

Relación fenilalanina/tirosina en niños sanos y con hiperfenilalaninemias en Cuba.

Phenylalanine/tyrosine ratio in healthy hyperphenylalaninemia children in Cuba.

Jiovanna Contreras Roura,^I Elsa Alonso Jiménez,^{II} Lisset Evelyn Fuentes,^{III} Ada Gandarilla.^{IV}

Resumen

Las hiperfenilalaninemias son un grupo de Errores Innatos del Metabolismo del aminoácido fenilalanina debido a deficiencias en la conversión de fenilalanina a tirosina relacionadas específicamente con la hidroxilación de la fenilalanina mediado por la enzima fenilalanina hidroxilasa. Esta alteración produce desde el punto de vista bioquímico aumento de los niveles de fenilalanina en suero (> 4 mg/dL ó $240 \mu\text{M}$) y desde el punto de vista clínico se caracteriza fundamentalmente por retraso mental severo. En el Centro Nacional de Genética Médica el diagnóstico confirmatorio y clasificación de la enfermedad se realiza mediante la determinación por fluorimetría de los niveles de fenilalanina en suero. Dado que existe reportado en la literatura como segundo criterio diagnóstico para las hiperfenilalaninemias la relación fenilalanina/tirosina, se validó un método por cromatografía líquida de alta resolución que permite la cuantificación simultánea de la fenilalanina y la tirosina en suero. En este trabajo se reportan los resultados obtenidos en la cuantificación de ambos aminoácidos en niños cubanos sanos y con hiperfenilalaninemia, con vistas a determinar la relación fenilalanina/tirosina en ambos grupos estudiados.

Palabras clave: Hiperfenilalaninemias, fenilalanina, tirosina, cromatografía líquida de alta resolución.

Abstract

Hyperphenylalaninemias are a group of inborn metabolism errors of the phenylalanine amino acid, due to deficiencies in the conversion of phenylalanine into tyrosine, specifically related to the phenylalanine hydroxylation by the phenylalanine hydroxylase enzyme. From the biochemical point of view, this alteration produces a phenylalanine concentration in serum (> 4 mg/dL or $240 \mu\text{M}$) and from the clinical point of view it is fundamentally characterized by severe mental handicap. In the National Center of Medical Genetics this disease is diagnosed and classified by means of the fluorometric determination of phenylalanine in serum. Since the phenylalanine/tyrosine ratio is widely reported as the second diagnosis criterion for hyperphenylalaninemias, a high-resolution liquid chromatography method was validated allowing the simultaneous quantification of phenylalanine and tyrosine in serum. In this paper, results of the quantification of both amino acids in healthy and hyperphenylalaninemia Cuban children are being reported aimed at the determination of the phenylalanine/tyrosine ratio in both groups studied.

Keywords: Hyperphenylalaninemias, phenylalanine, tyrosine, high resolution liquid chromatography.

Introducción

Las hiperfenilalaninemias (HFA) son un grupo de Errores Innatos del Metabolismo del aminoácido fenilalanina, que se deben a deficiencias en la conversión de fenilalanina a tirosina relacionadas específicamente con la hidroxilación de la fenilalanina, la cual está mediada por la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH). Esta alteración produce desde el punto de vista bioquímico aumento de los niveles de fenilalanina en suero (> 4 mg/dL ó $240 \mu\text{M}$) y desde el

punto de vista clínico se caracteriza fundamentalmente por retraso mental severo.¹⁻⁷

El déficit de la enzima FAH está condicionado genéticamente, y constituye una enfermedad autosómica recesiva. El gen de la FAH se localiza en el cromosoma 12q (región q22-q24.1) y existen más de 500 mutaciones diferentes conocidas. Esta enfermedad afecta a 1/10 000 recién nacidos vivos y se manifiesta de diversas formas clínicas, dependiendo del grado de actividad residual del enzima FAH.^{2,5} Entre el 1 y el 2

^I Máster en Ciencias en Farmacología Experimental. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: jcontreras@cngen.sld.cu.

^{II} Técnico Medio en Química. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{III} Licenciada en Matemática. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{IV} Técnico Medio. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana. Cuba.

% de las HFA se producen por un defecto en el sistema cofactor de esta enzima, siendo el más frecuente el déficit de dihidropteridina reductasa (DHPR).

Existen diferentes criterios en la literatura para la clasificación de las hiperfenilalaninemias, pero generalmente se clasifican según los niveles de fenilalanina en suero, la relación fenilalanina/tirosina, la tolerancia dietética de fenilalanina, actividad residual de la enzima y la mutación que la origina,^{1,3,5,6} como a parece a continuación:

Fenilcetonuria (PKU) clásica: se caracteriza por un nivel plasmático de fenilalanina sobre los 16,6 mg/dL, el valor en un individuo normal es inferior a 2 mg/dL; la tirosina menor de 0,8 mg/dL (el valor en un individuo normal es de 1 a 1,5 mg/dL); presencia de fenilcetonas en orina y una actividad de la enzima FAH inferior al 1 %. Los pacientes tienen una tolerancia a fenilalanina dietaria menor de 20 mg/kg/día.

PKU moderada: el nivel de fenilalanina en el plasma es de 4 a 16,6 mg/dL, con una tirosina en el rango normal, la actividad de la enzima FAH es del 3 al 50 % y la tolerancia a la fenilalanina es de 20 a 25 mg/kg/día.

PKU leve: los niveles séricos de fenilalanina se encuentran entre 4 y 10 mg/dL y se toleran ingestas de fenilalanina mayor de 50 mg/kg/día.

Hiperfenilalaninemias leve: los niveles de fenilalanina plasmática están entre 4 y 10 mg/dL, el nivel de tirosina es normal, la actividad de la enzima FAH es mayor del 50 %, la que se normaliza después de los 6 meses de vida. Los pacientes no requieren de una dieta.

El diagnóstico confirmatorio y clasificación de la enfermedad en el país hasta el año 2011 se realizaba mediante la determinación por fluorimetría de los niveles de fenilalanina en suero, pero existe reportado en la literatura como segundo criterio para el diagnóstico la relación fenilalanina/tirosina.⁶ Es por esta razón que en el laboratorio de genética bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica se validó un método analítico por HPLC, que permite la cuantificación simultánea de la fenilalanina y la tirosina en suero. En este trabajo se presenta el comportamiento preliminar de la relación fenilalanina/tirosina en niños sanos y niños con hiperfenilalaninemia, con vista a la introducción de este método en el diagnóstico confirmatorio y clasificación de las hiperfenilalaninemias en Cuba.

Métodos

El protocolo de esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Centro Nacional de Genética Médica y cumple con la

Declaración de Helsinki.⁷

Muestra de estudio: Se realizó un estudio analítico observacional de tipo caso-control, en una muestra de 139 niños. Como controles se incluyeron 101 niños, de ambos sexo (F: 48 y M: 53), que asistieron al laboratorio clínico del Hospital Pediátrico Universitario Juan Manuel Márquez para la realizarles chequeo médico de rutina. La edad promedio fue de 6 años, en un rango de 1-11 años. Los criterios de inclusión para este grupo fueron: niños sanos, con niveles normales en suero de fenilalanina (Punto de corte: < 4 mg/dL ó 240 µM, Fluorimetría/HPLC) y de tirosina (< 3 mg/dL ó 165 µM). Como aún no está establecido el punto de corte para la tirosina, se escogió ese valor de concentración de acuerdo al comportamiento observado en los niveles del aminoácido en los controles. El grupo correspondiente a los casos quedó formado por 38 pacientes con hiperfenilalaninemias, provenientes de la consulta del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Se empleó como criterio de inclusión niveles elevados de fenilalanina en suero (> 4mg/dL ó 240 µM), detectado por HPLC. No disponemos de los datos correspondientes a la edad y el sexo para este grupo.

Obtención y análisis de las muestras: Las muestras de sangre para colectar el suero se obtuvieron con el consentimiento de los padres, una vez que estos fueron debidamente informados sobre el estudio.

La determinación de los niveles de fenilalanina y tirosina se realizó por HPLC con detección directa por fluorescencia, según el método de Kandar Roman y cols.,⁸ ligeramente modificado en relación al pre-tratamiento de las muestras y validado en el laboratorio.

Análisis estadístico de los resultados: Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa Statistica v. 7.0.

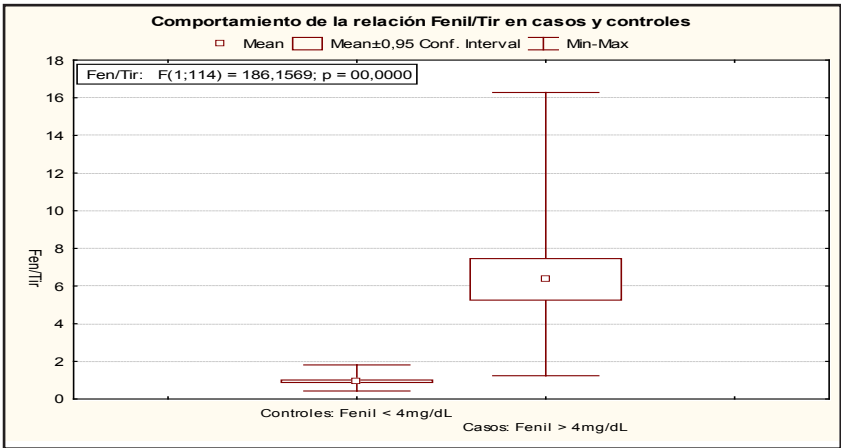
Resultados

En la tabla 1 se reporta la estadística descriptiva correspondiente a los dos grupos estudiados. El análisis estadístico de los resultados mediante la prueba *t Student* mostró que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la relación Fen/Tir entre los grupos estudiados (controles y casos). En el grupo control se encontró que la edad y el sexo no influyen en los resultados: sexo (*t Student*, $p = 0,59$) y edad (correlación de Pearson, $r = 0,17$). La concentración de fenilalanina promedio fue de 1,28 mg/dL (IC 95 %: 1,21-1,35 mg/dL) y para la tirosina de 1,43 mg/dL (IC 95 %: 1,36-1,51 mg/dL). La relación Fen/Tir obtenida en los controles fue de 0,93 (IC 95 %: 0,87-0,99). (Figura 1)

Tabla 1. Estadística descriptiva de los grupos estudiados.

Parámetro	Controles (Fen < 4 mg/dL)	Casos (Fen > 4 mg/dL)
Muestra	101	38
Fen (mg/dL)	1,28 IC 95 %: 1,21 -1,35	13,36 IC 95 %: 9,40 -15,94)
Tir (mg/dL)	1,43 IC 95 %: 1,36-1,51	2,22 IC 95 %: 1,57-2,89
Fen/Tir	0,93 IC 95 %: 0,87-0,99	5,73 IC 95 %: 4,45-6,71

Figura 1. Relación Fenilalanina/Tirosina obtenida para los casos y controles.



En los casos se obtuvieron valores de Fen/Tir de 5,73 (IC 95 % 4,45-6,71). En este grupo, se evaluó también el comportamiento de este criterio en relación a los niveles de fenilalanina en suero, empleados para la clasificación de las hiperfenilalaninemias en Cuba (Tabla 2); para ello se dividió el grupo en tres subgrupos según los valores de fenilalanina: Grupo 1

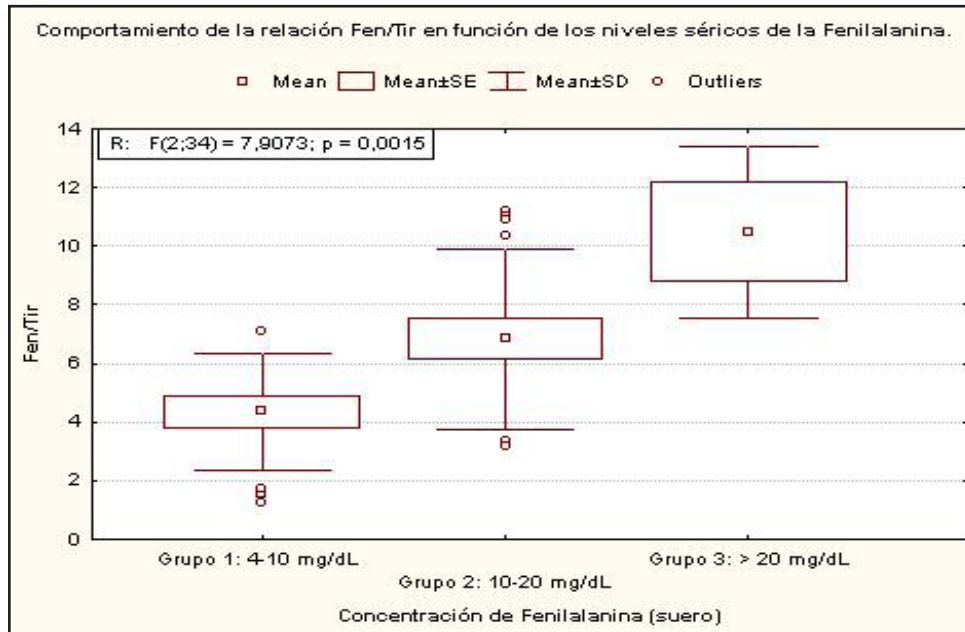
(n= 15, Fen: 4-10 mg/dL), Grupo 2 (n= 20, Fen: 10-16,6 mg/dL) y Grupo 3 (n= 3, Fen: > 16,6 mg/dL). Los valores Fen/Tir obtenidos para cada subgrupo fueron: Grupo 1: 5,33 (IC 95 %: 1,74-5,73), Grupo 2: 6,15 (IC 95 %: 4,49-9,45) y Grupo 3: 10,4 (IC 95 %: 7,57-13,43). (Figura 2)

Tabla 2. Relación Fenilalanina/Tirosina en función de los niveles de fenilalanina empleados en la clasificación de algunas HFA.

Grupos		Tipo HFA	Fen (mg/dL)	Fen/Tir Media, IC 95 %	Fen/Tir * (Punto corte)
Control	Controles (n = 101)	Población Normal	< 4	0,93 0,87-0,99	0,5-1
	Subgrupo 1 (n = 15)	HFA Transitoria	4-10	5,33 1,73-5,73	2-3
Casos	Subgrupo 2 (n = 20)	PKU Atípica	10-16,6	6,15 4,49-9,45	3-10
	Subgrupo 3 (n = 3)	PKU Clásica	> 16,6	10,4 7,57-13,43	> 10

*Controversias en la clasificación de las Hiperfenilalaninemias. Propuesta de unificación. Acta Pediatr. Mex. 2007;28(6):261-69.

Figura 2. Relación Fenilalanina/Tirosina en función de los niveles de fenilalanina empleados en la clasificación de algunas HFA.



Discusión

La no influencia de la edad y el sexo en la relación Fen/Tir, encontrada en el grupo control no difiere a lo reportado en la literatura, atendiendo a que las hiperfenilalaninemias se presentan en todas las razas, y ambos sexos son igualmente afectados.^{8,9} Los valores de concentración de fenilalanina y tirosina obtenidos se corresponden con los valores normales de estos aminoácidos en sujetos sanos.⁵ El valor de Fen/Tir para este grupo coincide con lo reportado en otros trabajos en individuos sanos, debido a que en los mismos una cantidad importante de fenilalanina es convertida por la enzima FAH hepática a tirosina y la relación Fen/Tir es menor que 1.¹⁰ La homeostasis de la fenilalanina obedece a un fino equilibrio entre lo que se ingiere a través de la dieta y las proteínas provenientes del catabolismo y lo que se transforma o degrada debido principalmente a la función enzimática de la FAH.⁶

Para los casos se obtuvieron valores de Fen/Tir mayor que 1. Esta razón se reporta de igual forma en la literatura, con independencia del tipo de método de análisis cuantitativo empleado en los laboratorios que realizan el tamiz neonatal y/o la confirmación del diagnóstico de las HFA en muestras de sangre.^{6,10-13}

En este grupo se pudo observar en el análisis de correlación de Pearson, que a medida que aumenta los niveles séricos de fenilalanina aumenta la relación

Fen/Tir ($r = 0,59$, $p = 0,000$); entre los subgrupos hubo diferencias significativas en la relación Fen/Tir (ANOVA, $p = 0,03$). El entrecruzamiento de los IC 95 % obtenidos para la relación Fen/Tir entre los tres subgrupos, se debe a que en este grupo están incluidos casos de seguimiento, es decir, pacientes diagnosticados con HFA que tienen en su tratamiento la restricción de fenilalanina en la dieta; así como la suplementación exógena de tirosina, lo que constituye una debilidad de este estudio. Esto también justifica los valores elevados de tirosina observados en este grupo, en relación a los valores obtenidos en los controles.

Debido a lo anteriormente planteado, se debe realizar el estudio en casos nuevos, donde se tenga en cuenta el valor de fenilalanina y tirosina en el momento del diagnóstico de la enfermedad, antes de comenzar la dieta con restricción de fenilalanina, lo que permitirá establecer con exactitud el valor del punto de corte óptimo de la relación Fen/Tir, necesario para realizar el diagnóstico y la clasificación de las HFA empleando ese criterio en pacientes cubanos.

El empleo de la relación Fen/Tir en el diagnóstico y/o clasificación de las HFA presenta ventajas como es la reducción considerable y/o eliminación de los casos falsos positivos que originalmente se obtienen por el método fluorimétrico, debido a interferencias de otros aminoácidos o de otros compuestos presentes

en las muestras.^{8,11-12} Además, permite la evaluación de los estados de hipo e hiper-alimentación en el curso del tratamiento dietético de los pacientes que lo requieran.^{8,13}

Atendiendo a la posibilidad de realizar la cuantificación simultánea en suero de fenilalanina y tirosina por

HPLC, a los resultados obtenidos en este estudio y a las ventajas que presenta el empleo de la relación Fen/Tir para el diagnóstico, se propone la introducción de esta determinación como segundo criterio en el diagnóstico y clasificación de las hiperfenilalaninemias en Cuba.

Referencias bibliográficas

- 1- Scriver C, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edition, New York: MacGraw Hill; 2001: pp 1667-724.
- 2- Cornejo V, Raimann E. Errores Innatos del Metabolismo de los Aminoácidos: Hiperfenilalaninemias. En Colombo M, Cornejo V, Raimann E. *Errores Innatos en el Metabolismo del niño*. 1a edición, Santiago de Chile; 1999: pp 59-65.
- 3- Cornejo V, Flores A., Raimann E, Cabello JF., Valiente A. y Colombo M. Evolución clínica de niños con niveles plasmáticos de fenilalanina entre 2.1 y 6.0 mg/dL en el período neonatal. *Rev Chil Nutr.* 2007;34(3):20-25.
- 4- M.J. Castieras Lacambra, X Fuentes Arderiu, J.M. Queraltó Compañó. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. Vol. 2. Editorial Reverte. 1998.
- 5- Verónica Cornejo E., Erna Raimann B. Diagnóstico, clínica y tratamiento de la fenilcetonuria (PKU). *Rev Chil Nutr.* 2003;31(1):25-30.
- 6- Carlett Ramírez-Farías, Martha Elva Pérez-Andrade, Isabel Ibarra-González, Marcela Vela-Amieva. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. Propuesta de unificación. *Acta Pediatr Mex.* 2007;28(6):261-69.
- 7- Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2000 Dec 20;284(23):3043-5.
- 8- Kandar Roman, Zakova Pavla. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B.* 2009;877:3926-29.
- 9- Georgianne L Arnold. Hyperphenylalaninemia. [en línea] Updated: Feb 13, 2009 [fecha de acceso 4 de agosto de 2010]. URL disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/945180-media>
- 10- Culea Mónica, Onuec Cozari, Adela Pinteá. ID-GC/MS as a tool for diagnosis of inborn errors of metabolism. *Bulletin USAMV-CN.* 2007;64(1-2).
- 11- Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Loret F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clinical Chemistry.* 1998;44:2405-09.
- 12- Lloyd-Puryear MA, Therrell BL. Screenings procedures: Variations in diagnostic criteria and followup. Consensus Development Conference on Phenylketonuria (PKU): Screening and Management October 16-18, 2000. William H. Natcher Conference Center National Institutes of Health Bethesda, Maryland. [fecha de acceso marzo de 2012]. URL disponible en: http://consensus.nih.gov/2000/2000Phenylketonuria_113_Program.pdf
- 13- Cabalska B, Nowacka M, Laskowska-Klita T, Nowaczewska I, Zorska K and Taljanski W, Serum tyrosine in children with phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia. *Med Wieku Rozwoj.* 2000; Jan-Mar 4(1):5-12.