



11237
165
205

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

DETECCION DE HETEROCIGOTOS PARA LA DEFICIENCIA DE
ORNITINA TRASCARBAMILASA (OTC) EN PACIENTES CON
SINDROME DE RETT Y EN SUS MADRES, MEDIANTE UNA
PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MEDICA
P R E S E N T A L A:

DRA. MARCELA B. VELA AMIEVA



FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA
SECRETARIA DE SALUD

**DETECCION DE HETEROCIGOTOS PARA LA DEFICIENCIA DE
ORNITINA TRASCARBAMILASA (OTC) EN PACIENTES CON SINDROME
DE RETT Y EN SUS MADRES, MEDIANTE UNA PRUEBA DE RETO CON
ALOPURINOL**

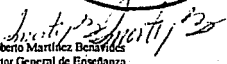
TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MEDICA
PRESENTA LA

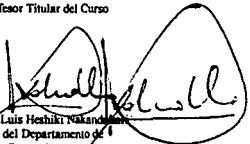
Dra. Marcela B. Vela Amieva

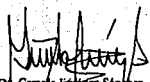
APROBACION DE TESIS




Dr. Héctor Fernández Marcella
Director General
Instituto Nacional de Pediatría
Profesor Titular del Curso


Dr. Rigoberto Martínez Benavides
Subdirector General de Enseñanza
Instituto Nacional de Pediatría


Dr. Luis Heshiki Nakandak
Jefe del Departamento de
Pre y Postgrado
Instituto Nacional de Pediatría


Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Unidad de Genética de la Nutrición,
Instituto Nacional de Pediatría -
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Asesor de Tesis

México D.F. 1994



INDICE

	Pag
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
TABLA 1. Criterios diagn3sticos del SR	3
TABLA 2. Características clínicas del SR	4
FIGURA 1. Ciclo de la Urea	6
FIGURA 2. Locus de la OTCD	7
FIGURA 3. Relaciones Metab3licas OTCD	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
4. JUSTIFICACION	9
5. HIPOTESIS	10
6. OBJETIVOS	10
7. MATERIAL Y METODO	11
7.1. Selecci3n de pacientes	11
7.2. Dise1o experimental y metodología	12
7.3. Hoja de recolecci3n de datos	16
8. CONSIDERACIONES ETICAS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	17
9. RESULTADOS	18
9.1. Descripci3n de la poblaci3n estudiada	18
9.2. Excreci3n urinaria de 3cido urico	18
Tabla 3. Edad de los grupos estudiados	20
Tabla 4. Valores de 3cido urico urinario en ni1as sanas durante la prueba	20
Tabla 5. Valores de 3cido urico urinario en mujeres adultas, sanas durante la prueba	20
Tabla 6. Valores de 3cido urico urinario en pacientes con SR durante la prueba	20

Tabla 7. Valores de ácido uréico urinario en las madres de niñas con SR	21
Tabla 8. Valores promedio de ácido uréico urinario en los cuatro grupos	21
Figura 5. Excreción de ácido uréico en niñas sanas y niñas con SR durante la prueba de reto con alopurinol	22
Figura 6. Excreción de ácido uréico en mujeres sanas y madres de niñas SR durante la prueba de reto con alopurinol	23
9.3. Detección de heterocigotos	24
9.4. Efectos secundarios a la prueba	24
10. DISCUSION	25
11. CONCLUSIONES	28
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
13. ANEXOS	31
ANEXO 1. Carta de consentimiento informado	32
ANEXO 2. Dieta previa al estudio	33
ANEXO 3. Técnica de cuantificación de uréico	34
ANEXO 4. Hoja de concentración de datos	37
ANEXO 5. Hoja de concentración de resultados	39

1. RESUMEN

El Síndrome de Rett (SR) es un desorden neurodegenerativo cuya etiología no se conoce con precisión. Se ha reportado la presencia de heterocigotos para la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC) en algunas pacientes con SR y en sus madres. Recientemente se describió una prueba de reto con alopurinol que permite detectar con seguridad, a través de su excreción urinaria aumentada de ácido orótico, a las mujeres heterocigotas para la deficiencia de OTC, evitando los riesgos que representan las pruebas habituales que utilizan una sobrecarga intravenosa de aminoácidos que ocasiona hiperamonemia. Se aplicó esta prueba para detectar heterocigotos para la deficiencia de OTC en cinco pacientes con SR y en sus madres, así como en un grupo control de niñas y adultas sanas. Se encontró que las pacientes con SR presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el patrón de excreción de ácido orótico en relación al grupo control. A través de este estudio se detectó a una paciente con SR que reúne los criterios de heterocigoto para la deficiencia de OTC.

2. INTRODUCCION

En 1966, A. Rett describió un desorden neurodegenerativo, de etiología desconocida, que afecta únicamente a niñas^{1,2}. Este síndrome se manifiesta con detención del desarrollo generalmente entre los 6 y los 18 meses de edad, además de existir pérdida de habilidades adquiridas y desarrollo de movimientos estereotipados de las manos³. Estudios independientes en diversos países tales como Suecia y Escocia, estiman la prevalencia del SR cercana a 1 en 10,000 niñas⁴.

El SR parece seguir un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X. Aunque su etiología no se conoce con precisión, se han sugerido varias posibilidades etiológicas como la presencia de sitios cromosómicos frágiles en la región Xp22, metabolismo anormal de la biotina y tetrahidrobiopterina y la inactivación anormal del cromosoma X⁵.

Hasta el momento no existen marcadores citogenéticos, bioquímicos o moleculares para ésta enfermedad, por lo que el diagnóstico se basa únicamente en criterios clínicos. Estos criterios, conocidos como "Criterios de Viena",⁶ se dividen en tres categorías: criterios necesarios, criterios de apoyo y criterios de exclusión. Aún cuando la mayoría de estos pacientes suelen presentar muchos, si no es que todos los criterios de apoyo, el diagnóstico puede hacerse aún si estos no están presentes, especialmente en pacientes muy pequeños. La presencia de uno o más criterios de exclusión, descarta el diagnóstico. Los criterios diagnósticos de esta enfermedad se muestran en forma detallada en la Tabla 1. Las características clínicas y el diagnóstico diferencial del SR pueden variar de acuerdo con el estadio de la enfermedad (Tabla 2).

Desde las primeras descripciones de este síndrome realizadas por Rett, la hiperamonemia ha sido un hallazgo frecuentemente asociado³. En estudios recientes, se ha encontrado una elevación en los niveles de amonio sanguíneo y excreción urinaria de ácido orótico y orotidina en algunas pacientes con SR después de somerérseles a una carga intravenosa de alanina⁷. Estos estudios sugieren fuertemente que algunos casos de SR se encuentran asociados con la deficiencia de alguna enzima del ciclo de la urea.

TABLA 1
CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE SINDROME DE RETT.
 Modificados de Haberg et. al.^{4,8.}

CRITERIOS NECESARIOS

1. Período prenatal y perinatal aparentemente normal.
2. Desarrollo psicomotor aparentemente normal durante los primeros 6 meses de vida.
3. Perímetro cefálico normal al nacimiento.
4. Desaceleración del crecimiento cefálico entre los 5 meses y los 4 años.
5. Pérdida de los movimientos propositivos adquiridos de las manos entre los 6 y los 30 meses, asociado temporalmente con disfunción de comunicación y aislamiento social.
6. Disparidad severa del lenguaje receptivo y expresivo, retraso psicomotor aparente.
7. Movimientos estereotipados de las manos (apretar, frotar, lavar, etc.).
8. Aparición de apraxia de la marcha y apraxia-ataxia troncal entre las edades de 1 a 4 años.
9. El diagnóstico es tentativo hasta la edad de 2 a 5 años.

CRITERIOS DE APOYO

1. Disfunción respiratoria.
 Apnea periódica durante la vigilia.
 Hiperventilación intermitente.
 Periodos de retención de la respiración.
 Expulsión forzada de aire o saliva.
2. Anormalidades en el electroencefalograma.
 Contexto de ondas lentas y periodos rítmicos lentos intermitentes (3 a 5 Hz).
 Descargas epileptiformes, con o sin crisis convulsivas clínicamente aparentes.
3. Crisis convulsivas.
4. Espasticidad usualmente asociada a atrofia muscular y distonía.
5. Desordenes periféricos vasomotores.
6. Escoliosis.
7. Crecimiento retardado.
8. Pies pequeños hipotróficos.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Evidencia de retardo en el crecimiento uterino.
2. Organomegalia, o bien otros signos de enfermedades por atesoramiento.
3. Retinopatía o atrofia óptica.
4. Microcefalia al nacimiento.
5. Evidencia de trastorno metabólico identificable o de otra enfermedad neurológica progresiva.
6. Evidencia de daño cerebral adquirido en período perinatal.
7. Trastorno neurológico adquirido resultante de infecciones severas o de traumatismo craneoencefálico.

TABLA 2
SINDROME DE RETT: CARACTERISTICAS CLINICAS Y DIAGNOSTICO DIFERENCIAL SEGUN SU ESTADIO

Modificado de Hagberg y Witt-Engerström⁶.

ESTADIO	CARACTERISTICAS CLINICAS	DIAGNOSTICO DIFERENCIAL
Estadio de desaceleración de inicio temprano Inicio: 6 a 18 meses Duración: meses	Detención del desarrollo Desaceleración del crecimiento cráneo/encefalo Desinterés en el juego Hipotonía	Hipotonía congénita benigna Síndrome de Prader-Willi Parálisis cerebral
Estadio "destrutivo" rápido Inicio: 1 a 3 años Duración: semanas o meses	Rápida regresión del desarrollo con irritabilidad Pérdida del uso de las manos Estereotipias de las manos: aplaudir, dar palmadas retorcer, etc. Manifestaciones autistas Pérdida del lenguaje expresivo Insomnio Comportamiento autoabusivo (morder dedos, golpearse la cara)	Autismo Psicosis Encefalitis Desorden visual o auditivo Espasmos infantiles (síndrome de West) Esclerosis tuberosa Deficiencia de otitina transcarbamiase Fenilcetonuria Ceroidlipofuscinosis neuronal infantil
Estadio pseudoestacionario Inicio: 2 a 10 años Duración: meses a años.	Retraso mental severo Demencia Mejoría de las características autistas Convulsiones Estereotipias típicas de las manos Apraxia y ataxia prominentes Espasticidad Hiperventilación, aerofagia Apnea en vigilia Pérdida de peso con buen apetito Escoliosis temprana Bruxismo	Parálisis cerebral atáxica espástica Degeneración espinocerebellar Leucodistrofia Distrofia neuroaxonal Síndrome de Lennox-Gastaut Síndrome de Angelman
Estadio de deterioro motor tardío Inicio: 10 años o más Duración: años	Signos combinados de neurona motora superior e inferior Escoliosis progresiva, pérdida muscular y rigidez Disminución severa de la movilidad Retraso de crecimiento Mejoría del contacto visual Ausencia virtual de lenguaje expresivo y receptivo Distrofismo de los pies Reducción de la frecuencia de las convulsiones	Desorden degenerativo desconocido

El ciclo de la urea consiste en una serie de reacciones bioquímicas, que tienen como función principal prevenir la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos. Esta función se logra a través de la síntesis de urea, una molécula estable, hidrosoluble y no tóxica para el organismo, que se elimina fácilmente por vía urinaria (Figura 1). El ciclo de la urea también incluye algunas reacciones bioquímicas requeridas para la síntesis "de novo" de arginina.

Se conocen con detalle cinco enfermedades del ciclo de la urea, cada una de ellas relacionada con la deficiencia de alguna de las enzimas del ciclo metabólico. Cuatro de estas enfermedades, la deficiencia de carbamilsulfato sintetasa, la deficiencia de ornitíntranscarbamilasa (OTC), la deficiencia de ácido arginosuccínico sintetasa y la deficiencia de arginosuccinasa, se caracterizan por signos y síntomas inducidos por la acumulación de los precursores de la urea, principalmente amonio y glutamina. La quinta de estas enfermedades, la deficiencia de arginasa, se caracteriza por elevación de amonio y de arginina en sangre⁸.

Los defectos del ciclo de la urea (DCU) son enfermedades monogénicas que se heredan en forma autosómica recesiva, con excepción de la deficiencia de OTC que se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X^{8,9}.

Recientemente se describió un estudio que aporta evidencia sobre la propuesta de que la mutación que causa el SR esta relativamente cercana al locus de la OTC en el cromosoma X¹⁰ (Figura 2). Se ha demostrado que algunas pacientes con SR son, además, heterocigotas para la deficiencia de OTC, lo que les causa un inadecuado metabolismo del nitrógeno y, en consecuencia, elevación de los niveles sanguíneos de amonio posterior a la ingesta de proteínas.

La hiperamonemia causada por la deficiencia de OTC, puede contribuir al daño neurológico que presentan las pacientes con SR. Por ello, la detección oportuna de la deficiencia de OTC agregada al SR puede ser de beneficio a la paciente, ya que su tratamiento evita la hiperamonemia.

Actualmente el tratamiento de las pacientes con deficiencia de OTC está enfocado a evitar al máximo la elevación de los niveles de amonio en la sangre a través de dietas hipoprotéicas y medicamentos que promueven la fijación y eliminación urinaria del amonio, con el mínimo efecto posible en el crecimiento y desarrollo del paciente.

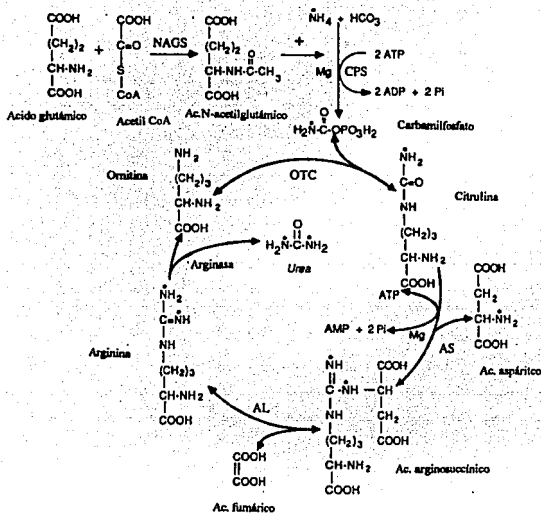


FIGURA 1. Ciclo de la Urea, con los sustratos, productos y cofactores requeridos para la ureagénesis. Los asteriscos muestran átomos perdedores de nitrógeno. AS = sintetasa arginosuccínica; AL = arginosuccinasa; CPS = carbamilfosfato sintetasa; NAGS = N-acetilglutamato sintetasa; OTC = ornitina transcarbamilasa.

FALLA DE ORIGEN

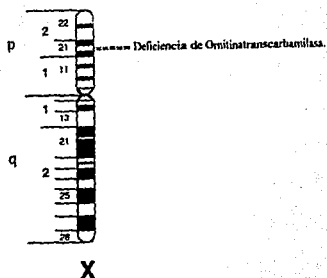


FIGURA 2. Locus de la deficiencia de ornitina transcarbamilasa en el cromosoma X.

El principio de la prueba de reto con alopurinol consiste en que la acumulación de carbamil fosfato dentro de las mitocondrias (como ocurre en heterocigotos para la deficiencia de OTC) da lugar a su difusión hacia el citoplasma, en dónde estimula la síntesis de pirimidinas. De esta forma, la inhibición de la enzima orotidina monofosfato (OMP) descarboxilasa por ribonucleótido de oxipurinol (producto de reacción del alopurinol *in vivo*), da lugar a la acumulación de OMP, ocasionando una sobreproducción de ácido orótico y orotidina, y eventualmente a aciduria orótica y orotidinuria (Figura 3). La severidad de estos hallazgos sirve para distinguir a las mujeres heterocigotas para la deficiencia de OTC de las mujeres normales¹³.

Esta prueba evita los riesgos que implican las pruebas de sobrecarga de proteínas con el fin de forzar el ciclo de la urea, que además de molestas para algunos pacientes, pueden ser en ocasiones peligrosas pues potencialmente pueden desencadenar hiperamonemia severa y también pueden dar resultados falsos positivos¹⁵.

Actualmente se conocen los valores de excreción de ácido orótico en niños sanos, así como en portadores de deficiencia de OTC^{16,17}.

7
FALLA DE ORIGEN

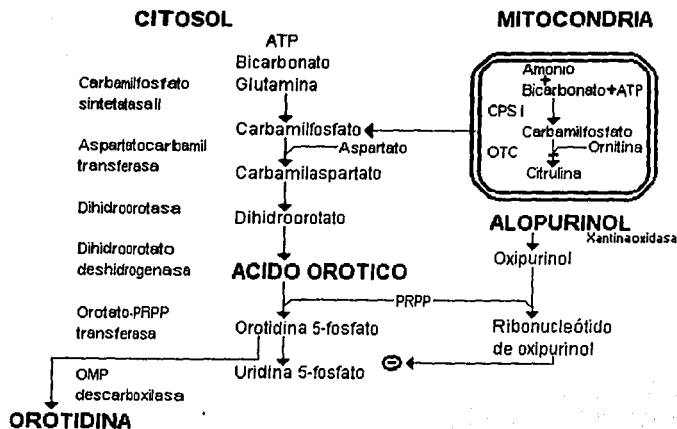


FIGURA 3. Relaciones metabólicas citosólicas y mitocondriales entre el carbamilo fosfato, pirimidinas y alopurinol en hepatocitos deficientes de ornitina transcarbamilasa. Cuando el carbamilo fosfato intramitocondrial se acumula en grandes cantidades, (como ocurre en los hemicigotos o heterocigotos de deficiencia de OTC, ante una carga de nitrógeno) se difunde al citoplasma, estimulando la biosíntesis de pirimidinas. Como consecuencia se depleta el fosforibosilpirofosfato (PRPP), limitando el flujo para la PRPP-orotato transferasa, lo que resulta en acumulación de ácido orótico. Cuando la Orotidina-monofosfotodecarboxilasa (OMP) es inhibida por el ribonucleótido de oxipurinol, conduce a acumulación de orotidina y ácido orótico. Esquema tomado de Brusilow y Horwich⁹.

FALLA DE ORIGEN

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Existen pacientes con SR en el INP que sean heterocigotos para la deficiencia de OTC, estudiadas por medio de la prueba de reto con alopurinol?
2. ¿Existen madres de niñas con SR que sean heterocigotos para la deficiencia de OTC, estudiadas por medio de la prueba de reto con alopurinol?

4. JUSTIFICACION

1. El detectar a las pacientes heterocigotas para la deficiencia de OTC permite ofrecer un manejo terapéutico coadyuvante, mediante la prescripción de dietas adecuadas y de medicamentos específicos.
2. En caso de comprobar dicho diagnóstico, se podrán tomar medidas para evitar los episodios recurrentes de hiperamonemia que dañan al sistema nervioso central.
3. Ante la sencillez, inocuidad y bajo costo de la prueba, se abre la posibilidad de buscar portadores de deficiencia de OTC en el resto de la familia.
4. El presente estudio abre líneas de investigación tanto en los aspectos genéticos de la deficiencia de OTC como en la estandarización de métodos para diagnóstico de portadores que permita hacer una detección oportuna, evite consecuencias y pueda reducir costos.

5. HIPOTESIS

1. Algunas pacientes con SR del INP son heterocigotas para la deficiencia de OTC , y esta deficiencia puede ser estudiada por medio de la prueba de reto con alopurinol.
2. Algunas de las madres de las pacientes con SR del INP son heterocigotas para la deficiencia de OTC y pueden ser detectadas por medio de la prueba de reto con alopurinol.

6. OBJETIVOS

1. El principal objetivo del presente estudio es conocer los niveles de ácido urico urinario antes y durante una prueba de reto con alopurinol, en las pacientes con SR del INP.
2. Conocer los niveles urinario de ácido urico antes y durante una prueba de reto con alopurinol en las madres de las pacientes con SR del INP.
3. Detectar heterocigotos para la deficiencia de OTC en las pacientes con SR y en sus madres, por medio de la observación de cambios en las concentraciones del ácido urico después de la administración de una dosis de alopurinol.

7. MATERIAL Y METODO

7.1 SELECCION DE PACIENTES:

- Se estudiaron a las todas las pacientes con diagnóstico comprobado de Síndrome de Rett del Servicio de Neurología del INP y a sus madres; previo consentimiento informado (ANEXO 1). Se determinaron niveles de ácido orótico en orina en una muestra basal previa a la toma de una dosis estandarizada de alopurinol (10 mg/k para las niñas, dosis única y 300 mg para las madres, dosis única); y en 4 muestras de orina posteriores a la toma del medicamento, en tiempos previamente establecidos.
- **POBLACION OBJETIVO:**
Todas las pacientes con diagnóstico de SR del INP y sus madres.
- **CRITERIOS DE INCLUSION:**
Tener síndrome de Rett o tener una o más hijas con dicho síndrome.
Consentimiento informado.
- **CRITERIOS DE EXCLUSION:**
Tener una enfermedad metabólica hereditaria del ciclo de la urea.
Cursar con estados catabólicos tales como procesos infecciosos o primeras horas postquirúrgicas.
Embarzo.
- **CRITERIOS DE ELIMINACION:**
Alta voluntaria

7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGIA

A. REALIZACION DEL ESTUDIO:

1. Se localizaron por medio del servicio de Neurología a todas las pacientes con diagnóstico comprobado de SR, y se invitó a los padres a una junta para explicarles el objetivo y la forma de realización del estudio. A las pacientes que aceptaron participar en la prueba, se les citó y se les internó por 24 horas en el servicio de Neurología.

Una vez internadas se les colocó una sonda de Foley a las 7:00 hrs, y se les tomó una muestra de orina basal. Inmediatamente después de colocada la sonda, se administró una dosis de alopurinol calculada a 10 mg/kg dosis única y se inició una recolección de orina de 24 horas, dividida en los siguientes intervalos:

MUESTRA	HORARIO	TIEMPO EN HORAS POSTERIOR A LA TOMA DE ALOPURINOL
Muestra 0	de 07:00 hrs.	Muestra basal
Muestra 1	de 08:00 hrs. a 14:00 hrs.	0 - 6
Muestra 2	de 14:00 hrs. a 20:00 hrs.	7 - 12
Muestra 3	de 20:00 hrs. a 02:00 hrs.	13 - 18
Muestra 4	de 02:00 hrs. a 08:00 hrs.	19 - 24

Las muestras de orina fueron recolectadas en frascos de vidrio etiquetados, indicando claramente la hora de la recolección, y fueron refrigeradas y entregadas al finalizar la prueba, al laboratorio de Genética de la Nutrición del tercer piso del INP en donde se almacenaron para su procesamiento en conjunto, con las demás muestras.

Una vez terminada la recolección a las 8:00 horas del día siguiente, se retiró la sonda de Foley y se envió la punta de dicha sonda a cultivo bacteriológico para detectar oportunamente posibles complicaciones infecciosas de la colocación.

Al terminar la recolección, la paciente fué egresada del Servicio, o continuó con sus estudios habituales. En caso de que la paciente se internara por otro motivo, por ejemplo realización de tomografía axial computada o de resonancia magnética nuclear, durante dicho internamiento se realizó el estudio, siempre que este no interfiriera con la prueba. Si se internó por algún otro motivo, por ejemplo infeccioso o quirúrgico, no fué sometida al mismo tiempo a éste protocolo.

2. La prueba se realizó también en las madres de las pacientes con SR, con las siguientes variaciones:
 - No se colocó sonda de Foley.
 - Se administró una dosis única de alopurinol de 300 mg.
 - Se descartó previo al estudio la presencia de embarazo por la fecha de última menstruación.
 - El horario de recolección de la muestra fué exactamente el mismo que se especificó para las pacientes con SR, al igual que la entrega.
3. El estudio únicamente se llevó a cabo cuando los padres entendieron su fundamento y estuvieron de acuerdo en su realización, previa firma de carta de consentimiento (ANEXO 1).
4. Tres días antes de la realización de la prueba llevaron una dieta libre de xantinas y de conservadores alimenticios tales como el benzoato de sodio que pueden alterar la prueba. La dieta se les explicó personalmente a cada madre y se le dió un folleto informativo con los alimentos que no debían consumir (ANEXO 2). Una vez terminada la prueba, se suspendieron las restricciones dietéticas antes mencionadas.
5. Las muestras enviadas al laboratorio de Genética de la Nutrición se almacenaron por duplicado tomando 10 ml de cada colección, los cuales se colocaron en frascos de plástico resistentes al frío. Las muestras se procesaron por método colorimétrico (ANEXO 3).
6. Los datos de información clínica y de realización de la prueba quedaron consignados en una hoja especial (ANEXO 4), y los resultados se anotaron en su respectiva hoja de concentración de datos (ANEXO 5).
7. El estudio fué realizado de igual forma en los grupos control. El primer grupo control, fué de niñas sanas. El segundo grupo control fué de mujeres adultas sanas, que se encontraban en los 10 primeros días posteriores a su fecha de última regla, a fin de descartar la posibilidad de embarazo y evitar la exposición del embrión al alopurinol. El horario de la recolección y el resto de la metodología fué idéntico, incluyendo la toma de la dosis de alopurinol.

B. EQUIPO BASICO PARA CADA PRUEBA

a) Para cada paciente con SR:

- Un mortero.
- Una jeringa de 5 ml.
- 1 ampula de agua estéril.
- 1 vasito de medicamentos.
- 1 Sonda de Foley nueva, estéril.
- Un par de guantes estériles.
- 1 frasco de agua estéril de 250 ml.
- Solución jabonosa.
- Torundas.
- Gel lubricante.
- Tela adhesiva.
- Equipo para colocación de Sonda de Foley
- 5 frascos debidamente etiquetados para recolección de orina
- 10 frascos para separar las muestras de orina en el laboratorio.

b) Para cada madre de paciente con SR:

- Un vaso de agua para medicamento.
- 5 frascos etiquetados para recolección de orina.
- 10 frascos para separar las muestras de orina en el laboratorio.

c) Para cada niña y para cada mujer adulta normal del grupo control se utilizó el mismo equipo básico, excepto la sonda de Foley, la cual fue sustituida por frascos recolectores de orina.

C. FUENTE DE ALOPURINOL

ZYLOPRIM: tabletas para uso oral.

Presentación de 100 mg Código Wellcome U4A.

Presentación de 300 mg Código Wellcome C9Q.

Fabricado por Burroughs Wellcome de México.

D. ACTIVIDADES DE CADA PARTICIPANTE:

Este estudio se realizó en colaboración de los Servicios de Genética de la Nutrición y Neurología del Instituto Nacional de Pediatría y participaron las siguientes personas:

a) Médico Neurólogo:

Fué el responsable de agrupar a las pacientes con diagnóstico comprobado de SR, y de notificar al Servicio de Genética de la Nutrición el día y la hora en la cual la paciente se internó en su servicio.

Habló en forma preliminar con los padres de la paciente y explicó someramente la idea del objetivo del estudio.

Revisó a su ingreso a la paciente para dar autorización para la realización del estudio.

Se encargó de los trámites administrativos de ingreso y egreso de la paciente, así como de la supervisión de la adecuada colocación de la sonda de Foley y del envío de la punta de dicha sonda, después de su retiro, al servicio de Bacteriología, para su cultivo.

b) Médico del Servicio de Genética de la Nutrición (autora de esta tesis):

Explicó en forma clara y sencilla el objetivo del protocolo a los padres de las pacientes.

Explicó detalladamente la dieta a la que debían someterse tanto la madre como la paciente 2 días antes de la realización del estudio.

Calculó las dosis de alopurinol correspondientes para la paciente y para su madre.

Se encargó de descartar la presencia de embarazo en la madre para la realización de la prueba.

Se encargó de vigilar el inicio de la colección de orina y habló con el personal de Enfermería del Servicio de Neurología para explicarles el protocolo y para solicitar su colaboración en la vigilancia de la recolección.

Notificó con uno o dos días de anticipación al personal del Laboratorio de Genética de la Nutrición la fecha en la que se realizó cada una de las pruebas.

Vigiló que las muestras llegaran al laboratorio de Genética de la Nutrición y fueran recibidas por el personal que realizó las determinaciones.

Coordinó las actividades de la Enfermera de Genética de la Nutrición.

Supervisó el llenado adecuado de las hojas de concentración de datos y de concentración de resultados.

c) Enfermera de Genética de la Nutrición:

Se encargó de vigilar la correcta recolección de la orina y notificó todos los problemas que ocurrieron durante la misma.

Vigiló que los frascos fueran membretados correctamente, con el horario de recolección claramente especificado.

Se encargó de transportar las muestras al laboratorio de Genética de la Nutrición, así como de la separación de cada una en dos frascos para las determinaciones posteriores.

Fué junto con el médico, la responsable del llenado de la hoja de concentración de datos.

d) Personal del laboratorio de Genética de la Nutrición:

Determinó por métodos colorimétricos los niveles de ácido orótico en las muestras de orina de las pacientes y de sus madres.

Se encargó de llenar la hoja de concentración de resultados.

Notificó el arribo correcto de las muestras.

Notificó los resultados una vez obtenidos.

7.3. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS (ANEXOS 4 Y 5).

8. CONSIDERACIONES ETICAS Y CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Se platicó ampliamente con los padres de las pacientes para que comprendieran la complejidad etiológica del Síndrome de Rett y lo importante que es su estudio integral, incluyendo éstas consideraciones metabólicas.

Se hizo especial incapié en los siguientes puntos:

- El estudio no será de utilidad directa para la paciente.
- La colocación de la sonda urinaria es molesta y en caso de haber alguna complicación esta es fácilmente detectable y suceptible de recibir tratamiento sencillo.
- El estudio no representa cargos adicionales a la cuenta del paciente.
- La aceptación del estudio no condiciona de ninguna manera la atención que reciba en el Instituto Nacional de Pediatría.
- Puede darse de alta en forma voluntaria del estudio en cualquier momento, sin que esto repercuta en su atención.

La carta de consentimiento informado se muestra en el ANEXO 1.

9. RESULTADOS

9.1. Descripción de la población estudiada.

Por medio del servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría, se lograron captar para los fines de este estudio a cinco pacientes con diagnóstico comprobado de SR. Se estudiaron a 4 de las madres de dichas pacientes, teniéndose que eliminar a una de ellas por sospecha de embarazo. Se realizó la prueba en 5 niñas sanas y 4 mujeres adultas sanas.

El promedio de edad de cada uno de los grupos se señala en la Tabla 3.

TABLA 3
EDAD DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPO	EDAD (años)	
	Media	Rango
NIÑAS CON SR	6.8	(3 - 11)
NIÑAS SANAS	8.2	(5 - 12)
MADRES DE NIÑAS CON SR	33.25	(26 - 40)
ADULTAS SANAS	33.0	(24 - 39)

9.2. Excreción urinaria de ácido orótico.

Los valores de excreción urinaria de ácido orótico de niñas y mujeres sanas, así como de pacientes con SR y sus madres se muestran en las Tablas 4 a 8. Las concentraciones de ácido orótico están expresadas en μg de ácido orótico por mg de creatinina ($\mu\text{g}/\text{mg Cr}$).

Los valores máximos de excreción urinaria de ácido orótico en las niñas sanas fueron $3.37 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ en estado basal, y de $20.16 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ posterior a la dosis de alopurinol. En las niñas con SR, los valores máximos de excreción fueron $6.8 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ en estado basal y $35.8 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ posterior al alopurinol.

Los límites superiores de las mujeres adultas sanas fueron de $1.47 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ en estado basal y de $11.4 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ posterior a la dosis. En las madres de las pacientes SR, el valor máximo basal fué de $5.6 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ y $11.57 \mu\text{g}/\text{mg Cr}$ posterior al reto.

El patrón de excreción de ácido orótico durante la recolección urinaria de 24 horas, se muestra en las Figuras 5 y 6.

En la Figura 5 se observan las distintas tendencias de la curva del grupo de niñas sanas y del de niñas SR; en el primer grupo se observa que inicia el pico de excreción entre las 7 y las 12 horas, y decae a valores basales a las 19-24 horas. En cambio, en las niñas SR, la excreción de ácido orótico muestra una curva ascendente con los valores máximos presentes hasta el último período de recolección realizado (19 a 24 horas posteriores a la toma del medicamento).

Los valores promedio de la excreción de ácido orótico entre los grupos de niñas sanas y niñas con SR son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) mediante prueba de "t" para dos colas, calculada mediante la fórmula:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

En la Figura 6 se puede ver el patrón de excreción en las mujeres sanas y en las madres de las pacientes SR, ambos grupos muestran una tendencia similar, a pesar de que los valores basales e iniciales posteriores al reto son mayores en las madres de pacientes SR que en las mujeres sanas, a lo largo de la prueba se invierte este patrón y los valores máximos se presentan en el grupo de mujeres sanas. Los valores máximos se alcanzaron en las primeras 12 horas (igual que las niñas sanas), para caer paulatinamente en las siguientes horas de la recolección.

TABLA 4
PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL
ACIDO OROTICO EN ORINA DE NIÑAS SANAS

REGISTRO	BASAL	ORINA 1	ORINA 2	ORINA 3	ORINA 4
03. BMA	0.5	2.57	3.2	1.87	1.43
04. NVA	0.33	0.930	2.25	0.93	0.25
05. NG	3.37	20.16	13.5	6.5	4.7
06. CAH	0.346	4.8	6.18	2.0	0.70
07. BVM	2.6	4.9	8.7	5.4	2.4
Media \pm DE	1.42 \pm 1.29	6.67 \pm 6.9	6.76 \pm 4.06	3.34 \pm 2.19	1.89 \pm 1.57
Error estándar de la media	0.58	3.09	1.81	0.98	0.70

Concentración de ácido orótico expresada en μ g/mg.de creatinina

TABLA 5
PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL
ACIDO OROTICO EN ORINA DE MUJERES ADULTAS SANAS

REGISTRO	BASAL	ORINA 1	ORINA 2	ORINA 3	ORINA 4
01. VAM	0.346	0.90	0.283	0.283	0.264
02. CAI	0.250	1.4	11.4	4.5	3.8
08. AE	1.47	1.65	5.5	7.9	3.48
09. JSC	1.02	1.54	6.1	7.6	4.0
Media \pm D.E.	0.77 \pm 0.50	1.37 \pm 0.28	5.82 \pm 3.9	5.07 \pm 3.06	2.88 \pm 1.52
Error estándar de la media	0.25	0.14	1.96	1.53	0.76

Concentración de ácido orótico expresada en μ g/mg.de creatinina

TABLA 6
PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL
ACIDO OROTICO EN ORINA DE PACIENTES CON SR

REGISTRO	BASAL	ORINA 1	ORINA 2	ORINA 3	ORINA 4
01. BMAA	3.27	14.0	9.4	10.7	7.0
02. LMA	6.8	13.2	10.6	12.7	7.34
05. RHS	2.45	1.29	8.84	20.1	35.8
07. BGA	0.89	4.9	6.6	5.2	5.0
09. FV	1.0	5.2	4.4	4.0	2.0
Media \pm DE	2.8 \pm 2.1	7.71 \pm 5.0	7.96 \pm 2.20	10.54 \pm 5.78	11.42 \pm 12.33
Error estándar de la media	0.94	2.24	0.98	2.58	5.51

Concentración de ácido orótico expresada en μ g/mg.de creatinina

TABLA 7
PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL
ACIDO OROTICO EN ORINA DE MADRES DE NIÑAS SR

REGISTRO	BASAL	ORINA 1	ORINA 2	ORINA 3	ORINA 4
03. MA	5.6	11.57	6.17	4.9	7.58
06. RHS	0.0	0.76	2.3	0.82	1.16
08. BGA	2.0	0.83	1.3	0.87	0.64
10. FV	1.2	0.83	3.0	2.17	0.89
Media \pm D.E.	2.2 \pm 2.0	3.49 \pm 4.66	3.19 \pm 1.82	2.19 \pm 1.65	2.56 \pm 2.89
Error estándar de la media	1.04	2.33	0.91	0.82	1.44

Concentración de ácido orotico expresada en μ g/mg. de creatinina

TABLA 8
EXCRECION URINARIA PROMEDIO DE ACIDO OROTICO EN NIÑAS Y MUJERES
SANAS, EN PACIENTES SR Y SUS MADRES

MUESTRA	Promedio y rango	Niñas sanas n = 5	Mujeres sanas n = 4	Niñas SR n = 5	Madres SR n = 4
BASAL	x \pm DE	1.42 \pm 1.29	0.77 \pm 0.50	2.8 \pm 2.1	2.2 \pm 2.0
	Rango	0.33 - 3.37	0.25 - 1.47	0.89 - 6.8	0.0 - 5.6
1	x \pm DE	6.67 \pm 8.9	1.37 \pm 0.28	7.71 \pm 5.0	3.49 \pm 4.66
	Rango	0.93 - 20.16	0.90 - 1.65	4.9 - 14.0	0.76 - 11.57
2	x \pm DE	6.76 \pm 4.06	5.82 \pm 3.9	7.96 \pm 2.20	3.19 \pm 1.82
	Rango	3.2 - 13.15	0.28 - 11.4	4.4 - 10.6	1.3 - 6.17
3	x \pm DE	3.34 \pm 2.19	5.07 \pm 3.06	10.54 \pm 5.78	2.19 \pm 1.65
	Rango	0.93 - 6.5	0.28 - 7.9	4.0 - 20.1	0.82 - 4.9
4	x \pm DE	1.89 \pm 1.57	2.88 \pm 1.52	11.42 \pm 12.33	2.56 \pm 2.89
	Rango	0.25 - 4.7	0.26 - 4.0	2.2 - 35.8	0.64 - 7.58

Concentración de ácido orotico expresada en μ g/mg. de creatinina

Los valores promedios de la excreción urinaria de ácido orotico en los grupos de mujeres sanas y de madres de pacientes con SR no son estadísticamente diferentes mediante la misma prueba estadística realizada para los otros grupos antes analizados.

FIGURA 5

EXCRECION DE ACIDO OROTICO EN NIÑAS SANAS Y NIÑAS CON SR DURANTE LA PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL

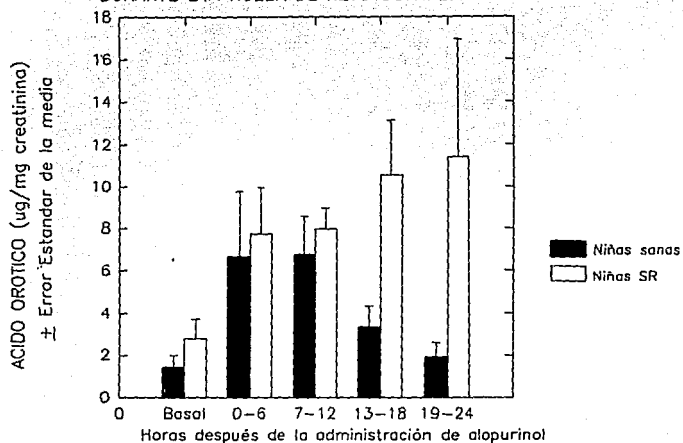
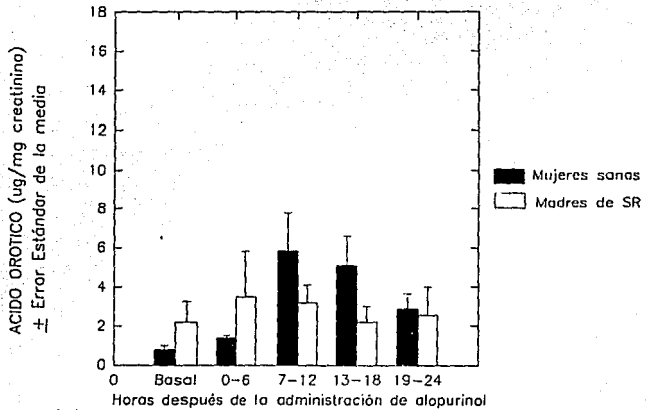


FIGURA 6

EXCRECION DE ACIDO OROTICO EN MUJERES SANAS Y MADRES DE NIÑAS SR DURANTE LA PRUEBA DE RETO CON ALOPURINOL



9.3. Detección de heterocigotos de deficiencia de OTC.

Los valores positivos para esta prueba, fueron previamente establecidos como iguales o mayores a 3 desviaciones estándar del valor promedio poblacional normal, que corresponde a un valor ≥ 18.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Cr en la muestra correspondiente a 13-18 horas después de la ingesta de la dosis.

En el grupo control de niñas, solo una (NG) mostró una curva positiva con un valor de 20.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Cr durante la primera muestra después de la dosis de alopurinol, normalizándose a partir de las siguientes muestras.

Ninguna de las madres que se sometieron al estudio presentó un patrón de excreción de ácido orótico que las hiciera ser diagnosticadas como heterocigotos para la deficiencia de OTC.

9.4. Reporte de efectos ante la toma del alopurinol.

De las 18 niñas y mujeres que recibieron el medicamento, ninguna reportó molestia alguna o efectos colaterales. Los cultivos de las 5 sondas de Foley, después de la prueba resultaron negativos.

10. DISCUSION

En mi primera hipótesis, postulé la posibilidad de que algunos pacientes con SR son homocigotos para la deficiencia de OTC y que este estado puede ser detectado mediante la prueba de reto con alopurinol. Los resultados apoyan esta hipótesis. Existe una clara diferencia en el patrón de excreción urinaria de ácido orótico entre las pacientes con SR y los demás grupos estudiados. Estas diferencias son patentes desde la muestra de orina basal, la cual en las niñas SR es, en promedio, 2 veces mayor que en las niñas sanas; las diferencias se atenúan en las primeras 12 horas de la recolección, sin embargo a partir de las 13 horas posteriores a la toma del medicamento, se ve una marcada diferencia entre los dos grupos comparados: mientras que las niñas sanas muestran valores cada vez menores y muy cercanos a los basales, las niñas SR muestran elevación progresiva y persistente de la aciduria orótica. A pesar de este comportamiento, sólo una de las pacientes RHS con SR presentó niveles anormales de ácido orótico que la diagnostican como heterocigoto para la deficiencia de OTC.

Los resultados encontrados en la presente investigación apoyan nuestra hipótesis inicial sobre la presencia de heterocigotos para la deficiencia de OTC dentro de la población de pacientes con SR. La paciente RHS, presentó una curva de excreción completamente diferente a todas las de los demás sujetos estudiados, y con base en este resultado se le debe realizar estudio enzimático de actividad de OTC para determinar el grado de la deficiencia que presenta, o bien, realizar estudio genético molecular.

El resultado positivo de la niña control no se comportó igual que el de RHS, puesto que solo tuvo un valor positivo a lo largo de la recolección. En esta paciente debe repetirse la prueba de reto con alopurinol para eliminar la posibilidad de algún error en la recolección. En caso de que su curva continúe siendo anormal, se deberá considerar la realización de ensayo enzimático y de biología molecular.

La respuesta a nuestra segunda hipótesis sobre la presencia de madres de SR heterocigotas para OTC, es negativa en esta muestra, es decir, no encontramos ninguna heterocigota dentro del grupo estudiado. A diferencia de lo esperado, la madre de la paciente SR que resultó positiva para la prueba, presenta valores muy bajos de ácido orótico desde la muestra basal y no presentó elevación significativa posterior al reto con el alopurinol. Si bien el resultado más esperado en una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X es que la madre de una portadora también lo sea, explicando así la procedencia de la mutación, en el caso de la deficiencia de OTC, esto no es la regla. Las mutaciones en este locus son frecuentemente mutaciones *de novo*, es decir que ocurren por primera vez en un cromosoma X del gameto que contribuye a la formulación del producto.

Si bien la excreción urinaria de ácido orótico es un buen indicador en el diagnóstico de heterocigotos para la deficiencia de OTC, existen estudios¹² que sugieren que la medición de orotidina ofrece mayor sensibilidad y especificidad. Las razones por las que decidí utilizar los niveles urinarios de ácido orótico como indicador diagnóstico fueron en primer lugar, la validación previa de su uso para el diagnóstico de heterocigotos para la deficiencia de OTC. En segundo lugar fué el hecho de que la determinación urinaria de ácido orótico es una técnica rutinaria en nuestro laboratorio, mientras que la determinación de orotidina requiere de procedimientos más caros y elaborados y aún no se encuentra disponible en México.

El empleo de los niveles urinarios de ácido orótico requiere la observación cuidadosa de tres variables agregadas. La primera es la posibilidad de falsos positivos que pueden deberse a deficiencia nutricional de arginina, nutrición parenteral total, ayuno prolongado, anemia megaloblástica, hepatocarcinoma y embarazo. En segundo lugar, y dado que se trata de una prueba colorimétrica, debe considerarse la interferencia de otras sustancias tales como carotenos y colorantes alimenticios artificiales¹⁷. Finalmente, es importante tener presente que la excreción urinaria de creatinina en 24 horas varía considerablemente de un individuo a otro, por lo que en casos de resultados poco claros, debe recurrirse a la excreción total de ácido orótico urinario en 24 horas. En las pacientes estudiadas no fué necesario hacer esto ya que es muy clara la diferencia entre el grupo y la paciente RHS.

La deficiencia de OTC, como el resto de las enfermedades metabólicas hereditarias, causa la acumulación de los sustratos de la vía metabólica bloqueada y deficiencia del producto(s) de la misma. Por esta razón, resulta de utilidad medir en los pacientes citrulina y glutamina en plasma. Estos aminoácidos muestran un comportamiento muy particular y característico en la deficiencia de OTC, es decir, la citrulina prácticamente está ausente y la glutamina se encuentra elevada. El diseño inicial de nuestro estudio no contempló la toma de muestra sanguínea de las pacientes ya que no contábamos con estas mediciones en nuestro laboratorio. Actualmente, contamos con las técnicas y el equipo adecuado para esto, y en una fase próxima de este estudio se determinarán dichos aminoácidos en plasma.

Es importante señalar que la OTC es una enzima mitocondrial que se codifica en el cromosoma X y que se expresa únicamente en el hígado y en el intestino delgado⁸. Las consecuencias fenotípicas de las mutaciones en el locus de la OTC varían. En pacientes del sexo masculino que tienen solo un cromosoma X, y por lo tanto no cuentan con una copia normal adicional de este gen, suele expresarse clínicamente como coma hiperamonémico que conduce a la muerte en el periodo neonatal. Existen también en pacientes del sexo masculino, formas moderadas del padecimiento que se presentan en la infancia o en la edad adulta y que probablemente son consecuencia de la

heterogeneidad de las mutaciones de dicho locus¹⁸. Estos pacientes pueden presentar diversos grados de retraso mental, comportamiento bizarro y episodios de hiperamonemia. En las mujeres, que cuentan con dos cromosomas X, cuando uno de los locus de OTC se encuentra mutado (heterocigotos), la copia normal, presente en algunas células del organismo, hacen que sus manifestaciones clínicas sean similares a las formas de deficiencia moderada en los hombres.

Esto último se explica por medio de la hipótesis de Lyon¹⁹, en la cual se postula que en las células somáticas de las mujeres, solo uno de los cromosomas X se encuentra activo. El segundo cromosoma X se encuentra condensado e inactivo y aparece como cromatina sexual en la interfase celular.

La inactivación de este cromosoma X ocurre en fases muy tempranas de la vida embrionaria, y el cromosoma que se inactiva puede ser de origen paterno o de origen materno en diferentes células del mismo individuo, sin embargo después de que se "decide" que cromosoma X se inactiva en una célula particular, la descendencia celular (clonas) inactiva siempre el mismo cromosoma X, esto es en otras palabras, la inactivación es aleatoria pero fija.

Si bien nuestros resultados no pretenden explicar una única causa del SR, son importantes puesto que al menos en una paciente que cuenta con dicho diagnóstico se encontraron anomalías bioquímicas sugestivas de defecto metabólico genético subyacente, que puede ser parte de la causa de su fenotipo neurológico y que debe corroborarse lo antes posible mediante las técnicas adecuadas. Estos resultados son concordantes con los informados por otros autores²⁰, en los que se apoya la presencia de disfunción del ciclo de la urea en pacientes con SR.

La muestra de pacientes del presente estudio es pequeña, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, sin embargo dados los patrones tan diferentes de excreción urinaria de ácido orótico que apoyan la presencia de defectos del ciclo de la urea, es fundamental continuar realizando este tipo de pruebas tanto en pacientes con SR como en pacientes que cursen con otros padecimientos en los que se sospechen estos errores metabólicos.

Considero que los resultados obtenidos son importantes para el estudio integral de las pacientes con SR y que todas aquellas pacientes que lleguen a nuestro hospital con dicho diagnóstico deben ser sometidas a la prueba de reto con alopurinol, la cual es sencilla, inocua y muy informativa.

11. CONCLUSIONES

1. Se cumplió con el principal objetivo del trabajo, el cual fue conocer los niveles de ácido uréico urinarios antes y después de la toma de alopurinol en las pacientes con SR y sus madres.
2. El patrón de excreción de ácido uréico urinario es significativamente diferente en el grupo de pacientes con SR que en el grupo de niñas sanas.
3. Mediante la prueba de reto con alopurinol se detectó una paciente con SR que tiene evidencia bioquímica de su heterocigoto de OTC.
4. En este estudio concluimos que la prueba de reto con alopurinol es útil para detectar pacientes con aciduria uréica, que en muestras de orina basal no muestran alteración alguna.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Rett A. Uber ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrome bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 1966;116:723-26.
- 2 Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia and loss of purposeful hand use in girls. *Rett syndrome: Report of 35 cases.* *Ann Neurol* 1983;14:471-79.
- 3 Rett A. Cerebral atrophy associated with hyperammonaemia. In Vinken, P.J. and Bruyn, G.W. (Eds.) *Metabolic and Deficiency Diseases of the Nervous System III*, vol 29 of *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier-North, Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977.
- 4 Hagberg B. Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Acta Paediatr Scand* 1985, 74:405-408.
- 5 Ricardi V M. The Rett syndrome: Genetics and the future. *Am J Med Genet*, 1986;24:389-402.
- 6 Hagberg B, Goulières F, Hanefeld F, et. al. Rett Syndrome: Criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 1985, 7: 372-373.
- 7 Kaj J D S, Seakins J W T, Geiseler D, Hjelm M. Validation of a method for measuring the short-term rate of urea synthesis after an amino acid load. *Clin Sci* 1986; 70: 31-38.
- 8 Brusilow S W, Horowich A, Urea Cycle Enzymes, in Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D, Eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6th Edition. McGraw-Hill, New York, 1989. P 629-663.
- 9 Snodgrass P J. Biochemical aspects of urea cycle disorders. *Pediatrics*, 1981, 68: 273-275.
- 10 Carpenter KH, Bonham JR, Clarke A. Rett's syndrome and ornithine carbamoyltransferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1990;13:308-310.
- 11 Hass RH, Rice MA, Trauner DA, Merritt TA. Therapeutic effects of a ketogenic diet on Rett's syndrome. *Am J Med Genet* 1986;24:225-246.
- 12 Hauser ER, Finkelstein JE, Valle D, Brusilow SW. Allopurinol induced orotidinuria. A test for mutations at the ornithine carbamoyltransferase locus in women. *N Engl J Med* 1990;322:1641-1645.

- 13 Beardmore TD, Kelly WN. Mechanism of allopurinol mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis. J Lab Clin Med 1971; 78:696-700.
- 14 MacKenzie AE, MacLeod HL, Heick HMC, Korneluk G. False positive results from the alanine loading test for ornithine carbamoyltransferase deficiency heterozygosity. J Pediatr.1989; 115:605-608.
- 15 Harris ML, Oberholzer VG. Conditions affecting the colorimetry of orotic acid and orotidine in urine. Clin Chem 1980;26,3:473-479.
- 16 Goldstein AS. Orotic acid measure. Pediatr Res 1974;8:5-12.
- 17 Pallela TD, Fox HI. Acquired disorders of purine and pyrimidine metabolism. In Cohen RD, Lewis B, Alberti KGM, Denman AM, Eds. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. Baillière Tindall, London, 1990. P 950-951.
- 18 Finkelstein JE, Hauser E, Brusilow SW. Late onset ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD) in males. Am J Hum Genet 1989; 45: Suppl: A5.
- 19 Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L). Nature 1961; 190: 372-373.
- 20 Pineda M, Vilaseca MA, Vernet A, Campistol J, Mas A, Fabrega C. The allopurinol Test in Patients with Rett Syndrome. J Inher Metab Dis 1993; 16: 577-580.

ANEXOS

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO I

DETECCION DE DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC) EN PACIENTES CON SINDROME DE RETT Y SUS MADRES.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El Dr.(a) _____ me ha explicado con claridad para que sirve la detección de heterocigotos para la deficiencia de OTC. Me ha explicado que los riesgos de éste estudio son mínimos, y que están relacionados con las molestias y complicaciones que pudiera causar la colocación de una sonda urinaria para recolección. En caso de presentar complicaciones, éstas pueden ser fácilmente detectadas y solucionadas con un tratamiento adecuado ya que se vigilará que no haya crecimiento bacteriano en dicha sonda.

Me han dicho que el estudio tendrá una duración de 24 horas durante las cuales estará internada mi hija.

También se me ha explicado que éste estudio no beneficiará directamente a mi hija, pero los conocimientos que de él se obtengan podrán servir para un mejor tratamiento de la enfermedad.

Se me ha explicado que tengo plena libertad para aceptar la inclusión de mi hija en éste estudio y que la atención que reciba no estará condicionada al mismo, también tengo la libertad de retirar a mi hija del estudio si así lo considero pertinente durante su estancia en el INP.

Lo anterior me fue explicado en palabras sencillas y claras y contestaron a mi entera satisfacción las dudas que manifesté. Por esto acepto que mi hija participe en el estudio.

ATENTAMENTE

México, D.F., a _____ de _____ de 1993.

NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE O MADRE

TESTIGO
NOMBRE Y FIRMA

DIRECCION _____

TESTIGO
NOMBRE Y FIRMA

DIRECCION _____

ANEXO 2

DIETA PREVIA AL ESTUDIO, SIN XANTINAS, RICA EN PROTEINAS, LIBRE EN LIQUIDOS Y CALORIAS.

1. Esta dieta debe ser llevada tanto por la paciente con Síndrome de Rett como por las madres de pacientes con dicho síndrome, así como por las personas voluntarias (niñas y adultas) que participen en el estudio. Esta dieta se realiza durante 2 días previos a la prueba.
2. Una vez terminada la recolección de orina, se debe regresar a la dieta habitual.
3. Los alimentos que **NO DEBE CONSUMIR** son los siguientes:
 - Té negro, café, refrescos de cola (pepsicola, cocacola, etc)
 - Jamón, salchichas, tocino, chorizo, salami, jamón serrano, mortadela, chuletas ahumadas y otros embutidos o alimentos de salchichonería.
 - Alimentos enlatados
 - Alimentos con conservadores artificiales (Benzoato de sodio) por ejemplo: conservas de frutas y verduras.
 - Pan de caja (Bimbo, Wonder, etc.)
 - Betabel y zanahorias.

PUEDE COMER LIBREMENTE:

Todos los alimentos que no están mencionados en la lista anterior, es decir: puede comer sopa (de pasta, de verduras, etc), arroz, frijoles, bolillos, tortillas, verduras crudas o cocidas, frutas crudas o cocidas, carne de res, o de cerdo, pollo, pescado, gelatina, azúcar, flan, dulces.

Debe comer alimentos ricos en proteínas tales como huevo, leche, pollo, carne y pescado, al menos una ración de este tipo de alimento en cada comida (desayuno, comida y cena).

Puede tomar todos los líquidos que desee, siempre que no esten mencionados en la lista previa.

ANEXO 3

TECNICA DE CUANTIFICACION DE ACIDO OROTICO EN ORINA¹⁶

Este procedimiento utiliza columnas de intercambio catiónico para remover compuestos que pudieran interferir (como la histidina) y dar falsas elevaciones de ácido orótico.

REACTIVOS:

1. Acido ascórbico al 5% (peso/volumen) (0.5 g en 10 ml de agua destilada). Se prepara fresco, antes de usarse.
2. Acido clorhídrico (HCl) 5 M.
3. Buffer de citrato 1 M. pH 2.45 ± 0.05
4. NaOH 5M
5. Reactivo de Ehrlich: p-dimetilaminobenzaldehído al 2.5% en n-propanol. Es estable a 4 grados centigrados por 4 meses. *Sensible a la luz*, debe almacenarse en botella ámbar. (2.5g en 100 ml).
6. Agua bromada saturada: *debe almacenarse y utilizarse en campana* porque desprende vapores tóxicos. Añadir 3ml de bromo a 100 ml de agua. Es estable a temperatura ambiente mientras la capa de bromo sea visible en el frasco.
7. Columnas de cromatografía Bio-Rad Poly-prep prellenas. Número de Catálogo 731-6214.

PROCEDIMIENTO:

1. Para el estándar: Utilizar 0.5ml de solución de $10\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido orótico.
Para la muestra: utilizar 0.5 ml de orina para creatininas $> 6 \text{ mg/dl}$.
2. Utilizar 1.0 ml de orina para creatininas $< 6 \text{ mg/dl}$.
3. Preparar las columnas frescas antes de utilizarlas. Destapar (arriba y abajo) las columnas para permitir que drenen. Lavar lentamente agregando 0.5 ml de agua destilada.
4. Prepare el ácido ascórbico y deja mezclando mientras se realizan los pasos anteriores.
5. Acidificar la orina a pH 2-3 con HCl 5 M. Pruebe el pH con tira reactiva.
6. Se pipetea cuidadosamente cada muestra de orina y el estándar en las columnas frescas lavadas, sin movilizar la resina. Se dejan drenar y se colecta el eluido en un tubo de 16*100 mm.
7. Enjuagar cada columna con tres volúmenes iguales de agua destilada en el tubo con eluido, de manera que el volumen final total sea 2.25 ml. (Para las muestras de 0.5ml, tres volúmenes iguales son 0.583ml en cada lavado, para las muestras de 1.0ml, tres volúmenes iguales son 0.417 ml por lavado).
8. Añadir 0.25ml del buffer de citrato 1 M. Si es necesario se reajusta la solución a un pH de 2.4 a 2.5, con 10-50 μl de NaOH 5 M.
9. Utilice 2 tubos 16*100 para cada muestra. Una es la muestra de orina y la otra es el tubo blanco.
10. Tomar alícuotas de 1ml de la muestra y del estándar de los tubos.
11. Añadir 0.5ml de ácido ascórbico en los tubos blanco. Se agitan los tubos.
12. *En la campana:* añada 0.5ml de agua bromada a todos los tubos, colocándose en el vórtex conforme se añade el agua bromada.
13. Después de 5 minutos, se agregan 0.5 ml de ácido ascórbico a los tubos muestra, se colocan en el vórtex después de cada adición. Los tubos deben tornarse claros, si no, debe de repetirse la prueba con reactivos nuevos.

14. Se dejan reposar por 3 a 5 minutos, y se añade después 1.0 de reactivo de Erlich a cada tubo y se mezcla.
15. Se dejan reposar por 1 hora a temperatura ambiente.
16. Se realiza la lectura de los tubos a 480 nm. Se mantienen estables por 5 horas, pero mientras más pronta sea la lectura, es mejor.

CALCULOS:

La cantidad de ácido orótico se calcula así:

$$((A - B)/C * (D) * 10 / \text{mg Cr}) * E = \mu\text{g ácido orótico/ml de orina.}$$

En donde A es la densidad óptica de la muestra, B es la densidad óptica del tubo blanco, C es la densidad óptica del estándar, D es la concentración del estándar y E es el factor de dilución.

ANEXO 4

DETECCION DE DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC) EN PACIENTES CON SINDROME DE RETT Y SUS MADRES.

HOJA DE CONCENTRACION DE DATOS:

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

EDAD _____ REG.INP _____ CAMA _____

FECHA DE REALIZACION DEL ESTUDIO: _____

ANTECEDENTES DE LA MADRE:

EDAD _____ G _____ P _____ C _____ ABORTOS: _____ causa: _____

OBITOS: _____

HIJOS FALLECIDOS: _____ sexo _____ causa de la muerte: _____

ANTECEDENTES DE CONSANGUINIDAD: _____ FUR _____

DIETA DOS DIAS ANTES Y DURANTE LA PRUEBA: _____

MEDICAMENTOS QUE HA RECIBIDO EN LOS ULTIMOS 6 MESES:

Nombre del medicamento _____ Dosis _____

Nombre del medicamento _____ Dosis _____

Nombre del medicamento _____ Dosis _____

REALIZACION DE LA PRUEBA:**TIEMPO 0:**

Hora: _____ Muestra basal de orina _____

Observaciones: _____

Administración de Alopurinol

Hora: _____ Dosis _____ mg (dosis única).

Observaciones: _____

TIEMPO 1:

Primera recolección de orina, comprende 6 hrs.

Hora de inicio: _____ Hora de término: _____

Observaciones: _____

TIEMPO 2:

Segunda recolección de orina, comprende 6 hrs.

Hora de inicio: _____ Hora de término: _____

Observaciones: _____

TIEMPO 3:

Tercera recolección de orina, comprende 6 hrs.

Hora de inicio: _____ Hora de término: _____

Observaciones: _____

TIEMPO 4:

Cuarta recolección de orina, comprende 6 hrs.

Hora de inicio: _____ Hora de término: _____

Observaciones: _____

NOMBRES DE LOS RESPONSABLES DE LA PRUEBA:

SERVICIO NOMBRE FIRMA

NEUROLOGIA: _____

U.GENETICA NUTRICION: _____

ANEXO 5

DETECCION DE DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC) EN PACIENTES CON SINDROME DE RETT Y SUS MADRES.

HOJA DE CONCENTRACION DE RESULTADOS

RESULTADO DE ACIDO OROTICO

CLAVE PROTOCOLO	REGISTRO INP	ORINA BASAL	ORINA TIEMPO 1	ORINA TIEMPO 2	ORINA TIEMPO 3	ORINA TIEMPO 4	OBSERVACIONES
01							
02							
03							
04							
05							
06							
07							
08							
09							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							