotor, epilepsia...), más tarde aparecen las alteraciones cardiológicas (QT prolongado, cardiomiopatía) o la atrofia del nervio óptico.

Algunos de estos síntomas son fácilmente explicables como secuelas de un episodio agudo, sobre todo las que se acompañan de hiperamonemia. La acumulación de propionato o metilcitrato crónicos son factores relevantes, pero hay algunas complicaciones que no se pueden atribuir a este factor y que aparecen incluso en los pacientes con buen control metabólico, lo que ha llevado a la búsqueda de explicaciones alteranativas a la teoría clásica del acúmulo de productos tóxicos<sup>3</sup>.

<b>Complicaciones gastrointestinales</b>	Pancreatitis aguda/ crónica/ recurrente
	Vómitos, anorexia
	Alteraciones de motilidad intestinal: ileus, episodios de pseudoobstrucción intestinal, estreñimiento
	Alteraciones hepáticas (aumento de las transaminasas, hepatomegalia)
<b>Complicaciones neurológicas</b>	Retraso psicomotor
	Epilepsia
	Trastorno de espectro autista
	Ictus metabólico
	Alteración de los ganglios basales. Trastornos de movimiento (coreoatetosis, distonias)
	Leucodistrofia; alteración en la sustancia blanca
	Hipotonía muscular
	Atrofia óptica
	Sordera neurosensorial
<b>Complicaciones cardiológicas</b>	Cardiomiopatía dilatada o hipertrófica
	Aumento del QT, extrasistolia
<b>Complicaciones hematológicas e inmunológicas</b>	Anemia, neutropenia, plaquetopenia
	Inmunodeficiencias
<b>Complicaciones endocrinológicas</b>	Talla baja; déficit de GH

Tabla 1. Complicaciones crónicas en pacientes con AP.

Dado que muchas complicaciones se producen en tejidos con alta demanda energética, una de las hipótesis más atractivas se refiere al fallo energético celular por disfunción mitocondrial secundaria. Los pacientes con AP comparten muchos rasgos clínico-metabólicos con las enfermedades mitocondriales. Las alteraciones neurológicas incluyen afectación de los ganglios basales, con pico de lactato objetivado mediante espectroscopia similar a niveles observados en los pacientes con síndrome de Leigh<sup>67</sup>. La cardiomiopatía, otra complicación muy frecuente en AP, está presente en casi todos los defectos de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>68</sup>. La atrofia óptica de los pacientes con AP comparte rasgos clínicos y patológicos con la neuropatía hereditaria óptica de Leber<sup>69,70</sup>. La anaplerosis deficiente puede contribuir a la disfunción mitocondrial secundaria. El propionil CoA es una molécula anaplerótica especialmente importante a nivel cardíaco<sup>61</sup> y, dados los múltiples papeles del Glu a nivel neuroglial, varios autores han propuesto alteraciones en el metabolismo del ciclo Glu/Gln como parte de explicación para las complicaciones neurológicas a largo plazo en AP<sup>3,119</sup>. Estas teorías se han detallado en los apartados anteriores y se resumen en la Figura 18. Su veracidad y el peso de cada una de ellas en la evolución de los pacientes están todavía por dilucidar completamente.



Figura 18. Causas propuestas para la aparición de las complicaciones a largo plazo en pacientes con AP.

Además de causas intrínsecas al desequilibrio metabólico que produce la enfermedad, el que las complicaciones crónicas aparezcan incluso en los pacientes con buena adherencia y considerados con adecuado control metabólico, pone en duda la eficacia del tratamiento propuesto hasta la fecha. Por un lado, dieta se ha asociado con varios trastornos inducidos por la restricción en proteínas naturales de alto valor biológico y el desbalance entre los aminoácidos

ramificados. Los niveles plasmáticos disminuidos de Val e Ile se han asociado con talla baja y la aparición de lesiones cutáneas similares a la acrodermatitis enteropática respectivamente<sup>120,121</sup>. El alto contenido en leucina de las mezclas especiales exentas de los aminoácidos propiogénicos se sabe que pueden influir en mecanismos de regulación de los niveles plasmáticos de Val, Ile u otros aminoácidos, con efectos potencialmente perjudiciales para varias rutas metabólicas<sup>122,123,124</sup>. A los efectos provocados por la dieta habría que sumar los posibles efectos secundarios de las distintas medicaciones utilizadas en estos pacientes y que se describen posteriormente.

En definitiva, la aparición de complicaciones aumenta la morbimortalidad de los pacientes y la complejidad en su seguimiento clínico y tratamiento. La falta de biomarcadores que sirvan para determinar la calidad del tratamiento y permitan predecir o detectar precozmente la aparición de estos trastornos dificulta el seguimiento a largo plazo de los pacientes con AP.

#### **4. Tratamiento de los pacientes con acidemia propiónica**

El tratamiento de los pacientes con AP, que deriva de la teoría clásica del daño por toxicidad, consiste en:

- Restricción de las proteínas naturales de alto valor biológico (PNAVb) para disminuir el aporte de los aminoácidos propiogénicos (Val, Ile, Tre, Met).
- Suplementos con productos especiales de aminoácidos exentos de Val/Ile/Met/Tre cuando la tolerancia proteica no alcanza las recomendaciones de la Organización Mundial para la Salud (OMS 2007) para una nutrición y crecimiento adecuado.
- Adecuado aporte calórico para evitar el catabolismo que puede favorecer la liberación de precursores propiogénicos.
- Aporte de carnitina para favorecer la eliminación del propiónico y sus derivados en forma de acilcarnitinas.
- Reducción de la producción de propiónico por las bacterias intestinales, evitando el estreñimiento y eliminando las mismas mediante tratamientos antibióticos.

Estas medidas, que se han demostrado eficaces en reducir los episodios de descompensación y mejorar la supervivencia de los pacientes con AP, no dejan de tener consecuencias que pueden ser negativas y que es posible se relacionen con algunos de los síntomas que se observan a largo plazo en estos pacientes.

### 5.1.- TRATAMIENTO DIETETICO

El tratamiento de la AP se basa en reducir el sustrato y disminuir la acumulación de propionil CoA y los productos de metabolismo alternativo. Como se ha comentado previamente, los aminoácidos propiogénicos contribuyen con una media de 50% al pool de propionato<sup>12</sup>, por lo que uno de los pilares fundamentales es el tratamiento dietético. Se realiza una dieta restringida en proteínas, a la que es preciso añadir en la mayoría de los casos una mezcla especial de aminoácidos exentos de Val/Ile/Met/Tre para cumplir las recomendaciones de aporte proteico diario<sup>2</sup>. La práctica clínica es bastante heterogénea en función de la tolerancia proteica y la necesidad de añadir los productos especiales<sup>125</sup>. Durante los episodios de descompensación o en los que existe un riesgo de la misma, es necesario recurrir a un régimen de emergencia, con restricción más estricta de la ingesta de proteínas naturales<sup>2</sup>.

Otra intervención dietética de máxima importancia son las recomendaciones de evitar el ayuno y hacer un aporte calórico suficiente para evitar el catabolismo proteico y la producción de los OLCFAs a través de la  $\beta$ -oxidación<sup>2</sup>. Estudios antiguos han demostrado que, en paciente con el mismo aporte proteico, un adecuado aporte calórico disminuye la producción de propionato hasta un 41%, probablemente a expensas de evitar la  $\beta$ -oxidación y la producción de OLCFAs<sup>11</sup>. Durante los procesos de descompensación y mayor restricción proteica, el aumento del aporte calórico es indispensable<sup>2</sup>.

Los pacientes con AP pueden tener problemas de tolerancia digestiva, con vómitos frecuentes y anorexia, a lo que se añade la afectación neurológica severa, por lo que en muchos

casos es preciso utilizar sondas nasogástricas o una gastrostomía para alcanzar una correcta nutrición.

Las intervenciones dietéticas son muy útiles en prevenir los episodios agudos de descompensación metabólica. Sin embargo, en los últimos años, varios autores han señalado posibles efectos adversos secundarios al desbalance entre los aminoácidos ramificados en la dieta, teniendo en cuenta la restricción en Val e Ile, con un aporte normal/alto de Leu<sup>124</sup>. Se ha observado que los pacientes con más ingesta de suplemento de aminoácidos y menos aporte de proteínas naturales, presentan niveles más disminuidos de Val e Ile y peor crecimiento<sup>120,123</sup>. Los autores concluyen en la necesidad de ajustar la ratio entre los tres aminoácidos ramificados, aumentando el aporte de proteínas naturales.

El déficit grave de Ile puede provocar un cuadro de acrodermatitis enteropática-*like* similar con el observado en pacientes con Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD), que consiste en hiperemia localizada (sobre todo en pliegues) o generalizada y que puede dar lugar a infecciones graves de origen cutáneo<sup>126,127</sup>. Aunque menos frecuente, la deficiencia de la Val también ha sido descrita como causa de acrodermatitis<sup>128</sup>. Se propone la suplementación “paradójica” con Ile y/o Val, igual que los pacientes con MSUD, para evitar la aparición de las complicaciones de mucosas<sup>2,129</sup>.



## 5.2.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento de los pacientes con AP incluye también la administración de cofactores, como la carnitina, que se une al propionilCoA y se detecta en plasma en forma de propionilcarnitina (C3). La biotina, a pesar de ser cofactor para la propionil CoA carboxilasa, no ha demostrado beneficio en el tratamiento de la AP<sup>2</sup>.

Por otro lado, se intenta disminuir el ácido propiónico producido por la flora intestinal, principalmente durante los procesos de fermentación de bacterias anaerobias, con la administración de antibióticos. La pauta principal sigue siendo el metronidazol en administración intermitente. Sin embargo, el uso de este antibiótico de forma crónica se ha asociado a efectos secundarios importantes como neuropatía periférica en tratamientos prolongados, leucopenia/neutropenia o trastornos gastrointestinales (diarrea, pancreatitis, vómitos)<sup>130</sup>. El tratamiento agresivo del estreñimiento para evitar la acumulación de bacterias intestinales también se ha puesto de manifiesto en los últimos años<sup>2</sup>.

A estas medicaciones que se utilizan en el tratamiento a largo plazo, hay que añadir aquellas que se utilizan de forma puntual durante los episodios de descompensación y que pueden tener beneficios, pero también efectos secundarios. En los últimos años ha tomado especial relevancia el uso de análogos del ácido caglúmico para activar el ciclo de la urea y reducir la hiperamonemia. Varios estudios avalan el perfil de seguridad y la eficacia del ácido caglúmico en los episodios de hiperamonemia aguda en AP<sup>57,58</sup>. Actualmente hay varios ensayos en marcha para establecer la eficacia de este tratamiento a largo plazo en las acidemias orgánicas.

La presente Tesis Doctoral se ha diseñado para ahondar en el entendimiento de la fisiopatología de la acidemia propiónica e investigar nuevas posibilidades que nos permitan ofrecer a los pacientes mejoras en su seguimiento y tratamiento, con el fin de aumentar su esperanza y calidad de vida.



## **OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo ha sido realizar una adecuada caracterización de los pacientes con AP de la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal con el propósito de ahondar en la fisiopatología de la enfermedad, aplicar nuevas estrategias de seguimiento, tratamiento y detección precoz de las descompensaciones, con el fin de mejorar su pronóstico y calidad de vida a largo plazo.

Con este fin se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

- 1) Caracterización del perfil metabólico de los pacientes durante un episodio de descompensación aguda.
- 2) Caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de sus complicaciones crónicas.
- 3) Determinar la validez de las muestras en papel de filtro de sangre y orina respecto a las muestras líquidas habituales tanto en periodos de estabilidad como de descompensación.
- 4) Detección del estado plasmático de CoQ10 y el posible beneficio del tratamiento con ubiquinol en los pacientes con AP.



**PACIENTES, MATERIAL Y**

**MÉTODOS**

Para alcanzar los objetivos de esta Tesis Doctoral se contó con los siguientes medios:

### **1. Pacientes**

Se han incluido todos los pacientes diagnosticados de AP en seguimiento en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal. Se trata de un centro de referencia para el seguimiento de pacientes detectados mediante cribado neonatal en la Comunidad de Madrid, y también es centro nacional de referencia (C.S.U.R.) para enfermedades metabólicas. Por este motivo los pacientes incluidos provenían de varias regiones de la geografía española.

### **2. Métodos bioquímicos**

La determinación de los distintos parámetros bioquímicos se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Dicho centro está avalado por la ERDIM (Control de calidad europeo para diagnóstico de errores innatos del metabolismo). La metodología utilizada fue la siguiente:

- *Aminoácidos en plasma.* Los aminoácidos en las muestras de plasma o suero se analizaron por cromatografía de intercambio iónico con ninhidrina.
- *Acilcarnitinas en plasma.* Las acilcarnitinas en plasma se determinaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS).
- *Aminoácidos y acilcarnitinas en sangre papel.* Las acilcarnitinas y los aminoácidos en sangre en papel se determinaron como sus ésteres de butilo por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con sonda de inyección directa en flujo y dilución de isótopos estables (FIA/MS/MS)<sup>131,132</sup>. De modo simultáneo, las acilcarnitinas se adquirieron por el modo Ion



Precursor de  $m/z$  85 y los aminoácidos por el modo de Pérdida Neutra de 102 uma, excepto los aminoácidos básicos, glicina, leucina e isoleucina, que se adquirieron por MRM (monitorización de múltiples reacciones).

- *Ácidos orgánicos en orina líquida.* Los ácidos orgánicos en las muestras de orina líquida se analizaron como sus trimetilsilil derivados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) tras un tratamiento con ureasa y extracción líquido-líquido con acetato de etilo sin oximación.
- *Ácidos orgánicos y acilglicinas en orina en orina papel.* Los ácidos orgánicos y las acilglicinas en las muestras de orina en papel se analizaron por HPLC/MS/MS (cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tandem) y MRM. Fue necesario el uso de una columna ACE C18 de HPLC para realizar la separación cromatográfica de aquellos compuestos con mismo MRM<sup>133</sup>.
- *OLCFAs.* Los OLCFAs en plasma se analizaron por cromatografía de gases.
- *Niveles plasmáticos de coenzima Q10.* Los niveles de CoQ10 se han determinado en plasma mediante HPLC/MS/MS; se consideraron niveles normales entre  $0,91 \pm 0,35$   $\mu\text{mol/L}$ , según los valores de referencia.

El resto de las determinaciones bioquímicas (glucemia, perfil hepático, amonio, gasometrías, etc) se llevaron a cabo en el laboratorio de bioquímica del Hospital Ramón y Cajal siguiendo los estándares habituales. Este laboratorio cuenta con la acreditación ISO 9001:2015.

### **3.Estudios estadísticos**

El análisis estadístico se realizó con la ayuda de la Unidad de Bioestadística Clínica del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). La metodología de cada estudio se detalla a continuación.

### **4.Consideraciones éticas**

Cada uno de los estudios realizados contó con la aprobación del Comité de Etica del Hospital Ramón y Cajal y todos los pacientes o sus representantes legales firmaron los consentimientos informados necesarios para ser incluídos en los distintos estudios propuestos.

### **5.Financiación.**

El estudio para determinar la validez de las muestras en papel de filtro de sangre y orina respecto a las muestras líquidas habituales tanto en periodos de estabilidad como de descompensación fue financiado por la Fundación Ramón Areces ([CIVP17A2827](#)).

El estudio para detección del estado plasmático de CoQ10 y el posible beneficio del tratamiento con ubiquinol en los pacientes con AP contó con la financiación de la Fundación SEUR.

Para alcanzar los objetivos concretos propuestos se llevaron a cabo cuatro estudios cuya metodología se describe detalladamente a continuación:

I. **Caracterización del perfil metabólico de los pacientes durante un episodio de descompensación aguda. Perfil de aminoácidos plasmáticos**

*Metodología.* Estudio prospectivo observacional en el que se han analizado los aminogramas, comparando los datos obtenidos durante la estabilidad metabólica con los episodios de descompensación con cetosis y/o hiperamononiemia. Las muestras de plasma en la situación de estabilidad metabólica se obtuvieron durante las visitas clínicas rutinarias al hospital, con al menos tres horas de ayuno, sin toma de carnitina en las últimas ocho horas. Se ha definido episodio de descompensación metabólica como la presencia de hiperamononiemia (niveles de amonio en plasma  $> 60 \mu\text{mol/L}$ ), cetosis significativa (++) o acidosis metabólica ( $\text{pH} < 7,3$ ,  $\text{HCO}_3^- < 20 \text{ mmol/L}$ ). Las muestras en situación de descompensación metabólica se obtuvieron antes del inicio de cualquier tratamiento dietético o farmacológico.

*Análisis estadístico.* Se describe la distribución de los niveles plasmáticos de aminoácidos según el estado metabólico (estabilidad metabólica, descompensación con cetosis, descompensación con hiperamononiemia) mediante la media y desviación estándar y la mediana y los percentiles 25 y 75. Dada la presencia de medidas repetidas de los pacientes, la asociación entre los niveles plasmáticos de los aminoácidos y el estado metabólico se ha analizado de modo univariable mediante modelos de regresión multinivel, siendo el primer nivel las observaciones

y el segundo nivel el paciente. La significación de la regresión se ha establecido mediante STATA 15 y se ha considerado estadísticamente significativo para un p-valor  $< 0,05$ .

## II. Caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de las complicaciones crónicas.

Se agrupan varios estudios retrospectivos en el que se describen las complicaciones crónicas detectadas a lo largo del seguimiento y se relacionan con el perfil metabólico asociado a ellas.

### II.1. Complicaciones hematológicas.

*Metodología.* Estudio retrospectivo sobre anemia grave persistente en los pacientes con AP. Se han revisado los registros de los pacientes para identificar aquellos con complicaciones hematológicas significativas fuera de episodios de descompensación metabólica. Se han excluido los episodios agudos, dado que se han descrito casos de pancitopenia grave transitoria en relación con estos episodios en los pacientes con AP pero cuya etiopatogenia puede ser diferente.

El objetivo principal fue encontrar la posible relación entre los parámetros nutricionales y control metabólico y la anemia grave que precisa transfusiones de hemoderivados. Dado que los pacientes recibían transfusiones periódicas en sus hospitales de referencia y fuera de nuestro centro, hemos optado por la ferritina como marcador de sobrecarga férrica como dato indirecto

de la persistencia de la anemia, al no tener siempre disponibles todos los parámetros hematológicos. Por este motivo se han excluido los episodios de infección intercurrente, por la interferencia que pueden tener con la ferritina como reactante de fase aguda.

Se ha analizado la correlación entre los parámetros nutricionales (ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico (g/kg/día), ingesta de producto especial exento de los aminoácidos propiogénicos (g/kg/día) y los niveles plasmáticos de aminoácidos ramificados (isoleucina, valina, leucina) con la ferritina como marcador de sobrecarga férrica.

*Análisis estadístico.* Se ha diseñado un modelo de regresión lineal multinivel, siendo la ferritina variable continua dependiente y cada aminoácido/parámetros nutricionales variables independientes. Se ha definido un modelo de dos niveles (primer nivel para las medidas y segundo nivel para el paciente), considerando de esta manera las medidas repetitivas. El análisis se realizó con el programa Stata versión 16, considerándose significativo el p-valor < 0,05.

## **II.2. Complicaciones gastrointestinales. Pancreatitis**

*Metodología.* Estudio retrospectivo de los episodios de alteraciones pancreáticas objetivadas en los pacientes a lo largo del seguimiento. Se han recogido los datos de parámetros bioquímicos y de control metabólico de los pacientes. El diagnóstico de pancreatitis se realizó según los criterios actuales, requiriendo un mínimo de 2 de los 3 siguientes: (1) aumento de la amilasa y/o lipasa pancreática sérica > 3 veces normal, (2) dolor abdominal o (3) imagen radiológica compatible con pancreatitis<sup>134</sup>.

*Análisis estadístico.* Se describe la distribución de los niveles plasmáticos y urinarios de varios metabolitos según los niveles de lipasa pancreática mediante la mediana y los percentiles 25 y 75. Los coeficientes de correlación y el p-valor se han obtenido mediante regresión lineal, considerándose significativo un p-valor < 0,05.

### **II.3. Complicaciones neurológicas y cardiológicas.**

*Metodología.* Descripción de las complicaciones neurológicas y cardiológicas recogidas retrospectivamente de las historias clínicas de los pacientes.

### **III. Determinar la validez de las muestras en papel de filtro de sangre y orina respecto a las muestras líquidas habituales tanto en periodos de estabilidad como de descompensación. Seguimiento a largo plazo con papel filtro en los pacientes con acidemia propiónica**

*Metodología.* Estudio prospectivo en el que hemos comparado el método tradicional *gold standard* de seguimiento bioquímico en muestras líquidas (sangre/plasma y orina) con las muestras de sangre y orina en papel de filtro (DBS: *dried blood spot*; DUS: *dried urine spot*). Las muestras de DBS y DUS se recogieron mensualmente por el paciente o su familia en su domicilio y se enviaban al laboratorio de referencia por carta. Además, cada 3 meses o durante los

episodios de descompensación metabólica se recogían en el hospital muestras líquidas de plasma y orina junto con las muestras de papel filtro. Se ha definido episodio de descompensación metabólica como la presencia de hiperamonemia (niveles de amonio en plasma  $> 60 \mu\text{mol/L}$ ), cetosis significativa (++) o acidosis metabólica ( $\text{pH} < 7,3$ ,  $\text{HCO}_3 < 20 \text{ mmol/L}$ ).

Se han analizado los siguientes parámetros bioquímicos considerados relevantes para el seguimiento de los pacientes con AP:

- Aminoácidos: aminoácidos ramificados (Val, Ile, Leu), aminoácidos propiogénicos (Met, Tre), Glicina (Gli)
- Acilcarnitinas: acilcarnitinas de cadena impar, propionilcarnitina
- Ácidos orgánicos: ácido 3-hidroxi propiónico, metilcitrato, lactato, succínico, málico, fumárico, ácido 2 metil- 3 hidroxi butírico; acilglicinas: propionil glicina, tigilil glicina

*Análisis estadístico.* Hemos valorado los coeficientes de correlación entre las muestras líquidas y las de papel filtro mediante regresión lineal, incluyendo la descompensación como variable de interacción. Se ha utilizado el modelo multivariante para los variables con interacción significativa y el modelo univariante para los sin interacción significativa. La significación de la regresión se ha establecido mediante STATA 15 y se ha considerado estadísticamente significativo para un p-valor  $< 0,05$ .

**IV. Detección del estado plasmático de CoQ10 y el posible beneficio del tratamiento con ubiquinol en los pacientes con Acidemia propiónica.**

*Metodología.* Estudio prospectivo intervencional durante el que los participantes recibieron suplementos de Coenzima Q10 (CoQ10) en forma de ubiquinol a 10 mg/kg/día dividida en 3 dosis durante 6 meses. No se realizaron modificaciones del resto de su tratamiento habitual durante el estudio. En el caso de aquellos pacientes que tomaban previamente suplementos de CoQ10, se suspendió dicha suplementación durante 1 mes previo a la inclusión en el estudio. Se han realizado análisis de sangre y orina al inicio, a los tres meses y a los 6 meses al finalizar el estudio. Se ha estudiado el perfil metabólico y bioquímico completo: ácidos orgánicos en orina, aminoácidos y acilcarnitinas en plasma, niveles plasmáticos de CoQ10 y ácidos grasos de cadena impar (OLCFAs). Los niveles de CoQ10 en plasma se determinaron con un ayuno mínimo de 8 horas. En todos los pacientes se realizaron estudios cardiológicos (ECG, ecocardiografía) al inicio y al final del estudio. Otras exploraciones, como el fondo de ojo, electroencefalograma o pruebas de imagen se realizaron según la clínica.

*Análisis estadístico.* El análisis estadístico se ha realizado mediante SSPS 20 con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar las distribuciones en los tres grupos (al inicio, a los 3 meses y a los 6 meses al finalizar el tratamiento con ubiquinol). En caso de ser estadísticamente significativo, se ha aplicado la prueba U de Mann-Whitney.





# **RESULTADOS**

En los distintos estudios se han incluido los datos de los 10 pacientes con AP en seguimiento en la Unidad de Enfermedades Metabólicas del Hospital Ramón y Cajal. La mediana de edad al inicio del estudio fue de 13,5 años (rango: 3-35 años). Sus características clínicas y demográficas se recogen en la Tabla 2.

	<b>Sex</b>	<b>Edad actual</b>	<b>Edad al diagnóstico</b>	<b>Genética</b>	<b>Complicaciones crónicas</b>
<b>1</b>	M	32	neonatal	Gen PCCB p.Gly407Argfs*14/p.Arg165Gln +p.Ala497Val	Neuropatía periférica, retraso psicomotor Pancreatitis, trombopenia Anemia persistente grave
<b>2</b>	H	12	neonatal	Gen PCCB p.Gly407Argfs*14/ p. Arg410Trp	Retraso psicomotor grave Leucopenia Anemia persistente grave
<b>3</b>	H	Fallecido (5 años)	neonatal	Gen PCCA p.Leu470Arg/p.Leu470Arg	Retraso psicomotor grave Coreoatetosis, lesiones de ganglios basales Infecciones de repetición, leucopenia Anemia persistente grave Cardiomiopatía dilatada Pancreatitis
<b>4</b>	M	15	4 meses	Gen PCCA p.Gly477fs*9/ p.Cys616_Val633del	Pancreatitis recurrente
<b>5</b>	H	9	Cribado neonatal	Gen PCCB p.Asn536Asp/p.Asn536Asp	Trastorno de espectro autista
<b>6</b>	M	27	4 meses	Gen PCCB p.Gly407Argfs*14/p.Glu168Lys	-
<b>7</b>	H	12	6 meses	Gen PCCA p.Gly477fs*9/ p.Cys616_Val633del	Retraso psicomotor grave
<b>8</b>	M	13	6 meses	Gen PCCB p.Arg512Cys/p.Gly255Ser	Retraso psicomotor leve-moderado Epilepsia Pancreatitis, miosistis
<b>9</b>	M	38	neonatal	Gen PCCB p.Glu168Lys/p.? (c.183+3G>C)	Retraso psicomotor leve-moderado
<b>10</b>	M	32	neonatal	Gen PCCB p.Gly407Argfs*14/ p.Gly407Argfs*14	Retraso psicomotor leve-moderado Cardiomiopatía dilatada Psicosis

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de los pacientes que participaron en el estudio

- I. Caracterización del perfil metabólico de los pacientes durante los episodios de descompensación aguda. Perfil de aminoácidos plasmáticos

Se han analizado 18 aminoácidos en las 188 muestras de plasma obtenidas de 10 pacientes incluidos enero 2015 y septiembre 2017. Las muestras correspondieron a 148 episodios de estabilidad metabólica y 40 episodios de descompensación (22 episodios de descompensación con cetosis y 18 episodios de descompensación con hiperamoniemia).

*Aminoácidos ramificados (Ile, Val, Leu).* Durante los episodios de descompensación, tanto los que cursaron con hiperamoniemia como en los que sólo hubo cetosis, los niveles de los tres aminoácidos ramificados se elevan significativamente respecto a su situación en momentos de estabilidad (ver Tablas 3 y 4, Figura 19), reflejando un aumento del catabolismo.

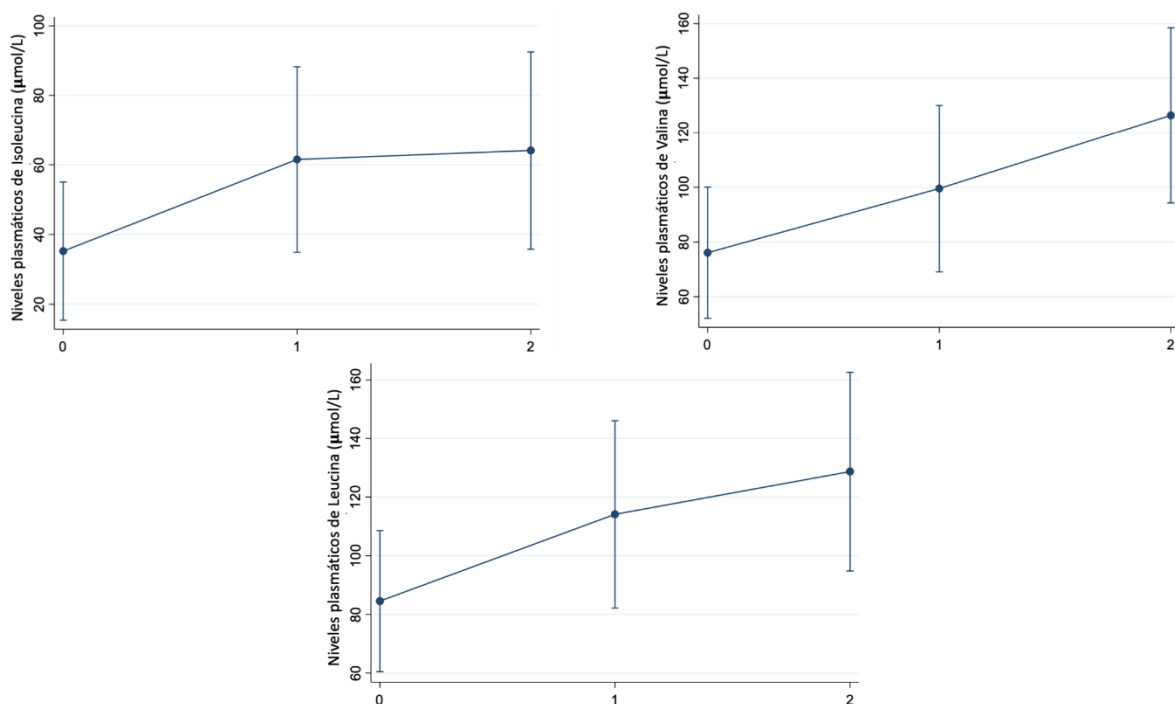


Figura 19. Evolución de los niveles plasmáticos de los aminoácidos ramificados según el estado metabólico. 0: estabilidad metabólica; 1: descompensación con cetosis; 2: descompensación con hiperamoniemia

*Glutamina y Alanina.* La glutamina (Gln) y la alanina (Ala) son los dos aminoácidos sintetizados en el músculo a partir de los aminoácidos ramificados<sup>135</sup>. Los niveles de Gln y Ala sí disminuyen de forma significativa ( $p < 0,001$  para ambos aminoácidos en los episodios de descompensación (con y sin hiperamoniemia), ver Tabla 3 y 4 y Figura 20. Los niveles plasmáticos de glutamato (Glu), como precursor de la Gln, no cambian según el estado metabólico.

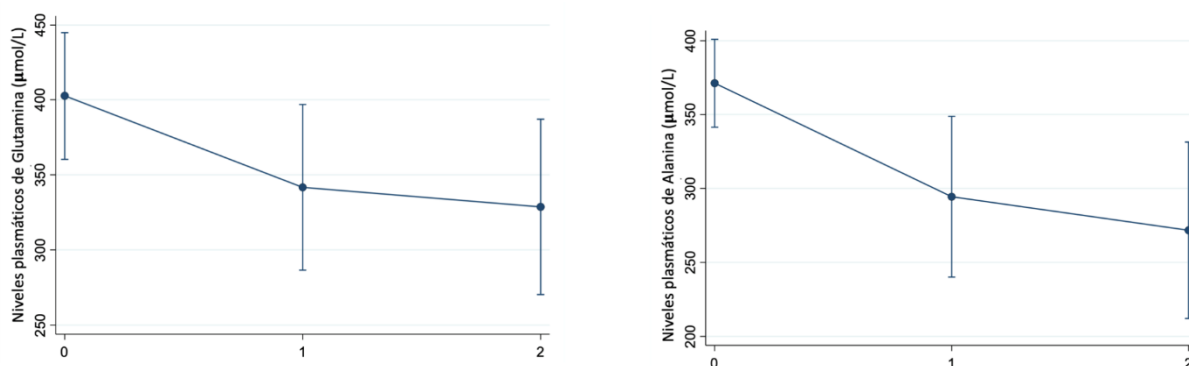


Figura 20. Evolución de los niveles de glutamina (Gln) y alanina (Ala) según el estado metabólico. 0: estabilidad metabólica; 1: descompensación con cetosis; 2: descompensación con hiperamoniemia

*Aminoácidos implicados en el ciclo de la urea.* Hemos detectado una disminución estadísticamente significativa de la citrulina (Cit) durante los episodios de hiperamoniemia ( $p < 0,001$ ). Los niveles de arginina (Arg) y ornitina (Orn) disminuyen en los episodios de descompensación, pero sin alcanzar significación estadística. Durante el estudio algunos pacientes recibieron suplementación con Arg, tanto en estabilidad como en descompensación

metabólica, por objetivar niveles plasmáticos muy disminuidos, lo que ha podido interferir con los resultados finales e impedir que se alcanzara significación estadística, ver Tabla 3 y 4 y Figura 21.

Curiosamente hemos detectado una disminución significativa de la prolina (Pro) en descompensación tanto con cetosis como con hiperamoniemia ( $p: 0,05$ ,  $p:0,03$  respectivamente), ver Figura 21 y Tablas 3 y 4. Este hallazgo no ha sido descrito hasta el momento en la literatura.

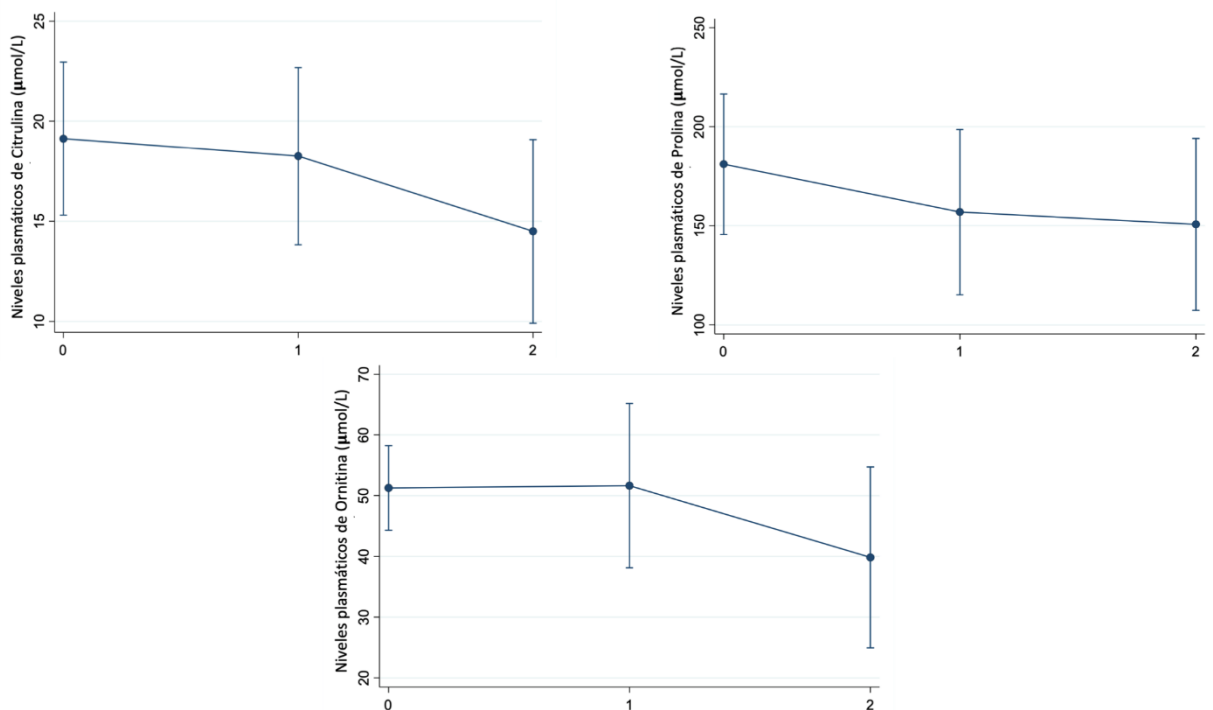


Figura 21. Evolución de los niveles plasmáticos de los aminoácidos del ciclo de la urea según el estado metabólico. 0: estabilidad metabólica; 1: descompensación con cetosis; 2: descompensación con hiperamoniemia

*Aminoácidos aromáticos.* Hemos detectado un aumento significativo de la fenilalanina (Phe) coincidiendo con la cetosis ( $p: 0,02$ ), pero no con la hiperamoniemia. Los niveles de Triptofano (Trp) están disminuidos durante los episodios de descompensación con hiperamoniemia ( $p: 0,05$ ); este hallazgo no ha sido descrito en la literatura hasta el momento, ver Figura 22 y Tablas 3 y 4.

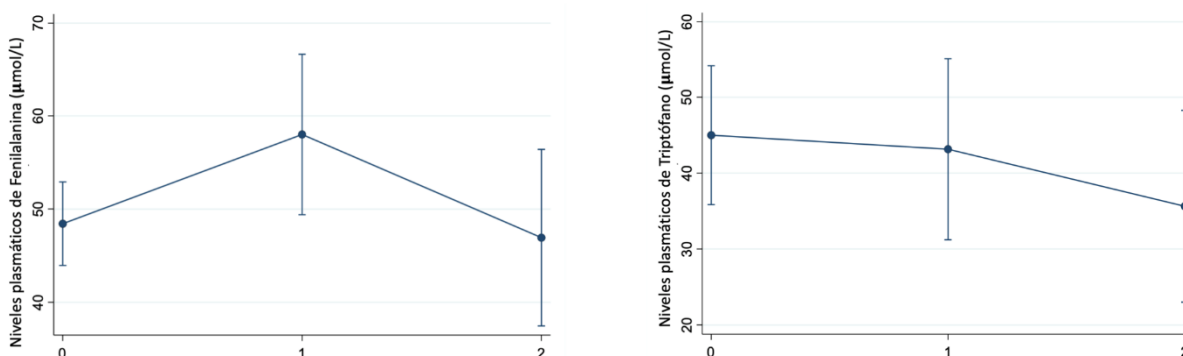


Figura 22. Evolución de los niveles de Fenilalanina (Phe) y Triptófano (Trp) según el estado metabólico. 0: estabilidad metabólica; 1: descompensación con cetosis; 2: descompensación con hiperamoniemia

El índice de Fischer (cociente entre los aminoácidos ramificados Ile/Leu/Val y los aromáticos Phe/tirosina (Tyr)) se encuentra disminuido durante los episodios de estabilidad metabólica ( $1.8 \pm 0.6$ ), probablemente por el desbalance entre los niveles bajos de aminoácidos ramificados comparando con los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr. Sin embargo, al aumentar la proporción de los AARR durante la descompensación, la ratio se acerca a valores normales



( $3\pm 0.5$ ). Las alteraciones del índice de Fischer pueden tener relevancia en el transporte de los aminoácidos a través de la barrera hemato-encefálica<sup>59,60</sup>.

*Otros aminoácidos.* En el caso de los otros dos aminoácidos propiogénicos, Met y Tre, los niveles en plasma no difieren con el estado metabólico. Los niveles de glicina (Gly) y lisina (Lys) tampoco presentan variaciones significativas durante los episodios de descompensación.

Tabla 3. Análisis descriptivo de los niveles plasmáticos de aminoácidos según el estado metabólico (ver pagina siguiente)

<b>Estado metabólico</b>			
	<b>Estabilidad metabólica</b>	<b>Descompensación con cetosis</b>	<b>Descompensación con hiperamoniemia</b>
	n = 148 media (sd) mediana (p25;p75)	n = 22 media(sd) mediana (p25;p75)	n = 18 media (sd) mediana (p25;p75)
<b>Glicina</b>	614 (304) 572 (355 ; 854)	687 (308) 698 (436 ; 1011)	662 (276) 651 (445 ; 748)
<b>Lisina</b>	170 (59) 157 (127 ; 207)	174 (92) 147 (131 ; 191)	178 (88) 163 (108 ; 204)
<b>Prolina</b>	173 (70) 158 (122 ; 209)	146 (74) 113 (96 ; 179)	134 (68) 116 (95 ; 138)
<b>Alanina</b>	364 (111) 357 (290 ; 421)	295 (92) 291 (233 ; 352)	250 (170) 241 (118 ; 354)
<b>Serina</b>	157 (50) 149 (127 ; 179)	160 (73) 140 (111 ; 174)	152 (49) 151 (125 ; 197)
<b>Isoleucina</b>	32 (27) 27 (20 ; 36)	60 (100) 26 (23 ; 60)	63 (99) 29 (18 ; 32)
<b>Leucina</b>	81 (46) 65 (52 ; 96)	113 (92) 79 (55 ; 119)	130 (107) 89 (40 ; 199)
<b>Valina</b>	71 (38) 68 (45 ; 84)	95 (78) 65 (44 ; 102)	112 (121) 63 (30 ; 97)
<b>Metionina</b>	15 (6) 13 (10 ; 18)	14 (6) 12 (10 ; 18)	14 (5) 13 (11 ; 19)
<b>Treonina</b>	56 (27) 51 (39 ; 66)	50 (22) 45 (37 ; 65)	60 (22) 61 (47 ; 77)
<b>Aspartato</b>	11 (6) 10 (8 ; 12)	12 (12) 9 (7 ; 12)	12 (8) 10 (6 ; 12)
<b>Arginina</b>	40 (20) 37 (27 ; 50)	36 (25) 32 (20 ; 44)	33 (18) 33 (21 ; 48)
<b>Citrulina</b>	17 (7) 17 (14 ; 22)	14 (6) 12 (9 ; 21)	9 (5) 9 (7 ; 12)
<b>Ornitina</b>	50 (28) 44 (31 ; 64)	49 (37) 30 (26 ; 62)	43 (29) 34 (26 ; 49)
<b>Fenilalanina</b>	45 (15) 45 (39 ; 54)	55 (36) 47 (35 ; 58)	46 (15) 44 (35 ; 54)
<b>Tirosina</b>	58 (28) 49 (38 ; 72)	58 (32) 51 (44 ; 59)	50 (24) 47 (33 ; 55)
<b>Fisher ratio</b>	1.8 (0.6) 1.8 (1.4 ; 2.2)	2.4 (1.4) 1.8 (1.6 ; 2.9)	3 (2.5) 1.9 (1.5 ; 2.7)
<b>Triptofano</b>	43 (22) 41 (29 ; 57)	42 (23) 39 (26 ; 52)	33 (23) 29 (18 ; 37)
<b>Glutamina+</b>	486 (113)	416 (92)	396 (105)
<b>Glutamato</b>	478 (404 ; 565)	370 (339 ; 515)	388.5 (323 ; 477)
<b>Glutamato/ Glutamina</b>	0.27 (0.38) 0.21 (0.14 ; 0.30)	0.3 (0.29) 0.23 (0.14 ; 0.29)	0.32 (0.12) 0.368 (0.21 ; 0.42)
<b>Glutamina</b>	393 (103) 394 (317 ; 466)	330 (91) 304 (272 ; 408)	303 (94) 316 (228 ; 377)
<b>Glutamato</b>	93 (62) 83 (58 ; 112)	87 (58) 76 (57 ; 106)	92 (35) 85 (71 ; 126)

	Descompensación con cetosis		Descompensación con hiperamoniemia	
	Coefficiente de regresión (95% C.I.)	p-valor	Coefficiente de regresión (95% C.I.)	p-valor
<b>Glicina</b>	36,5 (-75,4 ; 148,5)	0,52	-26,3 (-149,7 ; 97,2)	0,67
<b>Lisina</b>	0,5 (-27,1 ; 28,1)	0,97	-10,6 (-41,0 ; 19,8)	0,49
<b>Prolina</b>	-24,1 (-48,9 ; 0,6)	0,05	-30,3 (-57,7 ; -2,9)	0,03
<b>Alanina</b>	-76,7 (-281,4 ; 24,9)	< 0,001	-99,4 (-156,4 ; 42,4)	< 0,001
<b>Serina</b>	-1,7 (-25,2 ; 21,8)	0,88	-17,3 (-43,3 ; 8,5)	0,18
<b>Isoleucina</b>	26,3 (6,1 ; 46,4)	0,01	28,9 (6,7 ; 51,1)	0,01
<b>Leucina</b>	29,6 (5,8 ; 53,3)	0,01	44,1 (17,9 ; 70,4)	< 0,001
<b>Valina</b>	23,5 (2,2 ; 44,7)	0,03	50,3 (26,9 ; 73,7)	< 0,001
<b>Metionina</b>	0,05 (-2,2 ; 2,3)	0,96	0,9 (-2,3 ; 2,7)	0,89
<b>Treonina</b>	-3,1 (-13,5 ; 7,1)	0,54	10,2 (-1,1 ; 21,5)	0,07
<b>Aspartato</b>	1,3 (-1,9 ; 4,5)	0,43	0,9 (-2,6 ; 4,5)	0,59
<b>Arginina</b>	-5,3 (-13,5 ; 2,9)	0,20	-5,9 (-15 ; 3)	0,19
<b>Citrulina</b>	-0,8 (-3,3 ; 1,6)	0,5	-4,6 (-7,3 ; -1,8)	< 0,001
<b>Ornitina</b>	0,3 (-12,8 ; 13,6)	0,95	-11,4 (-25,9 ; 3,1)	0,12
<b>Fenilalanina</b>	9,5 (1,1 ; 17,9)	0,02	-1,5 (-10,7 ; 7,7)	0,75
<b>Tirosina</b>	3,7 (-5,7 ; 13,2)	0,43	-4,7 (-15,2 ; 5,7)	0,37
<b>Triptofano</b>	-1,8 (-10,5 ; 6,8)	0,67	-9,3 (-18,9 ; 0,0)	0,05
<b>Índice Fischer</b>	0,4 (0,0 ; 0,9)	0,03	1,2 (0,7 ; 1,7)	< 0,001
<b>Glutamato/ Glutamina</b>	-0,0 (-0,2 ; 0,2)	0,90	0,0 (-0,1 ; 0,2)	0,75
<b>Glutamina Glutamato</b> +	-81,3 (-127,7 ; -34,8)	< 0,001	-87,2 (-138,4 ; -36)	< 0,001
<b>Glutamina</b>	-60,9 (-100,8 ; 21,0)	< 0,001	-73,9 (-117,9 ; -29,9)	< 0,001
<b>Glutamato</b>	-19,7 (-45 ; 5,6)	0,12	-11,7 (-39,7 ; 16,1)	0,40

Tabla 4. Análisis de los niveles plasmáticos de aminoácidos según el estado metabólico mediante regresión lineal multinivel

**II. Caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de las complicaciones crónicas**

## II.1 Complicaciones hematológicas. Anemia severa

Se han identificado 3/10 pacientes con anemia persistente grave, requiriendo transfusiones de repetición. Debido a sobrecarga de hierro secundaria a transfusiones de repetición, todos recibieron tratamiento con quelantes de hierro (Deferasirox, Exjade®). Los tres pacientes se diagnosticaron en el periodo neonatal y presentan en el momento del estudio enfermedad multisistémica con varias complicaciones crónicas. Las características demográficas se presentan en la tabla 2. Dos de los pacientes recibieron tratamiento con eritropoyetina, sin objetivar beneficio. Las transfusiones de hematíes se realizaron para un nivel de Hb <7,5 g/dl; el nivel mínimo de Hb fue de 2,5 g/dl (VCM: 78,5 fl, HCM: 23,3 pg).

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Número de episodios</b>										
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>24</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>
<b>Ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico (g/kg/día)</b>										
Media	<b>0,29</b>	<b>0,55</b>	<b>0,79</b>	0,58	0,96	0,39	0,72	0,24	0,32	0,28
(sd)	<b>(0,14)</b>	<b>(0,25)</b>	<b>(0,29)</b>	(0,06)	(0,07)	(0,01)	(0,06)	(0,00)	(0,09)	(0,09)
<b>Min;max</b>	<b>0,11;0,17</b>	<b>0,17;0,89</b>	<b>0,4; 1,2</b>	0,5;0,65	0,87;1,1	0,38;0,41	0,6;0,3	0,24;0,24	0,21;0,36	0,16;0,36
<b>Ingesta de producto especial (mezcla de aminoácidos exenta de Val, Ile, Met, Tre) (g/kg/day)</b>										
Media	<b>1,23</b>	<b>1,97</b>	<b>1,58</b>	1,41	2	0,62	2,3	1,7	0,96	1,0
(sd)	<b>(0,23)</b>	<b>(0,33)</b>	<b>(0,2)</b>	(0,2)	(0,09)	(0,02)	(0,13)	(0,00)	(0,09)	(0,00)
<b>Min;max</b>	<b>0,92; 1,5</b>	<b>1,61; 2,77</b>	<b>1,33;1,93</b>	1,2;1,66	1,86;2,15	0,61;0,66	2,1;2,5	1,7; 1,7	0,91;1,07	1,0;1,0
<b>Porcentaje de proteína natural de alto valor biológico dentro de la ingesta proteica total (%)</b>										
Media	<b>19.1</b>	<b>22</b>	<b>33</b>	29,5	35,5	38	24	12	25	21,5
(sd)	<b>(8.5)</b>	<b>(9,5)</b>	<b>(10)</b>	(4,9)	(1,8)	(0,00)	(1,9)	(0,00)	(7)	(5,8)
<b>Min;max</b>	<b>7,2;28.5</b>	<b>7,4;35</b>	<b>17;44</b>	23;33	30; 36	38;38	19;26	12;12	16;29	14;26

Tabla 5. Analisis descriptivo del tratamiento nutricional. Los pacientes 1, 2 y 3 presentan anemia persistente grave.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Ferritina (ng/ml). VN: 20-250 ng/ml</b>										
Media	<b>429,1</b>	<b>873,1</b>	<b>556,2</b>	56	24,6	34,4	76	25	72,8	245
(sd)	<b>(223,6)</b>	<b>(768,1)</b>	<b>(657,2)</b>	(28,3)	(11,2)	(6,6)	(39)	(23)	(27,3)	(186)
Min; max	<b>124 ; 829</b>	<b>142 ; 2926</b>	<b>103 ; 2085</b>	24 ; 93	9 ; 50	28 ; 44	25 ; 139	10 ; 53	51 ; 103	111 ; 651
<b>Val (µmol/L). VN: 212±53 µmol/L</b>										
Media	<b>55</b>	<b>53,1</b>	<b>41,2</b>	73	77,7	77,2	38,5	138	118	57,4
(sd)	<b>(26,5)</b>	<b>(21,5)</b>	<b>(12,9)</b>	(11,5)	(17)	(11,2)	(11)	(67,5)	(17)	(15,5)
Min; max	<b>19 ; 100</b>	<b>12 ; 98</b>	<b>18 ; 56</b>	57 ; 84	41 ; 102	63 ; 88	25 ; 62	71 ; 206	99 ; 132	32 ; 81
<b>Ile (µmol/L). VN: 53±16 µmol/L</b>										
Media	<b>33,3</b>	<b>20,1</b>	<b>18,3</b>	30	25,5	26,6	23	97	37,6	57,4
(sd)	<b>(18,1)</b>	<b>(5,5)</b>	<b>(6,6)</b>	(5,4)	(6,6)	(1,1)	(7,5)	(53,6)	(5)	(15,5)
Min; max	<b>11 ; 67</b>	<b>10 ; 31</b>	<b>7 ; 29</b>	26 ; 38	14 ; 39	25 ; 28	13 ; 38	57 ; 158	33 ; 43	32 ; 81
<b>Leu (µmol/L). VN: 108±31 µmol/L</b>										
Media	<b>124,8</b>	<b>62,5</b>	<b>48,2</b>	63,5	66	58,4	73	94	70	105
(sd)	<b>(33,9)</b>	<b>(29,4)</b>	<b>(31,4)</b>	(10,6)	(24)	(5)	(23)	(40)	(8,7)	(9)
Min; max	<b>86 ; 174</b>	<b>24 ; 174</b>	<b>20 ; 138</b>	53 ; 78	42 ; 128	51 ; 64	40 ; 105	52 ; 131	60 ; 77	88 ; 113
<b>Val/Leu</b>										
Media	<b>0,46</b>	<b>1,01</b>	<b>1,05</b>	1,17	1,3	1,3	0,5	1,44	1,69	0,56
(sd)	<b>(0,27)</b>	<b>(0,48)</b>	<b>(0,37)</b>	(0,24)	(0,41)	(0,16)	(0,2)	(0,11)	(0,03)	(0,2)
Min; max	<b>0,11 ; 1,09</b>	<b>0,06 ; 1,7</b>	<b>0,13 ; 1,65</b>	0,9 ; 1,43	0,32 ; 1,78	1,15 ; 1,54	0,23 ; 0,87	1,36 ; 1,57	1,65 ; 1,71	0,28 ; 0,92
<b>Ile/Leu</b>										
Media	<b>0,27</b>	<b>0,36</b>	<b>0,41</b>	0,47	0,42	0,45	0,32	1,4	0,53	0,26
(sd)	<b>(0,15)</b>	<b>(0,12)</b>	<b>(0,08)</b>	(0,06)	(0,13)	(0,04)	(0,05)	(1,4)	(0,05)	(0,05)
Min; max	<b>0,06 ; 0,59</b>	<b>0,12 ; 0,6</b>	<b>0,21 ; 0,5</b>	0,42 ; 0,54	0,11 ; 0,54	0,42 ; 0,52	0,25 ; 0,41	0,57 ; 3,04	0,48 ; 0,59	0,19 ; 0,36

Tabla 6. Analisis descriptivo de los niveles de ferritina y de los aminoácidos ramificados

La hiperferritinemia se asocia con niveles más disminuidos de Val (p-valor < 0,001, coeficiente de correlación (95% C.I): -8,6 (-12,3 ; -4,8)) y con niveles más altos de Leu (p-valor 0.001, coeficiente de correlación (95% C.I): 5,6 (2,2 ; 9,1)), ver Figura 23 y Tablas 6 y 7. Una asociación negativa se observa también entre las ratios Val/Leu (p-value < 0,001, correlation coefficient (95% C.I): -771,5 (-987,4 ; -555,5)) e Ile/Leu (p-valor: 0,018, coeficiente de correlación (95% C.I): -431 (-788,6 ; -73,3)) con la ferritina, los que sugiere que el desbalance de los aminoácidos ramificados tiene un potencial deletéreo sobre la producción hematopoyética. La

ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico se correlaciona negativamente con los niveles plasmáticos de ferritina (p-valor: 0.003, coeficiente de correlación (95% C.I): 72,1 (-119,6 ; -24,5), mientras que la prescripción del producto especial exento de aminoácidos propiogénicos se asocia significativamente con sobrecarga de hierro (p-valor: 0.019, coeficiente de correlación (95% C.I): -431 (-788,6 ; -73,3), ver Figura 23 y Tablas 6 y 7.

Tabla 7. Correlación entre los parámetros nutricionales y los niveles de aminoácidos ramificados con la ferritina mediante regresión lineal multinivel.

	Coeficiente de correlación (95% C.I)	<i>p</i> -valor
Ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico (g/kg/día)	-72,1 (-119,6 ; -24,5)	<b>0,003</b>
Ingesta de product especial (mezcla de aminoácidos exenta de Val/Ile/Tre/Met) (g/kg/día)	37,8 (6,1 ; 69,5)	<b>0,019</b>
Valina (µmol/L)	-8,6 (-12,3 ; -4,8)	<b>&lt;0,001</b>
Isoleucina (µmol/L)	-5,2 (-12 ; 1,5)	n.a.
Leucina (µmol/L)	5,6 (2,2 ; 9,1)	<b>0,001</b>
Valina/Leucina	-771,5 (-987,4 ; -555,5)	<b>&lt;0,001</b>
Isoleucina/Leucina	-431 (-788,6 ; -73,3)	<b>0,018</b>

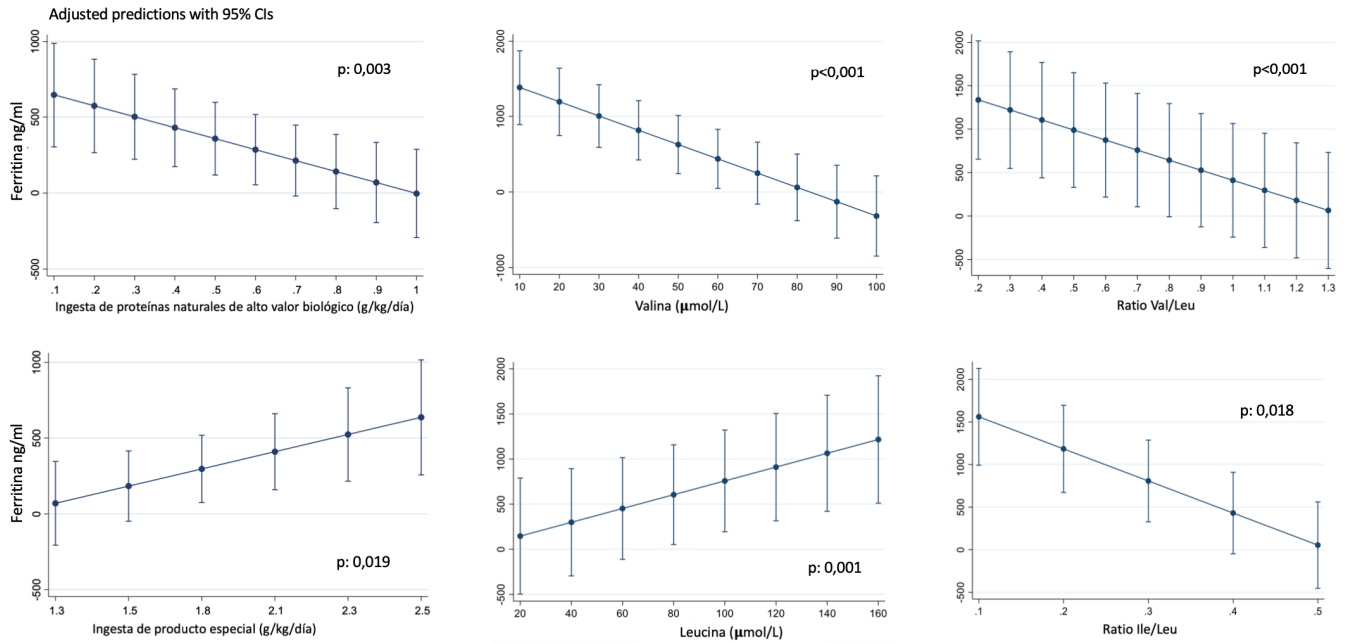


Figura 23: Correlación entre los parámetros nutricionales y los niveles de aminoácidos ramificados con la ferritina mediante regresión lineal multinivel.





## II.2 Complicaciones gastrointestinales. Pancreatitis

Hemos identificado 7 episodios de alteraciones pancreáticas en 4 pacientes (ver Tabla 8):

- 3 episodios de pancreatitis coincidiendo con hiperamonemia en contexto de descompensación metabólica durante episodios de bacteriemia con gérmenes intestinales (1 bacteriemia por *Escherichia coli*, 2 bacteriemias por *Enterococcus faecalis*)
- 1 episodio de pancreatitis en contexto de hipertrigliceridemia (2.925 mg/dl (VN: 25-200)).
- En otros 3 episodios no se ha podido identificar una causa evidente

Los episodios de pancreatitis cursaron con aumento de la lipasa pancreática (mínimo >3 veces normal), dolor abdominal e imagen radiológica. Los niveles de amilasa pancreática fueron normales o bajos en todos los pacientes durante el periodo de seguimiento, incluso coincidiendo con hiperlipasemia. Una paciente presentó únicamente un aumento transitorio de la lipasa (3 veces por encima de lo normal), sin clínica ni imagen radiológica compatible con pancreatitis.

El perfil metabólico de los aminoácidos evidenció una correlación significativa de la lipasa con niveles disminuidos de citrulina y elevados de ornitina, valina y treonina; también hemos observado correlación entre el aumento de la lipasa y niveles más altos de metilcitrato en orina, ver Tabla 9.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes durante los episodios de pancreatitis aguda

Paciente /sexo	Edad episodio pancreatitis (años)	Descompensación	Lipasa (VN: 8-78)	Amilasa (VN: 30-100)	Clínica	Prueba de imagen	Otros hallazgos
1/M	3	hiperNH4 leve (max 100 umol/L)	Max 1408	Normal/baja (6-18)	Vómitos, estreñimiento (10 días)	TAC abdominal normal	Bacteriemia por <i>Escherichia coli</i> relacionada con catéter central
	3.3	hiperNH3 leve (max 130 umol/L)	Max 2275	Minima elevación (ma 128)	Vómitos, estreñimiento (5 días)		Bacteriemia por <i>Enterococo faecalis</i> relacionada con catéter central
2/ F	8	no	Max 158	normal	Dolor abdominal	Eco abdominal: Alteración difusa de la ecoestructura glandular pancreática, con glándula de aspecto trabeculado, pero sin atrofia del parénquima glandular que sugiere afectación inflamatoria crónica.	hiperTG: 2925 mg/dl (VN: 25-200) hiperCol: 578 mg/dl
	8.5	no	Max 265	normal	Dolor abdominal, vómitos	Eco abdominal: pancreatitis focal con afectación únicamente de la porción cefálica y secundariamente de la grasa adyacente y de las paredes duodenales	no
	10	no	Max 313	normal	Dolor abdominal, vómitos incoercibles, sospecha CIPO	Eco abdominal normal	Alcalosis metabólica hipoCl (pH: 7.5, Cl: 90 mmol/L, K: 2.3; ionotest normal
3/F	26	hiperNH3 (max 190 umol/L)	Max 550 U/L	normal	Dolor abdominal	Eco abdom: barro biliar ColangioRM hepato-pancreática: dilatación del conducto pancreático; leve atrofia de cola pancreática	Bacteriemia por <i>Enterococo faecalis</i> relacionada con catéter central
4/F	10	no	536 U/L	normal	no	Eco abdominal normal	No

Tabla 9. Análisis descriptivo del perfil de aminoácidos relacionado con niveles altos de lipasa sérica (0: lipasa normal, 1: lipasa alta). Los coeficientes de correlación y el p-valor se han obtenido mediante regresión lineal.

	Validos		Media/ Desviación estándar		Coeficiente de correlación	p-valor
	0	1	0	1		
<b>Citrulina</b>	66	13	15 ±6	9±5	-0,33	<b>0,002</b>
<b>Lisina</b>	67	13	164±78	145±60	0,04	n.a.
<b>Arginina</b>	67	13	38±20	30±13	-0,03	n.a.
<b>Ornitina</b>	67	13	45±28	59±50	0,35	<b>0,001</b>
<b>Triptofano</b>	67	13	45±21	26±14	-0,2	n.a.
<b>Tirosina</b>	67	13	57±27	48±18	-0,01	n.a.
<b>Fenilalanina</b>	67	13	50±27	44±14	0,03	n.a.
<b>R. Fischer</b>	67	13	1.9±1.1	2.1±1.3	0,13	n.a.
<b>Valina</b>	67	13	78±46	85±87	0,23	<b>0,03</b>
<b>Isoleucina</b>	67	13	45±78	36±31	0,01	n.a.
<b>Metionina</b>	67	13	14±5	14±7	0,07	n.a.
<b>Leucina</b>	67	13	89±74	88±60	0,11	n.a.
<b>Treonina</b>	67	13	55±22	69±41	0,31	<b>0,004</b>
<b>Glutamina</b>	67	13	369±95	370±137	0,1	n.a.
<b>Alanina</b>	67	13	323±103	267±156	-0,09	n.a.
<b>Glicina</b>	67	13	654±310	510±220	-0,11	n.a.
<b>Metilcitrato</b>	60	10	246±655	970±2813	0,38	<b>&lt;0,001</b>
<b>3OH propionico</b>	60	10	795±1230	873±1520	0,005	n.a.
<b>Lactato</b>	60	10	96±236	617±1449	0,14	n.a.
<b>OLCFAs</b>	45	7	4.9±2.8	4.7±2.8	-0,13	n.a.



### II.3.- Complicaciones cardiológicas

En nuestra muestra hemos identificado 3 pacientes con cardiomiopatía dilatada. No hemos observado otro tipo de complicaciones cardiológicas.

- Paciente varón de 4 años, con múltiples episodios de descompensación y retraso psicomotor severo secundario a hiperamoniemia neonatal grave, que presenta en un control cardiológico de rutina leve dilatación de cavidades izquierdas (DDVI z-score +0,44, DSVI z-score +0,71, FE: 65%) y que progresa en los siguientes 6 meses aunque mantiene función cardíaca preservada (DDVI z-score +2, DSVI z-score +2,6, hipokinesia apical y septal, IT e IM moderadas, FE:50%). El paciente falleció por sepsis al poco tiempo.
- Paciente mujer de 32 años en la que, a los 11 años, coincidiendo con aceptable control metabólico previo, se detecta miocardiopatía discretamente dilatada (dilatación leve de las cavidades izquierdas, con IM leve y función preservada), con extrasístoles ventriculares trigeminadas y QT largo (490 mseg). Los hallazgos han remitido en la actualidad y no presenta datos de cardiomiopatía.
- Mujer de 32 años con cardiomiopatía dilatada leve detectada a los 9 años, en tratamiento con digoxina; actualmente remisión del cuadro, sin datos de cardiomiopatía.



## II.4 Complicaciones neurológicas

**Retraso psicomotor.** En nuestra muestra 3/10 pacientes tienen un retraso psicomotor severo evidente desde los primeros meses de vida y probablemente secundario a episodios de hiperamoniemia neonatal (140 -950  $\mu\text{mol/L}$ ). Una paciente tiene un retraso moderado, pero con buena interacción con el medio y adecuado desarrollo del lenguaje. Dos pacientes tienen un retraso leve, pero han precisado educación especial. En un caso el desarrollo psicomotor inicial fue normal, pero a partir del segundo año de vida se hace evidente sintomatología del espectro autista. Las tres pacientes restantes han tenido una escolarización normal, generalmente precisando apoyo. Una de ellas está cursando estudios universitarios.

**Trastorno de espectro autista.** Un paciente varón fruto de embarazo normal y padres consanguíneos presenta trastorno grave de espectro autista. Cabe destacar que este paciente se ha detectado mediante el cribado neonatal ampliado y no ha tenido nunca episodios de descompensación metabólica grave. Los estudios realizados hasta la fecha, incluyendo paneles genéticos específicos, no han detectado otras causas para su sintomatología.

**Epilepsia.** 2/10 pacientes han presentado crisis en el contexto de descompensaciones metabólicas con hiperamoniemia. Ambos pacientes fueron tratados con medicación antiepiléptica que se pudo retirar por el buen control de las crisis.

### **Otras complicaciones neurológicas:**

- Coreatetosis. Paciente varón, con diagnóstico neonatal, que, a los 4 años, sin descompensación metabólica, presenta movimientos de tipo coreoatetosis. En la



resonancia magnética (RM) craneal se objetivan lesiones en los ganglios basales (núcleos dentados y putamen).

- Neuropatía periférica grave de causa indeterminada de inicio a los 12 años de vida en una paciente que no había tenido descompensaciones desde los primeros años de vida. Persiste sin cambios tras 15 años de evolución.
- Sordera neurosensorial en un paciente varón con hiperamoniemia neonatal y retraso psicomotor grave secundario. La sordera se detectó mediante los potenciales evocados al año de vida.
- Episodios psicóticos sin relación con episodios de hiperamoniemia en una paciente de inicio a los 30 años de vida, con buena evolución.

#### **Alteraciones en la neuroimagen (resonancias magnéticas craneales):**

La resonancia magnética craneal se realizó en contexto de clínica neurológica reciente (ej.: trastorno de movimientos, epilepsia, psicosis etc)

- Atrofia cortical: 3/10 pacientes (2 con retraso psicomotor severo y 1 con retraso leve)
- Lesiones de la sustancia blanca subcortical: 2/10 pacientes, ver Figura 24.
- Lesiones de los ganglios basales (núcleos dentados y putámenes) en el paciente con coreoatetosis, ver Figura 24.

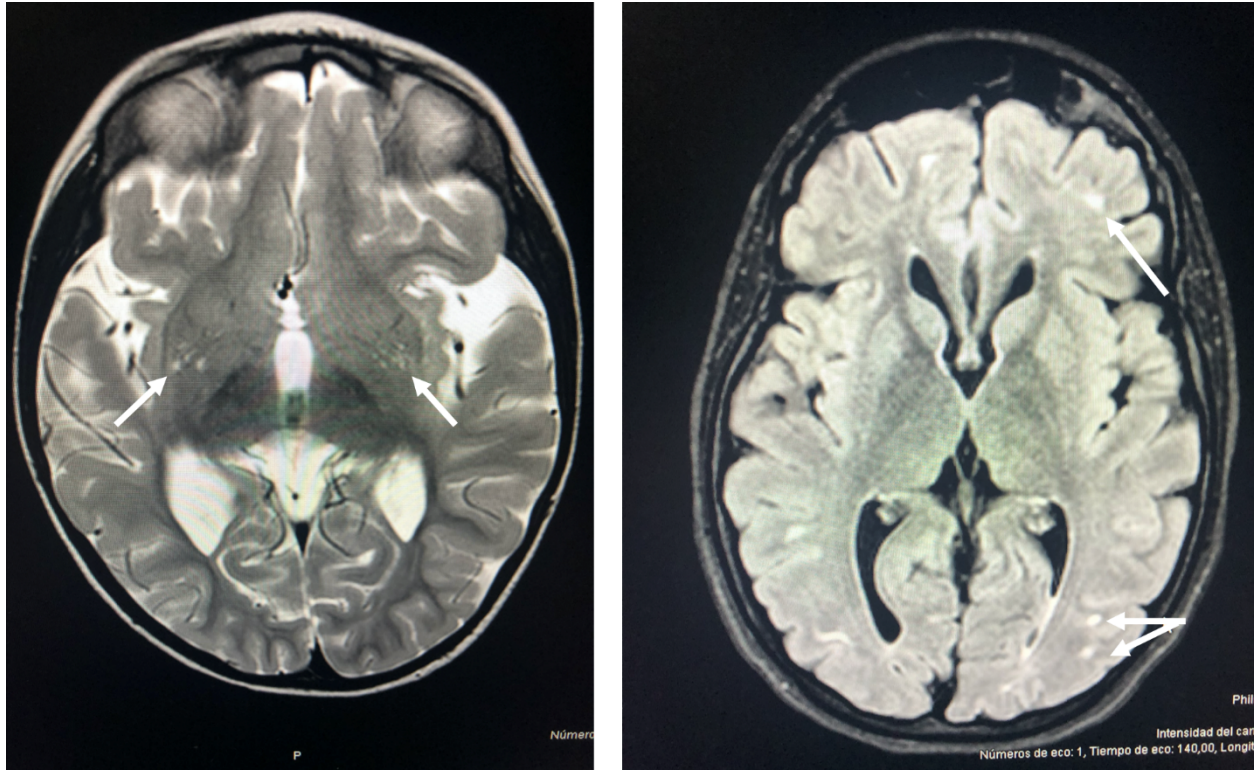


Figura 24: izquierda - lesiones bilaterales en ganglios basales (putamen); derecha: lesiones de sustancia blanca y atrofia cortical

**III. Seguimiento a largo plazo con muestras de papel filtro en pacientes**  
**con acidemia propiónica**

Se han incluido en el estudio los pacientes con AP en seguimiento en nuestra unidad entre los años 2015-2017. Se ha analizado 163 muestras en sangre papel (*dried blood spot*, DBS) y 119 muestras en orina papel (*dried urine spot*, DUS), que se han comparado con 160 muestras de plasma y 103 muestras de orina; 63 muestras de plasma se han procesado para detectar los niveles de OLCFAs. Las muestras correspondieron a 148 episodios de estabilidad metabólica y 40 episodios de descompensación (22 episodios de descompensación con cetosis y 18 episodios de descompensación con hiperamonemia). Se han comparado las muestras líquidas (plasma y orina) utilizadas habitualmente en el seguimiento de estos pacientes para determinar la validez de la utilización de este nuevo método de obtención y análisis de las muestras. El perfil metabólico de los pacientes se presenta en las Figuras 25-28, así como en la Tabla 10.

Aminoácidos. Los niveles de aminoácidos ramificados (AARR) fueron correctamente estimados en DBS comparando en plasma (p-valor 0,03 para Ile y Val, p-valor 0,001 para Leu). Durante las crisis metabólicas se ha observado un aumento significativo de los AARR (p-valor <0,001 para Ile y Val, p-valor: 0,04 para Leu), lo que refleja el aumento del catabolismo y cetogénesis (ver Tabla 10 y Figura 25). Otros aminoácidos no tuvieron buena correlación plasma-DBS y no se han observado cambios significativos durante las descompensaciones.

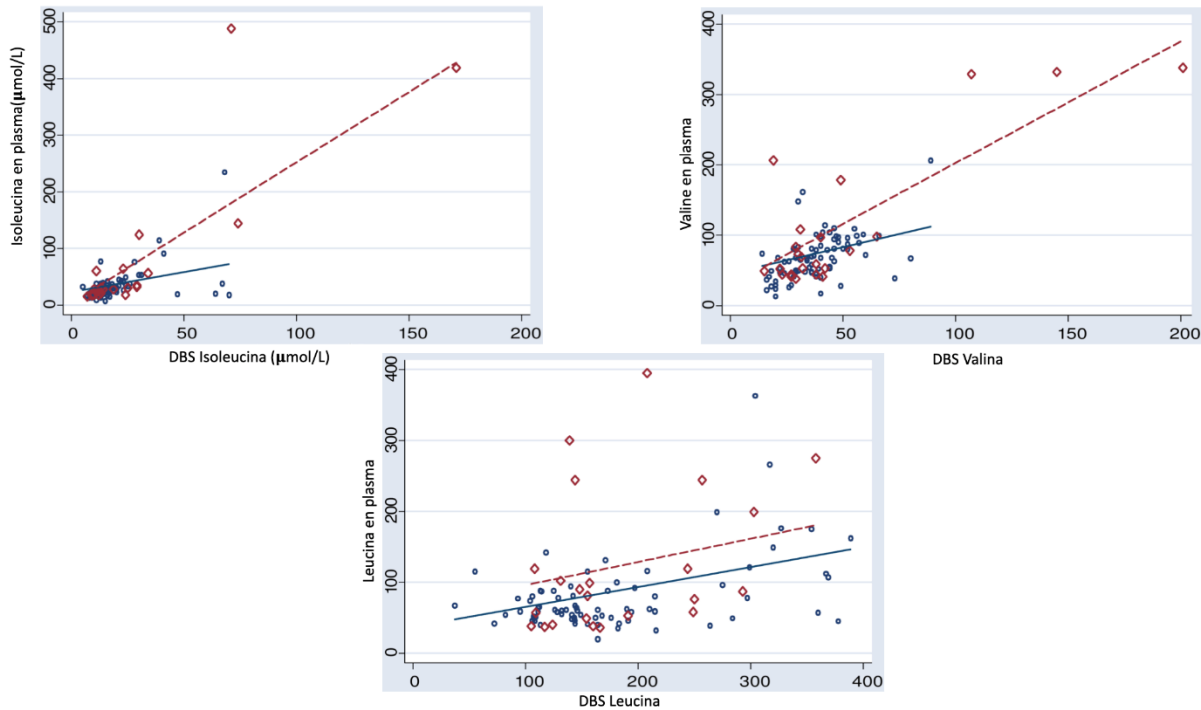


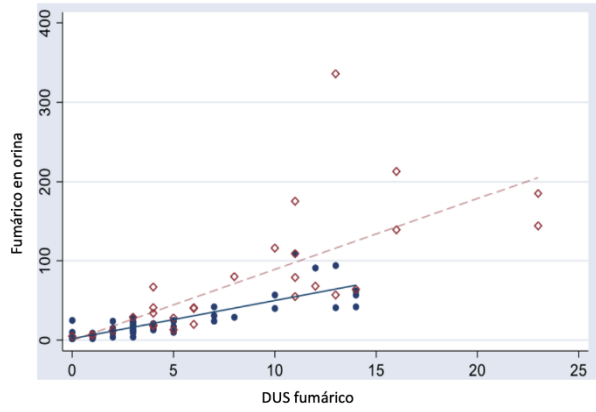
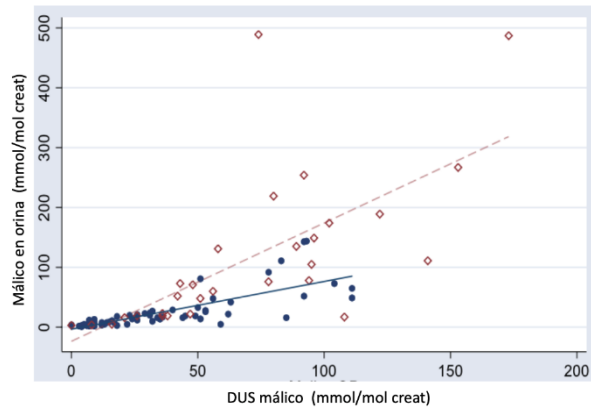
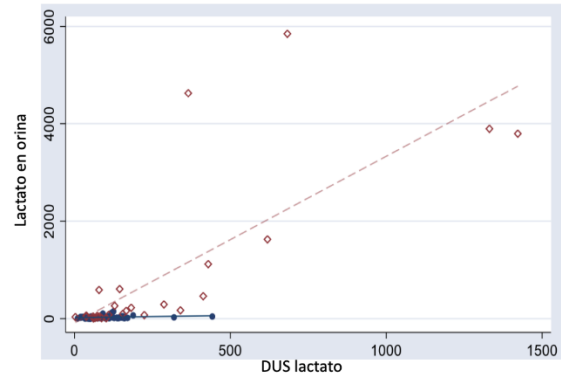
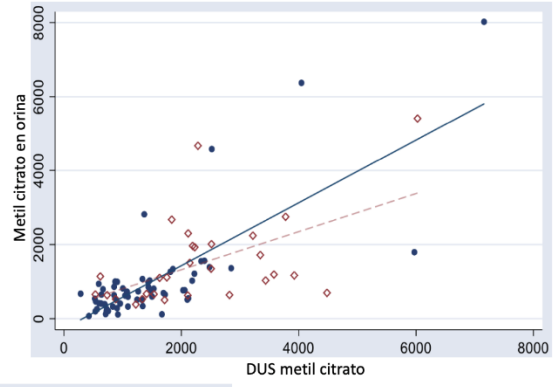
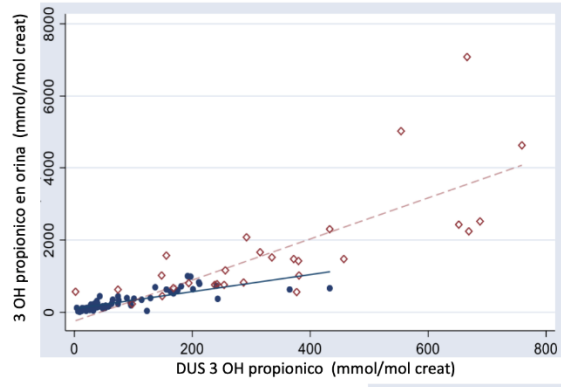
Figura 25. Aminoácidos ramificados. Correlación de las muestras líquidas (plasma) y las muestras en papel (DBS) utilizando el modelo mixto de regresión lineal durante la estabilidad metabólica (○) y en descompensación (◇).

Ácidos orgánicos. Las determinaciones en DUS y orina líquida tuvieron una buena correlación y reflejaron correctamente el estado metabólico de los pacientes. Como era de esperar, se ha observado un aumento significativo en orina de varios ácidos orgánicos durante las crisis metabólicas, que fue estadísticamente significativo en el caso del ácido 3 OH propiónico (p-valor < 0,001), ácido metil cítrico (p-valor 0,04), lactato (p-valor < 0,001), tigililglicina (p-valor < 0,001), ácido 2-metil-3OH butírico (p-valor < 0,001), fumárico (p-valor < 0,001) y málico (p-valor < 0,001), ver Tabla 10 y Figura 26. En cuanto a la propionil glicina, un importante marcador de la

AP, hemos observado una buena correlación en el modelo univariante (p-valor < 0,001), pero sin interacción significativa, ver Figura 27.

	Estabilidad metabólica		Descompensación metabólica	
	Coefficiente de regression	p-valor	Coefficiente de regression	p-valor
<b>Ácido 3 OH propionico</b>	2.36 (0.79;3.93)	0.003	5.68 (4.63;6.73)	<0.001
<b>Ácido metil citrico</b>	0.85 (0.66;1.03)	0.04	0.51 (0.24;0.77)	<0.001
<b>Ratio citrato/metilcitrato</b>	0.86 (0.67;1,06)	<0.001	-0.24 (-1.08;0.6)	0.57
<b>Lactato</b>	0.08 (-1,88;2,06)	0.93	3.41 (2.82;4.01)	<0.001
<b>Ácido 2metil 3hidroxi butirico</b>	0.08 (-0,7;0,87)	0.83	1.08 (0.68;1.47)	<0.001
<b>Tigilil glicina</b>	1.94 (-0.9;4.8)	0.18	6.97 (5.45;8.50)	<0.001
<b>Ácido fumárico</b>	4.8 (2.92; 6.68)	<0.001	8.9 (7.06; 10.78)	<0.001
<b>Ácido málico</b>	0.80 (0.35;1.25)	<0.001	2.00 (1.50; 2.45)	<0.001
<b>Isoleucina (Ile)</b>	0.7 (0.65;1.35)	0.03	2.50 (2.00;3.00)	<0.001
<b>Leucina (Leu)</b>	0.30 (0.10;0.45)	<0.001	0.30 (0,15; 0,65)	0.04
<b>Valina (Val)</b>	0.75 (0.25;1.20)	0.03	1.70 (1.45; 2.00)	<0.001

Tabla 10. Regresión lineal del modelo multivariante (interacción significativa)



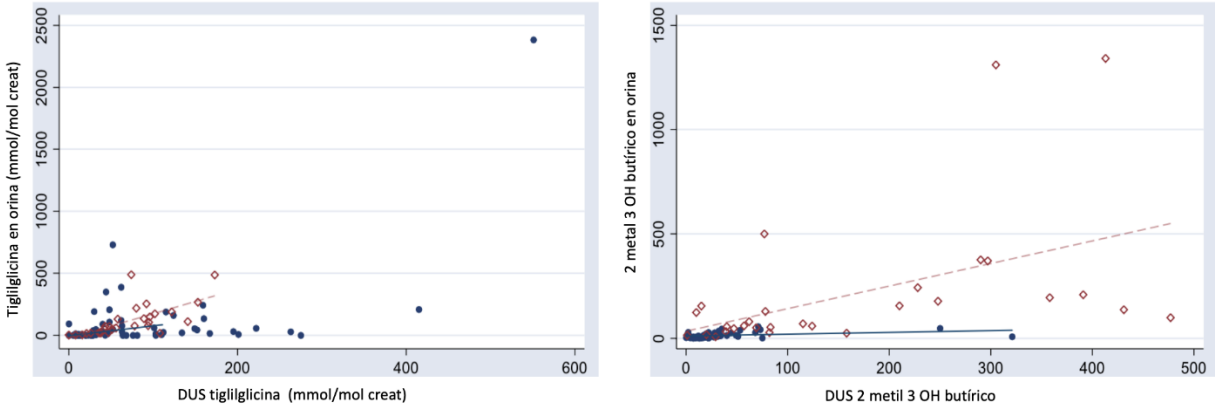


Figura 26. Ácidos orgánicos. Correlación de las muestras líquidas (orina) y las muestras en papel (DUS) utilizando el modelo mixto de regresión lineal durante la estabilidad metabólica (○) y en descompensación (◇).

Acilcarnitinas. Hemos detectado una asociación significativa entre los niveles de carnitina libre y la propionil carnitina en las muestras de plasma y DBS en el modelo univariante ( $p$ -valor < 0,001 para ambos marcadores, ver Figura 27). El modelo univariante se ha utilizado en caso de ausencia de la interacción con los episodios de descompensación metabólica.

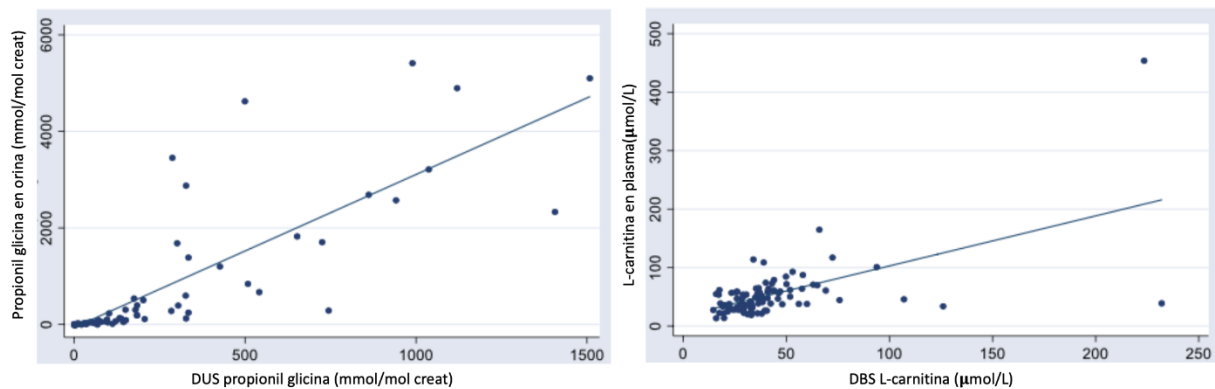


Figura 27. Correlación entre las muestras líquidas (plasma/orina) y las muestras en papel (DBS y DUS) utilizando el modelo univariante de regresión lineal (sin interacción).



Ácidos grasos de cadena impar larga (odd-numbered long chain fatty acids, OLCFAs). Las variaciones en los valores de OLCFAs se han propuesto como un marcador útil en el seguimiento a largo plazo de los pacientes con AP<sup>44</sup>. Se pueden detectar en plasma o en eritrocitos, pero no en DBS. Sin embargo, en las muestras de DBS hemos identificado las acilcarnitinas de cadena larga impar (C14:1-OH + C15, C16:1-OH + C17, C16:2-OH + C17:1), cuya suma se expresa como un valor único. Hemos observado una fuerte asociación entre la suma de las acilcarnitinas de cadena larga impar y los OLCFAs en plasma con un p-valor < 0,001 (IC. 95% (5.41; 10.95), coeficiente de regresión: 8.2) por lo que podrían considerarse equivalentes, ver Figura 28.

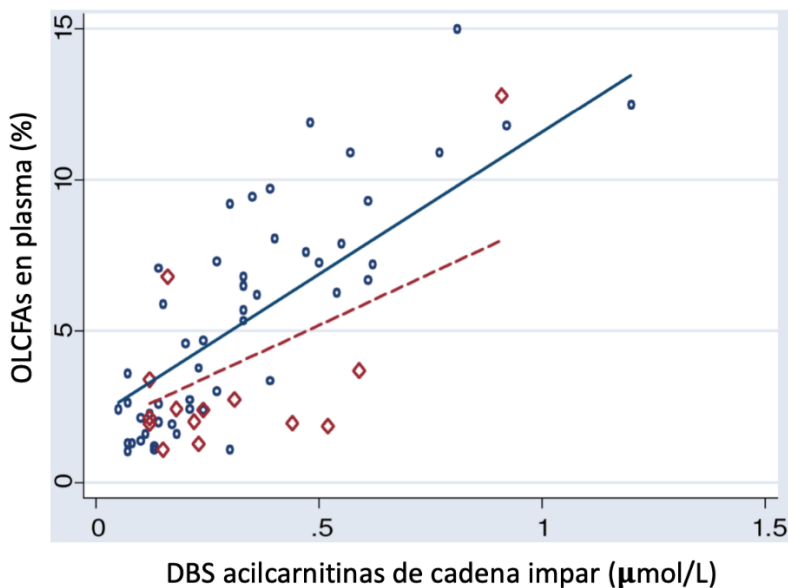


Figura 28. Asociación OLCFAs con la suma de acilcarnitinas de cadena larga impar en DBS utilizando el modelo mixto de regresión lineal durante la estabilidad metabólica (○) y en descompensación (◇).

IV. Detección del estado plasmático de CoQ10 y el posible beneficio del tratamiento con ubiquinol en los pacientes con Acidemia propiónica.

Para este estudio se han incluido sólo 7 de los 10 pacientes con AP en seguimiento en el Hospital Ramón y Cajal. La edad al inicio del estudio fue de 2,5-20 años. El tratamiento fue bien tolerado, sin efectos adversos notificados y no ha habido ninguna pérdida durante el estudio. A lo largo de los 6 meses de seguimiento, hubo tres episodios de ingreso hospitalario por una pancreatitis, una bacteriemia y un episodio de hiperamonemia leve (90  $\mu\text{mol/L}$ ) por transgresiones dietéticas. No se han objetivado datos de cardiomiopatía, atrofia de nervio óptico o clínica neurológica de reciente aparición durante el estudio.

Niveles plasmáticos de CoQ10. Al inicio del estudio, 6/7 pacientes tenían niveles basales plasmáticos disminuidos de CoQ10. Durante el tratamiento con ubiquinol, se ha observado un aumento significativo de los niveles plasmáticos de CoQ10 comparando con el basal (p-valor: 0,04 a los 3 meses de tratamiento, p-valor: 0,01 a los 6 meses de tratamiento), indicando la eficacia en alcanzar niveles plasmáticos con el suplemento, ver Figura 29 y Tabla 11.

Aminoácidos. Hemos valorado los aminoácidos implicados en la anaplerosis (glutamato, glutamina, alanina y lisina), sin objetivar cambios estadísticamente significativos en sus niveles plasmáticos; tampoco se han observado variaciones importantes de la glicina, ver Figura 29 y Tabla 11.

Ácidos orgánicos. El efecto más notable fue la elevación del ácido cítrico, pero sin llegar a alcanzar una significación estadística (p-valor: 0,07), probablemente por la escasa muestra de pacientes o el corto tiempo de evolución. En el caso del metilcitrato, unos de los ácidos orgánicos al que más toxicidad se le ha atribuido, ha habido una discreta disminución en la excreción sin significación estadística (p-valor: 0,6), ver Figura 30a. Otros metabolitos específicos de la AP, como el 3OH propiónico, se han mantenido elevados y no han cambiado durante el estudio. La

excreción urinaria de los demás ácidos orgánicos del ciclo Krebs y del lactato se mantuvo estable, sin cambios significativos, ver Figura 30a y 30b y Tabla 11.

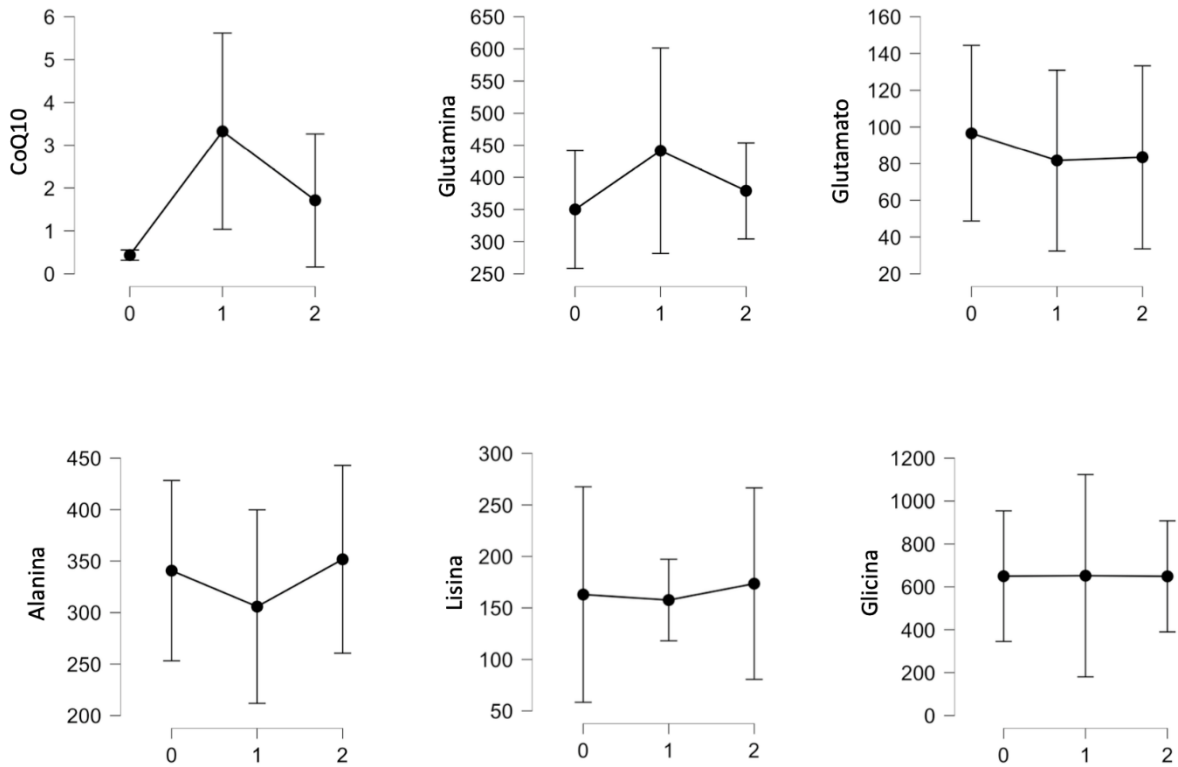


Figura 29. Evolución de los niveles plasmáticos de CoQ10 ( $\mu\text{mol/L}$ ) y de los aminoácidos ( $\mu\text{mol/L}$ ) a lo largo del tratamiento. (0: niveles basales, 1: a los 3 meses; 2: a los 6 meses).

	<b>N</b>		
	<b>Media (SD)</b>		
	Basal (0)	3 meses (1)	6 meses (2)
<b>CoQ10 (μmol/L)</b>	N=7	N=7	N=6
<b>VN: 0,91 ± 0,35</b>	0,436 (0,13)	3,327 (2,477)	1,713 (1,48)
<b>Glutamina (μmol/L)</b>	N=7	N=7	N=6
<b>VN: 440 ± 99</b>	350 (99,1)	441,5 (152,3)	379 (80,8)
<b>Glutamato (μmol/L)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 49 ± 28</b>	96,5 (51,7)	1,6 (46,9)	83,4 (53,9)
<b>Alanina (μmol/L)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 283 ± 88</b>	340,7 (94,6)	305,9 (89,5)	351,7 (98,5)
<b>Lisina (μmol/L)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 132 ± 32</b>	160 (113,1)	157,6 (37,7)	173,5 (100,5)
<b>Glicina (μmol/L)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 209 ± 66</b>	649,7 (329)	652 (449,4)	649 (259,9)
<b>Lactato (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 1-113</b>	38,2 (30,2)	25,3 (12,8)	62,8 (60,8)
<b>3OHpropiónico (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 5-27</b>	354,8 (337,8)	422,3 (580,5)	412,5 (274,4)
<b>α -cetoglutarato (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 17-492</b>	129,4 (130,3)	182,8 (246,1)	124,8 (115,2)
<b>Citrato (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 205-1735</b>	1823,8 (1458,6)	2285,6 (1168,9)	3752,7 (1921,2)
<b>Metilcitrato (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 1-13</b>	1451,4 (2438,8)	428,5 (369,1)	640,2 (447)
<b>Citrato/ metilcitrato</b>	N=7	N=6	N=7
	3,03 (2,71)	12,75 (12,47)	10,20 (12,18)
<b>Fumarico (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 0-17</b>	32,2 (35,7)	25,5 (45,2)	46,5 (56,6)
<b>Malico (mmol/mol creat)</b>	N=7	N=6	N=7
<b>VN: 0-35</b>	52 (66,1)	54,8 (104,1)	97,8 (174,3)
<b>Succinico (mmol/mol creat)</b>	N=6	N=6	N=6
<b>VN: 3-80</b>	55,8 (58,5)	50,8 (25,7)	50 (3,9)

Tabla 11. Análisis descriptivo de los parámetros metabólicos valorados a lo largo del estudio

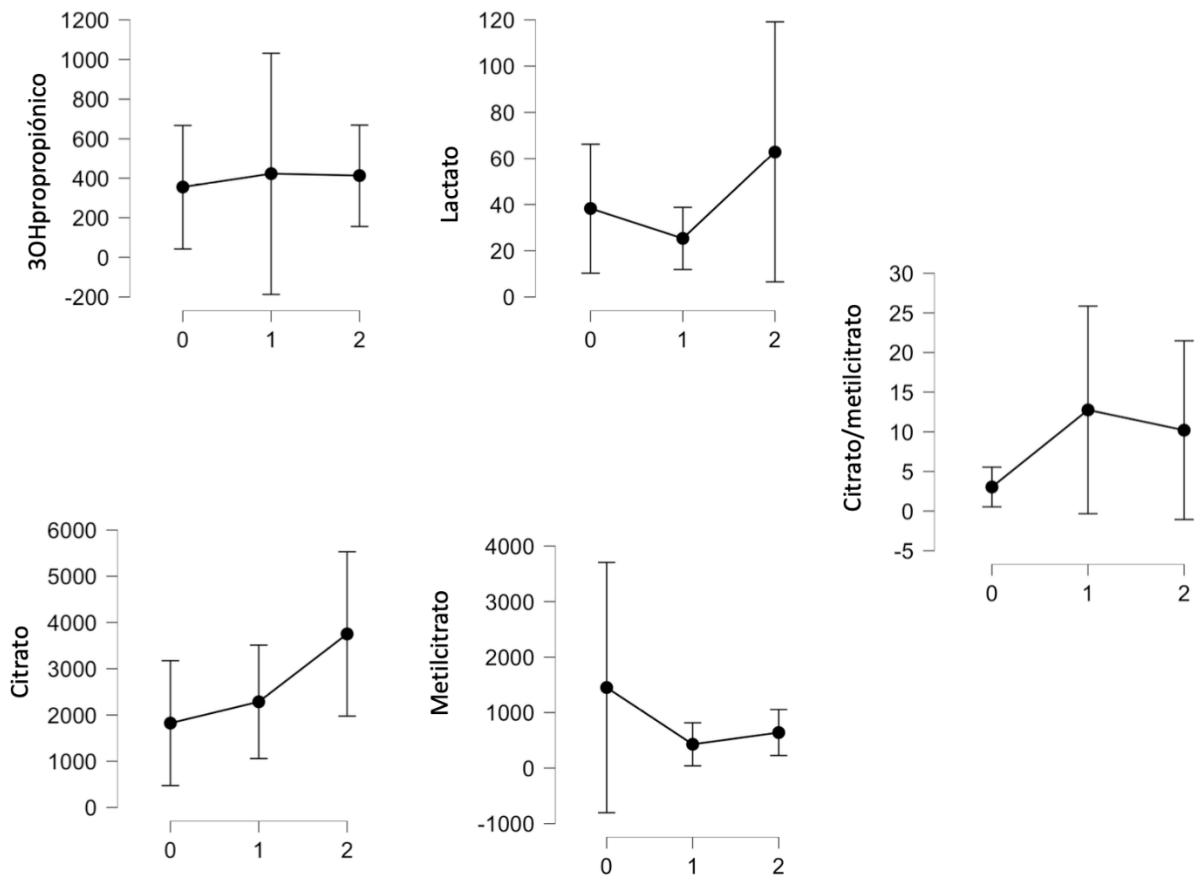


Figura 30a. Evolución de los niveles de ácidos orgánicos en orina (mmol/mol creatinina) (0: niveles basales, 1: a los 3 meses; 2: a los 6 meses).

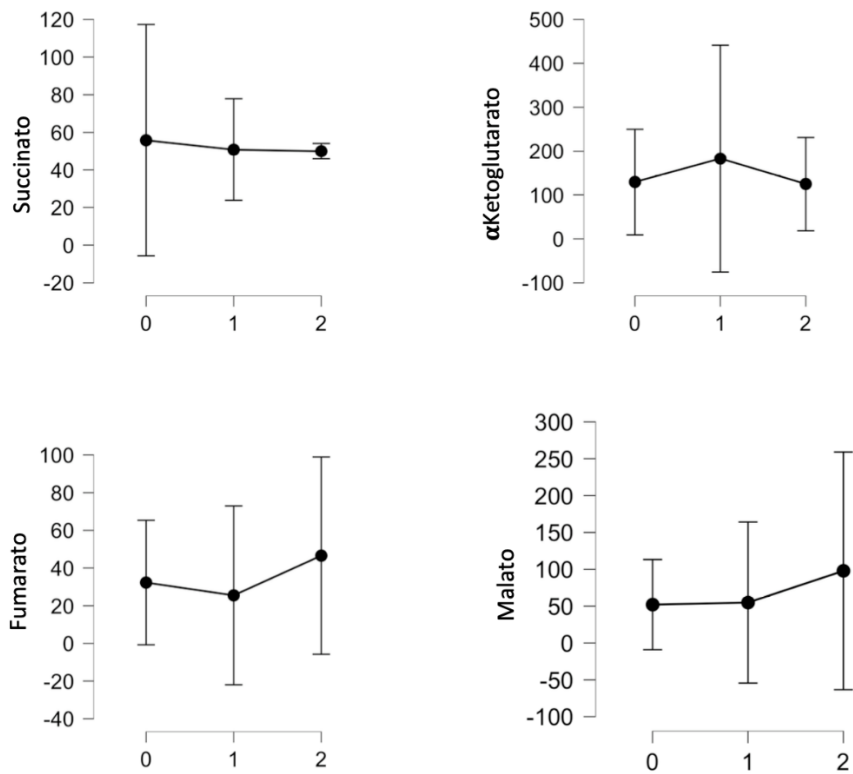


Figura 30b. Evolución de los niveles de ácidos orgánicos en orina (mmol/mol creatinina) (0: niveles basales, 1: a los 3 meses; 2: a los 6 meses).





## **DISCUSIÓN**

- I. **Discusión sobre caracterización del perfil de los aminoácidos plasmáticos durante un episodio de descompensación aguda**

## **I.1. Consideraciones sobre el papel central del músculo y la anaplerosis deficiente en la fisiopatología de la Acidemia propiónica.**

El músculo esquelético participa activamente en el metabolismo de los aminoácidos tanto en periodos de ayuno como durante el ejercicio, manteniendo y produciendo cantidades importantes de sustratos para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Por lo tanto, el metabolismo muscular de los aminoácidos juega un papel central en el metabolismo energético, no como fuente directa de energía como la glucosa o los ácidos grasos, sino como sustrato anaplerótico para el CAT<sup>16</sup>.

A diferencia del hígado que puede metabolizar la gran parte de los 20 aminoácidos, el músculo tiene aparato enzimático solamente para la oxidación de 6: los tres aminoácidos ramificados (Leu, Val, Ile), Glutamato, Aspartato (Ast) y Asparagina (Asn)<sup>16</sup>. El músculo es el principal sitio para la síntesis de Glutamina (Gln) y Alanina (Ala) a través de reacciones de transaminación de los aminoácidos ramificados (AARR)<sup>20,21</sup>. Estudios antiguos demostraron que la infusión de AARR en el músculo de rata resulta en una síntesis masiva de Glutamina (Gln) y Alanina (Ala)<sup>137</sup>. El músculo esquelético libera en plasma cantidades mucho más altas de Gln y Ala (hasta 48% de Gln total en plasma y hasta 32% de la Ala), de lo que se esperaría por su composición proteica (7% Gln, 9% Ala), lo que sugiere una síntesis muscular *de novo* de estos dos aminoácidos<sup>138</sup>.

La Gln es el producto final principal del metabolismo proteico muscular, tanto en ayuno como postprandial. Hay que recordar que la Gln es el aminoácido más abundante en el plasma:

600-700  $\mu\text{M}$  y que la tasa de síntesis de Gln en el músculo esquelético es más alta que la de cualquier otro aminoácido<sup>138</sup>. El motivo para esta síntesis masiva de Gln sugiere el papel importante que juega en otros órganos. En palabras de Hans Krebs: “Hay que buscar los motivos para la síntesis muscular de Gln en los efectos en otros órganos (...)”<sup>138</sup>.

En el estado postabsortivo y tras ingesta de una comida proteica, el músculo libera grandes cantidades de Gln y Ala sintetizadas a partir de los aminoácidos ramificados como donantes de grupo amino<sup>20,21</sup>. Solamente la Leu y parcialmente la Ile participan en reacciones de oxidación en el músculo para formar acetyl CoA. La Val y el resto de la Ile entran en reacciones de transaminación para formar Gln/Ala y sustratos anapleróticos para el ciclo de Krebs<sup>138</sup>. Durante el ejercicio intenso, cuando los depósitos de glicógeno se agotan, la anaplerosis se sostiene por la oxidación de la Leu y por la proteólisis muscular que libera grandes cantidades de aminoácidos; la deaminación de estos aminoácidos produce Gln y mantiene la anaplerosis<sup>138</sup>, ver Figura 31.

La función más importante de la Gln parece ser la detoxificación del amonio, sirviendo como medio de transporte para el  $\text{NH}_4$  hasta los órganos diana (hígado y riñón). Los hepatocitos periportales tienen alta afinidad para Gln que es deaminada para formar Glu +  $\text{NH}_4$ <sup>55</sup>. Sin embargo, gran parte de la Gln es captada por el enterocito en donde se deamina y participa como Glu en la síntesis de Pro y Orn/Cit/Arg. La captación intestinal de Gln se sigue de un aumento de Cit en el área esplácnica<sup>139</sup>.

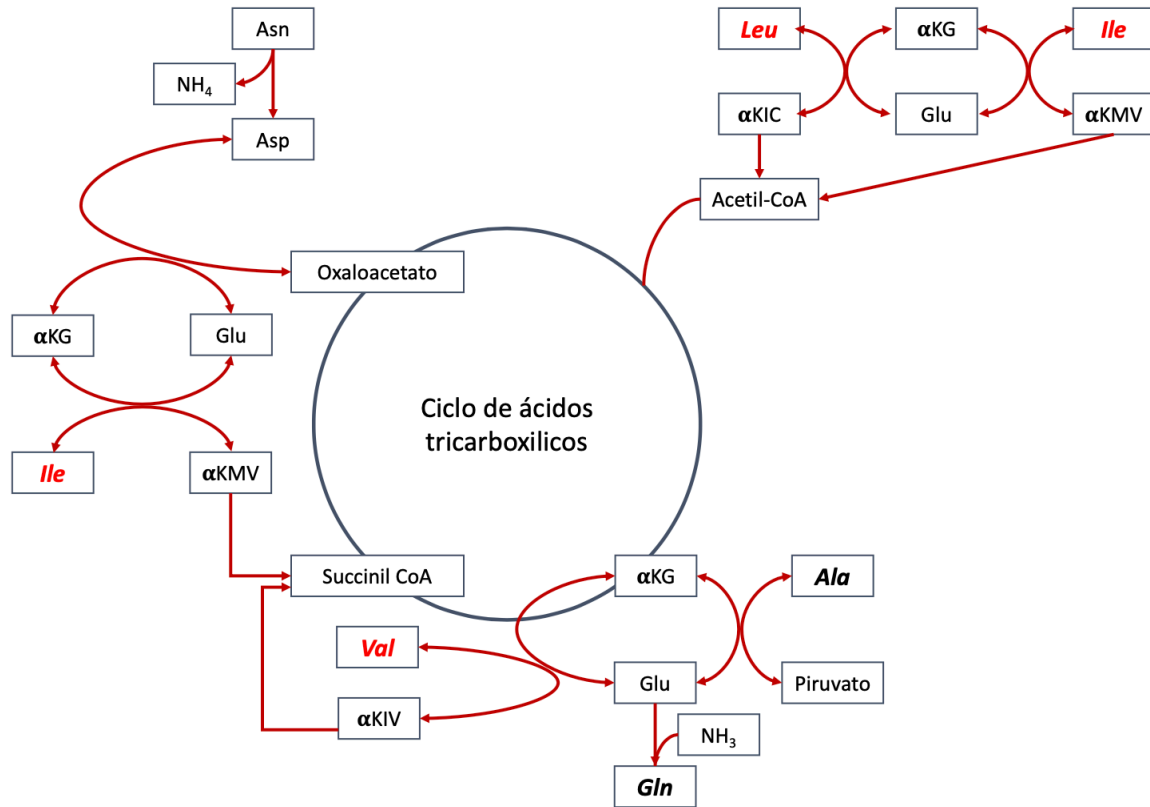


Figura 31: metabolismo de los AARR en el músculo y su relación con la síntesis de Gln/Glu y la anaplerosis del CAT (adaptado de Wagenmakers, 1998). Ala: alanina, Asn: asparagina, Asp: aspartato, Glu: glutamamto, Gln: glutamina, Leu: leucina, Val: valina, Ile: isoleucina, α-KG: α-cetoglutarato, α-KIV: α-cetoisovalérico, α-KMV: α-cetometilvalérico, α-KIC: α-cetoisocaproico.

La Ala, por otro lado, es el otro aminoácido resultante de la transaminación muscular de los AARR. La Ala interviene en la neoglucogenesis; se considera que hasta un 70% de la glucosa en plasma es secundaria a la gluconeogénesis hepática a través de Ala<sup>140,141,142</sup>. La Gln también

participa en la gluconeogénesis, principalmente renal, pero se considera que este proceso se activa en el riñón a partir de 60 horas de ayuno<sup>55</sup>.

El metabolismo muscular de los AARR en condiciones de hiperamoniemia ha sido estudiado exhaustivamente en los pacientes con cirrosis hepática. Se ha observado una disminución de los niveles plasmáticos de AARR, reflejada también en la relación Fischer, lo que ha determinado llegar a la hipótesis de la necesidad de suplementación con AARR a este grupo concreto de pacientes<sup>144</sup>. Esta disminución de los AARR se acompaña de síntesis de Gln por lo que se ha propuesto que en condiciones de hiperamoniemia, el músculo consume AARR para la síntesis de Gln a través de reacciones de transaminación<sup>144</sup>. A través del sistema L de transportadores membranaarios de aminoácidos neutros, la Gln se intercambia con los AARR, lo que acentúa la depleción extracelular de AARR necesarios para la detoxificación del amonio<sup>145</sup>. A pesar de que las condiciones fisiopatológicas son distintas, los estudios en los pacientes cirróticos demuestran el papel central que juega el músculo en el metabolismo de los AARR para la detoxificación del amonio a través de la síntesis de Gln.

En nuestros pacientes, hemos detectado una disminución significativa de la Gln y Ala durante los episodios de descompensación metabólica. Estos hallazgos, a pesar de ser descritos por varios autores, no tienen una explicación definitiva<sup>37,48,59,136</sup>. La disminución paradójica de la Gln durante la hiperamoniemia difiere fundamentalmente de los episodios similares en otros errores de metabolismo como los trastornos de ciclo de la urea. Por otro lado, los niveles disminuidos de Ala no se asocian con la acidosis láctica que acompañan las crisis metabólicas<sup>37</sup>.

Por lo tanto, la disminución simultánea de la Gln/Ala cuya síntesis se realiza en el músculo no puede ser una coincidencia y hay que buscar otro mecanismo fisiopatológico.

La síntesis muscular de Gln/Ala se realiza a raíz de los aminoácidos ramificados y utiliza Glu/  $\alpha$  -cetoglutarato como “compañero” de transaminación<sup>16,135</sup>.

AARR (Leu/Val/Ile) +  $\alpha$ -cetoglutarato  $\longrightarrow$   $\alpha$  -cetoácidos (KIV/KMV/KIC) + Glutamato

Alanina +  $\alpha$ -cetoglutarato  $\longrightarrow$  Piruvato + Glutamato

Desde este punto de vista, tanto la baja disponibilidad de  $\alpha$ -cetoglutarato, como el desajuste de los aminoácidos ramificados (restricción dietética de Val e Ile) podrían ser responsables de la disminución Gln/Ala durante los episodios de descompensación metabólica.

Varios estudios han propuesto las alteraciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el fallo energético secundario como posibles causas de la aparición de las complicaciones crónicas en la Acidemia propiónica<sup>3,65</sup>. En Acidemia propiónica, el ciclo de Krebs puede fallar en distintos puntos clave, siendo las principales la deficiente anaplerosis y la toxicidad directa de los metabolitos de AP sobre las enzimas integrantes<sup>82,145,146</sup>, ver Figura 32.

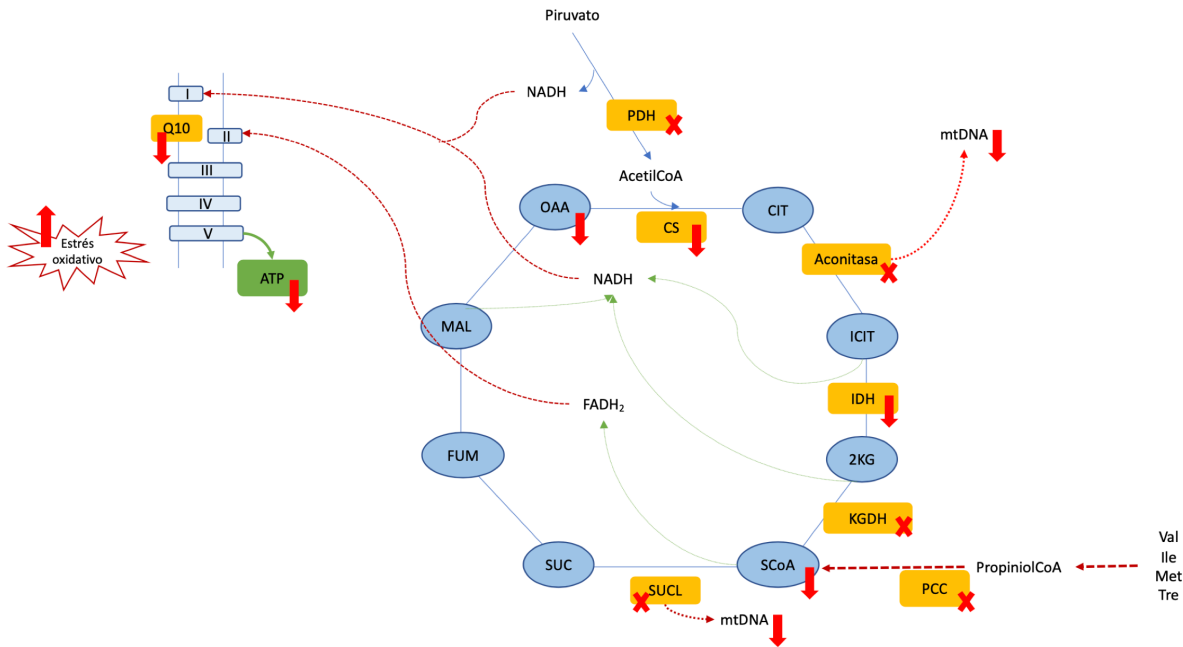


Figura 32: Mecanismos propuestos para las alteraciones del metabolismo energético en AP (PDH: piruvato deshidrogenasa, CS: citrato sintetasa, IDH: isocitrato deshidrogenasa, KGDH:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, PCC: propionil CoA carboxilasa, SUCL: succinil CoA ligasa, CIT: citrato, ICT: isocitrato, 2KG:  $\alpha$ ketoglutarato, SCoA: succinilCoA, SUC: succinato, FUM: fumarato, MAL: malato, OAA: oxaloacetato), adaptado de Kölker 2013.

La deficiencia de anaplerosis se debe en primer lugar al déficit de succinil CoA secundario al defecto enzimático primario de la propionil CoA carboxilasa. Por otro lado, el exceso de propionil CoA resultado se une con el oxaloacetato para formar metilcitrato, un metabolito de alta toxicidad. La depleción de succinil CoA y de oxaloacetato resultaría en una anaplerosis deficiente con disminución de  $\alpha$ -cetoglutarato. Niveles funcionalmente disminuidos de  $\alpha$ -



cetogluturato tendrían consecuencias sobre la síntesis de Gln/Ala, que podrían ser considerados como expresión indirecta de la anaplerosis deficiente. La deficiencia de  $\alpha$ -cetogluturato provoca alteraciones en otras vías metabólicas, como la vía de las Sacaropinas con aumento secundario de los niveles de lisina en plasma. Otros estudios han documentado aumento de los niveles de lisina en los pacientes con AP durante los episodios de hiperamoniemia, hallazgo interpretado como secundario a niveles inadecuados de  $\alpha$ -cetogluturato<sup>37,59</sup>. En nuestro estudio no hemos observado cambios significativos en los niveles plasmáticos de lisina.

## **I.2. Consideraciones sobre las alteraciones en el perfil de aminoácidos sustrato del ciclo de la urea.**

Gran parte de la morbimortalidad en los pacientes con acidemia propiónica se atribuye a sus descompensaciones metabólicas agudas. A pesar de los avances conseguidos en los últimos años en el diagnóstico precoz de los pacientes, el tratamiento hasta la fecha consigue reducir, pero no eliminar el riesgo de que se produzcan estos episodios. Durante los mismos, uno de los factores determinantes es la aparición de hiperamonemia debido a su alto poder patogénico sobre todo a nivel neuronal. Entender la etiopatogenia de la hiperamonemia en estas situaciones es imprescindible para intentar reducir su aparición, su grado de severidad y sus secuelas. Por este motivo, el estudio de la disfunción que se produce en el ciclo de la urea en estos pacientes será una de las claves para conseguir una mejor evolución para los pacientes en un futuro.

Hemos explicado en el apartado anterior, las posibles implicaciones fisiopatológicas de los niveles paradójicamente disminuidos de Gln durante los episodios de descompensación. También hemos observado una disminución estadísticamente significativa de la citrulina (Cit) en las crisis metabólicas, tanto en las que sólo cursan con cetosis como en las que se produce hiperamonemia. Se ha objetivado una disminución de la ornitina (Orn) y arginina (Arg) durante los episodios de descompensación, pero este hallazgo no ha alcanzado significación estadística. Finalmente, a estos hallazgos se añade curiosamente una disminución significativa de la prolina (Pro) durante las descompensaciones, a pesar de mantener niveles en rango normal en estabilidad. Este hallazgo no ha sido descrito previamente en la literatura. La disminución de prolina es todavía más marcada si se acompaña de hiperamonemia.

En un estudio sobre la relación interórganos en la homeostasis de los aminoácidos, se ha demostrado que la captación intestinal de glutamina (Gln) se acompaña de síntesis de Cit<sup>139</sup>. El área esplácnica libera Cit, captada luego por el riñón para la síntesis de Arg. Los hallazgos apoyan un circuito Gln-Cit-Arg *in vivo*, considerando la Cit/Arg como productos finales del metabolismo de Gln/Glu.

La biodisponibilidad de la Orn es, junto con el N-acetil glutamato (NAG), uno de los puntos clave en la regulación del ciclo de la urea<sup>55</sup>. Las fuentes de Orn son la ingesta de proteínas o la síntesis *de novo* en el intestino delgado a partir de glutamina (Gln)/glutamato (Glu), con la  $\Delta^1$ -pirolin-carboxilato sintetasa (P5CS) como enzima clave. La mitocondria del enterocito dispone de un amplio aparato enzimático que conecta la Gln/Glu con el ciclo de la urea: P5CS, N-acetil glutamato sintetasa (NAGS), ornitín aminotransferasa (OAT), carbamoil fosfato sintetasa 1 (CPS1)<sup>147</sup>. Otros tejidos extraintestinales que tienen P5CS no expresan el resto de las enzimas descritas anteriormente, lo que sugiere el papel central del enterocito en la síntesis *de novo* de Orn que se convierte en Arg (en niños <5 años) o en Cit (en > 5 años)<sup>147</sup>, ver Figura 33.

La  $\Delta^1$ -pirolin-carboxilato sintetasa (P5CS) es una enzima ATP y NADH dependiente localizada en la membrana interna mitocondrial y que interviene en la síntesis *de novo* de Orn y Pro a partir del glutamato (Glu) resultado de la conversión de la glutamina (Gln). Se han descrito dos isoformas: la corta localizada en el enterocito cuya actividad es modulada por los niveles de Orn; la isoforma larga de localización extraintestinal interviene sobre todo en la síntesis de Pro a partir del Glu y tiene una actividad independiente de la Orn<sup>147</sup>.

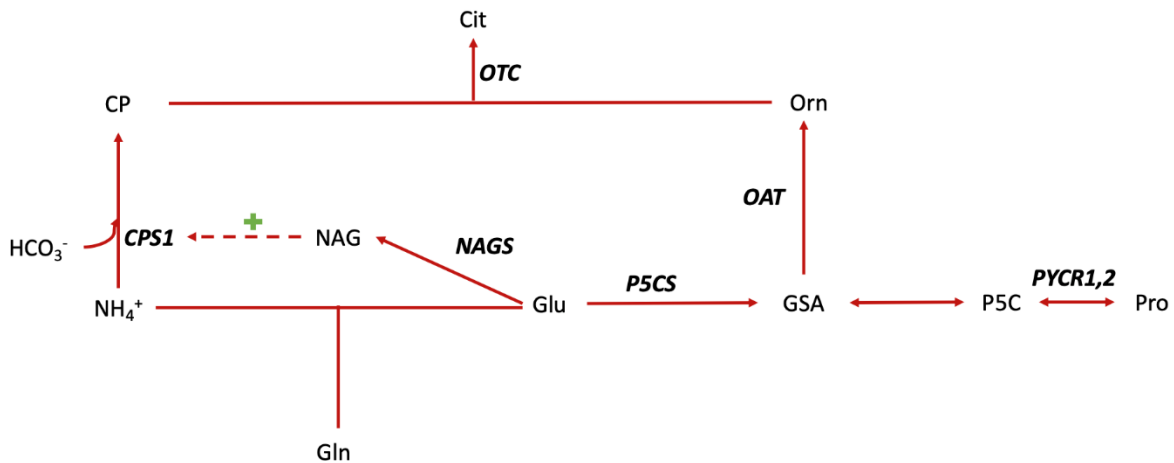


Figura 33.: síntesis de la Orn/Cit/Pro en el enterocito a partir del Glu. CP: carbamoil-fosfato; CPS1: carbamoil-fosfato sintetasa 1; NAGS: N-acetil glutamato sintetasa; NAG: N-acetil glutamato; P5CS:  $\Delta^1$ -pirolin-carboxilato sintetasa; PYCR: pirolin 5-carboxilato reductasa 1,2; P5C: pirolin 5-carboxilato; GSA: glutamato semialdehido; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Pro: prolina; Orn: ornitina; Cit: citrulina; OAT: ornitin aminotransferasa; OTC: ornitin transcarbamilasa. Adaptado de Marco-Marín, JIMD 2020.

Nuestra hipótesis es que el déficit de Gln durante los episodios de descompensación podría resultar en una disminución de la síntesis de los aminoácidos sustratos del ciclo de la urea a través de la P5CS. El perfil metabólico de los aminoácidos observado durante la descompensación en nuestros pacientes con AP favorece esta teoría ya que incluye niveles disminuidos de Gln, junto con hipoprolinemia e hipocitrulinemia; los niveles de Arg y Orn, aunque

diminueron con respecto al basal, no alcanzaron significación estadística. Este es el perfil descrito en los pacientes con deficiencia primaria de P5CS debida a mutaciones en el gen *ALDH18A1*<sup>56,148</sup>.

La disminución de los niveles de Pro no ha sido descrita hasta ahora en los pacientes con AP y se desconocen sus implicaciones en la fisiopatología de la enfermedad. Es posible que tenga influencia también en otros mecanismos fisiopatológicos ya que el ciclo de la Pro/Pirolin 5-carboxilato se encuentra en un cruce metabólico que conecta el ciclo de la urea con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos a través del sustrato común Gln/Glu, ver Figura 34.

Aunque sólo hemos estudiado las alteraciones de los aminoácidos relacionados con el ciclo de la urea durante los periodos de descompensación, otros autores describen alteraciones transitorias en el perfil de estos aminoácidos incluso en periodos de estabilidad<sup>59,60</sup>. Estas alteraciones podrían tener repercusión en la aparición de las complicaciones crónicas de los pacientes. Por ejemplo, un estudio multicéntrico reciente ha encontrado una asociación significativa entre el crecimiento y los niveles plasmáticos de Arg en los pacientes con acidemia propiónica y metilmalónica<sup>122</sup>. Este curioso hallazgo, puesto que la Arg no está directamente implicada en la ruta metabólica de la AP, podría deberse a defectos en su síntesis por la disfunción secundaria de la P5CS que proponemos. Además, la Pro es uno de los principales aminoácidos en el colágeno, fundamental en el desarrollo somático<sup>148</sup>. En los últimos años varios procesos metabólicos se han relacionado con las vías metabólicas de la Pro, como la apoptosis o la embriogénesis entre otros<sup>149</sup>.

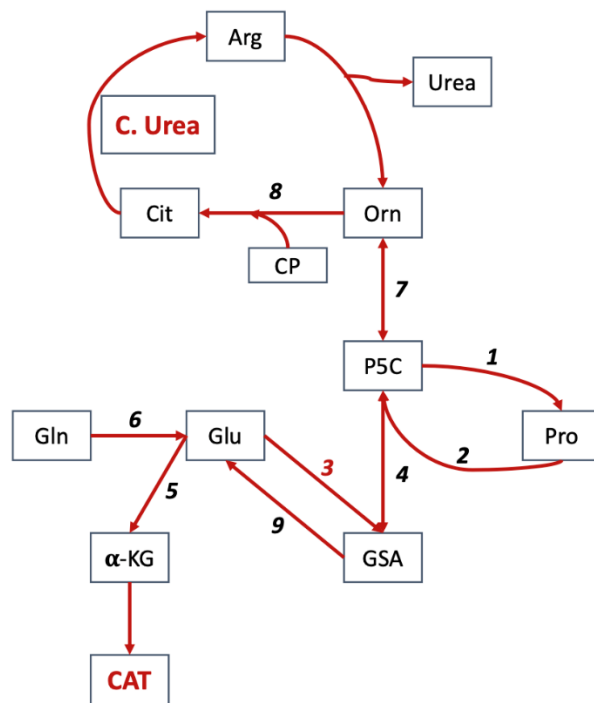


Figura 34: papel del P5CS como cruce metabólico entre el ciclo de la urea y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Leyenda: CP: carbamoil-fosfato, GSH: glutamato semialdehído, Glu: Glutamato, Gln: Glutamina, Pro: Prolina, Orn: Ornitina, Cit: Citrulina, OAT: ornitín aminotransferasa, OTC: ornitín transcarbamilasa, Arg: Arginina,  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato, 1: Pirolin-5-carboxilato reductase (PYRC), 2: Prolina deshidrogenasa/Prolina oxidase (PRODH/POX), 3: Pirolin-5-carboxilato sintetasa, 4: reacción espontánea, 5: glutamato deshidrogenasa, 6: glutaminasa, 7: ornitín aminotransferasa, 8: ornitín transcarbamilasa, 9: Pirolin-5-carboxilato deshidrogenasa, CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Adaptado de Phang, 2019.

### I.3 Alteraciones en el perfil de aminoácidos aromáticos

En la acidemia propiónica las vías metabólicas de los aminoácidos aromáticos no están alteradas. Sin embargo, en las muestras en descompensación de nuestros pacientes hemos detectado un aumento significativo de la fenilalanina Phe (con la cetosis, no con la hiperamoniemia) y una disminución no descrita previamente de los niveles del triptófano (Trp) (con la hiperamoniemia), ver Tabla 4 y Figura 22.

Los aminoácidos aromáticos (fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp)) juegan un papel esencial en la síntesis de neurotransmisores, tanto a nivel del sistema nervioso central, como periférico. La Phe/ Tyr interviene en la síntesis de dopamina y catecolaminas, mientras que el Trp está implicado en la síntesis de serotonina<sup>150</sup>. Por lo tanto, el funcionamiento normal del cerebro depende del flujo continuo de nutrientes desde la periferia a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). Los aminoácidos precisan un sistema de transporte a través de membranas, entre las que se encuentra la BHE, y por lo tanto han sido estudiados para entender la fisiología y la fisiopatología del sistema nervioso central. El sistema de L de transporte de aminoácidos (LAT) se refiere a un sistema de transporte común para distintos aminoácidos neutros (Leu, Ile, Val, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, His). Se sabe que el flujo neto hacia el sistema nervioso central puede estar determinado por la concentración plasmática de un aminoácido concreto al provocar una inhibición competitiva de los demás. El caso más estudiado es el de la fenilcetonuria, en la que este concepto se utiliza con fines terapéuticos al administrar suplementos de aminoácidos neutros para reducir el paso intracerebral de Phe y así disminuir su

efecto neurotóxico<sup>151</sup>. En los pacientes con enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce un estudio reciente ha demostrado que los elevados niveles plasmáticos de Leu compiten en el sistema L, lo que provoca su paso masivo al sistema nervioso central (SNC) y aumenta la neurotoxicidad<sup>152</sup>. Estos modelos demuestran cómo desequilibrios en los niveles plasmáticos de los aminoácidos neutros pueden influir en la actividad del SNC.

El índice de Fisher, utilizado habitualmente como marcador de la función hepática, es un cociente entre los aminoácidos ramificados (Ile+Leu+Val) y los aminoácidos aromáticos (Phe+Tyr) y por lo tanto indica si hay un equilibrio o no entre los distintos aminoácidos neutros. En nuestros pacientes, al igual que en otros estudios similares<sup>59,60</sup>, el índice de Fischer se encuentra disminuido durante los episodios de estabilidad metabólica (por la restricción dietética de Val e Ile), pero aumenta hasta acercarse a la normalidad durante los periodos de descompensación (por el de los aminoácidos ramificados secundarios al catabolismo), ver Tabla 3.

Es posible que este desequilibrio prolongado en los niveles de los distintos aminoácidos, y por lo tanto en su paso a SNC, pueda favorecer o empeorar los síntomas neurológicos de los pacientes con AP. Además, la alteración en el metabolismo de los neurotransmisores puede también tener repercusiones periféricas. La disminución de los niveles de Trp, no descrita previamente, puede provocar alteraciones a nivel de la motilidad gastrointestinal, por su implicación en la síntesis de serotonina<sup>150</sup> y de forma secundaria favorecer la aparición de estreñimiento y la producción de propiónico y amonio por la flora intestinal.



II. Discusión sobre caracterización del perfil clínico, bioquímico y metabólico de las complicaciones crónicas

## II.1 Consideraciones sobre el perfil metabólico de los pacientes con anemia severa persistente

Las complicaciones hematológicas en la AP se han descrito sobre todo durante las crisis agudas, en forma de pancitopenia<sup>2</sup>. Sin embargo, fuera de los episodios de descompensación metabólica, los pacientes también pueden presentar anemia, neutropenia o plaquetopenia<sup>51</sup>. Dado el escaso número de pacientes, la incidencia real de las complicaciones hematológicas es desconocida. Un metaanálisis reciente valora la presencia de anemia como relativamente frecuente, incluso por encima de complicaciones clásicas como la cardiomiopatía o las lesiones de ganglios basales<sup>3</sup>. En un estudio sobre las complicaciones a largo plazo en las acidemias orgánicas y los trastornos de ciclo de la urea tras analizar el registro europeo, Kolker et al valoran que la presencia de anemia en pacientes con AP llegaría a una incidencia de 22%; la leucopenia y la trombocitopenia se verían en hasta un 18%<sup>51</sup>.

Se han propuesto como causas para los trastornos hematológicos la toxicidad de varios metabolitos (3 hidroxipropiónico, metilcitrato, tigilglicina), la falta de varios nutrientes<sup>51</sup> o la disfunción mitocondrial<sup>3</sup>. La pancitopenia se observa sobre todo en pacientes con AP durante los episodios de descompensación metabólica y suele ser reversible<sup>2,153,154</sup>, apoyando la hipótesis de toxicidad directa de los metabolitos alternativos del propionato. Sin embargo, la presencia de los trastornos hematológicos durante los periodos de estabilidad metabólica no ha sido del todo aclarada.

La sangre es un tejido con alta tasa de regeneración teniendo en cuenta que sus células maduras tienen una vida media relativamente corta. Por lo tanto, las necesidades de nutrientes, y sobre todo de aminoácidos son altas comparando con otras estructuras. La demanda constante

y elevada de nutrientes por parte del tejido hematopoyético lo hace relativamente sensible en situación de malnutrición<sup>155</sup>. La anemia relacionada con la malnutrición protein-calórica es un cuadro muy frecuente sobre todo en las edades extremas, niños y personas mayores y puede tener también un componente de eritropoyesis ineficaz<sup>156</sup>.

Sin embargo, la producción constante de células sanguíneas no solamente depende del aporte de nutrientes en sí, sino también del microambiente hematopoyético (nicho), estructura que regula la fisiología de las células madre hematopoyéticas (CMH). En los últimos años se ha estudiado la influencia de la composición dietética en relación con la fisiología y la viabilidad de las CMH. Varios trabajos recientes, sobre todo en relación con el acondicionamiento pre-trasplante de médula ósea, han demostrado la influencia de la composición dietética en aminoácidos ramificados y cisteína (Cys) sobre el funcionamiento de las CMH y del microambiente hematopoyético. Se ha demostrado que la valina (Val) y la Cys son imprescindibles para el mantenimiento de las CMH<sup>157</sup>. *In vitro*, tanto las CMH humanas como de los ratones han dejado de proliferar en medios exentos de Val y Cys; además, en los ratones alimentados con dieta restringida en Val el recuento de CMH ha disminuido radicalmente tan solo una semana después. Es más, la dieta restringida en Val ha logrado vaciar el nicho hematopoyético medular, sin necesidad de ablación química o radioterápica<sup>157</sup>. Otro trabajo reciente en la misma línea investiga el efecto del balance de los aminoácidos ramificados en relación con la viabilidad de las CMH. Cuando la restricción dietética de la Val es de un 10%, la actividad de las CMH está discretamente alterada; pero cuando la misma restricción de la Val se aplica un aumento en la dieta de la Ile y Leu, la expansión de las CMH se ve completamente

bloqueada<sup>158</sup>. El motivo por el que las CMH sean tan sensibles al aporte disminuido de Val y al equilibrio entre los tres aminoácidos ramificados no ha sido investigado.

Estudios en ratones han demostrado que la Leu disminuye los niveles plasmáticos Val e Ile a través del sistema L de transporte de aminoácidos<sup>159</sup>. Los animales que reciben alto aporte de Leu presentan niveles disminuidos de Trp, Val, Ile, Met y Ala en el sistema nervioso central, lo que puede afectar la síntesis de neurotransmisores<sup>160</sup>. Otros estudios han demostrado la importancia del equilibrio de los niveles plasmáticos de aminoácidos ramificados en el crecimiento y la inmunidad celular en modelos animales<sup>161,162</sup>.

El tratamiento dietético en los pacientes con AP es uno de los pilares fundamentales y se basa en la restricción de las proteínas naturales de alto valor biológico junto con suplementos de aminoácidos exentos de Val, Ile, metionina y treonina cuando la tolerancia proteica es menor de la recomendada por la OMS/FAO. Por lo tanto, la combinación entre la restricción proteica y los suplementos pueden derivar en un desequilibrio del aporte de los aminoácidos ramificados con valores altos de la Leu/Val o Leu/Ile, que se expresa directamente en los niveles plasmáticos, al ser aminoácidos esenciales<sup>122,123,124</sup>.

En nuestro estudio utilizamos los valores de ferritina para intentar identificar aquellos pacientes que tienen anemia crónica grave y por tanto precisan transfusiones de repetición. Al excluir los pacientes con descompensación y/o infecciones intercurrentes se reduce el riesgo de incluir aquellos con otras posibles causas de anemia o aumento de la ferritina. Observamos que la ferritina (y por tanto la anemia grave) se asocia con niveles más altos de Leu, habiendo una correlación negativa con la Val y con las ratios Val/Leu e Ile/Leu. Además, hay una correlación

negativa entre la ferritina y la ingesta de proteínas naturales de alto valor biológico y una relación directa entre la prescripción del producto especial exento de aminoácidos propiogénica y la sobrecarga férrica, ver Tabla 7 y Figura 23. Nuestros resultados por tanto apoyan la hipótesis de un desbalance de las AARR y del componente nutricional en la aparición de algunas complicaciones crónicas, en este caso de la anemia grave, en los pacientes con AP en periodos de estabilidad metabólica.

## II.2 Consideraciones sobre el perfil metabólico de los pacientes con pancreatitis

Aunque se trata de una complicación poco frecuente, en algunos pacientes con acidemia propiónica se han descrito episodios de pancreatitis aguda, recurrente o crónica<sup>2</sup>. La gravedad de estos episodios es variable, desde pancreatitis fulminantes hasta casos leves con buena evolución:

- Gilmore et al describen el caso de un paciente con episodios repetidos de hiperamilasemia e hiperlipasemia sin alteraciones en el estudio de imagen en contexto de descompensaciones metabólicas<sup>163</sup>. Los autores sugieren similitudes entre los episodios de descompensación metabólica con cetosis que asocian alteraciones enzimáticas pancreáticas y la cetoacidosis diabética en la que se han descrito aumento de lipasa/amilasa en hasta un 40% en niños<sup>164</sup>.
- Burlina et al describen entre los primeros dos casos de pacientes con acidemia propionica complicada con pancreatitis aguda<sup>165</sup>. En un primer caso, la paciente presentaba niveles discretamente elevados de triglicéridos, sin datos de descompensación metabólica; sin embargo, la evolución fue nefasta y la paciente falleció a poco tiempo del ingreso, con datos de pancreatitis grave difusa en la necropsia. El segundo paciente presentaba una clínica de crisis metabólica con hiperamonemia y cetosis masiva y tuvo una buena evolución clínica.
- Choe et al presentan el caso de un niño de 4 años diagnosticado de acidemia propionica a raíz de un episodio de pancreatitis aguda (aumento de enzimas y edema pancreático en

la resonancia magnética abdominal) en contexto de una crisis metabólica con hiperamonemia y cetosis<sup>166</sup>.

- Bultron et al reportan el caso de una niña con AP que presenta pancreatitis recurrente (dolor abdominal, aumento significativo de las enzimas y edema pancreático en la ecografía abdominal) fuera de crisis metabólicas<sup>167</sup>.
- Kahler et al describen episodios de pancreatitis aguda en una serie de pacientes con acidemias orgánicas<sup>168</sup>. Encuentran 9 episodios entre 108 pacientes, 5 de ellos con acidemia metilmalónica, 3 con acidemia isovalérica y uno con enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce. Además, en la literatura hay otro caso de pancreatitis en un paciente con acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica<sup>169</sup> y otro episodio en homocistinuria<sup>170</sup>.

Las causas de las pancreatitis en acidemia propiónica no están elucidadas. Tampoco parecen estar en relación con descompensaciones agudas porque sólo algunos pacientes tienen acidosis o cetosis coincidente, y en menos se observa hiperamonemia.

En nuestra serie, hemos identificado 7 episodios de pancreatitis, de los cuales 4 tenían una causa probable (ver Tabla 8). Una paciente tuvo episodios recurrentes asociados a hipertrigliceridemia. En esta paciente la prueba de heparina fue sugestiva de deficiencia de la lipoproteína lipasa a, pero no se ha confirmado por diagnóstico genético. La hipertrigliceridemia es una causa establecida de pancreatitis aguda, pudiendo provocar ataques recurrentes que precisan hospitalizaciones de repetición. El riesgo de pancreatitis aguda cuando el nivel de triglicéridos es >1.000 mg/dl y > 2.000mg/dl es de un 5% y 10-20% respectivamente<sup>171</sup>. El manejo de la pancreatitis inducida por hipertrigliceridemia no difiere de las producidas por otras causas,

pero hay que identificar la causa de la dislipemia y tratarla en la medida de lo posible. En este caso la paciente tuvo episodios graves y prolongados que requirieron hospitalizaciones y una nutrición parenteral, adaptada a su metabolopatía, prolongadas. Mantener los niveles de triglicéridos < 500mg/dl previene nuevos ataques de pancreatitis aguda. En nuestro caso, la paciente precisa una dieta muy restringida en grasas pero ha tenido una buena evolución posterior.

En 3/7 los episodios de pancreatitis coincidieron con descompensaciones metabólicas en el contexto de bacteriemias por bacterias intestinales relacionadas con catéter central (1 bacteriemia por *Escherichia coli*, 2 bacteriemias por *Enterococcus faecalis*). Durante estos episodios los pacientes presentaron hiperamonemia leve y todos tuvieron una buena evolución con medidas conservadoras. El aumento de las enzimas pancreáticas en el contexto de bacteriemia se ha descrito sobre todo en relación con episodios de enterocolitis. En un estudio reciente, se ha observado que el aumento de las enzimas pancreáticas se relaciona con la colitis derecha y sobre todo con cultivos positivos de heces y sangre, siendo las bacterias que con más frecuencia se han identificado *Salmonella* y *Escherichia coli*<sup>172</sup>. Los autores hipotetizan como la causa de las alteraciones pancreáticas la diseminación hematógica o por contigüidad por la cercanía entre el colon derecho y el páncreas. La afectación pancreática también se ha atribuido a que durante los episodios de inflamación puede haber una resorción de macromoléculas, como la amilasa y lipasa, por el aumento de la permeabilidad intestinal. En este caso, varias endotoxinas de las bacterias intestinales podrían también traspasar, llegar a los ganglios mesentéricos u otras estructuras adyacentes y provocar lesiones, tal y como se ha demostrado en modelos animales<sup>173</sup>.



Curiosamente en nuestra serie durante los episodios de pancreatitis aguda solamente se ha objetivado aumento de la lipasa pancreática, manteniéndose la amilasa en niveles normales-bajos. A pesar de que muchos autores abogan por la determinación de los niveles de lipasa en lugar de la amilasa para el diagnóstico de la pancreatitis aguda por su mayor sensibilidad y especificidad<sup>174</sup>, se han descrito episodios de aumento significativos de los niveles de lipasa sin patología pancreática. Por lo tanto, hay que preguntarse, ¿la hiperlipasemia sin hiperamilasemia es diagnóstico de pancreatitis aguda? La lipasa es un enzima que aparte de los acinos pancreáticos en donde se halla en gran cantidad, se encuentra también en otras zonas del tracto digestivo, como el colon, estómago, intestino delgado o esófago; incluso se ha descrito en los pulmones, músculo cardíaco y leucocitos<sup>175,176</sup>. En una revisión sistemática reciente, los autores han tratado de identificar causas de aumento de la lipasa en pacientes sin pancreatitis. Entre las causas de hiperlipasemia sin pancreatitis se describe enfermedad celiaca, infecciones (HIV, VHC), neoplasias del tracto digestivo, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes tipo II o drogas hipoglucemiantes, sarcoidosis; también se han descrito episodios de hiperlipasemia sin pancreatitis en pacientes críticos, sobre todo politraumatizados<sup>177</sup>. Teniendo esto en cuenta, es posible que el aumento de lipasa en los pacientes con infección bacteriana pueda deberse parcialmente al estado inflamatorio en el que se encuentran. Por este motivo, antes de diagnosticar al paciente de pancreatitis, y tomar las medidas terapéuticas que este diagnóstico supone, se debe confirmar mediante pruebas de imagen.

Actualmente, los autores apuntan principalmente, aunque con escasa evidencia, a la disfunción mitocondrial<sup>3</sup>. Los estudios son extremadamente escasos<sup>178</sup> por lo que esta hipótesis se apoya sobre todo en las similitudes con las citopatías mitocondriales, en las que la aparición

de pancreatitis aguda o recurrente se ha descrito hace relativamente poco tiempo<sup>179,180</sup>. Esta complicación puede formar parte de un cuadro multiorgánico o aparecer de forma aislada. Aparte de la pancreatitis, la AP comparte con las citopatías mitocondriales muchas manifestaciones del tracto gastro-intestinal: vómitos cíclicos, alteraciones hepáticas, estreñimiento o diarrea, gastroparesis, pseudostrucción intestinal etc. Sin embargo, los episodios de pancreatitis descritos en las enfermedades mitocondriales tienden a ser asépticos y con buena evolución con tratamiento conservador<sup>181</sup>.

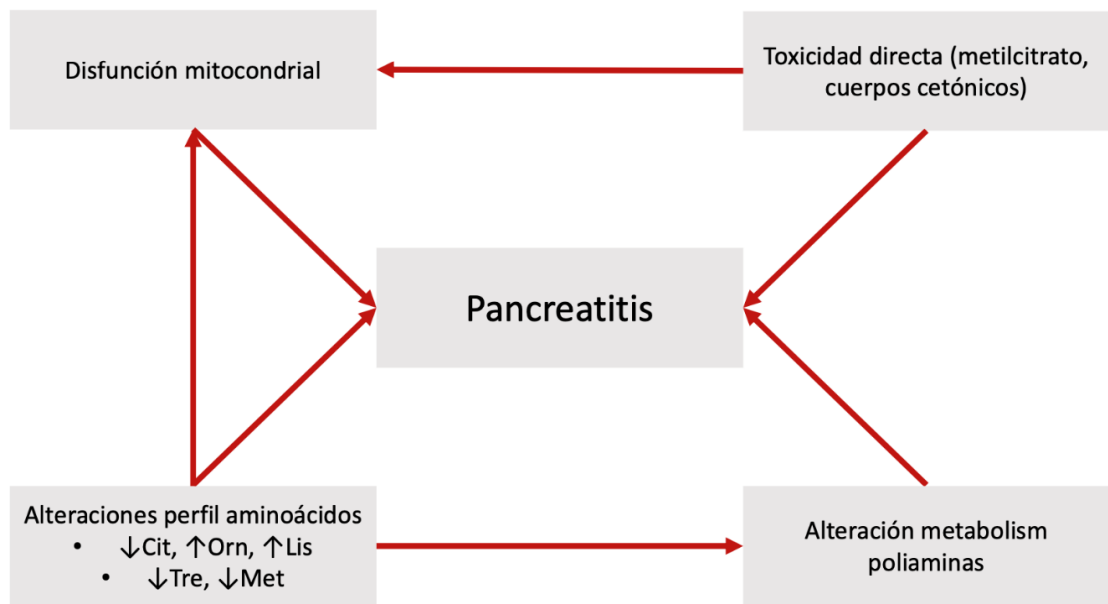


Figura 35: Mecanismos propuestos para la pancreatitis en AP. Cit: citrulina, Orn: ornitina, Lis: lisina, Tre: treonina, Met: metionina.

Nosotros proponemos otras posibles explicaciones etiopatogénicas para la aparición de pancreatitis en AP:

1.- Algunos metabolitos propios de la AP pueden tener un efecto tóxico directo sobre varios tejidos y órganos. El metilcitrato se ha perfilado como un potente tóxico para la médula ósea, induciendo aplasia medular y citopenias durante las crisis metabólicas<sup>154</sup>. De la misma manera, el metilcitrato podría tener un efecto tóxico para el páncreas, induciendo lesión tisular.

2.- En nuestros pacientes el aumento de la lipasa se asocia con niveles disminuidos de treonina (Tre) con una fuerte significación estadística (p-valor: 0,004). La Tre es uno de los aminoácidos propiogénicos cuyo papel es menos conocido. Curiosamente, a pesar de ser uno de los aminoácidos esenciales, una proporción importante de Tre (hasta 60%) se queda a nivel intestinal<sup>40,41</sup> en donde participa en la síntesis de mucina<sup>42</sup> y por tanto es indispensable para mantener la integridad de la mucosa intestinal. Alteraciones en la permeabilidad intestinal secundaria a la dieta restringida en Tre cobrarían una importancia especial en los pacientes con AP, sabiendo que, en nuestra serie, algunos pacientes presentan alteraciones pancreáticas coincidiendo con infecciones por bacterias intestinales.

3.- Los episodios de hiperlipasemia se asocian con niveles más disminuidos de Cit (p-valor: 0,002) y más altos de Orn (p-valor: 0,001). Hay modelos murinos de pancreatitis aguda inducida por los aminoácidos dibásicos Orn, Arg y Lis, pero no Cit<sup>182-185</sup>. Hemos demostrado en los capítulos anteriores que durante los episodios de hiperamonemia se observan niveles muy disminuidos de Cit; otros autores han descrito, aunque de manera inconstante, niveles disminuidos de Arg<sup>37</sup>. Además, los pacientes con AP pueden presentar niveles más altos de Lis como consecuencia de

la deficiencia de alfa-cetoglutarato y disfunción de la vía de la Sacaropinas<sup>37,59</sup>. Por lo tanto, un desajuste en los niveles de aminoácidos dibásicos podría favorecer la aparición de las alteraciones pancreáticas en los pacientes con AP.

Resumimos los mecanismos propuestos para las alteraciones pancreáticas en la AP en la Figura 35.

### II.3 Consideraciones sobre las complicaciones neurológicas.

La mayor parte de las complicaciones crónicas en los pacientes con AP están relacionadas con la afectación del sistema nervioso central (SNC)<sup>3,118</sup>. Clínicamente los pacientes con AP pueden presentar retraso psicomotor, trastornos de movimiento secundarios a lesiones en ganglios basales, trastorno de espectro autista, epilepsia, trastornos psiquiátricos (alucinaciones, psicosis...) etc. Las lesiones del SNC observadas en estos pacientes pueden afectar cualquier estructura, pero con frecuencia se han descrito lesiones de sustancia blanca subcortical o los ganglios basales<sup>3</sup>. Entre las acidemias orgánicas, la AP es la que más complicaciones neurológicas presenta a largo plazo<sup>186</sup>. Las lesiones cerebrales derivan en parte de las crisis metabólicas que cursan con hiperamoniemia, pero también aparecen en pacientes sin descompensaciones graves, en los que tienen adecuado control metabólico o posttrasplante de hígado<sup>2,187</sup>. La implementación del cribado neonatal y el tratamiento precoz debería haber evitado este pronóstico neurológico nefasto, pero, aunque ha mejorado no ha sido completamente así<sup>188</sup>. Varios mecanismos se han propuesto para explicar la fisiopatología de las lesiones de SNC aparte de las producidas por la hiperamoniemia, pero no existe todavía un nivel de evidencia suficiente para una conclusión definitiva sobre ninguna de ellas.

La fisiopatología de las alteraciones cerebrales en acidemias orgánicas no se puede entender por completo sin contar con el funcionamiento de la barrera hemato-encefálica (BHE). En este sentido, la BHE puede tener un doble papel, tanto por la regulación del flujo intracerebral de nutrientes como por el atrapamiento de varias moléculas potencialmente tóxicas a nivel cerebral. Se ha propuesto la existencia de una síntesis intracerebral de ácidos orgánicos que no

pueden “escaparse” a través de la BHE, quedando atrapados en el SNC en donde pueden ejercer sus efectos tóxicos. Es la llamada “*trapping hypothesis*” propuesta por Kohler et al principalmente para ácidos dicarboxílicos como el glutámico o el 3-OH-glutámico<sup>189</sup>. Sin embargo, esta hipótesis no puede ser una explicación completa en el caso de la AP, dado que el propionato es un ácido monocarboxílico que pasa la BHE a través del transportador MCT1 y el metilcitrato es un ácido tricarboxílico<sup>190</sup>.

Tanto el propionato, como el metilcitrato han sido propuestos y estudiados como tóxicos cerebrales importantes. El propionato inhibe GABA-transaminasa, lo que aumenta los niveles de GABA cerebrales induciendo coma y letargia<sup>53</sup>. Los ganglios basales, sobre todo el estriatum son unas de las zonas cerebrales con más densidad de neuronas GABA-érgicas (>90%) (Gerfen, 1988), por lo que la toxicidad directa del propionato podría ser uno de los mecanismos más importantes para las lesiones en los ganglios basales<sup>53</sup>.

A nivel del SNC, varios autores han apuntado que el propionato se metaboliza en las células gliales, pero no en neuronas que carecen del aparato enzimático<sup>191</sup>. Por lo tanto, las células gliales tienen capacidad de realizar la oxidación del propionato a propionilCoA, que en el caso de la AP quedaría atrapado en las células con efectos potencialmente tóxicos (ej: inhibición de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos<sup>63,82</sup>). En este sentido, se ha propuesto que el propionato puede representar un tóxico glial, lo que tendría implicaciones en la fisiopatología de las lesiones de sustancia blanca, dado que los oligodendrocitos juegan un papel fundamental en el funcionamiento de la mielina<sup>191</sup>. Además, el propionato afecta la acetilación de las histonas, lo que implicaría potencialmente cambios en la transcripción genética<sup>191</sup>. En modelos animales, se ha demostrado que el propionato provoca disminución de los neurotransmisores GABA,

dopamina y serotonina e induce lesiones en el ADN<sup>192</sup>. El propionato se ha relacionado con la presencia de autismo en varios modelos animales, aunque sin tener una explicación fisiopatológica definitiva<sup>52</sup>.

En otro estudio reciente, los autores demuestran el efecto tóxico directo del metilcitrato que inhibe la glutamato deshidrogenasa y aumenta la permeabilidad mitocondrial<sup>193</sup>. Curiosamente, en un modelo animal de acidemia metilmalónica, los autores concluyen que el metilcitrato es más tóxico que el ácido metilmalónico, induciendo cambios celulares estructurales e hiperamonemia con niveles disminuidos de glutamina<sup>194</sup>.

Además, la BHE regula la síntesis de los neurotransmisores por la biodisponibilidad de los precursores (aminoácidos aromáticos entre otros), como hemos explicado en los capítulos anteriores. Hay muy pocos estudios sobre los niveles de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con AP. Scholl-Burgi et al describen el aminograma en el LCR de un paciente con AP durante un episodio *ictus-like* y encuentran niveles aumentados de glutamina (Gln) y alanina (Ala) comparando con el plasma; en el caso de la glicina (Gly) hay un aumento importante en el LCR, pero con un ratio LCR/plasma normal<sup>195</sup>. En la resonancia magnética (RM) craneal de tres pacientes con AP, los autores presentan hallazgos en la espectrometría, como la disminución del N-acetil aspartato sugestivo de disfunción y pérdida neuronal y disminución del mio-inositol, junto con un pico de Glu+Gln y niveles altos de Ala<sup>196</sup>. Curiosamente, los niveles altos de Ala descritos en los dos estudios presentados anteriormente no se asocian con aumento plasmático de Ala y podrían reflejar hiperlactacidemia cerebral.

La hiperglicinemia es uno de los marcadores diagnósticos de la AP y se debe a la inhibición de las enzimas hepáticas del sistema de degradación de la glicina ("*glycine cleavage system*")

por el propionilCoA<sup>50</sup>. La glicina es un neurotransmisor que modula el receptor N-metil D-aspartato (NMDA) actuando como co-agonista necesario<sup>197</sup>. Por lo tanto, la modulación de la neurotransmisión excitatoria podría ser otro mecanismo de neurotoxicidad, sobre todo en el caso de los pacientes con epilepsia<sup>3</sup>.

Finalmente, varios autores han propuesto alteraciones en el metabolismo del ciclo glutamato (Glu)/glutamina (Gln) como parte de explicación para las complicaciones neurológicas a largo plazo en AP<sup>3,119</sup>. Por un lado, el Glu contribuye de manera fundamental al aclaramiento del amonio a través de la síntesis de Gln, pero no solamente interviene en la homeostasis del amonio, sino que es uno de los sustratos anapleróticos más importantes, como *buffer* (regulador) de los intermediarios C4-C5 del ciclo de los ácidos tricarbóxicos<sup>61</sup>. Además, el Glu es el principal neurotransmisor excitatorio a través de su receptor NMDA e interviene en la síntesis intracerebral de glutatión (GSH), con un potente efecto antioxidante.

Es importante mencionar que el Glu no se encuentra entre los aminoácidos que cruzan de manera significativa la BHE<sup>198</sup>, por lo que los niveles periféricos no justifican la concentración intracerebral. Por lo tanto, cabe preguntar, ¿cual es el origen del Glu cerebral? De nuevo volvemos a los aminoácidos ramificados; varios autores proponen la ruta de los aminoácidos ramificados a través de las enzimas BCAT (branch-chained aminotransferase) como fuente principal de Glu intracerebral<sup>198,199</sup>. ver Figura 36. Por lo tanto, alteraciones de los aminoácidos ramificados a nivel cerebral tendrían efectos directos en la síntesis de Glu, con todas sus implicaciones mencionadas anteriormente.



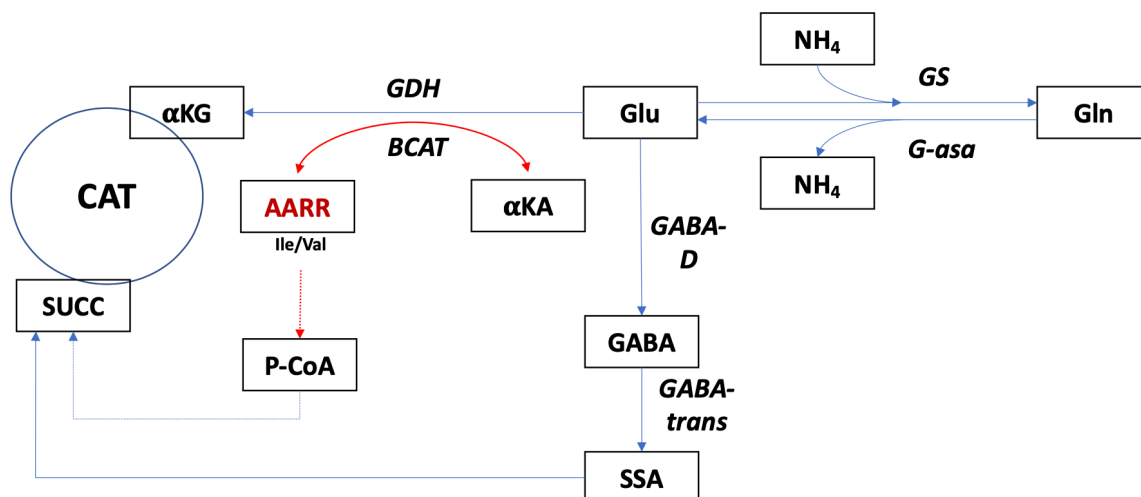


Figura 36. Contribución de los aminoácidos ramificados en la síntesis intracerebral de Glu/Gln.  $\alpha$ -KG: alfa-cetoglutarato, SUCC: succinato, AARR: aminoácidos ramificados,  $\alpha$ -KA:  $\alpha$ -cetocidos, Glu: glutamato, Gln: glutamina, BCAT: aminotransferasa de los AARR, GDH: glutamato deshidrogenasa, GS: glutamina sintetasa, G-asa: glutaminasa, GABA-trans: GABA transaminasa, GABA-D: GABA decarboxilasa. Adaptado de Cooper, 2016.

En nuestra serie, la mayoría de los pacientes presentan algún tipo de lesión o complicación relacionada con el sistema nervioso. Dada la complejidad y multitud de factores que afectan al desarrollo y funcionamiento cerebral, no hemos buscado correlaciones con ninguno de ellos pero en apartados anteriores hemos demostrado la presencia en nuestros pacientes de múltiples alteraciones bioquímicas que indican la posible alteración de varias vías metabólicas que justificarían esta sintomatología.

Debemos destacar que parte de las alteraciones podrían deberse a un control inadecuado de la propia enfermedad, pero algunas podrían ser secundarias al tratamiento propuesto, bien por restricciones dietéticas excesivas o a la terapia farmacológica. En el caso de la paciente con neuropatía periférica, por ejemplo, no se puede descartar que esta sintomatología sea un efecto secundario del tratamiento prolongado con metronidazol. Concluimos por tanto que el tratamiento actual de la acidemia propiónica debe revisarse para mejorar los resultados a largo plazo de nuestros pacientes.

## II.4 Consideraciones sobre las complicaciones cardiológicas

En algunas publicaciones las alteraciones cardiológicas aparecen en hasta un 23% de los pacientes con acidemia propiónica<sup>74</sup> y en muchas ocasiones es la causa directa de mortalidad. La mayoría de los casos tienen una cardiomiopatía dilatada, pero se describen también pacientes con cardiomiopatía hipertrófica o arritmias<sup>75</sup>.

El mecanismo principal que se propone para las alteraciones cardiológicas es la disfunción mitocondrial secundaria, apoyado por estudios funcionales en tejidos de pacientes con cardiomiopatía. Aunque escasos, estos estudios han objetivado alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial, sobre todo de los complejos respiratorios I+III y II+III, altamente sugestivos de deficiencia de CoQ10<sup>71,75,76</sup>. Además, la propionil CoA es un sustrato anaplerótico de especial importancia para el músculo cardíaco, por lo que una disfunción en la vía metabólica de la propionil CoA carboxilasa afectaría todavía más el metabolismo energético en este tejido<sup>61</sup>.

Hasta la fecha no hay estudios que determinen cuáles son los pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones cardiológicas y las posibilidades terapéuticas son extremadamente escasas. Por un lado, hay poca muestra de pacientes y por otro no existen marcadores bioquímicos de fácil alcance para determinar la efectividad de la intervención. En nuestros pacientes hemos detectado un déficit plasmático de CoQ10 y han sido tratados con ubiquinol desde entonces. Hemos identificado 3/10 pacientes con cardiomiopatía dilatada de aparición antes de iniciar esta terapia. Al contrario de lo observado en otras series en las que la evolución habitual es un empeoramiento progresivo, en uno de nuestros pacientes la afectación cardíaca se ha estabilizado y en los otros dos ha mejorado. Aunque se trata de una serie muy pequeña,

indica que la suplementación con ubiquinol/ubiquinona podría ser una opción atractiva para evitar la aparición de las complicaciones a largo plazo derivadas de la disfunción mitocondrial secundaria, como la cardiomiopatía.

III. Discusión sobre el seguimiento a largo plazo con muestras

papel

Los pacientes con acidemia propiónica (AP) requieren un seguimiento tanto clínico como de parámetros bioquímicos que incluye visitas programadas frecuentes a las que se suman las necesarias por procesos de descompensación o riesgo de descompensación por mala tolerancia oral o enfermedad intercurrente. Para obtener las muestras de sangre y orina es preciso realizar unas extracciones que hasta la fecha solamente se pueden realizar en el hospital y que por lo tanto hacen necesario que el paciente y su familia se desplacen a un centro médico. Además, estas extracciones son siempre incómodas y pueden ser dificultosas, sobre todo en niños pequeños o aquellos con accesos venosos escasos. En ocasiones incluso obligan a la utilización de técnicas agresivas (vías venosas centrales, sondaje vesical) o a la colocación de catéteres venosos permanentes, lo que conlleva un riesgo quirúrgico y de complicaciones infecciosas.

Para reducir el riesgo de descompensación, las guías clínicas recomiendan hacer un seguimiento estrecho de los pacientes, sobre todo los de menor edad<sup>2</sup>. Además, podemos especular que un seguimiento metabólico más estrecho podría ayudarnos a entender mejor la fisiopatología de las complicaciones crónicas que se producen en estos pacientes, incluso en aquellos con escasas descompensaciones, e identificar marcadores bioquímicos pronósticos de los cuales carecemos<sup>200</sup>. Sin embargo, las molestias ocasionadas al paciente, las dificultades técnicas en la obtención y manejo de las muestras y el coste económico que suponen hacen que la realización de estudios bioquímicos se restrinja, estando actualmente recomendadas cada 3-6 meses<sup>2</sup>.

Uno de los objetivos principales de nuestro estudio fue determinar si las muestras secas obtenidas en papel de filtro de sangre (dried blood sample: DBS) y orina (dried urine sample: DUS) reflejaban correctamente el estado metabólico del paciente. De ser así, se evitarían muchos

procedimientos invasivos para recolectar las muestras necesarias para las determinaciones bioquímicas. También resultan económicamente interesantes debido a su mayor facilidad de recogida y almacenamiento, y el menor coste de las determinaciones en el laboratorio.

En condiciones de estabilidad metabólica hemos observado una buena correlación para los aminoácidos ramificados (AARR) y para otros metabolitos específicos como el ácido 3 hidroxipropiónico, metilcátrico y propionil carnitina. Durante las crisis metabólicas, hemos observado un aumento significativo de los AARR tanto en plasma como en DBS, como marcadores de descompensación. Varios parámetros que resultan de la ruta metabólica de la isoleucina, como la tigilil glicina y el 2-metil-3-hidroxi-butírico aumentan durante las crisis agudas y reflejan el aumento de catabolismo proteico. Otros parámetros, como el 3hidroxipropionico, metilcitrato o el lactato también tuvieron una fuerte correlación con la descompensación metabólica, ver tabla 10 y figura 26.

Respecto a la determinación de aminoácidos, se encontraron relaciones significativas tanto en estabilidad como en descompensación en las concentraciones de los AARR, ver tabla 10 y figura 25. En concreto, la correlación de los niveles de isoleucina fue muy buena. Hay que recordar que niveles altos de este aminoácido son propios de una descompensación, pero niveles disminuidos secundarios a la restricción proteica pueden provocar un cuadro de acrodermatitis enteropática-like, precisando una suplementación “paradójica” con Ile. En nuestra serie, 9/10 pacientes requirieron suplementos de Ile para mantener los niveles plasmáticos  $> 15 \mu\text{mol/L}$  y evitar de esta manera las lesiones cutáneas, y las DBS reflejaron adecuadamente esta realidad.

Por desgracia, la correlación entre las muestras de plasma y DBS de otros aminoácidos como glicina, citrulina o glutamina no fue significativa y por lo tanto no podemos concluir que su

determinación en DBS pueda utilizarse para evidenciar su papel en distintos trastornos metabólicos secundarios y/o su papel en la aparición de complicaciones que hemos discutido en apartados anteriores. Como ocurre con la determinación de los niveles de fenilalanina que se usan en el seguimiento de la fenilcetonuria, es posible que sea preciso utilizar un factor de corrección para que ambos niveles se correspondan adecuadamente.

La determinación de acilcarnitinas en DBS también obtuvo resultados interesantes. En el caso de los niveles de carnitina libre C0 y la propionil carnitina C3 hemos observado una fuerte correlación en el modelo univariante (sin interacción con los episodios de descompensación) cuando comparamos los resultados de las muestras de plasma con las DBS, ver figura 27. Los niveles de C0 son de especial interés en el seguimiento de los pacientes, sobre todo para ajustar su tratamiento con suplementos de L-carnitina<sup>2</sup>.

Además, en nuestro estudio hemos detectado en las DBS una elevación de las acilcarnitinas de cadena larga impar expresadas como pico único C14:1-OH + C15, C16:1-OH + C17, C16:2-OH + C17:1 que tiene una correlación significativa con los OLCFAs plasmáticos (ver figura 28). Como ya describimos en la introducción, la utilización del propionil CoA en lugar del acetil CoA en la síntesis de los ácidos grasos produce la acumulación de los ácidos grasos de cadena larga impar (OLCFAs) como C15 o C17. La suma de los OLCFAs de 15 y 17 átomos de carbono saturados y monoinsaturado (C15:0, C17:0, C17:1) se calcula y se expresa como porcentaje del total de los ácidos C14-C22. Se ha propuesto utilizar el contenido de OLCFAs en distintos tejidos (plasma o membrana eritrocitaria) como marcador de seguimiento en AP, siendo una estimación indirecta para el *pool* intracelular de propionil CoA<sup>43,44</sup>. La suma de los OLCFAs de 15 y 17 átomo de carbono saturados y monoinsaturado (C15:0, C17:0, C17:1) se calcula y se



expresa como porcentaje del total de los ácidos C14-C22. Se ha propuesto utilizar el contenido de OLCFAs en distintos tejidos (plasma o membrana eritrocitaria) como marcador de seguimiento en AP, siendo una estimación indirecta para el *pool* intracelular de propionil CoA<sup>43,33</sup>. Los OLCFAs, igual que otros ácidos carboxílicos, se pueden esterificar con carnitina y producen las acilcarnitinas de cadena larga impar que detectamos en las DBS durante nuestro estudio. Explicamos en la introducción que este concepto ya se ha propuesto con el fin de utilizar las acilcarnitinas C17 como marcador de las alteraciones en el metabolismo del propionato en el cribado neonatal<sup>46</sup>, dado que en el periodo postnatal, el aumento de la lipólisis puede aumentar la producción de propionil CoA mitocondrial, que aumenta su *pool* no solamente por el catabolismo proteico, sino también a expensas de los OLCFAs<sup>45</sup>. Nosotros ampliamos este concepto y proponemos que, al igual que los OLCFAs se han propuesto como marcador para el seguimiento a largo plazo en AP, la suma de acilcarnitinas de cadena larga impar en DBS se pueden utilizar de la misma manera. Como ocurre con los propios OLCFAs, queda por determinar definitivamente la utilidad de este nuevo parámetro bioquímico como predictor de la evolución de los pacientes.

Con respecto a las muestras de orina, la determinación de los parámetros principales utilizados en el seguimiento de la AP, como el ácido 3 hidroxipropiónico o metilcátrico, tuvieron una adecuada correlación entre las muestras líquidas y las realizadas a partir de orina seca en papel de filtro, ver Tabla 10. Una de las limitaciones más importantes de nuestro estudio fue la imposibilidad de una correcta determinación de los cuerpos cetónicos en DUS, debido a la gran volatilidad del acetoacetato y 3-hidroxibutirato. Sin embargo, esta determinación es fácil de realizar con una tira rápida de orina que puede hacerse de forma simultánea.

Por lo tanto, hemos comprobado que los resultados obtenidos de las muestras en papel de filtro de sangre y orina se correlacionan adecuadamente con el estado metabólico de nuestros pacientes. Además, esta metodología nos ha permitido obtener muestras de los pacientes de forma mensual, con lo que el seguimiento de los pacientes puede ser mucho más estrecho. Como ha ocurrido en otras enfermedades como la diabetes o la fenilcetonuria, esperamos que un seguimiento más estrecho de los pacientes permita ajustar mejor el tratamiento y detectar cambios bioquímicos de forma precoz, evitando así las descompensaciones. Queda por determinar asimismo qué parámetros son los más útiles para predecir la evolución de los pacientes tanto a corto como a largo plazo.

Aunque en este estudio no se pudo medir de forma objetiva, se hizo evidente que además de los beneficios clínicos y económicos esperables de esta metodología no son desdeñables los beneficios en la calidad de vida que puede suponer para los pacientes. Esta mejoría se debería a medio y largo plazo por un mejor control de su enfermedad y a la reducción esperada de sus complicaciones. A corto plazo, supone una reducción en la necesidad de desplazarse para acudir a un centro médico ya que la propia familia puede obtenerlas en el domicilio, reduce la dificultad e incomodidad en la toma de muestras y permite un mayor empoderamiento del paciente, que puede tomar las las muestras inmediatamente en caso de síntomas o una enfermedad intercurrente. La experiencia obtenida gracias a la realización de este estudio nos ha permitido tratar adecuadamente mediante teleasistencia no sólo a los pacientes con AP sino también con otras aminoacidopatías durante los meses de confinamiento necesario por la pandemia por coronavirus<sup>201</sup>. Esta forma de atención ha demostrado ser más cómoda para los pacientes y, combinada con las necesarias visitas presenciales, se mantendrá en el futuro.

**IV. Discusión sobre la deficiencia de CoQ10 en Acidemia propiónica y suplementación con el ubiquinol**

Varios trabajos han propuesto el tratamiento coadyuvante con antioxidantes como alternativa para optimizar la disfunción mitocondrial secundaria al estrés oxidativo en los pacientes con AP<sup>73</sup>.

*In vitro*, el estudio del efecto antioxidante de distintas moléculas se mide directamente por la capacidad de reaccionar y eliminar las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, el efecto *in vivo* es más difícil de predecir y depende de múltiples factores como la absorción, metabolismo e incorporación en estructuras celulares y sobre todo mitocondriales. A pesar de un gran entusiasmo sobre el uso de antioxidantes en los años '80-'90, pocos han demostrado una utilidad terapéutica real basada en unos estudios clínicos pertinentes. En el caso de los errores innatos de metabolismo, la escasa muestra de pacientes sobre todo en edad pediátrica, la falta de biomarcadores y la necesidad de hacer pruebas invasivas como biopsias, son factores que dificultan enormemente la investigación de nuevas líneas terapéuticas sobre la disfunción mitocondrial y el uso de antioxidantes.

Como ya hemos referido en la introducción a esta tesis, algunos autores han descrito un efecto benéfico dosis dependiente en pacientes con AP y cardiomiopatía dilatada, con mejor respuesta clínica a dosis más altas<sup>78</sup>. Parte de la dificultad en comprobar la utilidad de estas terapias y comparar los resultados de los estudios publicados hasta la fecha es que hay mucha heterogeneidad en la dosis, formas de presentación y biodisponibilidad de los suplementos de CoQ10. Dentro de las presentaciones disponibles, parece que la forma reducida, el ubiquinol, puede ser más efectiva alcanzar niveles plasmáticos adecuados y la incorporación en estructuras celulares <sup>114,115,116</sup>.

En apartados anteriores hemos visto las posibles implicaciones de la disfunción mitocondrial y el potencial beneficio del tratamiento con antioxidantes en pacientes con AP. Varios estudios han objetivado el aumento del estrés oxidativo en modelos de animales con esta enfermedad y el potencial efecto benéfico de algunos antioxidantes se ha demostrado también in vitro en fibroblastos de los pacientes<sup>90,91</sup>. Sin embargo, no tenemos conocimiento de que se haya publicado hasta la fecha otro ensayo sobre el estado de la CoQ10 y la eficacia de la suplementación con ubiquinona en los pacientes con AP.

Nuestro objetivo principal fue determinar el estado de la CoQ10 en pacientes con AP y la tolerancia al tratamiento. Hemos demostrado una disminución de los niveles plasmático de CoQ10 que se han normalizado durante la suplementación con ubiquinol. No hemos podido objetivar cambios significativos en otros marcadores bioquímicos. El aumento de los niveles urinarios de citrato que fue el hallazgo más llamativo, aunque sin alcanzar significación estadística. Este metabolito puede ser considerado como un marcador del funcionamiento del ciclo de Krebs, como han reflejado algunos autores<sup>65</sup>.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones importantes, entre ellas la escasa muestra de pacientes y la duración relativamente corta de la suplementación con ubiquinol, lo que nos impiden observar un claro beneficio clínico. Entre los pacientes con acidemia propiónica hay una gran heterogeneidad de la aparición de las complicaciones a largo plazo que se podrían atribuir a alteraciones en el metabolismo oxidativo, siendo la afectación cardiaca (cardiomiopatía, QT largo) o neurológica (epilepsia, trastornos de movimiento) entre las más precozmente descritas<sup>118</sup>. Otras alteraciones, como la atrofia del nervio óptico aparecen más tarde en adolescentes o adultos jóvenes. En cualquier caso, tanto la aparición o no de los síntomas como

un posible beneficio en la suplementación con CoQ10 sólo se podrían observar en estudios prolongados. Sí podemos concluir que fue una medicación bien tolerada y con la que no se observaron efectos secundarios.

Otra limitación es la determinación plasmática de CoQ10. La CoQ10 sintetizada en el hígado se libera en la circulación sistémica dentro de partículas lipídicas, en donde ejerce su papel como antioxidante. No está establecido, por lo tanto, si los niveles plasmáticos de CoQ10 se corresponden con su actividad tisular. El *gold standard* para cuantificar la deficiencia de CoQ10 es medir sus niveles en el músculo esquelético, pero esto requiere la realización de una biopsia muscular y no nos parecía adecuado someter a nuestros pacientes a una técnica tan agresiva, sobre todo de forma repetitiva. También se han desarrollado técnicas para la determinación de CoQ10 en fibroblastos y linfocitos<sup>110,202</sup> que habrían podido ser más adecuadas pero que no teníamos disponibles al inicio de nuestro estudio.

A pesar de estas limitaciones, el que se hayan encontrado niveles disminuidos en la mayoría de nuestros pacientes, junto con la disminución de citrato (ver figuras 29 y 30), es un hallazgo llamativo y similar al encontrado por algunos autores que también han estudiado los niveles plasmáticos de CoQ10 en pacientes con otras enfermedades metabólicas o neurodegenerativas y sugieren su suplementación como prevención de un posible déficit crónico<sup>92</sup>.



## **CONCLUSIONES**



Los diferentes estudios realizados como parte de esta tesis doctoral han permitido apoyar en algunos casos o descubrir en otros posibles mecanismos etiopatogénicos para explicar la clínica y las alteraciones bioquímicas observadas en los pacientes con acidemia propiónica.

Por un lado, el perfil de aminoácidos observado con niveles plasmáticos de alanina y glutamina paradójicamente disminuidos para tratarse de pacientes con acidosis láctica e hiperamonemia, nos sugiere que existe un desequilibrio en el metabolismo de aminoácidos a nivel muscular. Estas alteraciones pueden tener profundas implicaciones a nivel del metabolismo energético por la anaplerosis deficiente y sobre todo en la detoxificación del amonio. En relación con esta última, el perfil de aminoácidos del ciclo de la urea con hipocitrulinemia e hipoprolinemia y en menor medida hipoornitinemia e hipoargininemia es sugestivo de disfunción secundaria de la  $\Delta^1$ -piroline-carboxilato sintetasa, probablemente debida a la disminución de su sustrato glutamina. Finalmente, hemos observado que los pacientes también tienen un desequilibrio de los aminoácidos aromáticos, lo que podría tener implicaciones en la síntesis de neurotransmisores.

Muchas de las alteraciones bioquímicas observadas, así como parte de los síntomas agudos y sobre todo crónicos, tales como la anemia y posiblemente también la pancreatitis, parecen estar en relación con desequilibrios en los niveles de los aminoácidos ramificados. La valina y la isoleucina se restringen de forma habitual en la dieta de estos pacientes por tratarse de sustratos propiogénicos, pero dados los resultados de nuestro estudio, que se correlacionan con hallazgos descritos previamente por otros autores, se presenta el dilema sobre si su

restricción excesiva, sobre todo si se asocia con un aporte proporcionalmente elevado de leucina, no sea también un factor que pueda favorecer la aparición de crisis hiperamoniémicas y/o complicaciones a largo plazo. La implicación de la treonina en el mantenimiento de la barrera intestinal está insuficientemente estudiada pero nuestros resultados apuntan a que podría tener implicación en el paso de nutrientes, propionato o gérmenes al organismo y por lo tanto influir así en la aparición tanto de síntomas agudos como crónicos.

En los últimos años algunos pacientes con acidemia propiónica se tratan mediante trasplante hepático. También se ha propuesto el análogo sintético de la N-acetil glutamato no sólo como tratamiento en las crisis hiperamoniémicas agudas sino como tratamiento crónico para reducir el riesgo de hiperamoniemia. Ninguno de estos tratamientos actuaría sobre el metabolismo muscular de los aminoácidos ramificados ni tendría efecto en la producción de los aminoácidos del ciclo de la urea, que tiene lugar en el enterocito. Sin embargo, en ambos casos se puede predecir un beneficio en la reducción de complicaciones agudas y crónicas si permiten aumentar la ingesta de proteínas naturales. Se plantea por tanto la duda sobre si este mismo beneficio se podría conseguir con medidas menos costosas o invasivas adecuando mejor la dieta de los pacientes, sobre todo evitando restricciones proteicas excesivas y/o administrando sustratos anapleróticos.

La disfunción mitocondrial secundaria también se especula como una causa importante de la sintomatología, fundamentalmente crónica y que incluye síntomas pancreáticos, neurológicos y cardiacos como los observados en nuestros pacientes. Hemos observado cambios bioquímicos que apoyan esta hipótesis, y también hemos comprobado que la

suplementación con ubiquinol es una terapia segura y eficaz para la normalización de los niveles de coenzima Q10, lo que en un futuro podría evitar la aparición de estas complicaciones.

Finalmente, hemos demostrado que las muestras de sangre y orina seca en papel de filtro reflejan correctamente el estado metabólico de los pacientes con acidemia propiónica y podrían ser útiles para su seguimiento a corto y largo plazo. La facilidad de recogida y transporte de las muestras, junto con el coste de las determinaciones hace que sean metodológica y económicamente ventajosas, lo que permite utilizarlas de forma más frecuente y así realizar estudios más precisos. Además, la obtención de muestras en papel filtro es sencilla, lo que reduce la necesidad de utilizar técnicas agresivas y permite su toma en el domicilio, mejorando la calidad de vida de los pacientes, especialmente aquellos que viven lejos de los centros hospitalarios de referencia.

Por todos estos motivos, se ha alcanzado el objetivo principal de la tesis, que consistía en mejorar el entendimiento de la acidemia propiónica con el fin de proponer nuevas formas de seguimiento y tratamiento de los pacientes para reducir su sintomatología y mejorar su esperanza y calidad de vida.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Desviat, L R; Pérez, B; Pérez-Cerdá, C; Rodríguez-Pombo, P; Clavero, S; Ugarte, M. Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles. *Mol Genet Metab.* 2004; 28-37
2. Baumgartner, M. R., Hörster, F., Dionisi-Vici, C., & et al. (2014). Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet J Rare Dis*, 130.
3. Haijes, H A; Jans, J JM; Tas, S Y; Verhoeven-Duif, N M; van Hasselt, P M. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: Complications. *J Inherit Metab Dis.* 2019; 730-744
4. Huang, C S; Shen, Y; Deng, B; Sadre-Bazzaz, K; Zhou, Z H; Tong, L. Crystal structure of the alpha(6)beta(6) holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature.* 2010; 1001-5
5. Wongkittichote, P; Ah Mew, N; Chapman, K A. Propionyl-CoA carboxylase - A review. *Mol Genet Metab.* 2017; 145-152
6. Gravel, R A; Lam, K F; Mahuran, D; Kronis, A. Purification of human liver propionyl-CoA carboxylase by carbon tetrachloride extraction and monomeric avidin affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys.* 1980; 669-673.
7. Tong, L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci.* 2013.863-91
8. Lamhonwah, A M; Barankiewicz, T J; Willard, H F; Mahuran, D J; Quan, F; Gravel, R A. Isolation of cDNA clones coding for the alpha and beta chains of human propionyl-CoA

carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 4864-8

9. Yorifuji, T; Kawai, M; Muroi, J; Mamada, M; Kurokawa, K; Shigematsu, Y; Hirano, S; Sakura, N; Yoshida, I; Kuhara. Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Hum Genet.* 2002; 161-5.
10. Walter, J H; Thomson, G N; Leonard, J V; Bartlett, K; Halliday, D. Contribution of aminoacid catabolism to propionate production in methylmalonic acidemia. *Lancet.* 1989; 1298-9.
11. Sbaï D, Nancy C, Thompson GN, Mariotti A, Poggi F, Saudubray JM, Bresson JL; Sbaï, D; Nancy, C; Thomson, G N; Mariotti, A; Poggi, F; Saudubray, J M; Bresson, J L. Contribution of odd-chain fatty acid oxidation to propionate production in disorders of propionate metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1994. 1332-7.
12. Thompson, G N; Walter, J H; Bresson, J L; Ford, G C; Lyonnet, S L; Chalmers, C A; Saudubray, J M; Leonard, J V; Halliday, D. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism.* 1990; 1133-7.
13. Creighton, T E. *Proteins: Structure and Molecular Properties.* Editores W. H. Freeman, 1993. New York.
14. Dill, K A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.* 1990. 7133-55.
15. Chou, P Y; Fasman, G D. Structural and functional role of leucine residues in proteins. *J Mol Biol.* 1973; 263-81.
16. Brosnan, J T; Brosnan, M E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr,* 2016; 207S-11S.

17. Holeček, M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition and Metabolism*. 2018; 15;33
18. Letto, J; Brosnan, J T; Brosnan, M E. Oxidation of 2-oxoisocaproate and 2- oxoisovalerate by the perfused rat heart. Interactions with fatty acid oxidation. *Biochem Cell Biol*. 1990; 260-5
19. Lee, S H; Davis, E J. Amino acid catabolism by perfused rat hindquarter. The metabolic fates of valine. *Biochem J*. 1986; 621-30.
20. Chang, T W; Goldberg, A L. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1978; 3685-95.
21. Chang, T W; Goldberg, A L. The origin of alanine produced in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1978; 3677-84.
22. Shimomura, Y; Murakami, T; Nakai, N; Nagasaki, M; Harris, R A. Exercise promotes BCAA catabolism: Effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr* 2004; 1583S–7S.
23. Anderson, K A; Huynh, F K; Fisher-Wellman, K; Stuart, J D; Peterson, B S; Douros, J D; Wagner, G R. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab*. 2017; 838-855.e15.
24. Duan, Y; Li, F; Li, Y; Tang, Y; Kong, X; Feng, Z; Anthony, T; Watford, M. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*. 2016: 41-51
25. Holecek, M; Muthny, T; Kovarik, M; Sispera, L. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. *Food Chem Toxicol*, 2009; 255-9.



26. Kovarik, M; Muthny, T; Sispera, L; Holecek, M. Effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. *J Physiol Biochem.* 2010; 311-9.
27. Métayer, S; Seiliez, I; Collin, A; Duchêne, S; Mercier, Y; Geraert, P A; Tesseraud, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem*, 2008; 207-15.
28. Kino, K; Okumura, J. The effect of single essential amino acid deprivation on chick growth and nitrogen and energy balances at ad libitum- and equalized-food intakes. *Poult Sci.* 1986; 1728-35.
29. Baker, D H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. *J Nutr.* 2006; 1670S-1675S.
30. Obled C, Papet I, Breuille D. Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. In: LA, Cynober. *Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition*. 2nd ed. CRC Press LLC Editores, Boca Raton. 2004, pag 667-87
31. Schwerin, M; Dorroch, U; Beyer, M; Swalve, H; Metges, C C; Junghans, P. Dietary protein modifies hepatic gene expression associated with oxidative stress responsiveness in growing pigs. *FASEB J*, 2002; 1322-4.
32. Weltman, M D; Farrell, G C; Liddle, C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. 1996; 1645–53
33. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR; Leclercq, I A; Farrell, G C; Field, J; Bell, D R; Gonzalez, F J; Robertson, G R. CYP2E1 and CYP4A as Microsomal

Catalysts of Lipid Peroxides in Murine Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2000; 1067-75.

34. Seneviratne, C K; Li, T; Khaper, N; Singal, P K. Effects of methionine on endogenous antioxidants in the heart. *Am J Physiol*, 1999; 2124-8.
35. Métayer, S; Seiliez, I; Collin, A; Duchêne, S; Mercier, Y; Geraert, P A; Tesseraud, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem.* 2008; 207-15.
36. Kim, G; Weiss, S J; Levine, R L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 901-5.
37. Filipowicz, H R; Ernst, S L; Ashurst, C L; Pasquali, M; Longo, N. Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2006; 123–30.
38. Levine, R L; Mosoni, L; Berlett, B S; Stadtman, E R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 15036–40.
39. Salmi, H; Leonard, J V; Lapatto, R. Patients with organic acidaemias have an altered thiol status. *Acta Paediatr (Oslo)*, 2012; e505-e508.
40. Stoll, B; Henry, J; Reeds, P J; Yu, H; Jahoor, F; Burrin, D G. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr*, 1998; 606-14.
41. Fuller, M F; Milne, A; Harris, C I; Reid, T M; Keenan, R. Amino acid losses in ileostomy fluid on a protein-free diet. *Am J Clin Nutr*, 1994; 70-3.

42. Faure, M; Moënnos, D; Montigon, F; Mettraux, C; Breuillé, D; Ballèvre, O. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *J Nutr*, 2005; 486-91.
43. Meissner, T; Leichsenring, M; Mayatepek, E. Odd-numbered long-chain fatty acids in erythrocyte phospholipids as long-term follow-up parameter in propionic acidemia. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 1005-8.
44. Sperl, W; Murr, C; Skladal, D; Sass, J O; Suormala, T; Baumgartner, R; Wendel, U. Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidaemia. *Eur J Pediatr*, 2000; 54-8
45. Lehnert, W; Sperl, W; Suormala, T; Baumgartner, R. Propionic acidaemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *Eur J Pediatr*. 1994; S68-80.
46. Malvagia, S; Haynes, C A; Grisotto, L; Ombrone, D; Funghini, S; Moretti, E; et al. Heptadecanoylcarnitine (C17) a novel candidate biomarker for newborn screening of propionic and methylmalonic acidemias. *Clin Chim Acta*, 2015; 342-8.
47. Burlina, A; Tims, S; Spronsen, F; et al. The potential role of gut microbiota and its modulators in the management of propionic and methylmalonic acidemia. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2018; 683-92.
48. Al-Hassnan, Z N; Boyadjiev, S A; Praphanphoj, V; Hamosh, A; Braverman, N E; Thomas, G H; Geraghty, M T. The relationship of plasma glutamine to ammonium and of glycine to acid-base balance in propionic acidaemia. *J Inherit Metab Dis*. 2003;89-91.
49. Mc Guire, P J; Parikh, A; Diaz, G A. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab*. 2009; 173-80.

50. Hayasaka, K; Tada, K. Effects of the metabolites of the branched-chain amino acids and cysteamine on the glycine cleavage system. *Biochem Int.* 1983; 225-30.
51. Kölker, S; Valayannopoulos, V; Burlina, A B; Sykut-Cegielska, J; Wijburg, F A; Teles, E L; et al. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 1059–74.
52. MacFabe, D F; Cain, D P; Rodriguez-Capote, K; Franklin, A E; Hoffman, J E; Boon, F; Taylor, A R; Kavaliers, M; Ossenkopp, K P. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* 2007; 149-69.
53. Morland, C; Frøland, A S; Pettersen, M N; Storm-Mathisen, J; Gundersen, V; Rise, F; Hassel, B. Propionate enters GABAergic neurons, inhibits GABA transaminase, causes GABA accumulation and lethargy in a model of propionic acidemia. *Biochem J.* 2018; 749-58.
54. Jafari, P; Braissant, O; Zavadakova, P; Henry, H; Bonafé, L; Ballhausen, D. Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;4.
55. Häberle, J. Current approach to hyperammonemia. *Future Medicine Editors*, 2015.
56. Baumgartner, M R; Hu, C A; Almashanu, S; Steel, G; Obie, C; Aral, B; Rabier, D; Kamoun, P; Saudubray, J M; Valle, D. Hyperammonemia with reduced ornithine, citrulline, arginine and proline: a new inborn error caused by a mutation in the gene encoding delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase. *Hum Mol Genet.* 2000; 2853-8.

57. Ah Mew, N; McCarter, R; Daikhin, Y; Nissim, I; Yudkoff, M; Tuchman, M. N-carbamylglutamate augments ureagenesis and reduces ammonia and glutamine in propionic acidemia. *Pediatrics*. 2010; e208-e214.
58. Valayannopoulos, V; Baruteau, J; Delgado, M B; Cano, A; Couce, M L; Del Toro, M; Donati, M A; et al. Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable risk-benefit profile: a retrospective observational study. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;32
59. Scholl-Bürgi, S; Sass, J O; Zschocke, J; Karall, D. Amino acid metabolism in patients with propionic acidaemia. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 65-70.
60. Scholl-Bürgi, S; Sass, J O; Heinz-Erian, P; Amann, E; Haberlandt, E; Albrecht, U; Ertl, C; et al. Changes in plasma amino acid concentrations with increasing age in patients with propionic acidemia. *Amino Acids*. 2010; 1473-81
61. Brunengraber, H; Roe, C R. Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis*, 2006; 327-31.
62. Roe, C R; Mochel F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: Therapeutic potential. *J Inherit Metab Dis*. 2006;332–40
63. Brock, M; Buckel, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. Propionyl-CoA inhibits glucose metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem*. 2004; 3227-41.
64. Mochel, F; DeLonlay, P; Touati, G; Brunengraber, H; Kinman, R P; Rabier, D; Roe, C R; Saudubray, J M. Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab*. 2005; 305-12.

65. Longo, N; Price, L B; Gappmaier, E; Cantor, N L; Ernst, S L; Bailey, C; Pasquali, M. Anaplerotic Therapy in Propionic Acidemia. *Mol Genet Metab.* 2017;51-9.
66. Wajner, M; Goodman, S I. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr.* 2011:31-8.
67. Chemelli, A P; Schocke, M; Sperl, W; Trieb, T; Aichner, F; Felber, S. Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) in Five Patients With Treated Propionic Acidemia. *J Magn Reson Imaging.* 2000;596-600.
68. Shoffner, J.M. Oxidative phosphorylation diseases. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill Editores, 2001, New York; pag 2367–2423
69. Martinez Alvarez, L; Jameson, E; Parry, N R; Lloyd, C; Ashworth, J L. Optic neuropathy in methylmalonic acidemia and propionic acidemia. *Br J Ophthalmol.* 2016;98-104.
70. Williams, Z R; Hurley, P E; Altiparmak, U E; Feldon , S E; Arnold, G L; Eggenberger, E; Mejico, L J. Late Onset Optic Neuropathy in Methylmalonic and Propionic Acidemia. *Am J Ophthalmol,* 2009; 929-33.
71. de Keyzer, Y; Valayannopoulos, V; Benoist, J F; Batteux, F; Lacaille, F; Hubert, L; et al. Multiple OXPHOS Deficiency in the Liver, Kidney, Heart, and Skeletal Muscle of Patients With Methylmalonic Aciduria and Propionic Aciduria. *Pediatr Res,* 2009;91-5
72. Schwab, M A; Sauer, S W; Okun, J G; Nijtmans, L G; Rodenburg, R J; van den Heuvel, L P; et al. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J,* 2007;106-12.

73. Gallego-Villar, L; Rivera-Barahona, A; Cuevas-Martín, C; et al. In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 1-12.
74. Romano, S; Valayannopoulos, V; Touati, G; Jais, J P; Rabier, D; de Keyzer, Y; Bonnet, D; de Lonlay, P. Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation. *J Pediatr*, 2010; 128-34.
75. Mardach, R; Verity, M A; Cederbaum, S D. Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*, 2005; 286-90.
76. Fragaki, K; Cano, A; Benoist, J F; Rigal, O; Chausseot, A; Rouzier, C; et al. Fatal heart failure associated with CoQ10 and multiple OXPHOS deficiency in a child with propionic acidemia. *Mitochondrion*, 2011; 533-6.
77. Rodenburg, R JT. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis*. 2011; 283-92.
78. Baruteau, J; Hargreaves, I; Krywawych, S; Chalasani, A; Land, J M; Davison, J E; et al. Successful reversal of propionic acidemia associated cardiomyopathy: Evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism. *Mitochondrion*, 2014;150-6.
79. Maruyama, K; Kitamura, H. Mechanisms of growth inhibition by propionate and restoration of the growth by sodium bicarbonate or acetate in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J Biochem*, 1985; 819-24.

80. Gregersen, N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-Co-A. *Biochem Med*, 1981;20-7.
81. Horswill, A R; Dudding, A R; Escalante-Semerena, J C. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem*. 2001; 19094-101
82. Cheema-Dhadli, S; Leznoff, C C; Halperin, M L. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatr Res*, 1975; 905-8.
83. Elpeleg, O; Miller, C; Hershkovitz, E; Bitner-Glindzicz, M; Bondi-Rubinstein, G; Rahman, S; Pagnamenta, A; Eshhar, S; Saada, A. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet*. 2005; 1081-6.
84. Chen, X J; Wang, X; Kaufman, B A; Butow, R A. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 2005; 714-7.
85. Richard, E; Gallego-Villar, L; Rivera-Barahona, A; Oyarzábal, A; Pérez, B; Rodríguez-Pombo, P; Desviat, L R. Altered Redox Homeostasis in Branched-Chain Amino Acid Disorders, Organic Acidurias, and Homocystinuria. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 1-17.
86. Ribas, G S; Biancini, G B; Mescka, C; et al. Oxidative Stress Parameters in Urine from Patients with Disorders of Propionate Metabolism: a Beneficial Effect of L-Carnitine Supplementation. *Cell Mol Neurobiol*. 2012; 77-82.
87. Nakao, S; Moriya, Y; Furuyama, S; Niederman, R; Sugiya, H. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol Int*. 1998; 331-7.



88. Rigo, F K; Pasquetti, L; Malfatti, C R; Fighera, M R; Coelho, R C; Petri, C Z; Mello, C F. Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. 2006;151-4.
89. Fontella, F U; Pulrolnik, V; Gassen, E; Wannmacher, C M; Klein, A B; Wajner, M; Dutra-Filho, C S. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. Neuroreport. 2000; 541-4.
90. Gallego-Villar, L; Pérez-Cerdá, C; Pérez, B; et al. Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia. J Inherit Metab Dis, 2012;731-40.
91. Gallego-Villar, L; Pérez, B; Ugarte, M; Desviat, L R; Richard, E. Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2014; 457-61.
92. Montero R, Yubero D, Salgado MC, et al. Plasma coenzyme Q10 status is impaired in selected genetic conditions. Sci Rep, 2019;793.
93. Yubero, D; Montero, R; Martin, M A; Montoya, J; Ribes, A; Grazina, M; et al. Secondary coenzyme Q10 deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. Mitochondrion. 2016;51-8
94. Haas, D; Niklowitz, P; Hörster, F; Baumgartner , E R; Prasad, C; Rodenburg, R J; et al. Coenzyme Q10 is decreased in fibroblasts of patients with methylmalonic aciduria but not in mevalonic aciduria. J Inherit Metab Dis. 2009;570-5.
95. Sadun, A. Mitochondrial optic neuropathies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;423– 5.

96. Pinar-Sueiro, S; Martínez-Fernández, R; Lage-Medina, S; Aldamiz-Echevarria, L; Vecino, E. Optic neuropathy in methylmalonic acidemia: the role of neuroprotection. *J Inherit Metab Dis.* 2010; S199–S203.
97. Traber, G; Baumgartner, M R; Schwarz, U; Pangalu, A; Donath, M Y; Landau, K. Subacute Bilateral Visual Loss in Methylmalonic Acidemia. *J Neuroophthalmol.* 2011;344-6.
98. Bentinger, M; Tekle, M; Dallner, G. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;74-9.
99. Gómez-Díaz, C; Rodríguez-Aguilera, J C; Barroso, M P; Villalba, J M; Navarro, F; Crane, F L; Navas, P. Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;51-7.
100. Papucci, L; Schiavone, N; Witort, E; Donnini, M; Lapucci, A; Tempestini, A; et al. Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem.* 2003; 28220–8.
101. Schmelzer, C; Lindner, I; Vock, C; Fujii, K; Döring, F. Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB Life.* 2007;628-33.
102. Thomas, S R; Neuzil, J; Stocker, R. Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;684-96.
103. Hamilton, S J; Chew, G T; Watts, G F. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;89-102.
104. Marcoff, L; Thompson, P D. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 2231-7.

105. Päivä, H; Thelen, K M; Van Coster, R; Smet, J; De Paepe, B; Mattila, K M; et al. High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: a randomized, controlled trial. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;60-8.
106. Banach, M; Serban, C; Ursoniu, S; Rysz, J; Muntner, P; Toth, P P; et al. Statin therapy and plasma coenzyme Q10 concentrations—A systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Pharmacol Res.* 2015;329-36.
107. Tomasetti, M; Alleva, R; Solenghi, M D; Littarru, G P. Distribution of antioxidants among blood components and lipoproteins: significance of lipids/CoQ10 ratio as a possible marker of increased risk for atherosclerosis. *Biofactors.* 1999;231-40.
108. Rötig, A; Mollet, J; Rio, M; Munnich, A. Infantile and pediatric quinone deficiency diseases. *Mitochondrion.* 2007; S112–S121.
109. Kocharian, A; Shabanian, R; Rafiei-Khorgami, M; Kiani, A; Heidari-Bateni, G. Coenzyme Q10 improves diastolic function in children with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiol Young.* 2009;501-6.
110. Arias, A; García-Villoria, J; Rojo, A; Buján, N; Briones, P; Ribes, A. Analysis of coenzyme Q(10) in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;23-6.
111. López, L C; Quinzii C M; Area, E; et al. Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PLoS One.* 2010; e11897.

112. Rötig, A; Appelkvist, E L; Geromel, V; et al. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet*. 2000; 391-5.
113. Bhagavan, H N; Chopra, R K. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion*. 2007; S78–S88.
114. López-Lluch, G; Del Pozo-Cruz, J; Sánchez-Cuesta, A; Cortés-Rodríguez, A B; Navas, P. Bioavailability of coenzyme Q10 supplements depends on carrier lipids and solubilization. *Nutrition*. 2019; 133-40.
115. Salviati, L; Trevisson, E; Rodriguez Hernandez, M A; Casarin, A; Pertegato, V; Doimo, M; et al. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet*. 2012; 187–91.
116. García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Doerrier C, et al.; García-Corzo, L; Luna-Sánchez, M; Doerrier, C; Ortiz, F; Escames, G; Acuña-Castroviejo, D; López, L C. Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 893–901
117. Quinzii, C M; López, L C; Von-Moltke, J; Naini, A; Krishna, S; Schuelke, M. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*. 2008; 1874–85.
118. Tuncel, A T; Boy, N; Morath, M A; Hörster, F; Mütze, U; Kölker, S. Organic acidurias in adults: late complications and management. *J Inherit Metab Dis*. 2018; 765-76.

119. Kölker, S; Sauer, S W; Hoffmann, G F; Müller, I; Morath, M A; Okun, J G. Pathogenesis of CNS involvement in disorders of amino and organic acid metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2008;194-204.
120. Manoli, I; Myles , J G; Sloan, J L; Shchelochkov, O A; Venditti, C P. A critical reappraisal of dietary practices in methylmalonic acidemia raises concerns about the safety of medical foods. Part 1: isolated methylmalonic acidemias. *Genet Med.* 2016; 386-95.
121. Bodemer, C; De Prost, Y; Bachollet, B; Poggi, F; Teillac-Hamel, D; Fraitag, S; Saudubray, J M. Cutaneous manifestations of methylmalonic and propionic acidemia: a description based on 38 cases. *Br J Dermatol.* 1994;93-8.
122. Molema, F; Gleich, F; Burgard, P; van der Ploeg, A T; Summar, M L; Chapman, K A; et al. Decreased plasma l-arginine levels in organic acidurias (MMA and PA) and decreased plasma branched-chain amino acid levels in urea cycle disorders as a potential cause of growth retardation: Options for treatment. *Mol Genet Metab.* 2019;394-405.
123. Molema, F; Gleich, F; Burgard , P; van der Ploeg, A T; Summar , M L; Chapman, K A; Barić, I; Lund, A M; et al. Evaluation of dietary treatment and amino acid supplementation in organic acidurias and urea-cycle disorders: On the basis of information from a European multicenter registry. *J Inherit Metab Dis.* 2019; 1162-75.
124. Myles, J G; Manoli, I; Venditti, C P. Effects of Medical Food Leucine Content in the Management of Methylmalonic and Propionic Acidemias. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2018;42-8.

125. Daly, A; Pinto, A; Evans, S; Almeida, M F; Assoun, F; Belanger-Quintana, A; et al. Dietary practices in propionic acidemia: A European survey. *Mol Genet Metab Rep.* 2017; 83-9.
126. Lane, T N; Spraker, M K; Parker, S S. Propionic acidemia manifesting with low isoleucine generalized exfoliative dermatosis. *Pediatr Dermatol.* 2007;508-10.
127. Bosch, A M; Sillevis Smitt, J H; Van Gennip, A H; Abeling, N G; Schutgens, R B; Bakker, H D; Wijburg, F A. Iatrogenic isolated isoleucine deficiency as the cause of an acrodermatitis enteropathica-like syndrome. *Br J Dermatol.* 1998;48-91.
128. Vitoria Miñana, I; Dalmau Serra, J. Lesiones semejantes a las acrodermatitis enteropática en la acidemia metilmalónica por déficit de valina. *An Esp Ped.* 2010;96-7.
129. van Vliet, D; Derks, T G; van Rijn, M; de Groot, M J; MacDonald, A; Heiner-Fokkema, M R; van Spronsen, F J. Single amino acid supplementation in aminoacidopathies: a systematic review. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9:7
130. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62224/FichaTecnica\\_62224.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62224/FichaTecnica_62224.html). Accedido enero 2021.
131. Ferrer I, Ruiz-Sala P, Vicente Y, Merinero B, Pérez-Cerdá C, Ugarte M. Separation and identification of plasma short-chain acylcarnitine isomers by HPLC/MS/MS for the differential diagnosis of fatty acid oxidation defects and organic acidemias. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;121-6

132. Casetta, B; Tagliacozzi, D; Shushan, B; Federici, G. Development of a method for rapid quantitation of amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in plasma. Clin Chem Lab Med. 2000;391-401
133. Rebolledo-Fernandez, M M; Castiñeiras, D E; Bóveda, M D; Couce, M L; Cocho, J A; Fraga, J M. Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism. Rapid Commun Mass Spectrom. 2012; 2131-44.
134. Abu-El-Haija, M; Kumar, S; Quiros, J A; et al. The Management of Acute Pancreatitis in the Pediatric Population: A Clinical Report from the NASPGHAN Pancreas Committee. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2018;159-76.
135. Wu, Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids. 2009;1-17.
136. Ierardi-Curto, L; Kaplan, P; Saitta, S; Mazur, A; Berry, G T. The glutamine paradox in a neonate with propionic acidaemia and severe hyperammonaemia. J Inherit Metab Dis. 2000;85-6.
137. Ruderman, N L; Lund, P. Amino acid metabolism in skeletal muscle: regulation of Glutamine and Alanine release in the perfused rat hindquarter. Israel J Med Sci. 1972; 295-302.
138. Wagenmakers, A J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. Exerc Sport Sci Rev. 1998;287-314.

139. van de Poll, M C; Siroen, M P; van Leeuwen, P A; Soeters, P B; Melis, G C; Boelens, P G; Deutz, N E; Dejong, C H. Interorgan amino acid exchange in humans: consequences for arginine and citrulline metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2007; 167-72.
140. Ahlborg, G; Felig, P; Hagenfeldt, L; Hendler, R; Wahren, J. Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest.* 1974;1-80-90.
141. Jungas, R L; Halperin, M L; Brosnan, J T. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev.* 1992; 419-48.
142. Katz, J; Tayek, J A. Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am J Physiol.* 1998; E537-E542.
143. Holeček, M. Branched-Chain Amino Acids and Branched-Chain Keto Acids in Hyperammonemic States: Metabolism and as Supplements. *Metabolites.* 2020;324.
144. Holecek, M; Kandar, R; Sispera, L; Kovarik, M. Acute hyperammonemia activates branched-chain amino acid catabolism and decreases their extracellular concentrations: different sensitivity of red and white muscle. *Amino Acids.* 2011; 575-84.
145. Stumpf, D A; McAfee, J; Parks, J K; Eguren, L. Propionate inhibition of succinate:CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. *Pediatr Res.*1980; 1127-31.
146. Kölker, S; Burgard, P; Sauer, S W; Okun, J G. Current concepts in organic acidurias: understanding intra- and extracerebral disease manifestation. *J Inherit Metab Dis.* 2013;635-44.



147. Marco-Marín, C; Escamilla-Honrubia, J M; Llácer, J L; Seri, M; Panza, E; Rubio, V.  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase deficiency: An emergent multifaceted urea cycle-related disorder. *J Inherit Metab Dis.* 2020; 657-70.
148. Martinelli, D; Häberle, J; Rubio, V; Giunta, C; Hausser, I; Carrozzo, R; et al. Understanding pyrroline-5-carboxylate synthetase deficiency: clinical, molecular, functional, and expression studies, structure-based analysis, and novel therapy with arginine. *J Inherit Metab Dis.* 2012;761-76.
149. Phang, J M. Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses. *Antioxid Redox Signal.* 2019;635-49.
150. Lehnert, H; Wurtman, R J. Amino acid control of neurotransmitter synthesis and release: physiological and clinical implications. *Psychother Psychosom.* 1993;18-32.
151. Pietz, J; Kreis, R; Rupp, A; Mayatepek, E; Rating, D; Boesch, C; Bremer, H J. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;1169-78.
152. Strauss, K A; Carson, V J; Soltys, K; Young, M E; Bowser, L E; Puffenberger, E G; et al. Branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase deficiency (maple syrup urine disease): Treatment, biomarkers, and outcomes. *Mol Genet Metab.* 2020;193-206.
153. Stork, L C; Ambruso, D R; Wallner, S F; Sambrano, J E; Moscinski, L C; Wilson, H L; McCab, E R. Pancytopenia in Propionic Acidemia: Hematologic Evaluation and Studies of Hematopoiesis in Vitro. *Pediatr Res.* 1986;783-8.

154. Inoue, S; Krieger, I; Sarnaik, A; Ravindranath, Y; Fracassa, M; Ottenbreit, M J. Inhibition of bone marrow stem cell growth in vitro by methylmalonic acid: a mechanism for pancytopenia in a patient with methylmalonic acidemia. *Pediatr Res.* 1981;95-8.
155. Santos, E W; Oliveira, D C; Silva, G B; et al. Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutr Rev.* 2017;909-19.
156. Bianchi, V E. Role of nutrition on anemia in elderly. *Clin Nutr ESPEN.* 2016;e1-e11.
157. Taya, Y; Ota, Y; Wilkinson, A C; Kanazawa, A; Watarai, H; Kasai, M; Nakauchi, H; Yamazaki, S. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science.* 2016; 1152-5.
158. Wilkinson, A C; Morita, M; Nakauchi, H; Yamazaki, S. Branched-chain amino acid depletion conditions bone marrow for hematopoietic stem cell transplantation avoiding amino acid imbalance-associated toxicity. *Exp Hematol.* 2018; 12-16.e1.
159. Zhen, H; Nakamura, K; Kitauro, Y; Kadota, Y; Ishikawa, Y; Kondo, Y; Xu, M; Shimomura, Y. Regulation of the plasma amino acid profile by leucine via the system L amino acid transporter. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 2057-62.
160. Wessels, A G; Kluge, H; Hirche, F; Kiowski, A; Schutkowski, A; Corrent, E; Bartelt, J; König, B; Stangl, G I. High Leucine Diets Stimulate Cerebral Branched-Chain Amino Acid Degradation and Modify Serotonin and Ketone Body Concentrations in a Pig Model. *PLoS One.* 2016;e0150376.
161. Gatnau, R; Zimmerman, D R; Nissen, S L; Wannemuehler, M; Ewan, R C. Effects of excess dietary leucine and leucine catabolites on growth and immune responses in weanling pigs. *J Anim Sci.* 1995;159-65.

162. Imamura, W; Yoshimura, R; Takai, M; Yamamura, J; Kanamoto, R; Kato, H. Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: a transcriptomic analysis to identify useful biomarkers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;45-55.
163. Gilmore, A; Bock, H G; Nowicki, M. Hyperamylasemia/hyperlipasemia in a child with propionic acidemia. *Am J Med Genet*. 2008;3090-1.
164. Haddad, N G; Croffie, J M; Eugster, E A. Pancreatic enzyme elevations in children with diabetic ketoacidosis. *J Pediatr*. 2004;122-4.
165. Burlina, A B; Dionisi-Vici, C; Piovani, S; Saponara, I; Bartuli, A; Sabetta, G; Zachello, F. Acute pancreatitis in propionic acidaemia. *J Inher Metab Dis*. 1995;169-72.
166. Choe, J Y; Jang, K M; Min, S Y; Hwang, S K; Kang, B; Choe, B H. Propionic Acidemia with Novel Mutation Presenting as Recurrent Pancreatitis in a Child. *J Korean Med Sci*. 2019;e303.
167. Bultron, G; Seashore, M R; Pashankar, D S; Husain, S Z. Recurrent Acute Pancreatitis Associated with Propionic Acidemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008; 370-1.
168. Kahler, S G; Sherwood, W G; Woolf, D; Lawless, S T; Zaritsky, A; Bonham, J. Pancreatitis in patients with organic acidemias. *J Pediatr*. 1994;239-43.
169. Wilson, W G; Cass, M B; Sjøvik, O; Gibson, K M; Sweetman, L. A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Eur J Pediatr*. 1984; 289-91.
170. Collins, J E; Brenton, D P. Pancreatitis and homocystinuria. *J Inher Metab Dis*. 1990;232-3.

171. Scherer, J; Singh, V P; Pitchumoni, C S; Yadav, D. Issues in hypertriglyceridemic pancreatitis: an update. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 195-203.
172. Choung, B S; Kim, S H; Seo, S Y; Kim, I H; Kim, S W; Lee, S O; Lee, S T. Pancreatic hyperenzymemia is associated with bacterial culture positivity, more severe and right-sided colitis. *Dig Dis Sci.* 2014; 2272-9.
173. Vasilescu, C; Herlea, V; Buttenschoen, K; Beger, H G. Endotoxin translocation in two models of experimental acute pancreatitis. *J Cell Mol Med.* 2003;417-24.
174. Gomez, D; Addison, A; De Rosa, A; Brooks, A; Cameron, I C. Retrospective study of patients with acute pancreatitis: is serum amylase still required? *BMJ Open.* 2012; e001471.
175. Tietz, N W; Shuey, D F. Lipase in serum--the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem.* 1993;746-56.
176. Lott, J A; Lu, C J. Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clin Chem.* 1991; 361-8.
177. Hameed, A M; Lam, V W; Pleass, H C. Significant elevations of serum lipase not caused by pancreatitis: a systematic review. *HPB (Oxford).* 2015;99-112.
178. Chandler, R J; Zervas, P M; Shanske, S; Sloan, J; Hoffmann, V; DiMauro, S; Venditti, C P. Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB J.* 2009; 1252-61.
179. Finsterer, J. Pancreatitis as a manifestation of mitochondrial disorder. *Am J Med Genet A.* 2007;623-3.

180. Debray, F G; Drouin, E; Herzog, D; Lortie, A; Lambert, M; Garel, L; Mitchell, G A; Michaud, J L. Recurrent pancreatitis in mitochondrial cytopathy. *Am J Med Genet Part A*. 2006;2330-5.
181. Finsterer, J; Frank, M. Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: a systematic review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017; 142-54.
182. Kui, B; Balla, Z; Végh, E T; Pallagi, P; Venglovecz, V; Iványi, B; et al. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Lab Invest*. 2014;138-49.
183. Rakonczay, Z Jr; Hegyi, P; Dósa, S; Iványi, B; Jármay, K; Biczó, J; et al. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med*. 2008;2118-27.
184. Biczó, G; Hegyi, P; Sinervirta, R; Berczi, S; Dósa, S; Siska, A; et al. Characterization of polyamine homeostasis in L-ornithine-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2010;2047-56.
185. Su, K H; Cuthbertson, C; Christophi, C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford)*. 2006;264-86.
186. Nizon, M; Ottolenghi, C; Valayannopoulos, V; Arnoux, J B; Barbier, V; Habarou, F; et al. Long-term neurological outcome of a cohort of 80 patients with classical organic acidurias. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;148.
187. Chakrapani, A; Sivakumar, P; McKiernan, P J; Leonard, J V. Metabolic stroke in methylmalonic acidemia five years after liver transplantation. *J Pediatr*. 2002;261-3.

188. Haijes, H A; Molema, F; Langeveld, M; et al. Retrospective evaluation of the Dutch pre-newborn screening cohort for propionic acidemia and isolated methylmalonic acidemia: What to aim, expect, and evaluate from newborn screening? *J Inherit Metab Dis.* 2020;424-37.
189. Kölker, S; Sauer, S W; Surtees, R A; Leonard, J V. The aetiology of neurological complications of organic acidaemias--a role for the blood-brain barrier. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 701-6.
190. Morris, A AM. Commentary on: The aetiology of neurological complications of organic acidaemias—a role for the blood–brain barrier. *J Inherit Metab Dis.* 2006;705-6.
191. Nguyen, N H; Morland, C; Gonzalez, S V; Rise, F; Storm-Mathisen, J; Gundersen, V; Hassel, B. Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia. *J Neurochem.* 2007;06-14.
192. Al-Ghamdi, M; Al-Ayadhi , L; El-Ansary, A. Selected biomarkers as predictive tools in testing efficacy of melatonin and coenzyme Q on propionic acid - induced neurotoxicity in rodent model of autism. *BMC Neurosci.* 2014;34.
193. Amaral, A U; Cecatto, C; Castilho, R F; Wajner, M. 2-Methylcitric acid impairs glutamate metabolism and induces permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem.* 2016;62-75.
194. Jafari, P; Braissant, O; Zavadakova, P; Henry, H; Bonafé, L; Ballhausen, D. Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;4.

195. Scholl-Bürgi, S; Haberlandt, E; Gotwald, T; et al. Stroke-like episodes in propionic acidemia caused by central focal metabolic decompensation. *Neuropediatrics*. 2009;76-81.
196. Bergman, A J; Van der Knaap, M S; Smeitink, J A; Duran, M; Dorland, L; Valk, J; Poll-The, B T. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the brain in propionic acidemia: clinical and biochemical considerations. *Pediatr Res*. 1996;44-9.
197. López-Corcuera, B; Geerlings, A; Aragón, C. Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Mol Membr Biol*. 2001;13-20.
198. Cooper, A J; Jeitner, T M. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*. 2016;16.
199. Hutson, S M; Lieth, E; LaNoue, K F. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr*. 2001; 846S-850S.
200. Sutton, V R; Chapman, K A; Gropman, A L; MacLeod, E; Stagni, K; Summar, M L; Ueda, K; et al. Chronic management and health supervision of individuals with propionic acidemia. *Mol Genet Metab*. 2012;26-33.
201. Stanescu, S; Belanger-Quintana, A; Fernández-Felix, B M; Pérez-Cerdá, C; Merinero, B; Ruiz-Sala, P; Arrieta, F; Martínez-Pardo, M. Long-term follow-up with filter paper samples in patients with propionic acidemia. *JIMD Rep*. 2020:44-51.
202. Buján, N; Arias, A; Montero, R; García-Villoria, J; Lissens, W; Seneca, S; et al. Characterization of CoQ10 biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ10 deficiency. 2014;53-62.







# ANEXOS

LETTER TO THE EDITOR

Open Access



# Severe anemia in patients with Propionic acidemia is associated with branched-chain amino acid imbalance

Sinziana Stanescu<sup>1\*</sup> , Amaya Belanger-Quintana<sup>1</sup>, Borja Manuel Fernandez-Felix<sup>2</sup>, Francisco Arrieta<sup>3</sup>, Victor Quintero<sup>4</sup>, Maria Soledad Maldonado<sup>4</sup>, Patricia Alcaide<sup>5</sup> and Mercedes Martínez-Pardo<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Propionic acidemia (PA), an inborn error of metabolism, is caused by a deficiency in propionyl-CoA carboxylase. Patients have to follow a diet restricted in the propiogenic amino acids isoleucine (Ile), valine (Val), methionine (Met) and threonine (Thr); proper adherence can prevent and treat acute decompensation and increase life expectancy. However, chronic complications occur in several organs even though metabolic control may be largely maintained. Bone marrow aplasia and anemia are among the more common.

**Materials and methods:** In this retrospective study, data for patients with PA being monitored at the *Hospital Ramón y Cajal* (Madrid, Spain) (n = 10) in the past 10 years were examined to statistically detect relationships between persistent severe anemia outside of metabolic decompensation episodes and dietary practices such as natural protein intake and medical food consumption (special mixture of precursor-free amino acids) along with plasma levels of branched-chain amino acids (BCAA). High ferritin levels were deemed to indicate that a patient had received repeated transfusions for persistent anemia since data on hemoglobin levels at the moment of transfusion were not always passed on by the attending centers.

**Results:** Three patients had severe, persistent anemia that required repeated blood transfusions. Higher medical food consumption and plasma Leu levels were associated with iron overload. Notably, natural protein intake and plasma Val were negatively correlated with ferritin levels. We also observed an inverse relationship between plasma Val/Leu and Ile/Leu ratios and ferritin.

**Conclusion:** The present results suggest that severe anemia in patients with PA might be associated with low natural protein intake and BCAA imbalance.

**Keywords:** Propionic acidemia, Anemia, Diet, Protein-restricted, Branched-chain amino acids imbalance

## Background

Propionic acidemia (PA; OMIM 606054) is a rare, inherited (autosomic recessive) metabolic disease caused by a deficiency in propionyl-CoA carboxylase, a

mitochondrial enzyme that transforms propionyl-CoA into methylmalonyl-CoA. Propionyl-CoA is an intermediate in the metabolism of the amino acids isoleucine (Ile), valine (Val), methionine (Met) and threonine (Thr). Other sources of propionyl-CoA include odd-numbered long-chain fatty acids (OLCFAs), cholesterol, and propionic acid generated by gut bacteria. Propionyl-CoA deficiency leads to the accumulation of 3-hydroxy propionic acid and methyl citrate, propionyl carnitine and tiglyl

\*Correspondence: [sinziana.stanescu@salud.madrid.org](mailto:sinziana.stanescu@salud.madrid.org)

<sup>1</sup> Servicio de Pediatría, Unidad de Enfermedades Metabólicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Crta de Colmenar Viejo, km 9,100, 28034 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



glycine among other abnormal intermediates of propionyl-CoA metabolism [1].

Commonly beginning in neonatal life, patients with PA experience acute metabolic decompensation during scenarios involving increased catabolism, e.g., infections or prolonged fasting. These episodes are the result of intoxication by alternative metabolism products, leading to lactic acidosis, ketosis, hyperammonemia, and multi-organ failure [2]. Moreover, patients with PA, even those with good metabolic control, suffer chronic complications involving organs with high energy demands, e.g., the central nervous system (encephalopathy, abnormal movements, epilepsy, psychomotor delay, ataxia, lesions in the basal ganglia similar to those seen in Leigh's syndrome, and atrophy of the optic nerve), the heart (dilated cardiomyopathy, arrhythmias), bone marrow (bone marrow aplasia, cytopenia), and the gastrointestinal tract (pancreatitis, hepatitis), etc [3]. No complete pathophysiological explanation for this is yet available. Treatment is based largely on dietary natural protein restriction to limit the intake of amino acids providing precursors of propionyl-CoA (Met, Thr, Val and Ile), together with a special mixture of precursor-free amino acids (SMAA) when the natural protein tolerance is below FAO/WHO/UNU (2007) recommendations, plus the administration of carnitine and metronidazole [2, 4].

The main aim of the present work was to detect the possible relationships between severe anemia in patients with PA outside of metabolic decompensation episodes and nutritional parameters, such as protein intake and BCAA plasma levels.

## Materials and methods

The medical records of patients with PA being monitored in the past 10 years at the Metabolic Disease Unit, *Hospital de Ramón y Cajal* (Madrid, Spain) (N=10), were examined in order to identify those with significant anemia outside of metabolic decompensation episodes. Since these patients receive periodic transfusions of blood derivatives at hospitals other than the above, high plasma ferritin was used as a marker of iron overload secondary to repeated transfusions for severe anemia. This proxy was employed since hemoglobin levels at the moment of transfusion were not available for all patients (they were not passed on by all attending centers). The blood transfusion was provided by their attending hospitals when hemoglobin concentrations were below 7.5 g/dl; genetic causes of hyperferritinemia (e.g. haemochromatosis) and renal disease were discarded. Relationships were sought between plasma ferritin, the natural protein intake (NPI), SMAA consumption and the BCAA (Ile, Val, Leu, Val/Leu and Ile/Leu ratios) plasma levels. Periods of metabolic decompensation were not taken into account in

analysis since severe pancytopenia can occur at such times. Infection episodes were also excluded given the possible interference with plasma ferritin concentrations. Blood and plasma samples were collected with 4–6 h of fasting. When prescribing total protein, the WHO/FAO/UNU (2007) safe levels of protein intake were used as point of reference [2].

Amino acids in plasma/serum were analyzed by ion-exchange chromatography with ninhydrine. All lab measurements were completed in our ERNDIM approved, reference laboratory (CEDEM, Centro de Diagnostico de Enfermedades Moleculares, Universidad Autonoma, Madrid).

## Statistical analysis

We fitted a multilevel linear regression model with plasma ferritin as the dependent continuous outcome and each amino acid together with natural protein and SMAA intakes as the independent variable. We defined a two-level model for measures (first level) within patients (second level). Thus, we considered repeated measures were made for each patient. We considered statistically significant for a p-value < 0.05. All analyses were performed using Stata software version 16 [5].

## Results

Data of ten PA patients (aged 5–38 years) were examined. The number of measures for each patient ranged from 3 to 24, see Table 2 and Additional file 1. Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the patients. 3/10 patients showing persistent severe anemia and requiring repeated transfusions were detected (patients 1, 2 and 3). All three were diagnosed when neonates, and at the time of study they all showed multi-system disease with different chronic complications, see Table 1. The iron overload caused by these transfusions led all three to require iron chelation treatment with deferasirox (Exjade®). Although the renal function estimated by plasma creatinine was normal (see Additional file 2), treatment with erythropoietin was prescribed in two patients (patient 1 and 2), but without benefit.

Median natural protein prescription was below the WHO/FAO/UNU (2007) safe levels, therefore SMAA supplements was prescribed for all the patients included (see Table 2). All received treatment with metronidazole, carnitine and Ile supplements; the caloric intake was maintained between 100 and 150 kcal/kg/day.

The natural protein intake (g/kg/day) was negatively associated with iron overload (p-value 0.003, regression coefficient (95% C.I): -72.1 (-119.6; -24.5)), whereas the SMAA consumption (g/kg/day) resulted in higher plasma ferritin levels (p-value 0.019, regression coefficient (95% C.I): 37.8 (6.1; 69.5)). Notably, the

**Table 1** Demographic and clinical data of 10 PA patients included in the study

	Sex	Current age (years)	Age at diagnosis	Genetics	Clinical course (long term complications)
1	F	32	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Arg165Gln	Peripheric neuropathy, neuromotor delay, pancreatitis, thrombopenia Severe persistent anemia
2	M	12	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/ p. Arg410Trp	Severe neuromotor delay, leukopenia Severe persistent anemia
3	M	Died (5)	Neonatal	PCCA gene p.Leu470Arg/p.Leu470Arg	Severe neuromotor delay Choreoathetosis, basal ganglia involvement, leukopenia, frequent infections, dilated cardiomyopathy, pancreatitis Severe persistent anemia
4	F	15	4 months	PCCA gene p.Gly477fs*9/p.Cys616_Val633del	Pancreatitis
5	M	9	Neonatal screening	PCCB p.Asn536Asp/p.Asn536Asp	Autism
6	F	27	4 months	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Glu168Lys	–
7	M	12	6 months	PCCA gene p.Gly477fs*9/p.Cys616_Val633del	Sever neuromotor delay
8	F	13	6 months	PCCB gene p.Arg512Cys/p.Gly255Ser	Neuromotor delay, epilepsy, pancreatitis, myositis
9	F	38	Neonatal	PCCB p.Glu168Lys/p.? (c.183 + 3G > C)	Neuromotor delay
1	F	32	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Gly407Argfs*14	Neuromotor delay, dilated cardiomyopathy

**Table 2** Descriptive statistics for ferritin levels and nutritional support: natural protein intake (NPI) (g/kg/day), special mixture of precursor-free amino acids (SMAA) intake (g/kg/day), total protein intake, % of protein provided by natural protein intake

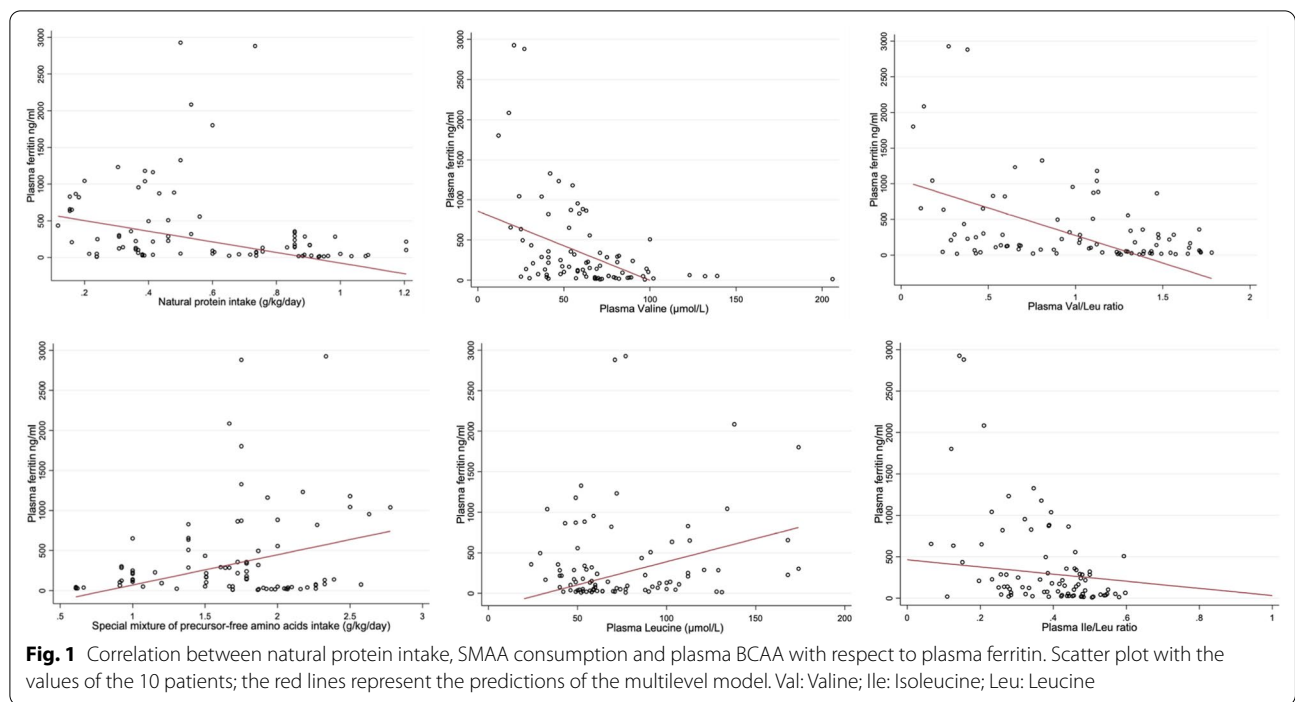
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Measures (N)	N = 10	N = 24	N = 9	N = 4	N = 12	N = 5	N = 9	N = 3	N = 3	N = 7
<i>Natural protein intake (NPI) (g/kg/day)</i>										
Mean (sd)	0.29 (0.14)	0.55 (0.25)	0.79 (0.29)	0.58 (0.06)	0.96 (0.07)	0.39 (0.01)	0.72 (0.06)	0.24 (0.00)	0.32 (0.09)	0.28 (0.09)
Min; max	0.11; 0.46	0.17; 0.89	0.4; 1.2	0.5; 0.65	0.87; 1.1	0.38; 0.41	0.6; 0.3	0.24; 0.24	0.21; 0.36	0.16; 0.36
<i>SMAA intake (g/kg/day)</i>										
Mean (sd)	1.23 (0.23)	1.97 (0.33)	1.58 (0.2)	1.41 (0.2)	2 (0.09)	0.62 (0.02)	2.3 (0.13)	1.7 (0.00)	0.96 (0.09)	1.0 (0.00)
Min; max	0.92; 1.5	1.61; 2.77	1.33; 1.93	1.2; 1.66	1.86; 2.15	0.61; 0.66	2.1; 2.5	1.7; 1.7	0.91; 1.07	1.0; 1.0
<i>Amount of total protein from natural protein (%)</i>										
Mean (sd)	19.1 (8.5)	22 (9.5)	33 (10)	29.5 (4.9)	35.5 (1.8)	38.5 (0.00)	24 (1.9)	12 (0.00)	25 (7)	21.5 (5.8)
Min; max	7.2; 28.5	7.4; 35	17; 44	23; 33.3	30; 36	38.5; 38.5	19; 26	12; 12	16.6; 29	14; 26
<i>Ferritin (ng/ml). NV: 20–250 ng/ml</i>										
Mean (sd)	429.1 (223.6)	873.1 (768.1)	556.2 (657.2)	56 (28.3)	24.6 (11.2)	34.4 (6.6)	76 (39)	25 (23)	72.8 (27.3)	245 (186)
Min; max	124; 829	142; 2926	103; 2085	24; 93	9; 50	28; 44	25; 139	10; 53	51; 103	111; 651

hyperferritinemia was associated with lower levels of Val (p-value < 0.001, regression coefficient (95% C.I): – 8.6 (– 12.3; – 4.8)) and higher levels of Leu (p-value 0.001, regression coefficient (95% C.I): 5.6 (2.2; 9.1), see Fig. 1 and Table 3. Also, a negative correlation was observed between the ratios of Val/Leu (p-value < 0.001, regression coefficient (95% C.I): – 771.5 (– 987.4; – 555.5)) and Ile/Leu (p-value < 0.018, regression coefficient (95% C.I): – 431 (– 788.6; – 73.3)) with the ferritin suggesting that

BCAA imbalance was potentially detrimental for the bone marrow, see Fig. 1 and Table 3.

### Discussion

The long-term complications suffered by patients with PA affects their prognosis [3]. Certainly, they increase morbidity and mortality rates outside of the acute decompensation episodes. Given the small number of patients with PA, the actual prevalence of hematological



**Table 3** Analysis of plasma amino acid plasma levels and dietary practices (natural protein and special amino acid mixture intake) according to ferritin levels using multilevel linear regression

	Regression coefficient (95% CI)	p value
Natural protein intake (g/kg/day)	- 72.1 (- 119.6; - 24.5)	0.003
Special mixture of precursor-free amino acids intake (g/kg/day)	37.8 (6.1; 69.5)	0.019
Valine (µmol/L)	- 8.6 (- 12.3; - 4.8)	< 0.001
Isoleucine (µmol/L)	- 5.2 (- 12; 1.5)	0.128
Leucine (µmol/L)	5.6 (2.2; 9.1)	0.001
Valine/Leucine	- 771.5 (- 987.4; - 555.5)	< 0.001
Isoleucine/Leucine	- 431 (- 788.6; - 73.3)	0.018

complications is unknown. A recent meta-analysis determined anemia to be more common than cardiomyopathy or lesions in the basal ganglia [3]. In another study of the long-term complications of organic acidemia and urea cycle disorders (as recorded in the European Registry of Organic Acidemia and Urea Cycle Disorders), the prevalence of anemia among patients with PA was determined to be 22%, while figures for leucopenia and thrombocytopenia reached 18% [6]. Pancytopenia has generally been described as occurring during periods of acute decompensation, but patients can also experience anemia, neutropenia or thrombocytopenia outside of these times

[2]. The reason for these hematological problems may lie in the toxicity of accumulating metabolites such as 3-hydroxy propionic acid, methyl citrate or tiglyl glycine, a lack of certain nutrients [6], or mitochondrial dysfunction [3]. The pancytopenia seen during decompensation episodes is generally reversible [2, 7, 8], supporting the idea that accumulating toxic metabolites are to blame. However, why hematological problems should occur during times of metabolic stability remains unclear.

The blood is a tissue with a high regeneration rate. The need for nutrients—especially amino acids—is therefore high compared to other tissues, leaving the hematopoietic tissue sensitive to malnutrition [9]. Certainly, anemia associated with protein-energy malnutrition is relatively common in children and elderly people in general [10]. The constant production of blood cells from hematopoietic stem cells (HSC) is also influenced by the latter’s microenvironment, a complex biological niche [11]. In recent years, interest has grown in understanding the influence of diet on the physiology and viability of HSC. Several studies, particularly those investigating the pre-transplant conditioning of the bone marrow, have shown the influence exerted by dietary BCAAs and cysteine (Cys) on the function of HSC and their microenvironment. Indeed, Val and Cys have been reported indispensable for the maintenance of HSC [12]. In vitro, neither human nor rat HSC can proliferate in media without these amino acids, and rats fed a Val-restricted diet show a reduced HSC count within a week [12]. In another

study that examined the effect of BCAA balance on HSC viability, restricting the Val intake by 10% led to a significant fall in HSC numbers. The same 10% restriction in Val in the presence of increased Ile and Leu led to the complete blockage of HSC proliferation [13]. The reason why HSC are so sensitive to a reduced Val intake and to disequilibrium between BCAAs has not been explored. However, it may involve Val's role as a structural unit of proteins, or some relationship with cell signaling [11].

The above evidence suggests that an imbalance of the BCAA can have a negative effect on the bone marrow. Certainly, among the present patients, reduced plasma Val negatively correlated with ferritin levels, whereas Leu was directly associated with iron overload. Moreover, there was an inverse relation between the ratios Val/Leu and Ile/Leu with plasma ferritin.

The dietary recommendations for PA patients are based on the restriction of natural protein intake, the use of SMAA together with the avoidance of prolonged fasting and adequate energy supply [2]. The SMAA contains no Val, Ile, Met and Thr, but a normal-high Leu levels and they are recommended if natural protein tolerance is below FAO/WHO/UNU safe levels [2]. The actual amount of medical food versus intact protein intakes are not detailed by the current guidelines and protein tolerance should be titrated individually [2, 14].

Thus, in PA patients, the combination between the natural protein restriction and the use of SMAA might result in an imbalanced BCAA dietary content with high Leu/Val or Leu/Ile ratios [15] that will directly reflect in BCAA plasma levels [16, 17], since these are essential amino acid entirely provided by the diet. Still, there are scarce studies investigating the impact of an BCAA imbalanced diet in organic aciduria patients. In an observational study in methyl malonic acidemia patients, increased leucine intake was associated with adverse growth outcomes [16].

In mice, elevated Leu was found to reduce plasma Val and Ile via system L amino acid transporter [18]. Animals fed high doses of Leu show low central nervous system concentrations of tryptophan, Val, Ile, Met and alanine, which might affect the synthesis of neurotransmitters [19]. Other authors have reported the importance of BCAA equilibrium in body growth and cellular immunity in animal models [20, 21]. In normal adults, high Leu intake was found to increase ammonia levels and to significantly decrease plasma concentration of Val and Ile [22].

The present work is the first to provide positive evidence of a nutritional component underlying the hematological complications of PA during stable metabolic periods. Our findings suggest that the natural protein and medical food intake as well as the balance of BCAA

plasma levels might play an important role in the onset and development of severe anemia in PA. The natural protein restriction below 25–30% of total protein intake together with generous use of medical food might result in branched-chain amino acids imbalance and should be avoided.

The small number of patients examined is an important limitation of this study. Confirmatory studies involving international registries should be performed.

## Conclusion

Patients with PA can experience serious hematological complications even during periods of metabolic stability. The severe anemia may be due to an imbalance of BCAA plasma levels, presumably due to a low natural protein intake/high synthetic protein consumption. Further work is needed to confirm the importance of dietary practices and the BCAA equilibrium in the development of long-term hematological complications in patients with PA.

## Abbreviations

PA: Propionic acidemia; BCAA: Branched-chain amino acids; Val: Valine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Met: Methionine; Thr: Threonine; OLCFAs: Odd-numbered long-chain fatty acids; SMAA: Special mixture of precursor-free amino acids; NPI: Natural protein intake.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01865-7>.

**Additional file 1.** Descriptive analysis of plasma branched-chain amino acids levels. Val: valine; Ile: isoleucine; Leu: Leucine.

**Additional file 2.** Excell data.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

SS had a significant contribution to the conception and design of the study. ABQ, MMP and FA contributed to the acquisition and interpretation of the data. BMFF performed the statistical analysis. VQ and MSM analyzed the anemia hematological markers. PA carried out the ion-exchange chromatography. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was supported by the "Ramon Areces" Foundation (Grant Number CIVP17A2827).

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

## Declarations

### Ethical approval and Consent to participate

The study was approved by the Ethical Committee of our hospital (Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain). Patients or their parents signed an informed consent prior to the inclusion in the study.

### Consent for publication

Informed consent to participate in the study was obtained from participants or their parent or legal guardian in the case of children under 16.

### Competing interests

SS has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflor-Nestlé, BioMarin. ABQ has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflor-Nestlé, Takeda, BioMarin; advisory fees from BioMarin and Merk Serono. BMFF declares that she has no conflict of interest. VQ declares that he has no conflict of interest. FA has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Recordatti Rare Diseases, Vitaflor-Nestlé, BioMarin. PA declares that she has no conflict of interest. MSM declares that she has no conflict of interest. MMP has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflor-Nestlé, Takeda, BioMarin.

### Author details

<sup>1</sup>Servicio de Pediatría, Unidad de Enfermedades Metabólicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Crta de Colmenar Viejo, km 9,100, 28034 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Unidad de Bioestadística Clínica, Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria, CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Crta de Colmenar Viejo, km 9,100, 28034 Madrid, Spain. <sup>3</sup>Unidad de Enfermedades Metabólicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, CIBER-OBN, Crta de Colmenar Viejo, km 9,100, 28034 Madrid, Spain. <sup>4</sup>Unidad de Oncohematología, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Crta de Colmenar Viejo, km 9,100, 28034 Madrid, Spain. <sup>5</sup>Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERER, IdiPAZ, C/ Francisco Tomás y Valiente, 7, 28049 Madrid, Spain.

Received: 20 January 2021 Accepted: 10 May 2021

Published online: 18 May 2021

## References

- Wongkittichote P, Ah Mew N, Chapman KA. Propionyl-CoA carboxylase—a review. *Mol Genet Metab*. 2017;122:145–52.
- Baumgartner MR, Hörster F, Dionisi-Vici C, et al. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:130.
- Hajjes HA, Jans JJM, Tas SY, Verhoeven-Duif NM, van Hasselt PM. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: complications. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42:730–44.
- Hajjes HA, van Hasselt PM, Jans JJM, Verhoeven-Duif NM. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 2: treatment strategies. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(5):745–61.
- StataCorp. Stata statistical software: release 16. College Station: StataCorp LLC. 2019.
- Kölker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, et al. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38:1059–74.
- Stork LC, Ambruso DR, Wallner SF, Sambrano JE, Moscinski LC, Wilson HL, McCabe ER. Pancytopenia in propionic acidemia: hematologic evaluation and studies of hematopoiesis in vitro. *Pediatr Res*. 1986;20:783–8.
- Inoue S, Krieger I, Sarnaik A, Ravindranath Y, Fracassa M, Ottenbreit MJ. Inhibition of bone marrow stem cell growth in vitro by methylmalonic acid: a mechanism for pancytopenia in a patient with methylmalonic acidemia. *Pediatr Res*. 1981;15:95–8.
- Santos EW, Oliveira DC, Silva GB, Tsujita M, Beltran JO, Hastreiter A, Fock RA, Borelli P. Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutr Rev*. 2017;75:909–19.
- Bianchi VE. Role of nutrition on anemia in elderly. *Clin Nutr ESPEN*. 2016;11:e1–11.
- Wilkinson AC, Yamazaki S. The hematopoietic stem cell diet. *Int J Hematol*. 2018;107:634–41.
- Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, Nakauchi H, Yamazaki S. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*. 2016;354:1152–5.
- Wilkinson AC, Morita M, Nakauchi H, Yamazaki S. Branched-chain amino acid depletion conditions bone marrow for hematopoietic stem cell transplantation avoiding amino acid imbalance-associated toxicity. *Exp Hematol*. 2018;63:12–16.e1.
- Forny P, Hörster F, Ballhausen D, Chakrapani A, Chapman KA, Dionisi-Vici C, Dixon M, Grünert SC, Grunewald S, Haliloglu G, Hochuli M, Honzik T, Karall D, Martinelli D, Molema F, Sass JO, Scholl-Bürgi S, Tal G, Williams M, Huemer M, Baumgartner MR. Guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic acidemia and propionic acidemia: first revision. *J Inherit Metab Dis*. 2021. <https://doi.org/10.1002/jimd.12370>.
- Myles JG, Manoli I, Venditti CP. Effects of medical food leucine content in the management of methylmalonic and propionic acidemias. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018;21:42–8.
- Manoli I, Myles JG, Sloan JL, Shchelochkov OA, Venditti CP. A critical reappraisal of dietary practices in methylmalonic acidemia raises concerns about the safety of medical foods. Part 1: isolated methylmalonic acidemias. *Genet Med*. 2016;18(4):386–95.
- Molema F, Gleich F, Burgard P, van der Ploeg AT, Summar ML, Chapman KA, Barić I, Lund AM, Kölker S, Williams M. Additional individual contributors from E-IMD. Evaluation of dietary treatment and amino acid supplementation in organic acidurias and urea-cycle disorders: on the basis of information from a European multicenter registry. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(6):1162–75.
- Zhen H, Nakamura K, Kitaura Y, Kadota Y, Ishikawa T, Kondo Y, Xu M, Shimomura Y. Regulation of the plasma amino acid profile by leucine via the system L amino acid transporter. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79:2057–62.
- Wessels AG, Kluge H, Hirche F, Kiowski A, Shutkowski A, Corrent E, Bartelt J, König B, Stangl GI. High leucine diets stimulate cerebral branched-chain amino acid degradation and modify serotonin and ketone body concentrations in a pig model. *PLoS ONE*. 2016;11:e0150376.
- Gatnau R, Zimmerman DR, Nissen SL, Wannemuehler M, Ewan RC. Effects of excess dietary leucine and leucine catabolites on growth and immune responses in weanling pigs. *Anim Sci*. 1995;73:159–65.
- Imamura W, Yoshimura R, Takai M, Yamamura J, Kanamoto R, Kato H. Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: a transcriptomic analysis to identify useful biomarkers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59:45–55.
- Elango R, Chapman K, Rafii M, Ball RO, Pencharz PB. Determination of the tolerable upper intake level of leucine in acute dietary studies in young men. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(4):759–67.


## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## RESEARCH REPORT

# Long-term follow-up with filter paper samples in patients with propionic acidemia

Sinziana Stanescu<sup>1</sup>  | Amaya Belanger-Quintana<sup>1</sup> |  
 Borja Manuel Fernández-Felix<sup>2</sup> | Celia Pérez-Cerdá<sup>3</sup> | Begoña Merinero<sup>3</sup> |  
 Pedro Ruiz-Sala<sup>3</sup> | Francisco Arrieta<sup>1</sup> | Mercedes Martínez-Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Enfermedades Metabólicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, CIBER-OBN, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Unidad de Bioestadística Clínica, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERER, IdiPAZ, Madrid, Spain

## Correspondence

Sinziana Stanescu, Unidad de Enfermedades Metabólicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Crta de Colmenar Viejo, km 9, 100, 28034 Madrid, Spain.  
 Email: sinziana.stanescu@salud.madrid.org

## Funding information

“Ramon Areces” Foundation, Grant/Award Number: CIVP17A2827

**Communicating Editor:** Martina Huemer

## Abstract

**Background:** Propionic acidemia (PA) is an inherited disorder caused by deficiency of propionyl CoA carboxylase. Most patients with this disorder are diagnosed during the neonatal period because of severe metabolic acidosis and hyperammonemia. Patients are required to undergo blood and urine analysis at least 3 to 4 times per year, depending on age and metabolic control.

**Methods:** We designed a prospective study in which we investigated the results from blood and urinary samples collected monthly in filter paper from 10 PA patients followed in a single metabolic reference center from January 2015 to September 2017. The aim of this study was to evaluate the usefulness of filter paper samples in the follow-up of the PA patients.

**Results:** During the follow-up period, 163 dried blood spot (DBS) and 119 urine dried spot samples were analyzed and compared with 160 plasma and 103 liquid urine specimens; 64 specimens of plasma were analyzed for odd-numbered long-chain fatty acids (OLCFAs). A total of 40 metabolic crises, 18 of them with hyperammonemia were documented. We observed a strong correlation between the filter paper and the urine/plasma samples for the main PA parameters both in stable metabolic conditions as well as in acute decompensations. Also, there was a strong correlation between OLCFAs measured in plasma and quantification of odd number acylcarnitines in DBS.

**Conclusions:** We conclude that filter paper blood and urinary samples can be used for the follow-up of the patients with PA, correctly reflecting their metabolic situation.

## KEYWORDS

filter paper samples, follow-up, propionic acidemia

## 1 | INTRODUCTION

Propionic acidemia (PA; OMIM 606054) is a rare autosomal recessive disease with an estimated prevalence of 1:100 000 to 150 000.<sup>1</sup> It is caused by a deficiency of propionyl CoA carboxylase (PCC), a mitochondrial enzyme that converts the propionyl CoA to methylmalonyl CoA, which will enter in the citric acid cycle to generate ATP. Propionyl CoA is formed by degradation of several essential amino acids, cholesterol, and odd-numbered long-chain fatty acids (OLCFAs). Also, important amounts of propionic acid are produced by the gut bacteria.<sup>1</sup>

PCC is composed by two distinct subunits (PCCA and PCCB) and mutations in either of their genes can produce PA. The etiopathology of PA is not completely understood, but apart from interference with the citric acid cycle, a large variety of secondary metabolites is formed that interfere in other metabolic pathways and are responsible for the severe metabolic acidosis, ketosis, hypoglycemia, lactic acidosis, and hyperammonemia observed in these patients. Many of these secondary metabolites are excreted in urine, such as 3-hydroxypropionic acid or methyl citric acid (Figure 1).

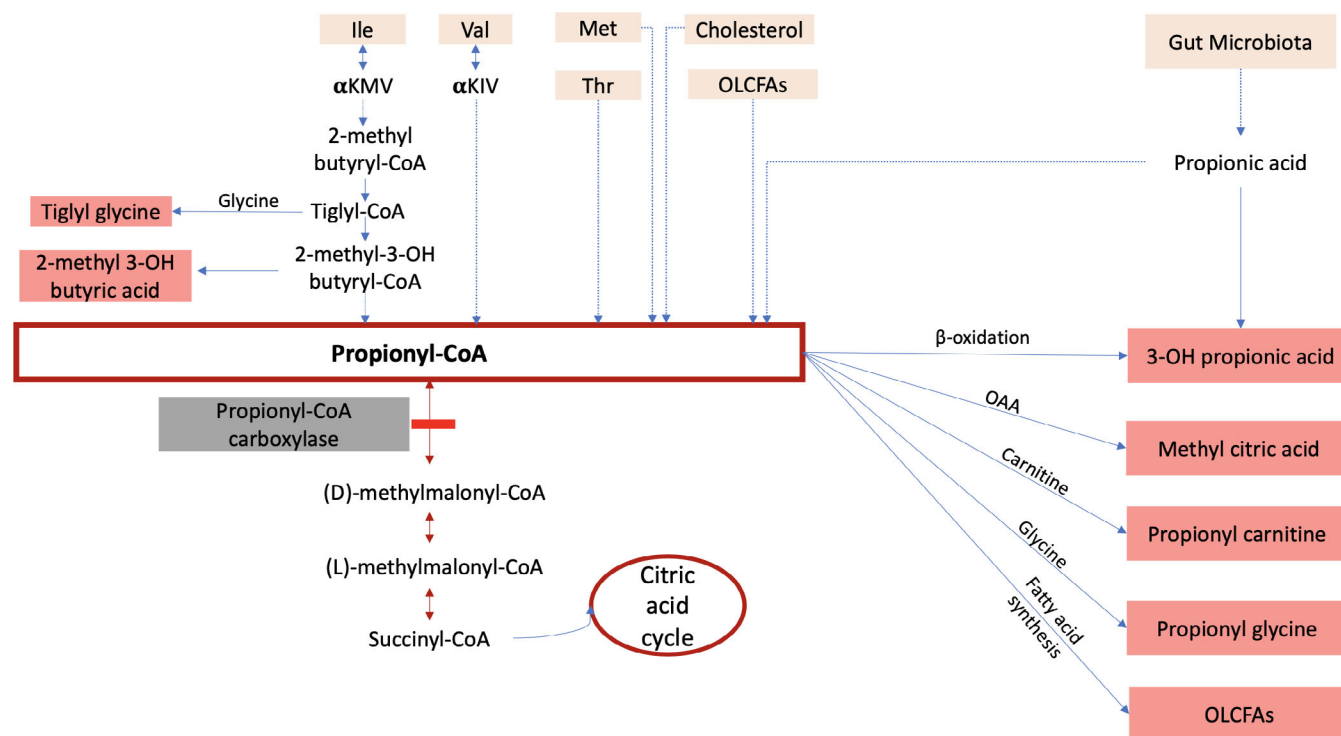
Most of the patients with PA present in the first days of life with metabolic coma, lethargy, vomiting, dehydration, or seizures. Later in life, metabolic crisis can be triggered by infections, fever, or other catabolic events. The

### Synopsis

The filter paper samples can be used for the follow-up of the patients with propionic acidemia, correctly reflecting their metabolic situation.

management of PA patients include low protein intake limiting the propiogenic amino acids (isoleucine, valine, methionine, and threonine), together with precursor-free amino acid formulas in order to achieve WHO nutritional recommendations. Additionally, cofactors such as L-carnitine and intermittent antibiotic therapy in order to avoid gut propionic formation are indicated.<sup>1,2</sup>

Neonatal screening and a better control of decompensations have significantly increased the survival of PA patients over the last decades. However, chronic complications have become increasingly apparent even in patients with adequate metabolic control, posing new challenges in patients' care. These complications can affect any organ: epilepsy, movement disorders caused by metabolic stroke of the basal ganglia, optic neuropathy, cardiomyopathy, pancreatitis, high liver transaminase levels, anemia, and so on. The underlying mechanism of these complications is still debated.<sup>3</sup>



**FIGURE 1** Metabolic pathways in propionic acidemia. Ile, isoleucine; Met, methionine; OAA, oxaloacetate; OLCFAs, odd-numbered long-chain fatty acids; Thr, threonine; Val, valine

It is clear that PA patients, even those with an apparently good clinical status, require a close clinical and biochemical supervision. In order to improve the follow-up of our patients and lower the burden of the families, we have designed a study in which we compared the traditional gold-standard methods of liquid blood and urine analysis for the PA metabolites with the dried blood (DBS) and dried urine spots (DUS) that could be collected by the families in their homes. We also tried to identify which metabolites best correlate with the metabolic status of the patient.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

We designed a prospective study in which we analyzed data collected from PA patients followed in a single metabolic reference center in Spain from January 2015 to September 2017. The study was approved by the Ethical Committee of our hospital and all patients or their guardians signed the appropriate informed consent form. The study received financial support from an independent foundation (Fundación Ramon Areces).

Samples of DBS and DUS were collected monthly by the patient's family in their homes and sent to the laboratory by regular mail. Both dried spots and liquid blood and urine samples were collected every 3 months or during metabolic decompensation in the hospital. We defined metabolic decompensation as the presence of either hyperammonemia (ammonia levels  $> 60 \mu\text{mol/L}$ ), ketosis (++), or metabolic acidosis ( $\text{pH} < 7.30$ ,  $\text{HCO}_3^- < 20 \text{mmol/L}$ ).

All lab measurements were completed in our ERNDIM approved, reference laboratory (CEDEM, Centro de Diagnostico de Enfermedades Moleculares, Universidad Autonoma, Madrid). Acylcarnitines and amino acids in DBS were determined as their butyl esters by flow injection analysis-tandem mass spectrometry with stable isotope dilution.<sup>4,5</sup> Simultaneously, acylcarnitines were acquired by precursor ion scan of  $m/z$  85 mode and amino acids by neutral loss of 102 amu, except basic amino acids, glycine, leucine, and isoleucine which were acquired by multiple reaction monitoring (MRM). Amino acids in plasma/serum were analyzed by ion-exchange chromatography with ninhydrine. Organic acids and acylglycines in DUS were analyzed by HPLC-tandem mass spectrometry and MRM mode.<sup>4</sup> In addition, an ACE C18 HPLC column was included to resolve MRM isomers.<sup>6</sup> Organic acids in liquid urine samples were determined as trimethylsilyl derivatives by GC-MS after urease treatment and ethyl acetate liquid-liquid extraction without oxymation. Odd long-chain fatty acids in plasma/serum were analyzed by gas chromatography

coupled to flame ionization detection.<sup>7</sup> Total (free and esterified) fatty acids were obtained after acidic hydrolysis and derivatized as methyl esters. The results were given as the percentage of C15, C17, and C17:1 in the total fatty acid content.

The data collected was deidentified for statistical analysis. We evaluated the correlation coefficients between the liquid and the filter paper samples by linear regression and we included the decompensation as an interaction variable. We used multivariate model for the variables with statistically significant interaction and the univariate model for those with no significant interaction. The significance of the regression was established using STATA 15 and considered statistically significant for  $P$ -value  $< .05$ .

## 3 | RESULTS

All 10 PA patients attending the Metabolic Unit of the Hospital Ramon y Cajal (Madrid, Spain) agreed to participate in the study. Median age at the beginning of the study was 13.5 years (range: 3-35 years). The clinical and demographic characteristics of our sample are shown in Table 1.

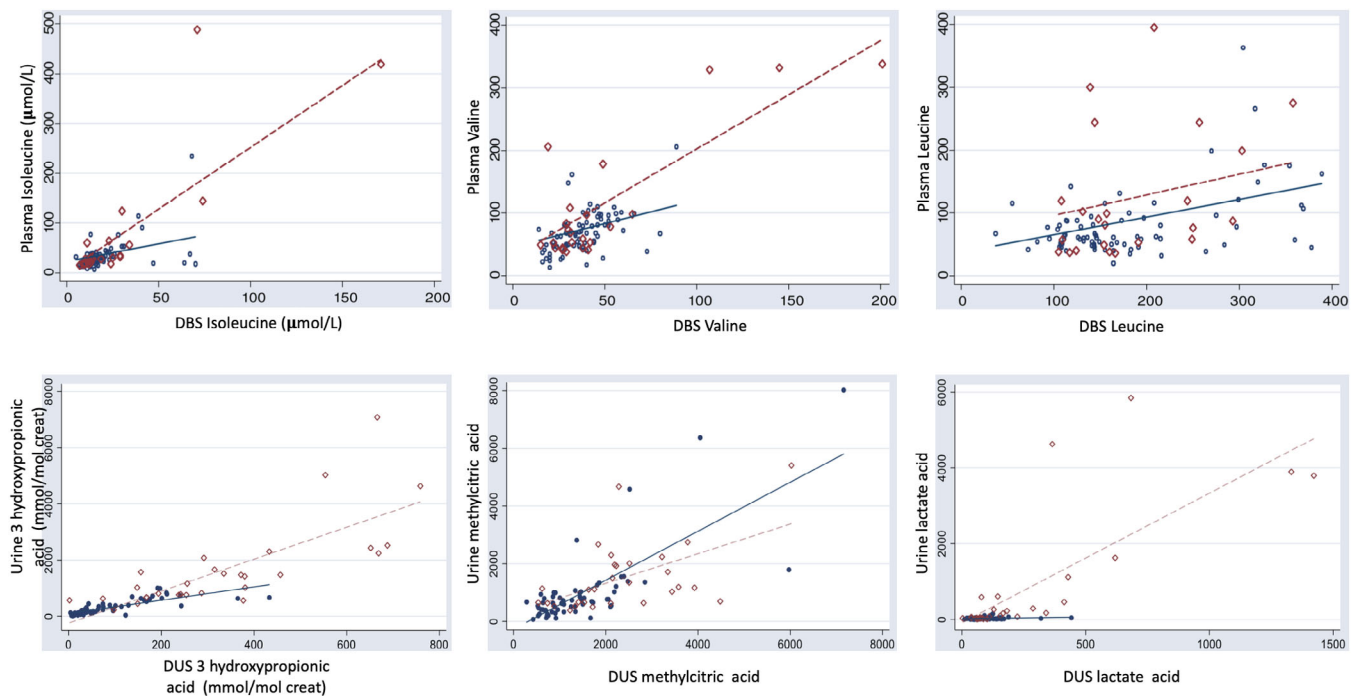
We identified 40 metabolic crises during the study (18 with hyperammonemia, 22 with ketosis without hyperammonemia). The metabolic profile of our patients is shown in Figures 2 and 3 and summarized in Tables 1 and 2. Regarding the different metabolites measured, results are shown in Table 2. As a summary:

**Amino acids:** branched-chained amino acids (BCAA) in DBS were correctly estimated comparing to plasma ( $P$ -value .03 for isoleucine and valine,  $P$ -value .001 for leucine). During metabolic crisis there was a significant elevation of BCAAs ( $P$ -value  $< .001$  for isoleucine and valine,  $P$ -value .04 for leucine), reflecting increased catabolism and ketogenesis. Other amino acids did not have such a good correlation in plasma and in DBS and no differences were observed during decompensations.

**Organic acids:** findings in DUS and in liquid urine correlated and reflect the metabolic status of the patients. As expected, there was an elevation of several urinary organic acids during the decompensation crisis, which was statistically significant in the case of 3-hydroxypropionic acid ( $P$ -value  $< .001$ ), methyl citric acid ( $P$ -value .04), lactate ( $P$ -value  $< .001$ ), tiglyl glycine ( $P$ -value  $< .001$ ), 2-methyl 3-hydroxy butyric acid ( $P$ -value  $< .001$ ), fumaric ( $P$ -value  $< .001$ ), and malic acid ( $P$ -value  $< .001$ ) (see Table 2). As for propionyl glycine, an important marker of PA, there was a good correlation in the univariate model between DUS and urine ( $P$ -

**TABLE 1** Demographic and clinical data of 10 PA patients included in the study

	Sex	Current age (y)	Age at diagnosis	Genetics	Clinical course (long-term complications)
1	M	Died (5)	Neonatal	PCCA gene p.Leu470Arg/p.Leu470Arg	Severe neuromotor delay Choreoathetosis, basal ganglia involvement, leukopenia, frequent infections, dilated cardiomyopathy, pancreatitis
2	M	9	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Arg410Trp	Severe neuromotor delay, anemia, leukopenia
3	F	35	Neonatal	PCCB p.Glu168Lys/p.? (c.183+3G>C)	Neuromotor delay
4	F	29	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Gly407Argfs*14	Neuromotor delay, dilated cardiomyopathy
5	F	15	6 mo	PCCB gene p.Arg512Cys/p.Gly255Ser	Neuromotor delay, epilepsy, pancreatitis, myositis
6	M	6	Neonatal screening	PCCB p.Asn536Asp/p.Asn536Asp	Autism
7	F	29	Neonatal	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Arg165Gln+p. Ala497Val	Peripheral neuropathy, neuromotor delay, pancreatitis, thrombopenia
8	F	24	4 mo	PCCB gene p.Gly407Argfs*14/p.Glu168Lys	—
9	F	12	4 mo	PCCA gene p.Gly477fs*9/p.Cys616_Val633del	Pancreatitis
10	M	10	6 mo	PCCA gene p.Gly477fs*9/p.Cys616_Val633del	Sever neuromotor delay



**FIGURE 2** Association between the liquid (plasma/urine) and the filter paper samples (DBS/DUS) using mixed linear regression models in metabolic stability (○) and crisis (◇). DBS, dried blood spot; DUS dried urine spot

value < .001), since no significant interaction was detected.

*Acylcarnitines*: there was a good statistical correlation between free carnitine and propionyl carnitine levels in plasma and DBS samples in the univariant model ( $P$ -value < .001 for both markers). No significant changes were found in any of the acylcarnitines during the metabolic crisis.

*Odd-numbered long-chain fatty acids*: OLCFAs have been used as a long-term control marker in PA patients. It cannot be analyzed in DBS. However, odd-numbered acylcarnitines (C14:1-OH + C15, C16:1-OH + C17, C16:2-OH + C17:1) are expressed in DBS as a common peak. We observed a strong correlation between the sum of odd-numbered acylcarnitines in DBS and the OLCFAs levels in plasma with a  $P$ -value < 0.001 (CI 95% [5.41; 10.95], regression coefficient: 8.2) in the univariant model.

## 4 | DISCUSSION

PA is one of the most frequent and severe types of organic acidemia and as such requires frequent clinical and biochemical controls that up to now could only be performed in a hospital setting. Adding to their regular visits, a majority of patients need to come to the hospital due to situations that have led or may lead to a metabolic decompensation. It is in the first years of life in which patients are especially at risk, as metabolic control is harder to achieve because of frequent infections or feeding difficulties. Whether because of previous frequent intravenous procedures or because of age, many times blood and urine collection are difficult to obtain in PA patients.

Also, the number of PA children who are surviving into adolescence and adulthood is increasing and more chronic complications are observed. These problems are usually not related with previous metabolic decompensations and their pathophysiology is not well understood. We cannot help but wonder if being able to have more frequent measurements of the metabolic status of our patients might help better understand the underlying mechanisms of long-term complications and help achieve better outcomes, as it happened in diabetes and phenylketonuria. Long-term management of PA is a difficult task, considering that no reliable biochemical parameters are yet available for quality control of therapy.<sup>8</sup>

Most of the PA literature is centered on the pathophysiology of the metabolic disturbances. However, there are also social and quality of life issues for the patients and their families which tend to be disregarded because our interventions are indispensable to avoid complications and frequently save the patient's life. One of the aims of our study was to determine whether the filter paper samples could be a method that reliably reflect the metabolic status of PA patients. If so, using this sample collection method would avoid many invasive procedures, might help increase the autonomy of the patients, who could send the paper samples from home. Easier sample handling and storage and the limitation of hospital visits are economically interesting. Therefore, the use of DBS and DUS would be more convenient for hospitals, laboratories, and patients.

In stable conditions, we observed a good correlation for BCAAs levels as well as for other specific PA metabolites such as 3-hydroxypropionic acid, methyl citric acid, and propionyl carnitine. During the metabolic crisis, there was a significant elevation of BCAA, reflected both

**TABLE 2** Linear regression in multivariant model (significant interaction)

	Metabolic stability		Metabolic crisis	
	Regression coefficient	$P$ -value	Regression coefficient	$P$ -value
3-OH propionic acid	2.36 (0.79;3.93)	.003	5.68 (4.63;6.73)	<.001
Methyl citric acid	0.85 (0.66;1.03)	.04	0.51 (0.24;0.77)	<.001
Citric/methyl citric ratio	0.86 (0.67;1.06)	<.001	-0.24 (-1.08;0.6)	.57
Lactate	0.08 (-1.88;2.06)	.93	3.41 (2.82;4.01)	<.001
2-Methyl 3-hydroxy butyric acid	0.08 (-0.7;0.87)	.83	1.08 (0.68;1.47)	<.001
Tiglyl glycine	1.94 (-0.9;4.8)	.18	6.97 (5.45;8.50)	<.001
Fumaric acid	4.8 (2.92; 6.68)	<.001	8.9 (7.06; 10.78)	<.001
Malic acid	0.80 (0.35;1.25)	<.001	2.00 (1.50; 2.45)	<.001
Isoleucine	0.7 (0.65;1.35)	.03	2.50 (2.00;3.00)	<.001
Leucine	0.30 (0.10;0.45)	<.001	0.30 (0.15; 0.65)	.04
Valine	0.75 (0.25;1.20)	.03	1.70 (1.45; 2.00)	<.001

in DBS and plasma, as a marker of decompensation. Several metabolites are formed from the breakdown of isoleucine, such as tiglyl-CoA which is trapped by glycine and excreted as tiglyl glycine.<sup>9</sup> Hydration of tiglyl-CoA results in formation of 2-methyl 3-hydroxy-butyryl-CoA, also significantly elevated during the decompensation. The amount of these former metabolites during the acute metabolic derangement therefore seems to reflect the enhanced metabolism of Isoleucine. Other tested parameters such as 3-hydroxypropionic acid, methyl citric acid, lactate, and propionyl carnitine, also showed a significant correlation during the acute decompensation.

Although there is little consensus concerning the utility of metabolic markers in the long-term follow-up, quantitative plasma amino acids are indicated each 3 to 6 months mainly to evaluate the nutritional status.<sup>1</sup> Low levels of Isoleucine are often described in PA forms that require severe natural protein restriction and are associated with acrodermatitis enteropathica-like, requiring supplementation.<sup>1</sup> In our series, 9 of 10 receive isoleucine supplements to maintain Ile levels above 15  $\mu\text{mol/L}$  in order to avoid the skin lesions. Results from DBS samples correctly reflected the nutritional status, with a strong correlation both in stable condition as in metabolic acute decompensation.

Other amino acids patterns, such as high glycine or lysine, low levels of citrulline or normal/low glutamine during the hyperammonemia,<sup>10</sup> that might help in understanding the biochemical changes in PA, have not proved any clinical relevance.

Free carnitine C0 and propionyl carnitine C3 were strongly correlated in the univariate model in plasma and DBS, but no interaction with the decompensation was observed. All our patients were supplemented with L-carnitine (150-200 mg/kg/d), as all of them were diagnosed previously to be included in the study.

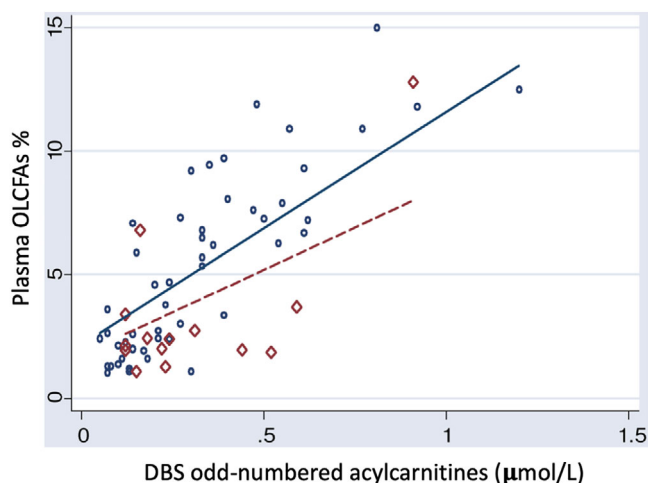
One important limitation of our study was the lack of measure of the ketone bodies in the DUS due to the extreme volatility of acetoacetate and 3OH butyric acid. However, the ketones bodies can be easily determined qualitatively in dipstick urine.

Utilization of propionyl-CoA as a primer in fatty acid synthesis instead of acetyl-CoA leads to accumulation of OLCFAs in patients with PA, such as C15 and C17 fatty acids. These acids, like any other carboxylic acid, could be esterified to form carnitine-conjugates, among them the odd-number acylcarnitines detected in DBS samples of our patients. It has been proposed that the content of OLCFAs in different body lipids or tissues (ex. erythrocyte membrane) can be used as a tool for monitoring patients with PA, as a quantitative estimation of the intracellular pool of propionyl-CoA.<sup>11,12</sup> The sum of the OLCFAs 15- and 17-carbon saturated and

17-carbon monounsaturated fatty acids (C15:0, C17:0, C17:1) is calculated and expressed as a percentage of the total C14-C22 fatty acids. The technique was first described in erythrocyte, but it can also be performed in plasma.

It is known that OLCFAs production is already active prenatally and large amounts have been detected in fetuses suffering of propionate metabolism defects, even if these alterations seem not to influence normal pregnancy and birth.<sup>13</sup> Enhanced postnatal lipolysis may lead to increase production of propionyl-CoA in mitochondria not only from proteins but also from OLCFAs.<sup>9</sup> Thus, not surprisingly, several papers have recently reported that in patients affected by disorders of propionate metabolism, newborn screening showed an increased concentration of heptadecanoyl carnitine (C17) in addition to elevated C3; therefore, C17 has been proposed as a second-tier test in the neonatal screening for the detection of propionate metabolism defects.<sup>14</sup>

In our study we detected in DBS samples elevation of odd number acylcarnitines that were expressed as a common peak C14:1-OH + C15, C16:1-OH + C17, C16:2-OH + C17:1. We could also demonstrate a strong statistical correlation between the sum of odd-numbered acylcarnitines and the OLCFAs in plasma. As the OLCFAs have shown utility as a biochemical marker for the severe forms of PA, we could conclude that the sum of odd-numbered acylcarnitines might be considered an equivalent of OLCFAs in DBS. The usefulness of these parameters in monitoring PA patients or as a second-tier test in neonatal screening of propionate disorders should be further analyzed.



**FIGURE 3** Association between plasma OLCFAs (%) and the DBS impar acylcarnitines sum using the mixed linear regression models in metabolic stability ( $\circ$ ) and crisis ( $\diamond$ ). DBS, dried blood spot

Despite many advances that have been made in understanding the disorders of propionate metabolism, still no clinical or biochemical marker is available for the quality of treatment control. A recent retrospective study concluded that in decision-making on the start of emergency treatment in PA patients, the most useful biochemical parameters seem to be ammonia, acid-base balance and anion gap; no statistical correlation was found with any other biochemical markers of PA. Still, this study refers exclusively to the risk of metabolic decompensation, the question of the long-term management and outcome remain unresolved.<sup>15</sup>

## 5 | CONCLUSIONS

PA patients require lifelong monitoring. DBS and DUS correctly reflect the metabolic and nutritional status and might be used for the long-term follow-up of these patients. The simplicity of obtention and transportation of the samples are considerable advantages. Their use can facilitate having more frequent metabolic control of patients and are especially convenient in those cases in which the patient resides far from the metabolic center or have a difficult social situation.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the “Ramon Areces” Foundation (grant number CIVP17A2827).

## CONFLICT OF INTEREST

Sinziana Stanescu has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflo-Nestlé, BioMarin. Amaya Belanger has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflo-Nestlé, Takeda, BioMarin; advisory fees from BioMarin and Merk Serono. Francisco Arrieta has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Recordatti Rare Diseases, Vitaflo-Nestlé, BioMarin. Mercedes Martínez-Pardo has received travel and speaker fees from Nutricia, Mead Johnson, Genzyme, Recordatti Rare Diseases, Vitaflo-Nestlé, Takeda, BioMarin. All other authors declare no conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr Martinez-Pardo had a significant contribution to the conception and design of the study. Drs Stanescu and Belanger-Quintana had contributed to the acquisition and interpretation of the data. Dr Fernandez-Felix had performed the statistical analysis. All authors have contributed to the acquisition and the interpretation of the data and gave the final approval for the article.

## ETHICS STATEMENT

This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors. The study was approved by the Ethical Committee of our hospital (Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain). The patients signed a consent statement previous to the inclusion in the study.

## ORCID

Sinziana Stanescu  <https://orcid.org/0000-0003-0340-4580>

## REFERENCES

- Baumgartner MR, Hörster F, Dionisi-Vici C, et al. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9:130.
- Haijes HA, van Hasselt PM, Jans JJM, et al. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: treatment strategies. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(5):745-761.
- Haijes HA, Jans JM, Tas SY, et al. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: complications. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(5):730-744.
- Ferrer I, Ruiz-Sala P, Vicente Y, Merinero B, Pérez-Cerdá C, Ugarte MJ. Separation and identification of plasma short-chain acylcarnitine isomers by HPLC/MS/MS for the differential diagnosis of fatty acid oxidation defects and organic acidemias. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;860(1): 121-126.
- Casetta B, Tagliacozzi D, Shushan B, Federici G. Development of a method for rapid quantitation of amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(5):391-401.
- Rebollido-Fernandez MM, Castiñeiras DE, Bóveda MD, et al. Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26(18):2131-2144.
- Merinero B, Pérez B, Pérez-Cerdá C, et al. Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to Mut, cblA or cblB complementation group. *Inherit Metab Dis.* 2008;31(1):55-66.
- Sutton VR, Chapman KA, Gropman AL, et al. Chronic management and health supervision of individuals with propionic acidemia. *Mol Genet Metab.* 2012;105(1):26-33.
- Lehnert W, Sperl W, Suormala T, Baumgartner ER. Propionic acidemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. *Eur J Pediatr.* 1994;153(suppl 1):S68-S80.
- Filipowicz HR, Ernst SL, Ashurst CL, Pasquali M, Longo N. Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. *Mol Genet Metab.* 2006;88(2): 123-130.
- Wendel U, Baumgartner R, Van der Meer SB, et al. Accumulation of odd-numbered long-chain fatty acids in fetuses and neonates with inherited disorders of propionate metabolism. *Pediatr Res.* 1991;29(4):403-405.
- Meissner T, Leichsenring M, Mayatepek E. Odd-numbered long-chain fatty acids in erythrocyte phospholipids as long-

- term follow-up parameter in propionic acidemia. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(9):1005-1008.
13. Sperl W, Murr C, Skladal D, et al. Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidaemia. *Eur J Pediatr.* 2000;159(1-2): 54-58.
  14. Malvagia S, Haynes CA, Grisotto L, et al. Heptadecanoylcarnitine (C17) a novel candidate biomarker for propionic and methylmalonic acidemias during expanded newborn screening. *Clin Chim Acta.* 2015;23(450):342-348.
  15. Zwickler T, Riderer A, Haege G, Hoffmann GF, Kölker S, Burgard P. Usefulness of biochemical parameters in decision-

making on the start of emergency treatment in patients with propionic acidemia. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(1):31-37.

**How to cite this article:** Stanescu S, Belanger-Quintana A, Fernández-Felix BM, et al. Long-term follow-up with filter paper samples in patients with propionic acidemia. *JIMD Reports.* 2020;1-8. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12166>