

## DETECCION DE FENILCETONURIA Y OTROS ERRORES CONGENITOS DEL METABOLISMO EN CENTROS DE EDUCACION ESPECIAL DE COSTA RICA

Carlos de Céspedes<sup>\*\*\*</sup>, Inés Santistéban<sup>\*</sup>, Emilse Rojas<sup>\*</sup> y Daniel Ortiz<sup>\*</sup>

Key Words: Phenylketonuria, Mental Retardation, Inborn Errors of Metabolism, Exceptional children, Selective Screening

### RESUMEN

*El presente trabajo comprende la detección de fenilcetonuria (PKU) y otros errores congénitos del metabolismo (ECM) en niños excepcionales que asisten a los Centros de Educación Especial de Costa Rica, cubriéndose prácticamente la totalidad de estos centros.*

*Se realizó la prueba de Guthrie para los aminoácidos: fenilalanina, metionina, histidina y tirosina en sangre capilar recolectada en papel filtro de 1186 niños, con retardo mental (722), problemas de la audición y del lenguaje (347) y defectos visuales (117). Se logró recoger orina en 1074 de estos niños (628,332 y 114, respectivamente para los tres grupos mencionados). En la orina se realizaron las siguientes pruebas químicas: Benedict, 2,4 dinitrofenilhidrazina y cianuro nitroprusiato, así como cromatografía unidimensional en papel.*

*Se diagnosticó fenilcetonuria en una niña con retardo mental y en uno de sus tres hermanos.*

*Se encontraron 38 casos con metionina ligeramente elevada, sin ninguna otra alteración. Todas las pruebas químicas fueron negativas con excepción de un niño con problemas de la audición y del lenguaje que presentó la prueba del cianuro nitroprusiato positiva, pero ninguna otra alteración, y la 2.4 dinitrofenilhidrazina, que fue positiva en los dos casos con fenilcetonuria. Asimismo, la fenilalanina se demostró en cantidades aumentadas por cromatografía en papel de la orina de estos dos casos.*

*La prevalencia de fenilcetonuria en este estudio entre los niños con retardo mental (1:722), es similar a la encontrada en California en niños retardados educables. La ausencia de casos de homocistinuria e histidinemia, nos inclina a considerar que la importancia de estos ECM en relación con retardo mental y, respectivamente, con defectos visuales y del lenguaje, ha sido exagerada. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984: 5(1): 17-25].*

### INTRODUCCION

En Costa Rica, el aumento en la prevalencia de enfermedades genéticas, o con algún componente genético, es evidente a través de las estadísticas del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", que en los últimos años nos señalan a las malformaciones congénitas en primer o segundo lugar como causa de admisión y mortalidad en ese Centro (5).

---

\* Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos, Costa Rica

\*\* Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica.

Hasta el momento, no habían sido reportados estudios etiológicos en niños con retardo mental u otros problemas, que asisten a Centros de Educación Especial en Costa Rica, no habiéndose intentado la detección ("screening") de fenilcetonuria (PKU) y otros errores congénitos del metabolismo (ECM) en este grupo de "alto riesgo".

La asociación de la histidinemia y la homocistinuria con el retardo mental, no es tan constante como en la PKU. Asimismo, existen resultados contradictorios de la asociación de la histidinemia con defectos del lenguaje y de la homocistinuria con defectos visuales sobre todo en cuanto a la amaurosis se refiere (6,9, 12).

Estas tres situaciones nos motivaron a realizar el presente estudio, que consiste en la detección de PKU y otros ECM, de los aminoácidos y carbohidratos en niños con retardo mental, problemas de audición y lenguaje y defectos visuales, que comprenden los trastornos presentes en la población que atiende a los Centros de Educación Especial de Costa Rica. Consideramos que este estudio representa, además, una etapa previa de interés a un programa de detección masiva neonatal de ECM en Costa Rica.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Sujetos**

Se estudió la población escolar que atiende a los Centros de Educación Especial: Fernando Centeno Güell de Guadalupe, Cartago, Heredia, Ciudad Quesada, Pérez Zeledón, Puntarenas, Alajuela, Liberia, San Ramón, así como las Escuelas de Niños Sordos de Cartago y Turrialba y las Aulas diferenciadas de la Escuela Mariano Cortés de Turrialba. Estos Centros y Escuelas comprenden prácticamente todos los existentes en el país. Cada institución, fue visitada por personal del INCIENSA para la toma de las muestras. A todos los padres de familia se les informó previamente de la naturaleza del estudio.

### **Obtención y manejo de las muestras**

Se impregnó un papel filtro (Schleicher & Schuell N° 903, de SIGMA CHEM, CO) con tres o más gotas de sangre obtenidas por punción capilar del dedo medio, evitando superponerlas. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis en el INCIENSA.

La muestra de orina se recolectó en un recipiente plástico sin preservante transfiriéndose aproximadamente 15 ml a un tubo de ensayo que se mantuvo en una hielera durante su traslado al INCIENSA, donde se conservó congelada a -30°C hasta su análisis.

### **Pruebas de laboratorio**

En la muestra de sangre se determinaron los siguientes aminoácidos por la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie (2): fenilalanina, metionina, histidina y tirosina.

En la orina se practicaron las siguientes pruebas: 2,4 dinitrofenilhidrazina (dnph), cianuro nitroprusiato para cetoácidos y aminoácidos azufrados respectivamente, así como la prueba de Benedict para sustancias reductoras (10).

A cada muestra de orina, se le determinó el nivel de creatinina con un analizador automático (Eeckman Creatinin Analyzer-2) y se le practicó cromatografía unidimensional en papel de acuerdo con la técnica de Efron *et al* (1). El cromatograma se impregnó con un volumen suficiente para obtener una cantidad de creatinina de 5 ug en todas las muestras. En cada cromatograma se incluyeron mezclas estándar de aminoácidos y una orina control normal.

La interpretación de todas las pruebas fue hecha por tres observadores en prácticamente todos los casos.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se resumen las pruebas efectuadas, así como los metabolitos y padecimientos que detectan.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la prueba de Guthrie en 1186 muestras de sangre, así como de las pruebas químicas y la cromatografía en papel en 1.074 muestras de orina.

Dentro del grupo de niños con retardo mental, se encontró una niña de 6 años de edad que presentó niveles de fenilalanina en sangre de más de 20 mg/dl, así como excreción aumentada de este aminoácido en la cromatografía de orina.

Este caso de PKU presentó también la prueba de la 2,4 dinitrofenilhidrazina positiva, lo que corresponde a excreción aumentada de cetoácidos, notablemente fenilpirúvico. Estudiando la familia de esta niña, se encontró un hermano menor que presentó asimismo retardo mental, con idénticos resultados en sangre y orina. Otros tres hermanos varones, la madre y una tía no mostraron alteraciones en sangre ni en orina, con excepción de un hermano que presentó hiperglicinuria.

En la Fig. 1 se muestra el crecimiento bacteriano excesivo en los casos de PKU encontrados en este estudio, así como de un caso previo. Entendemos que estos son los únicos tres casos de PKU confirmados hasta el momento en Costa Rica. En la Fig. 2 se muestra la excreción exagerada de fenilalanina en la orina detectada por cromatografía de papel. Se puede observar un patrón en general aumentado de los demás aminoácidos, lo cual se debe a competición de la fenilalanina por la reabsorción de otros a nivel del túbulo renal.

De acuerdo con la sensibilidad de la prueba de Guthrie (6), consideramos como probable la presencia de hipermetioninemia en 38 casos que presentaron niveles de metionina comparables a los del estándar. Ninguno de estos casos presentó, sin embargo, la prueba de cianuro nitroprusiato positiva, ni alteraciones en la cromatografía.

En todos los casos los niveles de histidina y tirosina en sangre fueron normales.

Aparte de los dos casos con fenilcetonuria, las pruebas químicas fueron siempre negativas, con excepción de un niño con problemas de audición y lenguaje que presentó la prueba de Guthrie o en la cromatografía.

Se encontraron alteraciones en la cromatografía en orina, consideradas generalmente como benignas, que incluyen un caso de iminoglicinuria, 19 casos de hiperglicinuria y 40 de hiperexcreción de ácido B-amino isobutírico. El análisis de estos hallazgos se hará en otra comunicación.

## DISCUSION

Las cifras de incidencia de fenilcetonuria en individuos institucionalizados con retardo mental severo varían ampliamente en diferentes países. Para una sola institución la frecuencia varía desde 0 por ciento en Canadá Francesa a 2.7 por ciento en Inglaterra (4), aceptándose, en general una frecuencia de 0.5 a 1.0 por ciento en este tipo de pacientes (3). De especial interés es la observación hecha en California, que en grupos de niños retardados educables, entrenables o en instituciones del estado, la incidencia de fenilcetonuria fue de 1:750, 1:175, y 1:100 respectivamente (7). La primera cifra concuerda con la encontrada en el presente trabajo de 1:722. Esto nos lleva a postular que la cifra para la fenilcetonuria en la población de niños retardados en Costa Rica es mucho mayor que la aquí reportada, ya que la población estudiada por nosotros no representa a niños con retardo más severo, los cuales en nuestro país no están institucionalizados.

Aunque la frecuencia de PKU encontrada en este estudio es similar a la reportada en los Estados Unidos en grupos similares (11), la ausencia de histidinemia y homocistinuria hace pensar que su importancia como causa de este tipo de problemas, ha sido exagerada.

La determinación de la metionina por la prueba de Guthrie, se hizo tratando de buscar homocistinuria, cuyo diagnóstico es sugerido si al mismo tiempo que se encuentra este aminoácido elevado en sangre, la prueba del cianuro nitroprusiato en orina es positiva. En ningún caso de los 38 con metionina supuestamente elevada, se encontró la prueba del cianuro nitroprusiato positiva. Por otro lado, el único caso con prueba del CNP positiva no presentó ninguna otra alteración en sangre o en orina. No habiéndose practicado determinación cuantitativa de metionina en ninguno de estos casos, lo único que podemos anotar en este punto es que puede esperarse un porcentaje relativamente alto de falsos positivos para metionina plasmática con la prueba de Guthrie. La contribución por un lado de una deficiencia parcial de ATP 1-metionina-s-adenosiltransferasa, conocida como causa de elevación aparentemente benigna de metionina en plasma (6) y de la dieta por otro, pueden también postularse como explicaciones probables de este hallazgo.

Es notable la ausencia de histidinemia en un grupo de 722 niños con retardo mental y 347 con problemas de la audición y del lenguaje. Existen reportes contradictorios con respecto a la relación entre el defecto bioquímico y el retardo mental o problemas del lenguaje encontrados en algunos pacientes con histidinemia (9). La ausencia de sujetos histidinémicos en grandes "screenings" de niños con defectos del lenguaje y los resultados negativos del presente estudio, sugieren que esa asociación es casual. Sin embargo, debe comentarse que no se han encontrado defectos de la audición en la histidinemia (9).

La ausencia de homocistinuria en 114 niños con defectos visuales podría explicarse por el tamaño reducido de la muestra o más bien por corresponder la mayoría de los casos a retinitis pigmentosa. Estos hallazgos no están de acuerdo con el estudio de Zavala *et al.*, en México, que encontraron 5 casos de "homocistinuria" en 297 ciegos (12). El hecho de que estos autores utilizaron únicamente la prueba del cianuro nitroprusiato y la cromatografía unidimensional en papel sin realizar estudios en plasma, hace difícil la comparación de ese estudio con el nuestro. Por otro lado, los 59 casos de homocistinuria encontrados por Presley en 379 niños de una escuela estatal para ciegos (7), han sido todos descartados por Mudd y Levy (6) al no poderse confirmar el diagnóstico por otros autores en 8, lo que hace pensar que la metodología empleada no es confiable.

La inconstancia de la asociación de la iminoglicinuria con retardo mental, así como estudios prospectivos en neonatos con este ECM, han llevado a postular por un lado que puede existir una forma benigna y otra asociada a patología, o bien que en todos los casos se trata de una entidad benigna (8). Aunque la alternativa que prevalece actualmente es esta última, llama la atención, que la única "anormalidad" encontrada, además de la PKU, fue un caso de iminoglicinuria en un niño con retardo mental. Esto tiene más relevancia si tomamos en cuenta que en otro estudio realizado por nosotros no se encontró ningún caso de iminoglicinuria (ni otros ECM) en una población escolar normal representativa del país.

La ausencia de tirosinemia, así como de anomalías del metabolismo de los carbohidratos susceptibles de detectarse inicialmente por la prueba de Benedict, no debe sorprender, al considerar la edad y el tipo de pacientes estudiados.

Tomando en cuenta la alta especificidad y sensibilidad de la prueba de Guthrie, podemos descartar la posibilidad de falsos negativos y positivos en el presente trabajo.

De esta manera, la baja frecuencia de enfermedades metabólicas encontradas en este grupo de niños que atienden Centros de Educación Especial, por retardo mental, problemas de audición y del lenguaje o de la visión, indican por un lado que en este tipo de pacientes el "alto riesgo" para ECM es relativo, a pesar de que tradicionalmente han sido objeto de estudios como el presente. Es de suponer que el riesgo es mayor en niños lactantes con problemas agudos como acidosis metabólica, por ejemplo, y que el "screening" selectivo debe dirigirse a niños atendidos en servicios de Neonatología y de cuidados intensivos. La detección neonatal en masa, es desde luego el enfoque racional para el control de los ECM, tanto desde el punto de vista médico como económico.

Finalmente, estos hallazgos indican que otras causas genéticas y/o ambientales, generalmente más difíciles de controlar que los ECM, son las responsables de los problemas en niños como el objeto de este estudio. Para lograr un impacto sustancial sobre estos padecimientos, se necesita un ataque multidisciplinario con énfasis en la atención prenatal, que incluye esfuerzos dirigidos a prevenir la anoxia y la hemorragia en el neonato así como infecciones adquiridas anteriormente o durante el parto (toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, herpes y sífilis). Ya sea a través de la prevención directa, como en el caso de la rubéola, o a través del consejo genético, en enfermedades cromosómicas para las cuales existen posibilidades de diagnóstico prenatal, fundamentalmente Síndrome de Down (el 7% de los niños retardados en este estudio eran mongoloides) se puede tratar de controlar estos trastornos,

#### ABSTRACT

*A selective screening for phenylketonuria (PKU) and other inborn errors of aminoacid and carbohydrate metabolism (IEM), was done in exceptional children of Costa Rica, covering practically all the schools for special education of the country. The aminoacids, phenylalanine, methionine, histidine and tyrosine were measured in dry blood spots by the Guthrie test, in 1186 children with mental retardation (722), speech and hearing defects (374) and visual defects (177). Urine collection was successfull in 1074 of these children, 628, 322, and 144, respectively for the three groups. Chemical tests, bene-*

dict, 2,4, dinitrophenylhydrazine and cyanide nitropruside, as well as one dimentional paper chromatography were done in the urine. PKU was found in one girl and in one of her three brothers.

Slightly high methionine in blood, with no other abnormalities was found in 38 children.

All chemical tests were negative except for a child with speech and hearing defects, that showed a positive cyanide nitropruside test, with no other abnormality, and the 2,4 dinitrophenylhydrazine test that was shown to be positive in the 2 cases with PKU. Phenylalanine was also present in large amounts in the chromatogram of the urine of the 2 cases with PKU.

The prevalence of PKU found among the population of mentally retarded (1:722) is quite similar to that found in California in retardate, but educable children like these.

The absense of homocystinuria and histidinemia in this relatively large group, led us to consider that the relative significance of these two IEM in connection with mental retardation and respectively, visual and language defects, has been exaggerated.

#### CUADRO 1

##### PRUEBAS DE "SCREENING" Y ALTERACIONES QUE DETECTAN, REALIZADAS EN NIÑOS EXCEPCIONALES DE COSTA RICA

MUESTRA	PRUEBA	METABOLITO	PADECIMIENTO
SANGRE	Guthrie	Fenilalanina	Fenilcetonuria
	Guthrie	Metionina	Homocistinuria
	Guthrie	Histidina	Histidinemia
	Guthrie	Tirosina	Tirosinemia
ORINA	<u>Pruebas químicas</u>		
	Benedict	Azúcares y otras sustancias reductoras.	Galactosemia e Intolerancia hereditaria a la fructosa Alcaptonuria Glucosuria renal Diabetes
	2,4 dinitro-fenilhidrazina	Cetoácidos	Fenilcetonuria Enf. de la orina del jarabe de arce Tirosinemia
	Cianuro nitroprusiato	Aminoácidos azufrados	Cistinuria Homocistinuria
	<u>Cromatografía unidimensional en papel</u>	Aminoácidos	Aminoacidurias renales o prerrenales

CUADRO 2

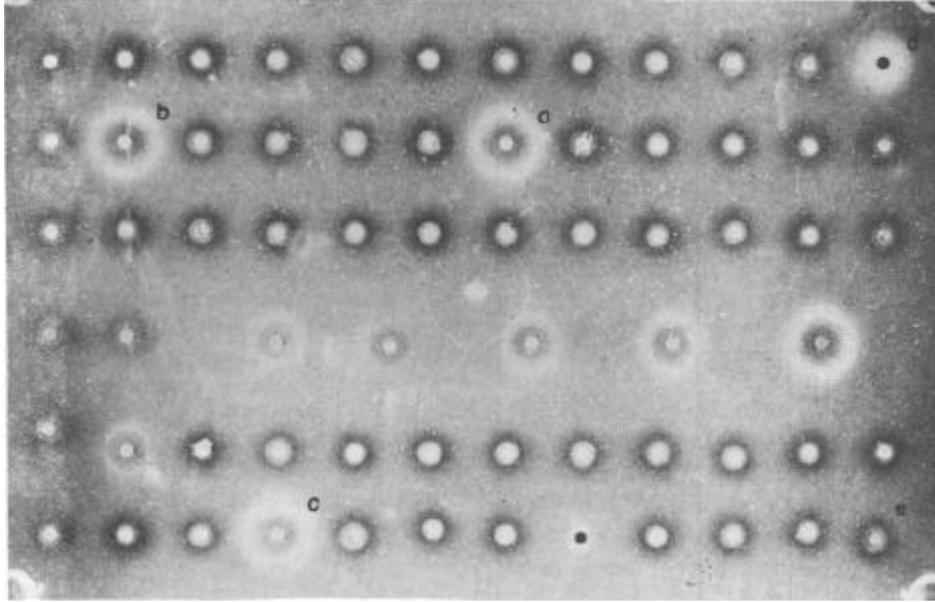
NUMERO DE CASOS CON AMINOACIDOS U OTROS METABOLITOS AUMENTADOS EN SANGRE Y ORINA EN NIÑOS EXCEPCIONALES DE COSTA RICA

	Metabolito	CATEGORIA DE TRASTORNO				Diagnóstico
		Retardo	Problemas de	Defectos	Visuales	
		Mental	la Audición y del Lenguaje			
SANGRE, N		722	347	117		
Guthrie						
	Fenilalanina	2	0	0	Fenilcetonuria	
	Metionina	30*	6*	2*	Deficiencia de ATP-1-MSAT**?	
	Histidina	0	0	0		
	Tirosina	0	0	0		
ORINA, N		628	332	114		
a.	Pruebas químicas					
	2,4 dinitrofenilhidrazina	2	0	0	***	
	Cianuro					
	Nitroprusiato	0	1	0		
	Benedict	0	0	0		
b.	Cromatografía unidimensional en papel					
	Fenilalanina	2			***	

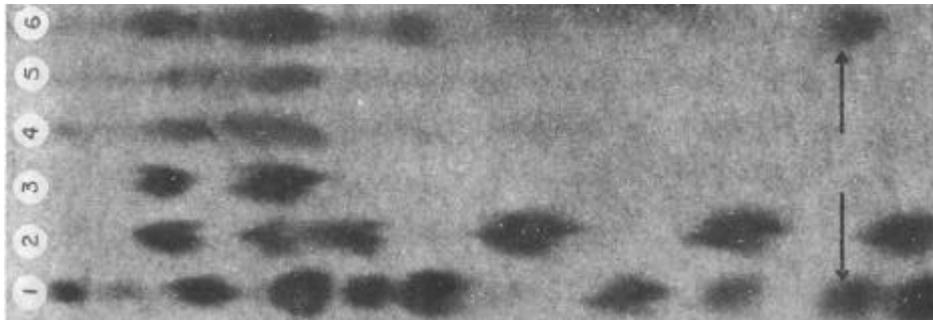
\* Metionina en todos los casos fue similar al estándar de 1 mg/dl, supuestamente elevado para la prueba de Guthrie (6).

\*\* ATP-1-metionina-s-adenosil transferasa.

\*\*\* Corresponden a los casos de fenilcetonuria.



Determinación de fenilalanina en sangre por la prueba de Inhibición bacteriana de Guthrie. En la cuarta fila de arriba hacia abajo, se muestran los estándares, de izquierda a derecha: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 20 mg / dl. a. Caso de fenilcetonuria encontrado. b. Hermano da caso a. c. Caso costarricense conocido de fenilcetonuria. d. Control positivo. e. Control normal



Cromatografía unidimensional en papel de aminoácidos urinarios. 1, 2 y 3 mezclas estándar, 4 y 5 orinas normales. 6. Caso de fenilcetonuria encontrado. Las flechas señalan a la fenilalanina

## REFERENCIAS

1. Efron, M.L.; Young, D.; Moser, H.W. & McCready, R.A. A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of aminoacid metabolism. A technique using whole blood or urine collected on filter paper. *New Engl. J. Med.* 1964; 270:1378-1383.
2. Guthrie, P.; Susi, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963; 32:338-343.
3. Harris, H. *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 3rd. ed. North Holland: Elsevier, 1980; 201.
4. Know, W.E. Phenylketonuria. IN: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. Fredrickson, D.S., eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 3rd. ed. McGraw-Hill, 1972; 266-295.
5. Mohs, E. Infectious diseases and Health in Costa Rica: the development of a new paradigm. *Pediatric Infectious Disease* (in press).
6. Mudd, S.H.; Levy, H.L. Disorders of Transsulfuration. IN: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Fredrickson, D.S., eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill. New York, 1978; 458-503.
7. Presley, G.D.; Stinson, I.N.; Sidbury, J.B. Homocystinuria at the North Carolina State School for the Blind. *Amer. J. Ophthalmol.* 1968; 66:884-889.
8. Scriver, C.R. Familiar iminoglicinuria, IN: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, eds. *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 1978; 1593-1606.
9. Scriver, C.R. Rosenberg, L.E. *Aminoacid metabolism and its disorders*. Philadelphia: Saunders, 1973; 372.
10. Thomas, G.H. Howell, R. *Selected screening tests for Genetic Metabolic Disease*. Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc., 1973.
11. Williamson, M.; Kosch, R.; Henderson, P. Phenylketonuria in school age retarded children. *Amer. J. Mental. Defic.* 1968; 72:740-746.
12. Zavala, C.; Cobo, A.; Lisker, R.; Chavez, Y. Frequency of Homocystinuria amongst the blind. *Clin Gen.* 1973; 4:98-100.