

Diagnóstico de fenilcetonuria clásica mediante dos métodos analíticos confirmatorios, a propósito de un caso.

Diagnosis of classical phenylketonuria by means of two confirmatory techniques: a case presentation.

Jazminia Anayl Moreno Arango,^I Jiovanna Contreras Roura,^{II} Jacqueline Pérez Rodríguez,^{III} Elsa Alonso Jiménez,^{IV} Gretsya Arcas Emerso,^V Yaixa Piloto Roque.^{VI}

Resumen

La fenilcetonuria es un desorden metabólico de herencia autosómica recesiva, caracterizado por una deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que ocasiona un aumento de las concentraciones de fenilalanina en sangre y niveles muy bajos de tirosina. Se describe el caso de un recién nacido con concentraciones elevadas de fenilalanina, detectado por el Programa Nacional de Pesquiasje Neonatal. Se realizó el diagnóstico de fenilcetonuria clásica mediante dos métodos de análisis: Espectrofluorimetría y Cromatografía Líquida de Alta Resolución, detectando valores séricos de fenilalanina de 41,25 y 29,61 mg/dL respectivamente y una relación fenilalanina/tirosina de 59,42. Esta relación es nuevo criterio introducido en el Centro Nacional de Genética Médica, que permite realizar el diagnóstico diferencial de las hiperfenilalaninemias en Cuba.

Palabras clave: Fenilcetonuria, espectrofluorimetría, cromatografía líquida de alta resolución.

Abstract

Phenylketonuria is an autosomal recessive inheritance metabolic disorder, characterized by deficiency of the phenylalanine hydroxylase enzyme, which causes an increase in the phenylalanine concentration in blood and very low tyrosine levels. In this article a case is described about a newborn having high phenylalanine concentrations, detected by the National Neonatal Screening Program. Classical phenylketonuria diagnosis was carried out by two analysis techniques: spectrofluorometry and high resolution liquid chromatography, detecting phenylalanine values equal to 41,25 and 29,61 mg/dL respectively and a phenylalanine/tyrosine ratio value equal 59,42. This ratio represents a new criterion introduced in the National Center of Medical Genetics that allows carrying out the differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in Cuba.

Keywords: Phenylketonuria, spectrofluorometry, high resolution liquid chromatography.

^I Máster en Ciencias en Farmacia Clínica. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigador. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: jamar@cngen.sld.cu.

^{II} Máster en Ciencias en Farmacología Experimental. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{III} Técnico Medio en Farmacia Industrial. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{IV} Técnico en Medios Diagnósticos e Investigaciones Médicas. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^V Doctora en Medicina. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Centro Provincial de Genética Médica. Provincia Villa Clara. Cuba.

^{VI} Máster en Ciencias en Genética Médica. Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Profesor Instructor. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

Introducción

La fenilcetonuria fue descrita por primera vez por el médico noruego Ivar A. Folling en 1934.¹ Es un desorden hereditario autosómico recesivo causado por una deficiencia del gen fenilalanina hidroxilasa.² Debido a esta falla se produce un incremento de la concentración sanguínea de fenilalanina al impedirse su transformación en tirosina. Además, aumenta la transaminación de la fenilalanina como vía metabólica alternativa, y se acumulan los metabolitos fenilpiruvato, fenilactato y fenilacetato.³ La enfermedad tiene una frecuencia de aparición que varía en dependencia de cada población, y oscila desde 1/ 143 000 nacidos vivos en Japón, 1/10 000 en el Norte de Europa hasta 1/2 600 en Turquía. En la población cubana, la incidencia de este defecto es de aproximadamente 1/50 000 nacidos vivos.⁴

Hiperfenilalaninemia (HFA) es el término usado para aquellos fenotipos clínicos que cursan con concentraciones elevadas del fenilalanina en sangre y generalmente se clasifican de acuerdo a diferentes criterios: niveles del aminoácido al momento del diagnóstico, cociente fenilalanina/tirosina, tolerancia dietética de fenilalanina, actividad residual de la enzima y la mutación que la origina.^{5,6}

La fenilcetonuria (PKU) es la forma grave o clásica y se caracteriza por una actividad enzimática residual muy escasa o nula y en consecuencia concentraciones del aminoácido en sangre superiores a 1 200 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL).⁷

La PKU conduce a un retardo mental profundo si no es diagnosticada y tratada desde el período neonatal. Los síntomas iniciales se manifiestan en los primeros meses de vida con falta de interés por el medio, convulsiones, espasmos masivos y eczema rebelde a tratamiento. En el niño mayor, aparecen graves trastornos de conducta como agresividad, hiperactividad y rabietas. No obstante, el desenlace clínico de dicho padecimiento puede ser muy alentador si se sigue una dieta baja en fenilalanina.^{8,9}

La PKU ha sido incluida en los programas de Pesquisa Neonatal de la mayoría de los países, por contarse con métodos confiables y tratamiento capaz de modificar el curso de la enfermedad. En Cuba, en 1983 se inició la detección de esta enfermedad por el método microbiológico de Guthrie Susi, utilizando sangre seca en papel de filtro, para medir los niveles de fenilalanina. Posteriormente

se extendió a todo el país alcanzando coberturas nacionales como Programa de Detección Precoz de Hiperfenilalaninemias.¹⁰ En el año 2000 se introdujo al pesquiasaje neonatal el diagnosticador UMTEST-PKU, una nueva tecnología cubana desarrollada por el Centro Nacional de Inmunoensayo, basada en el Sistema Ultramicronalítico (SUMA) y la confirmación del diagnóstico por el método espectrofluorimétrico, en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM).⁴ Desde el año 2010 se estableció en el CNGM el diagnóstico diferencial de las HFA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), lo que ha permitido la introducción en el país de un segundo criterio diagnóstico: la relación fenilalanina/tirosina.¹¹

Presentación del caso

Paciente femenino proveniente de la provincia de Villa Clara, de tres meses de edad, con pelo y ojos oscuros. Presentó al examen físico ligero tinte icterico solo a nivel de la piel, no microcefalia y buen desarrollo psicomotor. En el Programa Neonatal de detección precoz de Hiperfenilalaninemias a partir de sangre seca en papel de filtro, cuyo punto de corte es 250 $\mu\text{mol/L}$, tuvo una concentración de fenilalanina de 1 483 $\mu\text{mol/L}$.

El diagnóstico confirmatorio se realizó mediante la determinación de los niveles del aminoácido en suero por dos métodos, estos fueron el método Espectrofluorimétrico de Mc Caman y Robin y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección directa por fluorescencia, recientemente modificado y validado en el Centro Nacional de Genética Médica.^{12,13} En ambos análisis, con punto de corte de 20 mg/dL (1200 $\mu\text{mol/L}$) para la PKU, se detectaron en la muestra concentraciones elevadas de fenilalanina y valores muy bajos de tirosina. Al ser restablecida la dieta del paciente los valores resultaron inferiores para el primer aminoácido y más elevados para el segundo, como se muestra en la tabla 1.¹⁴

Se realizó además el estudio de 6 mutaciones en el gen PAH: I65T, R252W, R261Q, R261X e *ivs10nt11*. El ADN fue extraído por el método de precipitación salina descrito por Miller *et al.*¹⁵ La detección de las mutaciones se realizó por PCR-RFLP, según las condiciones descritas por Eiket y Zchocke.^{16,17} Los fragmentos digeridos fueron separados en gel de agarosa al 3 %.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras según los métodos empleados para la determinación de los aminoácidos Fenilalanina y Tirosina.

Criterios	Método Fluorimétrico	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (posterior a la dieta)
Fenilalanina	41,25 mg/dl (2 475 umol/L)	29,61 mg/dL (1 776,6 umol/L)	8,35 mg/dl (501 umol/L)
Tirosina	No	0,50 mg/dl (27,5 umol/L)	0,98 mg/dl (58,8 umol/L)
Fen/Tir	No	59,42	8,5

La presentación de los resultados de este caso cuenta con el consentimiento informado de los padres del paciente.

Discusión

Los hallazgos bioquímicos obtenidos por ambos métodos de análisis permitieron realizar el diagnóstico confirmatorio de un caso de fenilcetonuria clásica. La introducción del HPLC permitió utilizar por primera vez el segundo criterio más empleado en el mundo para la clasificación de las hiperfenilalaninemias: la relación fenilalanina/tirosina. El punto de corte para esta variable en la población cubana es de 2, para

los pacientes con PKU es mayor de 10, lo cual fue evidente en este reporte.¹⁸

El paciente no presentó ninguna de las 6 mutaciones estudiadas en el gen PAH, por lo que se requiere ampliar el estudio molecular para determinar la mutación causal de la PKU en este caso.

Los resultados derivados de éste estudio permitieron la implementación de una dieta adecuada en el paciente y por consiguiente una reducción considerable del nivel de fenilalanina en sangre, lo que demuestra la importancia de un diagnóstico precoz en las enfermedades metabólicas

Referencias bibliográficas

- Galjaard H, Genetic Metabolic Disease: Early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam: Elsevier /North-Holland; 1980.
- Gutiérrez G E, Gutiérrez G R, Distribución de las frecuencias de mutaciones del gen fenilalanina hidroxilasa (PAH) en diferentes provincias de Cuba. Rev Cub Gen Comun. 2007;1(2):42-47.
- Mueller R, Young. Genética Médica. 10ma ed. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2006.
- Martínez R L, Robaina J Z, Resultados Clínicos Sociales del Programa Cubano de Pesquisa Neonatal de Fenilcetonuria durante 20 años. Rev Cub Gen Comun. 2007;2(1): 45-51.
- Cornejo V, Flores A., Raimann E , Cabello JF., Valiente A, 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.
- Verónica Cornejo E, Erna Raimann B.Diagnóstico, clínica y tratamiento de la Fenilcetonuria (PKU). Rev chil nutr. 2003;31(1):25-30.
- Álvarez F.R. Síndrome de Fenilcetonuria Materna. Rev Cub Obstet Ginec. 2003; 29(3).
- Becerra C, Hipotiroidismo Congénito y Fenilcetonuria en el niño. Revista Chilena de Pediatría. 2008;79 Supl(1):96-102.
- Nussbaum RL, McInnes R R. Genética en Medicina. 7ma ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
- Herederó L, Atencio G. Diagnóstico precoz de la Fenilcetonuria en Cuba (Informe preliminar). Revista Cubana de Pediatría.1986;58(1):27-33.
- 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.
- Plascencia M. Perfeccionamiento del tratamiento dietético de la Fenilcetonuria en Cuba (Tesis para optar por el título de Máster en Nutrición). La Habana; 2010.

- 13- 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;3926-3929.
- 14- Kazmierczak S. Diseases of Metabolism. *Analytical Chemistry*. 1993;65(12):401-404.
- 15- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
- 16- Eiken HG, Odland E, Boman H, Skjelkvale L. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:1427-1430.
- 17- Eiken HG, Knappskog PM and Apold J. Restriction enzyme-based assays for complete genotyping of phenylketonuria patients. *Dev Brain Dysfunct*. 1993;6:53-59.
- 18- Jiovanna Contreras Roura, Elsa Alonso Jiménez, Lisset Evelyn Fuentes, Ada Gandarilla. Comportamiento preliminar de la relación Fenilalanina/Tirosina en niños sanos y con Hiperfenilalaninemias en Cuba. *Rev Cubana Genet Comunit*. 2012; 6(2).