

## Punto de corte óptimo para el diagnóstico confirmatorio de hiperfenilalaninurias por HPLC.

## Optimum cutting point for the confirmatory diagnosis of hyperphenylalaninuria by HPLC.

*Lisset Evelyn Fuentes Smith,<sup>I</sup> Jiovanna Contreras Roura,<sup>II</sup>  
Elsa Alonso Jiménez,<sup>III</sup> Laritza Martínez Rey.<sup>IV</sup>*

### Resumen

Las hiperfenilalaninurias son un grupo de errores innatos del metabolismo del aminoácido fenilalanina, debido a deficiencias en la conversión del mismo a tirosina. Desde el punto de vista bioquímico se caracterizan por aumento de los niveles de fenilalanina en suero y valores bajos o normales de tirosina; desde el punto de vista clínico se asocian, en su forma más severa, con la discapacidad intelectual. En este trabajo se describe la metodología empleada para la determinación del punto de corte óptimo para la relación fenilalanina/tirosina, como segundo criterio diagnóstico de las hiperfenilalaninurias en el Centro Nacional de Genética Médica. Se realizó un estudio de normalidad mediante el prueba de Shapiro-Wilk para la variable en estudio, se analizó la asociación de los niveles de fenilalanina con las variables sexo y edad mediante la prueba U -Mann-Whitney y el coeficiente de correlación de Spearman, respectivamente, con un nivel de significación  $p=0,05$ ; para el análisis estadístico se empleó el software IBM SPSS Statistics 20. Se determinó como punto de corte óptimo el valor que minimizando la suma de diagnósticos errados, maximizara la sensibilidad, la especificidad y el índice de Youden. La relación Fen/Tir tuvo como punto de corte óptimo el valor 2. Seguidamente se validó el punto de corte óptimo obtenido en una muestra de 526 neonatos. Los resultados permitirán emplear la relación Fen/Tir como segundo criterio diagnóstico de las hiperfenilalaninurias en Cuba.

**Palabras clave:** Hiperfenilalaninurias, diagnóstico, punto de corte.

### Abstract

Hyperphenylalaninurias are a group of innate metabolism errors of the phenylalanine amino acid, due to deficiencies in its conversion to tyrosine. From the biochemical point of view they are characterized by an increase in phenylalanine levels in serum and low or normal tyrosine values, while from the clinical point of view they are associated with intellectual impairment. In this work the methodology applied for the determination of the optimal cutting point for the phenylalanine/tyrosine ratio is described, as the second diagnostic criterion applied in The National Center for Medical Genetics in Cuba. A normality study for the variable under study was carried out applying the Shapiro-Wilk test, analyzing the association of phenylalanine levels with sex and age variables by means of the U -Mann-Whitney test and the Spearman correlation coefficient respectively, with a significance level equal to  $p=0,05$ , using IBM's SPSS Statistics 20 software for statistical analysis. The optimal cutting point was found determining the value that, at the same time, allowed minimizing the number of wrong diagnoses, while maximizing sensitivity, specificity and Youden's index, resulting in an optimal cutting value equal to 2 for the phen/tyr ratio. Afterwards the obtained optimal cutting point was validated in a sample of 526 neonates. These result will allow applying the ratio phen/tyr as a second diagnostic criterion for hyperphenylalaninurias in Cuba.

**Keywords:** Hyperphenylalaninemia, diagnosis, cutting point.

<sup>I</sup> Máster en Ciencias en Genética Médica. Licenciada en Matemáticas. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: [evelynfuentes@infomed.sld.cu](mailto:evelynfuentes@infomed.sld.cu).

<sup>II</sup> Máster en Farmacología Experimental. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Técnico en Química. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup> Doctor en Medicina. Especialista de Primer Grado en Genética Clínica. Profesor Asistente. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

## Introducción

Las hiperfenilalaninemias son un grupo de errores innatos del metabolismo del aminoácido fenilalanina, que resultan de deficiencias en la conversión de fenilalanina a tirosina,<sup>1-5</sup> relacionadas específicamente con defectos en la hidroxilación de la misma, donde se produce un aumento en los niveles plasmáticos de este aminoácido por encima de los considerados como normales.<sup>1</sup> A pesar de que las cifras del mismo pueden variar discretamente según el origen étnico de la población, internacionalmente se han considerado como normales, niveles por debajo de 2 mg/dL en los recién nacidos, alrededor de 1,1 mg/dL en los infantes y 1 ml/dL en la adolescencia.<sup>6-7</sup>

Las hiperfenilalaninemias comprenden varias condiciones que se diferencian entre sí, tanto clínica como bioquímicamente, siendo la fenilketonuria clásica la entidad más común.<sup>8</sup> La fenilketonuria (FC) es una enfermedad genética autosómica recesiva, causada por mutaciones en el gen de la fenilalanina hidroxilasa.<sup>9</sup> Tienen una frecuencia de aparición que varía en dependencia de cada población, y va desde 1/143 000 nacidos vivos en Japón, 1/10 000 en el Norte de Europa, hasta 1/2 600 en Turquía.<sup>1</sup> En la población cubana, la incidencia de este defecto es de 1/50 000 recién nacidos vivos.<sup>10</sup>

Este grupo de enfermedades hereditarias, que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo, se caracteriza por presencia de retraso mental, despigmentación de la piel y el cabello, falla en la ganancia de peso, olor característico en la orina, eczema y epilepsia, entre otros; evitable únicamente con un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno.<sup>11</sup>

En Cuba, desde el año 1984 se inició el programa nacional de prevención de hiperfenilalaninemias en los recién nacidos de Ciudad de La Habana, utilizando sangre seca en papel de filtro para medir la concentración de fenilalanina por el método de Guthrie Susi,<sup>12</sup> el que se generalizó a todo el país a partir del año 1986.<sup>13-14</sup>

Este programa ha permitido el comienzo cada vez más temprano del tratamiento dietético, con lo que se ha disminuido considerablemente la aparición de retraso mental en estos pacientes.

En el Centro Nacional de Genética Médica de Cuba el diagnóstico confirmatorio y clasificación de la enfermedad se realiza mediante la cuantificación de la fenilalanina en suero, empleando la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); el objetivo de este trabajo es establecer un punto de corte para la relación fenilalanina/tirosina (Fen/Tir) e

implementarlo como segundo criterio diagnóstico para las hiperfenilalaninemias.

## Métodos

**Muestra de estudio.** Se estudiaron 40 pacientes con hiperfenilalaninemias, provenientes de la consulta multidisciplinaria de atención a los errores innatos del metabolismo. Se empleó como criterio de inclusión niveles elevados de fenilalanina en suero ( $> 4\text{mg/dL}$ ). En la actualidad, en Cuba, se considera como punto de corte para la fenilalaninemia  $4\text{mg/dL}$  de fenilalanina en suero.

Para los controles se emplearon 76 niños, pareados por edad y sexo con los casos. Los criterios de inclusión para este grupo fueron: niños sanos, con niveles normales en suero de fenilalanina ( $< 4\text{ mg/dL}$ ) y de tirosina ( $< 3\text{ mg/dL}$ ). El tamaño total de la muestra estuvo conformado por 116 niños y el diseño de la investigación fue de tipo casos-contróles.

**Obtención y análisis de las muestras.** Para la obtención de las muestras de suero se solicitó y se obtuvo el consentimiento informado de los padres, después que los mismos fueron debidamente informados sobre el estudio, dando cumplimiento con la Declaración de Helsinki del 2008.<sup>15</sup> La determinación de los niveles de fenilalanina y tirosina se realizó por el método de HPLC con detección directa por fluorescencia, validado para ese propósito en el laboratorio de Genética Bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica de Cuba.

**Metodología empleada para el cálculo de los puntos de corte óptimos.** En la muestra de controles se realizó un estudio de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk; se indagó la asociación entre los niveles séricos de fenilalanina con las variables sexo y edad mediante la prueba U -Mann-Whitney y el coeficiente de correlación de Spearman, respectivamente, con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

Los puntos de corte candidatos se obtuvieron mediante la siguiente metodología:

- Representación gráfica de la variable en estudio.
- Estimación de los percentiles 75 y 97,5 a través de la metodología Bootstrap.<sup>16</sup>
- Determinación, para todos los valores de la variable X que se desea categorizar, del valor que mejor separa a los pacientes de acuerdo a la prueba de asociación del  $Ji^2$ , confeccionando una tabla de contingencia  $2 \times 2$  para cada valor de la covariable continua X. Se eligió el valor muestral (M) para el cual se obtiene el valor del estadístico  $Ji^2$  más elevado.<sup>16</sup>

d) Determinación del valor de corte con mayor nivel de buena clasificación, a través de árboles de clasificación.

Para la obtención del punto de corte óptimo fue necesario el cálculo de los indicadores: número de falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), sensibilidad (S), especificidad (E) y el índice de Youden (IY), para cada valor candidato.

De modo que:

FP: Número individuos controles clasificados como enfermos.

FN: Pacientes clasificados como sanos.

VP (Verdaderos positivos): Número de individuos clasificados como enfermos y clínicamente enfermos.

VN (Verdaderos negativos): Número de individuos clasificados como sanos y realmente sanos.

Entonces:

*Sensibilidad:*  $S = VP / \text{Total de enfermos}$ .

*Especificidad:*  $E = VN / \text{Total de Sanos}$ .

*Índice de Youden:*  $I = (S + E) - 1$

Luego se consideró como punto de corte óptimo aquel que minimizando la suma de FP+FN, maximizara la sensibilidad, la especificidad y el índice de Youden.

**Validación del punto de corte para la relación Fen/**

### **Tir basados en el método anterior (Cuantificación de los niveles de fenilalaninemia)**

Se validó el punto de corte óptimo propuesto en una muestra de 526 neonatos durante el periodo junio 2010-junio 2012. Se evaluó la concordancia entre los dos métodos mediante el estadígrafo de McNemar, el índice de kappa, así como con la sensibilidad, especificidad y la eficiencia obtenida para el nuevo método. Se presentó la curva COR y el área bajo la curva (ABC) como índice de exactitud, que expresa la probabilidad de diagnosticar correctamente un caso y un control tomados al azar.<sup>16,17</sup>

### **Resultados**

Para la incorporación de este segundo criterio de confirmación diagnóstica, se determinó que la variable medida (Relación Fenil/Tir) no sigue una distribución normal (Shapiro-Wilk  $W=0,93792$ ,  $p=,00003$ ) y que no existe asociación entre la misma con el sexo ( $p=0,862016$ ) y la edad ( $r=0,070754$ ).

La relación Fen/Tir tuvo en el intervalo de 2 a 3, igual valores en los parámetros medidos para la selección de punto de corte óptimo (Tabla 1). Sin embargo, como se busca que sea un valor confirmatorio, es decir, evitar el falso positivo, se tomó como punto de corte 2 para el cual el método es 100 % específico.

**Tabla 1.** Relación de puntos de corte óptimos para la fenilalaninemia, la tirosina y la relación fenil / tirosina en niños con hiperfenilalaninemias.

	Punto de Corte óptimo	FP+FN	Sensibilidad VP/TE	Especificidad VN/TS	Índice de Youden (S+E)-1
Fenilalaninemia	2-4	0	100%	100%	1,00
Tirosina	2	23	55%	93%	0,48
Relación Fenil/Tirosina	2	4	90%	100%	0,90

Los resultados obtenidos en este estudio, para nuestra población, son similares a los valores de puntos de corte reportados en la literatura para la relación Fen/Tir, donde se confirma el diagnóstico para un valor superior a 2.<sup>18</sup>

Al validar el punto de corte óptimo obtenido para

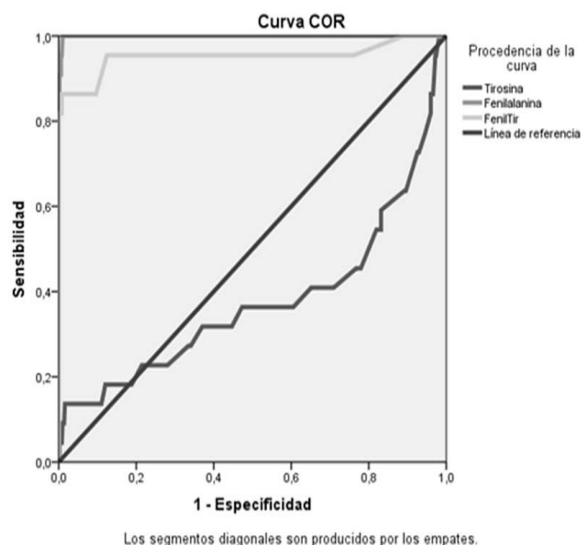
la relación Fen/Tir en la muestra de 526 recién nacidos (Tabla 2), se obtuvo que la población tiene proporciones iguales de positivos ( $p>0,05$ ) para ambos métodos, por su parte el índice de kappa resultó igual a 0,76 lo que sugiere una buena concordancia entre los métodos.

**Tabla 2.** Concordancia entre los dos métodos diagnósticos estudiados.

		Cuantificación de fenilalanina		Total
		Positivo (mayor de 4)	Negativo (menor o igual a 4)	
Determinación de la relación Fenil/Tirosina	Positivo (mayor de 2)	19	6	25
	Negativo (menor o igual a 2)	6	495	501
Total		25	501	526

Se observa una eficiencia de la relación Fen/Tir como segundo criterio diagnóstico, de un 97,7 %, con una sensibilidad y especificidad del 76 y 99 % respectivamente.

La figura 1 muestra como la fenilalanina ( $ABC=0,999$   $IC95\%:0,99-1,00$ ) y la relación Fen/Tir ( $ABC=0,952$   $IC95\%:0,88-1,00$ ) tienen una alta probabilidad de realizar un acertado diagnóstico.



## Discusión

Los programas de detección temprana de enfermedades metabólicas en el recién nacido, constituyen un acto de medicina preventiva dentro de la salud pública, para la identificación precoz de enfermedades que pueden conducir potencialmente a problemas con graves consecuencias para la salud. El pesquiasaje clásico para una población de recién nacidos, se lleva a cabo para enfermedades clínicamente no detectables y que sean tratables antes que los efectos sean irreversibles.<sup>11</sup> La fenilcetonuria es el prototipo de enfermedad genética para la cual los pesquiasajes masivos en recién nacidos están justificados.<sup>13</sup>

En la mayoría de los países desarrollados los niños son pesquiasados para la detección de hiperfenilalaninemias, por cuantificación de la fenilalanina en sangre durante el periodo neonatal, usando técnicas microbiológicas y fluorimétricas. La mayoría de estos programas han

usado un valor de corte entre los 2 y 4 mg/dL (120-240  $\mu$ M/L) como un indicador de prueba positiva.<sup>1</sup> El valor de corte considerado para la población cubana es de 4 mg/dL (240  $\mu$ M/L).

Existe un amplio espectro de presentación clínica de la hiperfenilalaninemia, que va desde las formas más leves que no requieren tratamiento, hasta la forma más severa de la enfermedad conocida como fenilcetonuria (PKU) clásica.<sup>19</sup>

La detección precoz de un recién nacido con niveles elevados de fenilalanina en suero, tiene su mayor impacto en la prevención de las manifestaciones clínicas, donde la discapacidad intelectual constituye la más grave expresión de algunos de estos defectos.<sup>20</sup> De ahí la importancia de un diagnóstico confiable que permita manejar cada caso en correspondencia con el defecto que padece, por lo que la introducción de un segundo criterio diagnóstico al Programa Cubano de Pesquisa Neonatal de hiperfenilalaninemias podrá ofrecer mayor seguridad en la definición de un caso enfermo y con ello mejor manejo del mismo.

El diagnóstico de las hiperfenilalaninemias mediante programas de pesquisa neonatal, se aborda generalmente utilizando varios criterios diagnósticos. En la actualidad el estudio de la actividad enzimática de la fenilalanina hidroxilasa, la determinación de la tolerancia a la ingestión de fenilalanina, conjuntamente con los niveles de fenilalanina en sangre, son los criterios diagnósticos más utilizados en programas de pesquisa neonatal similares al nuestro;<sup>20,21</sup> sin embargo, otros grupos de trabajo han usado criterios como la combinación de los niveles de FA y tirosina en suero, así como la relación fenilalanina/tirosina para considerar un individuo afectado.<sup>7,19</sup>

Valorando los resultados obtenidos en el estudio realizado, consideramos oportuno la incorporación de la relación Fen/Tir como segundo criterio en el diagnóstico confirmatorio de las hiperfenilalaninemias en Cuba.

## Agradecimientos

A la Técnico Ada I. Gandarilla Argudín por su valiosa contribución a este estudio.

## Referencias bibliográficas

1. Wilcox WR, Cederbaum SD. Amino acid metabolism. In Emery and Rimoin's. Principles and Practice of Medical Genetics. 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2002.p.2405-40.
2. Arriman BE, Cornejo EV. Una primera aproximación al diagnóstico y tratamiento de errores innatos del metabolismo. En: Colombo CM, Cornejo EV, Arriman BE, editoras. Errores innatos en el metabolismo del niño. Santiago de Chile: editorial Universitaria; 1999.p.45-6. ISBN 956-11-1663-4. P.379

3. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. The Molecular and Biochemical Bases of Genetic Disease. In: Schmitt W, Lewis Grigg L, editors. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;2001.p.203-53
4. Sarkissian CN, Boulais DM, McDonald JD, Scriver CR. A Heteroallelic mutant mouse model: A new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab.* 2000;69(3):188-94.
5. Jennings IG., Cotton RG., Kobe B. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in FAnyketonuria. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(9):683-96.
6. Scriver CR., Kaufman S., Eisensmith RC., Woo SLC. The Hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill Inc; 1995.p.1015-76.
7. Ramírez-Farías C., Pérez-Andrade ME., Ibarra-González I., Vela Amieva M. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. Propuesta de unificación. *Acta Pediatr Mex.* 2007;28(6):261-9.
8. Gámez A., Pérez B., Ugarte M., Desviat LR. Expressionanalysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29737-42.
9. Blau N., Blaskovics ME. Hyperphenylalaninemia. Phisichian's guided to the Laboratory diagnosis of metabolic diseases. London: Chapman & Hall Medical;1996.p. 65-78.
10. Gutiérrez García E, Barrios García B, Damiani Rosell A. Estudio de prevalencia de la Fenilketonuria en una muestra de niños con Retraso Mental. *Rev Cubana Ped.* 1989;61(1):94-8.
11. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>.
12. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963;32: 338-43.
13. Heredero L, Atencio G, Vega JL, Gutiérrez E, Damiani A. Diagnóstico precóz de fenilketonuria en Cuba. *Rev Cubana Ped.* 1986;58(1):27-33.
14. Marrero N, Frómata A, Coto R, Villegas L. Medición de TSH, TA y FA en muestras de sangre de cordón umbilical en papel de filtro: impacto en el tamisaje neonatal. *Biomed Colombia.* 2000;20:30-41.
15. Asociación Médica Mundial (AMM). Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones con seres humanos. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre de 2008 [en línea]. [Fecha de consulta: 20 de mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>.
16. Molinero L. Elección de los puntos de corte para convertir una variable cuantitativa en cualitativa. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión, 2003.
17. Cerda J., Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. *Rev Chil Infect.* 2012;29(2):138-141. ISSN 0716-1018.
18. Martínez Reyes, L. Las hiperfenilalaninemias. Recomendaciones para el genetista clínico. Editorial Ciencias Médicas;2006.
19. Belmont Martínez L., Fernández Lainez C., Ibarra González I., Guillén López S., Monroy Santoyo S., Vela Amieva M. Evaluación bioquímica de la fenilketonuria (PKU): del diagnóstico al tratamiento. *Acta Pediatr Mex.* 2012;33(6):296-300.
20. Vela Amieva M. Ibarra González I., Monroy Santoyo S., Fernández Láinez C., Guillén López S., et al. Modelo de atención inicial de la fenilketonuria y otras hiperfenilalaninemias en el Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr Mex.* 2010;31(6):297-303.
21. Blau N., Spronsen FJ., Harvey LL. Phenylketonuria. *The Lancet.* 2010;9750 (376):1417-1427.