

SP0122  
22  
Zej

Universidad Autónoma de Guadalajara

— INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO —

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



PREVENCION DEL RETRASO MENTAL MEDIANTE LA  
DETECCION PRECOZ DE ERRORES CONGENITOS  
DEL METABOLISMO

T E S I S  
Q U E P R E S E N T A  
ELIZABETH PLANCARTE SAGRERO  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
Asesor: PH. Dr. Rosa María Muñoz Saucedo  
GUADALAJARA, JALISCO 1989

FALLA DE ORIGEN



## **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.

# INDICE GENERAL

	PAG.
Introducción	1
Objetivos generales	4
Justificación	5
<b>CAPITULO I.- Generalidades</b>	<b>7</b>
1.1.- Antecedentes	12
1.2.- Plan de trabajo	14
1.3.- Planteamiento del problema	14
<b>CAPITULO II.- Metodología.</b>	
2.1.- Material y Métodos	15
2.2.- Preparación de reactivos.	19
2.3.- Determinación de Muconolisacáridosis	23
2.3.1. Turbidez de la Albúmina Ácida	25
2.3.2. Turbidez del Cloruro de Cetil Piridinium	27
2.3.3. Prueba del Azul de Toluidina	28
2.4.- Determinación de Aminoácidos	29
2.4.1. Prueba de Cloruro Férrico	29
2.4.2. Prueba de Dinitrofenilhidrazina	32
2.4.3. Prueba de Nitrato de Plata	36
2.4.4. Prueba de Ciano-Nitroprusiato	39
2.4.5. Prueba de Nitrososaftol	41
2.4.6. Prueba de Millon	43
2.5.- Determinación de Azúcares	
2.5.1. Método de Fenedict	44
2.5.2. Prueba de Antrona	46
2.5.3. Prueba de Sellivanoff-Desorcinol	47
2.6.- Prueba de Obermayer	48
2.7.- Prueba de Tiosulfato	49
2.8.- Ácidos Orgánicos	
2.8.1. Ácido Metil Malónico	
2.8.2. Ácido Pantoic	52

CAPITULO III.- Metodología Diagnóstica	53
3.1.- Pruebas Químicas Cualitativas	53
3.2.- Cromatografía en Papel	53
3.3.- Pruebas Microbiológicas	53
3.4.- Procedimiento enzimático de tamizaje por Fluorescencia	54
3.5.- Pruebas confirmatorias	55
3.6.- Diagnóstico Prenatal	56
3.7.- Análisis directo de la estructura del gene anormal	56
3.8.- Análisis por Ligamiento	57
CAPITULO IV.- Datos Clínicos a considerar en un paciente seleccionado para tamiz metabólico	58
4.1.- Criterios de Selección para tamiz Metabólico	59
CAPITULO V.- Ejemplos Clínicos	60
5.1.- Fenilcetonuria	61
5.2.- Tirosinosis	68
5.3.- Homocistinuria	70
5.4.- Enfermedad de la Orina del Jarabe de Maple	71
5.5.- Alcaptonuria	72
5.6.- Mucopolisacaridosis	73
CAPITULO VI.- Resultados	76
CAPITULO VII.- Discusión	83
CAPITULO VIII. Bibliografía	85
CAPITULO IX.- Resumen	87

## I N T R O D U C C I O N

## INTRODUCCION :

La genética bioquímica humana se inició a principios del siglo XX. Fue en el año de 1908 cuando el médico inglés Archibald Garrod introdujo en medicina el término "Errores Innatos del Metabolismo", (EIM), e inició el estudio brillante de la enfermedad conocida como "Alcaptonuria", que culminó con su monografía "Errores Congénitos del Metabolismo", la cual apareció en 1909 y fue modificada en 1923, en donde desarrolló el concepto, de que ciertas enfermedades se producen porque una enzima que gobierna un simple paso metabólico está disminuida en su actividad o falta totalmente. Desde entonces los progresos en la detección y entendimiento de los errores congénitos del metabolismo han sido impresionantes. Se puede notar que en los postulados de Garrod estaba implícita la idea de que había una relación entre gen y enzima; sin embargo, el postulado de Garrod de que la Alcaptonuria se debía a un defecto enzimático específico, no fue confirmado sino hasta 50 años después. En 1958 La Du y Cols. estudiaron en biopsias de hígado de individuos normales y de pacientes con alcaptonuria, a las enzimas que participaban en la degradación de tirosina. En los pacientes alcaptonúricos demostraron una deficiencia virtualmente total de la enzima homogentisico-oxidasa. La actividad de las demás enzimas comprometidas en el catabolismo de la tirosina hasta ácido acetoacético, fue similar en los pacientes y en los individuos normales. La primera evidencia directa de que una mutación genética puede conducir a la síntesis de una proteína estructuralmente alterada, se derivó de la investigación sobre la hemoglobina, proveniente de pacientes con anemia de células falciformes. De estos estudios emergió el concepto de "enfermedad molecular". En 1949, Pauling y Cols. descubrieron que la hemoglobina de estos pacientes, tenía una movilidad electroforética diferente a la hemoglobina normal y la denominaron hemoglobina S (sickle). En 1957, Ingram ofreció la prueba directa de que un gen es el responsable de controlar la estructura de una proteína, al demostrar que la diferencia entre la hemoglobina normal y la hemoglobina S, consiste en la sustitución de un residuo de ácido glutámico, por un residuo de valina, en la cadena polipeptídica beta de la hemoglobina. Este cambio fue consecuencia de una mutación en el gen que codifica la estructura de dicha cadena polipeptídica. Así, la enfermedad de células falciformes, constituye el primer ejemplo de una enfermedad explicada en

términos moleculares en el humano.

En la última edición del catálogo de McKusick de "Herencia Mendeliana en el hombre", se enlistan cerca de 3,907 enfermedades causadas por un solo gen mutante (monogénicas), se conocen la localización cromosómica específica de más de 1,096 de estos genes y aproximadamente, en 250 de estas enfermedades se ha identificado el defecto bioquímico básico, de los cuales, en 166 se han identificado anomalías en proteínas enzimáticas.

Un defecto genético que altere cualitativa o cuantitativamente una proteína puede tener varias consecuencias metabólicas. A continuación se enumeran las diferentes consecuencias y se ilustran con ejemplos de Errores Innatos del Metabolismo específicos:

1.- DEFICIENCIA DE UN PRECURSOR: Ejemplo (Enfermedad de Hartnup; el triptofano es un aminoácido esencial que se absorbe por difusión y transporte activo a nivel del intestino delgado. Intracelularmente la vía catabólica principal del triptofano de Hartnup presenta un defecto en el transportador intestinal del triptofano, lo que disminuye la concentración intracelular de este aminoácido y la cantidad de nicotinamida sintetizada a partir de él. Las consecuencias clínicas de este bloqueo metabólico impuesto por la deficiencia de una proteína transportadora (pt) son de ataxia cerebelosa y otras manifestaciones pelagroides que pueden ser prevenidas por medio de la administración oral de nicotinamida.

2.- ACUMULACION DE LOS METABOLITOS ANTERIORES AL BLOQUEO METABOLICO: - Ejemplo. Galactosemia Clásica: La vía metabólica principal de la galactosa en los tejidos implica su conversión en glucosa. La galactosemia clásica es un error innato del metabolismo debido a la deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT); este defecto enzimático impone un bloqueo metabólico que conduce a la acumulación de los metabolitos galactosa-1-fosfato y galactosa.

3.- FORMACION INSUFICIENTE DE LOS METABOLITOS POSTERIORES AL BLOQUEO METABOLICO: Ejemplo. (Hiperplasia Suprarrenal Congénita), por deficiencia de la enzima 21 hidroxilasa (21-OHA). Varias enzimas participan en la vía biosintética de las hormonas esteroides a partir del colesterol, se han descrito diferentes errores innatos del metabolismo por defectos enzimáticos específicos en la biosíntesis de esteroides adrenocorticales que dan lugar al Síndrome de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. La forma más común de este -

síndrome es debida a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa; como consecuencia del bloqueo metabólico se forman cantidades reducidas de corticoides y aldosterona.

4.- UTILIZACION DE LAS VIAS ALTERNAS: Ejemplo (Fenilcetonuria Clásica). La fenilalanina es convertida a tirosina mediante una reacción catalizada por la enzima fenilalanina-4-hidroxilasa (PAH); el primer aminoácido también puede ser metabolizado a través de vías alternas de menor importancia fisiológica. En la fenilcetonuria clásica, la conversión de fenilalanina a tirosina está bloqueada por deficiencia de la enzima fenilalanina-4-hidroxilasa; por lo que se acumula fenilalanina en los tejidos y líquidos corporales y las vías alternas se hacen prominentes originando una sobreproducción y excreción de los ácidos fenilpirúvicos, fenilacético y fenil láctico, ácidos que normalmente no se encuentran en la orina.

5.- ALTERACIONES EN EL CONTROL POR RETROALIMENTACION: Ejemplo. (Hipercolesterolemia familiar). La Hipercolesterolemia familiar, es un error innato del metabolismo, causado por una mutación en el gen que codifica para la proteína receptora (R) de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son las principales partículas transportadoras de colesterol. Como consecuencia de este defecto de receptor a nivel de la superficie de la membrana celular, no ocurre captación celular de colesterol plasmático; en estas condiciones se incrementa la síntesis de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoAR), enzima que limita la velocidad de flujo a través de la vía biosintética de colesterol. Normalmente, el colesterol exógeno regula su propia síntesis por retroalimentación inhibiendo la síntesis de la enzima HMGCoAR.

6.- SOBREPDUCCION DE INTERMEDIARIOS Y PRODUCTOS DE UNA SECUENCIA METABOLICA: Ejemplo. (Artritis Gotosa) por un incremento en la actividad de la enzima fosforribosilpirofosfato sintetasa (PRPFS), la mutación responsable de este error innato del metabolismo da por resultado la síntesis de una enzima alterada estructuralmente y con un incremento de 2 a 3 veces en su actividad catalítica. Los pacientes con este defecto metabólico muestran una sobreproducción de fosforribosilpirofosfato, de purinas y de ácido úrico.

## **OBJETIVOS GENERALES**

**OBJETIVOS GENERALES:**

- 1.- Implementación de las técnicas de laboratorio necesarias para el diagnóstico inicial de sospecha de un error congénito del metabolismo (tamiz metabólico).
- 2.- Detección precoz de errores congénitos del metabolismo.
- 3.- Prevención del retraso mental progresivo e irreversible, mediante manejo fundamentalmente dietético de los pacientes detectados.
- 4.- Prevención de este tipo de padecimientos mediante el asesoramiento genético (detección de portadores).

**J U S T I F I C A C I O N**

## JUSTIFICACION:

Si bien, los errores innatos del metabolismo, tienen baja frecuencia - en relación a otro tipo de patología genética, su repercusión a nivel del -- sistema nervioso central es tan importante, que por ello adquiere gran relevancia, además de que con un diagnóstico precoz oportuno, se pueda prevenir - en la mayoría de los casos el retraso mental, logrando así individuos productivos, en vez de ser una carga para la familia y la sociedad, haciendo de -- las pruebas de diagnóstico temprano un instrumento de gran valor para el médico. Sin embargo, el número tan reducido de personas interesadas en estas áreas y de la dificultad en la obtención de reactivos, para llevar a cabo -- las pruebas de tamizaje y algunas pruebas confirmatorias, hacen que solo muy pocos centros hospitalarios cuenten con este tipo de pruebas de diagnóstico.

Cabe señalar, que si bien el montaje de las técnicas es laborioso, una vez establecidos los estándares, su aplicación es sencilla y de bajo costo, - lo cual permite su empleo en grandes grupos poblacionarios.

En el Hospital General "Dr. Manuel Gea González", se atienden pacientes con diversas patologías, que incluyen retraso mental; sin embargo, por - no contar con suficiente personal, capacitado para la implementación de estas pruebas de tamiz, se ha dificultado el diagnóstico de un gran número de - pacientes que acuden a la consulta externa de genética y por consiguiente -- gran número de ellos quedan sin diagnóstico y sin la posibilidad de prevención del daño cerebral en sus familiares (hermanos), que pudieran presentar - la misma patología. Por otra parte, estas pruebas de tamiz aplicadas a niños recién nacidos podría evitar el desarrollo de nuevos casos, lo que tampoco se ha logrado, porque hasta ahora no ha sido posible contar con la tecnología y el apoyo necesario para la implementación de estas técnicas en todos los centros hospitalarios en donde se encuentran este tipo de pacientes.

Así reviste de gran importancia para cualquier departamento de genética de un Hospital General, contar con las pruebas colorimétricas más sencillas y elementales para el diagnóstico temprano de los errores innatos del - metabolismo.

Una vez que se han diagnosticado merced a estas pruebas los pacientes - sospechosos, se envían al centro de referencia: Instituto Nacional de Pediatría (INP) para estudios bioquímicos específicos; sin embargo, el hecho de -

enviar pacientes preseleccionados, permite una mayor optimización de recursos y reducción de costos, lo cual redundará en una mayor eficiencia, en la prestación de los servicios de salud.

Mediante esta detección, se podrán tratar a estos niños, básicamente - con dietas especiales, eliminándoles las proteínas y alimentos que contengan los elementos que provocan el desorden en cuestión.

CAPITULO I.

## GENERALIDADES :

El concepto de Garrod de que los Errores Innatos del Metabolismo (EIM), son debidos a bloqueos en vías metabólicas como resultado de un defecto enzimático, ha sido ampliado. También se consideran como EIM aquellos defectos hereditarios que afectan a proteínas circulantes y a proteínas estructurales.

Rosenberg define a los EIM como "desórdenes bioquímicos genéticamente-determinados debido a defectos congénitos específicos en la estructura o función de moléculas protéicas".

El estudio de los EIM tiene tres objetivos interdependientes :

- 1°.- definir el diagnóstico, la terapéutica y el pronóstico.
- 2°.- conocer los riesgos de recurrencia del padecimiento para la descendencia del individuo y sus familiares, lo que constituye la base del asesoramiento genético.
- 3°.- entender los eventos bioquímicos y genéticamente responsables de la alteración clínica.

Los desórdenes monogénicos muestran uno de los tres tipos de herencia mendeliana: autosómico recesivo, autosómico dominante, o ligado al cromosoma X.

Los Errores Innatos del Metabolismo en su mayoría tienen un modo de herencia autosómico recesivo, esto significa que solamente se son detectables-clínicamente cuando el gen mutante está presente en doble dosis (homocigocidad); los heterocigotos con una dosis conocida del gen mutante y una dosis del alelo normal, son clínicamente normales.

Como regla general, los individuos heterocigotos muestran un nivel de actividad enzimática intermedia entre los niveles sumamente reducidos que se observan en los homocigotos deficientes y los niveles encontrados en los homocigotos normales. El hecho de que los sujetos heterocigotos sean clínicamente normales implica que la enzima en cuestión tiene una gran reserva funcional, de tal forma que la reducción de aproximadamente 50% en la actividad de la enzima no se acompaña de alteraciones clínicas.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los EIM tienen un modo de herencia autosómico recesivo y son poco frecuentes, de tal manera que el estado homocigoto "verdadero" es más probable si existe consanguinidad entre los progenitores; en ausencia de consanguinidad parental es muy probable

que el individuo afectado sea un heterocigoto "compuesto" es decir, que sea portador de un par de alelos mutados estructuralmente diferentes.

Aquellos EM con un modo de herencia autosómico dominante son detectables clínicamente en estado heterocigoto o sea cuando el gen mutante está en dosis única.

En varios errores innatos del metabolismo autosómico dominantes se ha identificado el defecto bioquímico básico; estos defectos involucran a enzimas de las vías biosintéticas sujetas a control por retroalimentación o a -- proteínas de una importancia fundamental con diferentes funciones. Un ejemplo del primer tipo es la porfiria Intermitente Aguda, EM debido a una deficiencia parcial de la enzima uroporfirinógeno-1-sintetasa que participa en la vía biosintética del grupo heme; un ejemplo del segundo tipo es la hipercolesterolemia familiar; este EM es debido a una reducción en el número de receptores de membranas para lipoproteínas de baja densidad. En los errores innatos del metabolismo autosómicos dominantes, las manifestaciones clínicas de la enfermedad serán más severas en el individuo homocigoto deficiente que en el heterocigoto.

Los defectos hereditarios ligados al cromosoma X presentan una característica importante. Así, por ejemplo, el locus que determina la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) está en el cromosoma X y por lo tanto está representado dos veces en las células de las mujeres (XX) y solo una vez en las células de los varones (XY). Sin embargo, los niveles de actividad de la enzima G-6-PD encontrados en mujeres normales son iguales que en los varones normales. Este fenómeno de igualación de efectos de genes ligados al X en los dos sexos se denomina compensación de dosis.

Este fenómeno es aplicado en la hipótesis de Lyon mediante la explicación de que durante la vida embrionaria temprana ocurre una inactivación al azar de uno de los cromosomas X en las células somáticas de las hembras; este puede ser el cromosoma X derivado de la madre o el cromosoma X derivado del padre, de tal forma que en cualquier célula del organismo de las hembras solo uno de los cromosomas presentes es funcionalmente activo. En el varón el único cromosoma X presente es funcional en todas las células. De acuerdo a esta hipótesis una mujer puede ser considerada como un mosaico; aproximadamente en la mitad de sus células únicamente será funcional el cromosoma X derivado de su padre, mientras que en las otras células solo es activo el cro-

moscma X derivado de la madre. Por lo tanto, las mujeres heterocigotas para mutaciones ligadas al cromosoma X tendrán dos tipos de células: células con un fenotipo normal y células con un fenotipo mutante. Existen múltiples evidencias que apoyan la validez de la hipótesis de Lyon, varias de ellas derivadas del estudio de errores innatos del metabolismo ligados al X.

#### Influencias ambientales:

Los factores ambientales pueden modificar la expresión de las mutaciones responsables de los EIM. Así, en múltiples EIM la mutación produce respuestas anormales a la dieta o a las drogas. Por ejemplo, los pacientes con galactosemia clásica carecen de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y por lo tanto son incapaces de metabolizar a la galactosa. Si estos pacientes ingieren lactosa, que es la fuente más importante de galactosa, — puede llegar a desarrollarse daño hepático, retraso mental, cataratas y daño renal; la instauración oportuna y permanente de una dieta libre de galactosa es eficaz en prevenir o revertir dichas complicaciones. La deficiencia de la enzima G-6-PD es un ejemplo clásico de un EIM en el cual la mutación produce una respuesta idiosincrática a ciertas drogas. La G-6-PD es la primera enzima de la derivación hexosa-monofosfato y cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato. La glucosa metabolizada a través de esta vía genética puede reducir en forma de nicotinamida adenina dinucleótido-fosfato reducir (NADPH). En el eritrocito humano maduro esta vía es particularmente importante debido a que constituye la fuente más significativa de NADPH; este compuesto es utilizado por el eritrocito para el mantenimiento de glutatión en estado reducido (GSH). La principal función del GSH en el eritrocito consiste en proteger a las proteínas, entre ellas a la hemoglobina, de daño oxidativo proveniente de fuentes endógenas y exógenas. La deficiencia de G-6-PD es el EIM más común en el hombre y tiene un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X.

#### Las proteínas como productos génicos:

La secuencia de aminoácidos de las proteínas determinan sus propiedades potenciales y constituyen la base molecular del fenotipo. A su vez, la secuencia de aminoácidos de las proteínas está determinada por la secuencia de nucleótidos en el DNA y esta última constituye la base molecular del genotipo. Los EIM son el resultado de alteraciones en la estructura del DNA de-

bidas a mutaciones específicas; las alteraciones en el genotipo producen alteraciones en el fenotipo a través de modificar la estructura y/o función de las proteínas, lo que a su vez conduce a alteraciones en la función celular. Solamente en unos pocos EIM (por ejemplo hemoglobinopatías y talasemias) se ha logrado definir la alteración a los 3 niveles de expresión: DNA, Proteína y función celular. Para la mayoría de los EIM solo se conocen las alteraciones a nivel de la proteína o a nivel de la función celular. Los EIM pueden originarse por mutaciones que afecten genes que determinen la secuencia de aminoácidos de la proteína (genes estructurales) o por mutaciones en genes que controlen (genes controladores) la velocidad de transcripción del gene estructural o la velocidad del procesamiento y traducción del RNA mensajero. Son varios los ejemplos de EIM que involucran a enzimas o a proteínas no enzimáticas en los cuales se ha demostrado la existencia de mutaciones en genes estructurales; sin embargo, hasta la fecha no se han identificado mutaciones en genes controladores en humanos.

Muchas mutaciones génicas se expresan por una alteración característica en la actividad de una enzima específica y un gene mutante particular puede causar dicha alteración por varios mecanismos. La deficiencia en actividad enzimática puede ser el resultado de: 1).- Una anomalía en la eficiencia catalítica de la enzima debida a una mutación estructural que disminuye la afinidad por sustratos o cofactores, o la actividad intrínseca de la enzima, o ambas; 2).- Una menor concentración intracelular de la enzima causada por: a) una disminución en su velocidad de síntesis debido a una mutación que interfiere en la transcripción o con la traducción; b) un aumento en la velocidad de degradación intracelular de la enzima debido a una mutación estructural que le confiere a la enzima mutada una mayor labilidad o susceptibilidad o proteólisis intracelular.

Si bien la mayoría de los EIM conocidos son causados por una reducción o ausencia de actividad de una enzima o proteína, también se conocen ejemplos de EIM en los cuales una mutación estructural originó un incremento en la síntesis de la enzima (variante G-6-PD Hektoen) o un incremento en la actividad catalítica de la enzima (una forma rara de gota debida a una fosforribosil pirofosfato sintetasa alterada).

Las consecuencias de una alteración genética en la calidad o en la cantidad de una proteína dependerán de la función que normalmente desempeña dicha proteína y de la severidad de la alteración. La mayoría de los EIM co

nocidos son debido a defectos enzimáticos intracelulares o a anomalías de transporte a nivel de la membrana celular. Los substratos afectados en los desórdenes hereditarios de transporte membranar pueden ser metabolitos pequeños (aminoácidos, azúcares, iones, etc.) o macromoléculas (hormonas peptídicas, lipoproteínas de baja densidad, etc.).

## ANTECEDENTES :

El término "errores congénitos o innatos del metabolismo" lo introdujo Garrod, para explicar las características de la Alcaptonuria. Las observaciones de Garrod sobre esta enfermedad fueron las siguientes: a) Los pacientes con alcaptonuria excretaban por la orina grandes cantidades de ácido homogentísico (alcapton) desde el nacimiento; este ácido normalmente no se encuentra en orina; b) si a los individuos alcaptonúricos se les administraba ácido homogentísico, éste se recuperaba casi totalmente en la orina. Además, la administración de proteína, fenilalanina o tirosina provocaba un incremento en la excreción urinaria de ácido homogentísico. Los individuos normales no excretaban dicho ácido en ninguna de las condiciones anteriores; c) la alcaptonuria, además de ser congénita, mostraba una distribución familiar. Los padres de los pacientes con alcaptonuria no excretaban ácido homogentísico y entre ellos la frecuencia de consanguinidad era elevada. A partir de estas observaciones Garrod postuló: 1) que el ácido homogentísico era un intermediario normal en el metabolismo de los aminoácidos fenilalanina y tirosina; 2) que los individuos con alcaptonuria excretaban grandes cantidades de ácido homogentísico debido a la existencia de un bloqueo metabólico impuesto por la deficiencia de la enzima hepática responsable de la degradación de ácido homogentísico; 3) que de acuerdo a las Leyes de Mendel, la alcaptonuria podía ser considerada como una enfermedad recesiva, esto es, una condición causada por la presencia en doble dosis de un factor Mendeliano (gene) anormal.

Los EIM, de acuerdo al concepto de Garrod, son condiciones que resultan de un bloqueo metabólico impuesto por la deficiencia de una enzima específica responsable de llevar a cabo una reacción química. Como consecuencia del defecto enzimático los metabolitos anteriores al bloqueo se acumularán y los posteriores no se formarán o se sintetizarán en cantidades reducidas.

La validez de este concepto fue apoyada fuertemente por los experimentos de Beadle y Tatum que usaron como modelo biológico al hongo *Neurospora crassa* y formularon explícitamente la relación entre genes y enzimas. La cepa silvestre de *N. crassa* crece óptimamente en medios de cultivo simples que contengan una fuente de nitrógeno inorgánico, una fuente de carbono, sales minerales y biotina. Cuando estos cultivos se exponen a un agente mutagénico

co, se pueden obtener mutantes que no crecerán en el medio de cultivo simple, a menos que se le adicionen nutrientes específicos. De esta manera se pueden producir ELM para cualquier reacción química cuyo producto se pueda adicionar al medio de cultivo. El análisis sistemático de los requerimientos nutricionales específicos de las mutantes permite definir la secuencia de reacciones en una vía metabólica y la posición de los bloqueos impuestos por deficiencias enzimáticas específicas genéticamente determinadas. Del estudio de las mutantes nutricionales de *Neurospora* y la caracterización de las deficiencias enzimáticas específicas en estas cepas se derivó el concepto de que la función de los genes es dirigir la síntesis de enzimas específicas. El concepto de "un gene - una enzima" de Beadle y Tatum plantea que:

- 1.- Todos los procesos bioquímicos en todos los organismos están bajo control genético.
- 2.- Estos procesos bioquímicos se pueden resolver en una serie de reacciones individuales consecutivas.
- 3.- Cada reacción bioquímica está bajo control de un solo gene diferente.
- 4.- La mutación de un solo gene altera la capacidad de la célula para llevar a cabo solamente una sola reacción química primaria.

El concepto "un gene una enzima" sufrió varias modificaciones y finalmente se expresó como "un cistron un polipéptido", definiendo cistron como la unidad funcional de DNA que especifica la estructura de una sola cadena polipeptídica. En su expresión final, el concepto incluye a todas las proteínas interdependientes de su función, así como aquellas proteínas formadas por dos o más cadenas polipeptídicas diferentes.

**PLAN DE TRABAJO:**

- 1) Investigación Bibliográfica.
- 2) Elaboración del Protocolo de tesis.
- 3) Adiestramiento, Selección y Aprendizaje de técnicas.
- 4) Adquisición de los recursos materiales
- 5) Implementación de la Técnica.
- 6) Recolección de datos.
- 7) Confirmación de los resultados por pruebas confirmatorias.
- 8) Análisis de los resultados.
- 9) Divulgación de los resultados (publicación de tesis).

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

¿Es posible prevenir el retraso mental secundario a un error congénito del metabolismo a través de su detección temprana, mediante el empleo de técnicas de tamiz metabólico en el recién nacido?

CAPITULO II

**MATERIAL Y METODOS:**

**Material:** Tubos de ensaye  
Gradilla para tubos  
Placa de porcelana blanca  
Papel filtro  
Embudos de Plástico  
Embudos de vidrio  
Baño María  
Vasos de Precipitado  
Frascos ámbar con tapón esmerilado  
Varilla de vidrio  
Mechero Bunsen  
Matraz volumétrico aferado  
Tiras reactivas BILLI-LAPSTEX  
Pipetas  
Buretas  
Estufa  
Caja de petrí  
Cromatoplasmas de Silica Gel 60  
(sin indicador fluorescente)  
para cromatografía en capa fina 20 x 20 cm.  
espesor de la capa de 0.25 mm.  
Cromatofolios de Aluminio de Celulosa  
(sin indicador fluorescente)  
para cromatografía en capa fina 20 x 20 cm.  
espesor de la capa 0.1 mm.

REACTIVOS: Acetato de sodio trihidratado.

- Acido Acético glacial.
- Acido Clorhídrico conc.
- Albumina bovina fracción V
- Sulfato de Cobre pentahidratado
- Carbonato de Sodio Anhidro
- Citrato de Sodio
- Cloruro Férrico hexahidratado
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina
- Cianuro de Sodio
- Etanol al 95%
- Nitroprusiato de Sodio
- Hidróxido de Amonio
- Nitrato de Plata
- Antrona
- Acido Sulfúrico concentrado
- Mercurio
- Acido Nítrico concentrado
- Azida de Sodio
- Yodo
- Persorcinol
- Cloroformo
- Para-nitroanilina
- Nitrito de Sodio
- Acetato de Sodio Anhidro
- Nitrosnaftol
- Acido Cítrico
- Cloruro de Cetil Piridinium
- Azul de Toluidina
- Butanol

Reactivos para corrimiento de las placas de Cromatografía de Capa Fina de -

Azúcares: Butanol

Acido Acético Glacial

de Aminoácidos: Butanol

Acido Acético

Acetona

Standar de Azúcares para Cromatografía de Capa Fina:

- Lactosa	Ribosa
- Glucosa-6-Fosfato	Maltosa
- Sucrosa	Xilosa
- Galactosa	Fucosa
- Sacarosa	Gliceraldehído
- Tagatosa	Dextrosa
- Fructuosa	Lixosa
- Arabinosa	Maltosa

Standar de Aminoácidos:

- Cistina	Treonina
- Arginina	Triptofano
- Histidina	Meticinina
- Glicina	Valina
- Homocistina	Alanina
- Fenilalanina	Tirosina
- Acido Glutámico	Ac. beta-isobutírico
- Leucina	Ac. Aspartico.

Revelador para cromatografía de capa fina de Aminoácidos:

- Ninhidrina                      - Acetona                      - Piridina

Revelador para cromatografía de capa fina de Azúcares:

- Orcinol                              - Acido Sulfúrico              - Etanol

## MÉTODOS:

AMINOACIDOS: Dinitrofenilhidrazina (Penrose y Cuastel)  
 Cloruro Ferrico (Penuart)  
 Ciano-Nitroprusiato (Knox)  
 Plata-Nitroprusiato (Spaeth, G, y Barber G.)  
 Millon (Bernhart, F.M., and Schneider, R.W.)  
 Nitrosoaftol (Perry y Cols).

AZUCARES: Benedict  
 Antrona (Harper, H.A.)  
 Selliwanoff

ACIDOS ORGANICOS: Acido Homogentísico (Jensen y Mc Kenzie)  
 Acido Metilmalónico (Gioglio, A.J., and Lubby, Al.)

MUCOPOLISACARIDOS: Turbidez de la Albumina Ácida (Dorfman)  
 Cloruro de Cetil Piridinium  
 Azul de Toluidina (Berry, H.K. and Spirager, .J.)

INDICAN URINARIO: Obermayer

DEFICIENCIA DEL SULFITO OXIDASA: Tiosulfato (Fiegl, F.)

## PREPARACION DE REACTIVOS:

## Reactivos para la técnica de ALBUMINA ACIDA:

- Prepara solución de Albumina bovina fracción V al 0.1% en buffer Acético - 0.1 M, pH 3.75.
- para preparar el buffer: Disolver 13.6 gr. de Acetato de sodio tri-hidratado en 800 ml de agua destilada y agregar 5.7 ml. de Acido Acético glacial, más 1 gr. de Albumina bovina fracción V. Ajustar el pH a 3.75 con - Acido Clorhídrico 10 N.

## CLORURO DE CETIL PIRIDINIUM

- Buffer citrato pH 4.8  
Disolver 9.68 gr, de ácido cítrico y 15.88 de citrato de sodio en 100 ml.- de agua destilada.
- Solución de cloruro de cetil piridinium al 0.1% en buffer citrato 4.8 - - (w/v).

NOTA: estable a temperatura ambiente durante 1 año.

## AZUL DE TOLUIDINA:

- Disolver 1 gr. de azul de toluidina en 400 ml. de acetona más 100 ml. de - agua destilada.
- Solución 1:10 de ácido acético en agua destilada: 1 ml. de ácido acético. - en 9 ml. de agua destilada.

## CLORURO FERRICO AL 10%.

- Disolver 10 gr. de cloruro férrico en 100 ml. de agua destilada.

## DINITROFENILHIDRAZINA (DNPH):

- Disolver 0.7 gr. de 2,4-DNPH en 250 ml. de ácido clorhídrico 1 N. con calen- tamiento.
- Enfriar y envasar en frasco ambar.

## REACTIVO DE BENEDICT:

- Disolver 17.3 gr. de sulfato de cobre penta-hidratado en 100 ml. de agua - destilada caliente, esta será la solución 2A.
- Disolver 173 gr. de citrato de sodio con calentamiento en agua y 100 gr. - de carbonato de sodio anhidro, aforar a 700 ml. de agua destilada, esta se rá la solución 2B.
- Enfriar ambas soluciones y agregar la solución 2B a la solución 2A, con --. agitación, aforar ambas soluciones a 1 litro con agua destilada.

NOTA: Estable a temperatura ambiente.

## REACTIVO DE OBERMAYER:

- Disolver 0.2 gr. de cloruro férrico en 100 ml. de agua destilada =  $\text{FeCl}_3$  - al 0.2%.

## REACTIVO DE SELLIVANOFF:

- Disolver 0.05 gr. de resorcinol en una mezcla de 60 ml. de agua destilada- más 30 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

## REACTIVO DE MILLON:

- Disolver 10 gr. de mercurio en 11 ml. de ácido nítrico concentrado y di--- luir a 22 ml. con agua destilada.

## REACTIVO DE ANTRONA:

- Disolver 0.2 gr. de Antrona en 100 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

## REACTIVO DE TIOSULFATO:

- Disolver 0.317 gr. de Iodo en 25 ml. de etanol puro, a esto agregar 0.75 - gr. de azida de sodio y aforar a 50 ml. con agua destilada.

REACTIVO DE ACIDO METIL MALONICO:

- Disolver 0.1 gr. de para-nitroanilina en 100 ml. de ácido clorhídrico - - 0.16 N.
- Disolver 0.5 gr. de nitrito de sodio en 100 ml. de agua destilada.
- Buffer acetato de Sodio 1 M. pH 4.3:  
Disolver 8.2 gr. de acetato de sodio nahidro en agua destilada y aforar a 100 ml. agregar 158 ml. de ácido acético 1 M.
- \* Estable de 2 a 3 meses.

REACTIVO DE CIANO-NITROPRUSIATO:

- Cianuro de Sodio 5%: disolver 0.125 gr. de cianuro de sodio en 2.5 ml. de una solución que contiene 1 ml. de agua destilada más 1.5 ml. de etanol al 95%.

NOTA: Prepararlo al momento de realizar la prueba.

- Nitroprusiato de sodio al 5% (nitroferricianuro de sodio). Disolver 0.125 gr. de nitroprusiato de sodio en una solución que contiene 1 ml. de agua - destilada más 1.5 ml. de etanol al 95%.

NOTA: Prepararlo al momento de realizar la prueba.

REACTIVO DE PLATA NITROPRUSIATO:

- Preparar nitrato de plata al 1% en solución de amonio al 3% solución de -- amonio al 3%: a 0.06 ml. de hidróxido de amonio agregar 1.94 ml. de agua - destilada.
- Almacenar en botella ambar u obscura.
- Nitroprusiato de sodio al 1%: disolver 20 mg. de nitroprusiato de sodio en 2 ml. de agua destilada.
- \* Estable por varios días en refrigeración.
- Cianuro de sodio al 0.7%: disolver 0.014 gr. de cianuro de sodio en 2 ml.- de agua destilada.

## REACTIVO DE NITROSONAFTOL:

- Preparar ácido nítrico 2.63 N.
- Preparar nitrato de sodio al 2.5% en agua destilada (p/v).
- Preparar una solución de nitrosoaftol al 0.1% en etanol al 95%.

## M E T O D O L O G I A :

### MUCOPOLISARIDOSIS:

Screening para concentraciones urinarias aumentadas de mucopolisacáridos ácidos.

Los mucopolisacáridos ácidos están distribuidos ampliamente en varios tejidos y líquidos corporales. Este grupo incluye el ácido hialurónico, condroitín sulfato A, condroitín sulfato B y condroitín sulfato C, Kerátan sulfato y Heparan sulfato. El análisis bioquímico de estos compuestos se ha hecho muy importante debido a que hay varias mucopolisacaridosis clínicamente importantes, asociados con concentraciones urinarias aumentadas de mucopolisacáridos ácidos.

Como resultado del descubrimiento de varios tipos de mucopolisacaridosis se han desarrollado varios procedimientos de screening para detectar la presencia de cantidades anormales de mucopolisacáridos en orina. Una de las más útiles es la llamada "Prueba de turbidez de la albúmina ácida".

Esta prueba tiene su principio en la observación de Mayes y Palmer, de que una preparación de carbohidratos del humor vítreo, forma un precipitado con globulinas séricas en presencia de ácido. En 1939 C.V. Feastone usó esta observación como una base para la estimación cuantitativa de polisacáridos mucoides derivados de streptococos del grupo C. Este autor midió la turbidez formada por el "humor vítreo" o carbohidratos mucoides de estreptococos en presencia de suero de caballo a pH de 4.2. Este procedimiento fue utilizado posteriormente para medir la actividad de la hialuronidasa en contra del ácido hialurónico, y se demostró que bajo condiciones controladas — la turbidez es directamente proporcional a la concentración de ácido hialurónico.

Además de varios procedimientos de screening basados sobre la formación de soluciones turbias en presencia de mucopolisacáridos ácidos, se ideó una prueba que hace uso de las propiedades metacromáticas de estos compuestos. Aunque el Azul de Toluidina ha sido utilizado como un medio para localizar el condroitín sulfato sobre cromatogramas en orina, Berry y Spinanger, primero observaron que las orinas de controles normales dan un resultado negativo cuando se prueban directamente con el colorante; entonces se pensó — que la separación cromatográfica fue necesaria para propósitos de screening.—

Con esto en mente estos autores diseñaron una prueba simplificada en papel - filtro para niños con Síndrome de Hurler.

Con este procedimiento los mucopolisacáridos ácidos se localizan poniendo una pequeña cantidad de orina sobre el papel filtro y luego tificándolo con Azul de Toluidina. La tinción metacromática resulta cuando la orina contiene concentraciones de mucopolisacáridos. La tinción o lavado del papel, se realiza a pH 2 para prevenir la tinción de compuestos que son ionizados - arriba de este pH, lo que conduce a aumentar la especificidad del procedimiento. Sin embargo se menciona que muchas otras sustancias además de condroitín sulfato, pueden producir metacromasia aún a este pH, y que esta observación debe tenerse en mente cuando se usa este procedimiento como - - - screening. Berry y Spinanger reportaron que una cantidad de 5 microlitros de una solución de condroitín sulfato de 10 mg. % da una prueba positiva.

PRUEBA DE TAMIZAJE EN ORINA DE TURBIDEZ DE ALBÚMINA.

Fundamento:

Los mucopolisacáridos ácidos en orina se precipitan como complejos insolubles en presencia de albúmina bovina amortiguada. El grado de turbidez es una medida de exceso.

Interpretación:

Una orina que contiene pocos, o ningún polisacárido permanece clara. - La Orina que contiene mucopolisacáridos equivalentes a 5 mg. de condroitín sulfato o más por 100 ml. se convierte en turbia.

Método:

- A un ml. de orina agregar 2 gotas de HCL 5 N.
- Mezclar.
- Agregar 2 ml. de Albúmina Ácida 0.1% en buffer acético 0.1 M. pH - - 3.75.

Mezclar.

- Reposar 10 minutos.
- Observar turbidez contra un blanco de agua, y un standar de 5 mg. de condroitín sulfato, en 100 ml. de agua destilada.

Preparación del Reactivo de Albúmina Ácida.

- Albúmina 0.1 % en Buffer Acético 0.1 M, pH 3.75.
- Disolver 13.6 gr. de Acetato de Sodio Tri-hidratado en 800 ml. de -- agua destilada y agregar 5.7 ml. de Acido Acético Glacial más 1 gr.- de Albúmina ácida bovina.
- Ajustar el pH a 3.75 con Acido Clorhídrico 10 N.
- Esta solución permanece indefinidamente a 4°C.

NOTAS:

- Usando ácido hialurínico y albúmina sérica de caballo acidificada se ha encontrado que la turbidez máxima se desarrolla a pH 3.82, la tur bidez es disminuida si el pH es superior o inferior a este valor.
- El desarrollo de la turbidez disminuye cuando las fuerzas iónicas -- aumentan. Esta observación muestra la importancia de usar orinas -- dializadas.
- El tiempo de lectura debe ser uniforme, ya que se ha encontrado que- la turbidez aumenta con el tiempo.

- El grado de turbidez, en esta prueba varía según el tipo de mucopolisacaridosis (esta variación se observa en la intensidad de la turbidez).

PRUEBA DE TURBIDEZ DE CLORURO  
DE CETIL PIRIDINIUM

Fundamento:

Los mucopolisacáridos urinarios y mucoproteínas se precipitan en un medio ácido (Buffer citrato pH 4.8 = citrato de sodio y ácido cítrico) por la formación de un complejo con el cloruro de cetil piridinium (CPC) precipitable, el cual forma una turbidez directamente proporcional a la cantidad de mucopolisacáridos presente en la orina.

Método:

A 1 ml. de orina filtrada agregar 1 ml. de reactivo de cloruro de cetil piridinium.

Dejar reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.

Transcurrido el tiempo observar turbidez.

### PRUEBA DE AZUL DE TOLUIDINA:

**FUNDAMENTO:** Esta prueba ha sido usada como medio para revelar la presencia de condroitín sulfato en orina debido a las propiedades metacromáticas de este compuesto. Berry y Spinanger, observaron que las orinas de controles normales daban un resultado negativo cuando se probó directamente con el colorante, con ésto en mente diseñaron una prueba simplificada en papel filtro, para niños con síndrome de Hurler. Con este procedimiento los mucopolisacáridos ácidos se tiñen metacromáticamente cuando se encuentran presente en la orina.

#### METODO:

- Disolver 1 gr. de Azul de Toluidina en una solución que contiene 400 ml. de acetona y 100 ml. de agua destilada.
- A un papel filtro Wattman No. 1 aplicar 25 microlitros de orina de 5 microlitros en 5, dejando secar entre cada aplicación.
- Sumergir el papel filtro conteniendo la muestra seca en una caja de petri que contiene unos 20 ml. del reactivo por un tiempo de 45 segundos, contados con reloj.
- Sacar el papel una vez transcurridos los 45 segundos y sumergirlo en otra caja de petri que contiene una solución fresca de Ácido Acético al 10%, esto es con el fin de aclarar la tinción, por un tiempo de 45 minutos.
- Dejar secar completamente el papel, una vez transcurridos los 45 minutos y evaluar la tinción de la mancha.

#### RESULTADOS E INTERPRETACION:

**POSITIVO:** Aparecerá una mancha color púrpura.

**NEGATIVO:** No se tiñen con el colorante.

- Los recién nacidos normales en ocasiones pueden dar pruebas positivas.
- Un borde débil de metacromasia alrededor de la mancha se considera una prueba negativa.

## METODOLOGIA :

### AMINOACIDOS:

Las técnicas para la detección de aminoácidos en fluidos fisiológicos son simples y confiables. La disponibilidad de estas técnicas han hecho posible programas de tamiz, para la detección de aminoácidos anormales en diferentes poblaciones. Como resultado de estos estudios, sobre 30 errores congénitos del metabolismo en el cual aminoácidos anormales, ya sea primarios o secundarios, han sido ya descubiertos. En un gran número de estos desórdenes, son excretados metabolitos anormales, más que aminoácidos. Los hallazgos de estos compuestos por pruebas químicas simples preliminares nos dan una idea de la existencia de anomalías de aminoácidos y una guía para estudios futuros.

### PRUEBAS QUIMICAS:

Muchas de las pruebas químicas para la detección de metabolitos anormales de aminoácidos, son no específicas y reaccionan con un grupo de sustancias como una prueba de tamiz.

### PRUEBA DE CLORURO FERROICO

Método: de Renuart.

Reactivos: Solución de Cloruro Férrico al 10% en agua destilada.

Procedimiento:

- 1.- Colocar 1 ml. de orina en un tubo de ensaye limpio y seco.
- 2.- Agregar 4 gotas de  $\text{ClFe}_3$  al 10% gota a gota.
- 3.- Observar el color.

Resultados e Interpretación:

Muchos compuestos reaccionan con cloruro férrico para formar varios colores complejos:

Desorden	Color de reacción de $\text{FeCl}_3$
- Fenilcetonuria	
Acido fenilpiruvico	Verde
- Tirosinemia	
Ac. p-hidroxifenilpiruvico	Verde que desaparece rápidamente
- Enfermedad de orina de Jarabe de Maple.	

Cambios en la cadena de cetoacidosis	Grisaseo con tintes verdes.
- Histidinemia	
Acido Imidazolpiruvico	Gris
- Alcaptonuria	
Acido Homogentisico	Azul efervescente

Para hacer un diagnóstico presuntivo de fenilcetonuria. Una prueba de Cloruro Férrico VERDE podría ser apoyada por una prueba positiva de Dinitrofenilhidrazina (DNPH), a través de una reacción de color y la aparición de un precipitado amarillo.

Una reacción de color con el reactivo de Cloruro Férrico ha sido observada también en Histidinemia y Tirosinemia.

PRUEBAS POSITIVAS: Color VERDE.

NOTA: Si el color VERDE desaparece lentamente en el lapso de una hora, es característico de Acido Fenilpiruvico.

La aparición de un color VERDE estable sugiere la presencia de Acido Imidazol piruvico, o algunos otros compuestos.

ORUEBAS FALSAS NEGATIVAS: Estas las darán, orinas alcalinas que contengan Ac. Fenilpiruvico debido a la precipitación de los iones férricos como hidróxido, u orinas alcalinas por oxidación del ácido fenilpiruvico el cual es destruido.

Tocante al pH, Centerwall y Cols. reportaron el hecho de que se establece en algunos métodos que la orina debe ser acidificada, esto no es necesario en el procedimiento empleado por nosotros, ya que si uno lleva a cabo la prueba usando de 3 a 5 gotas de solución de cloruro férrico al 10% con 1-ml. de orina, la solución de cloruro férrico (pH 1.8) la acidificará contrarestando cualquier exceso de alcalinidad presente en la orina.

Si se usa una solución de cloruro férrico de menor concentración, con un volumen mayor de orina, puede suceder que se forme hidróxido ferroso y de lugar a resultados erróneos.

Las soluciones de cloruro férrico pueden volverse alcalinas si se guardan en recipientes de vidrio y tapadas con tapones de hule, esta alcalinidad da lugar a la formación de óxido férrico y la solución se vuelve turbia amarillenta, si se observa muy turbia debe desecharse y prepararse de nuevo.

**FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE CLORURO FERRICO:**

El ácido fenilpirúvico es oxidado en una solución alcalina. Por lo tanto si la orina es alcalina, o se hace alcalina por acción bacteriana, --- existe el peligro de que todo el ácido fenilpirúvico presente sea destruido y de lugar a una prueba falsa positiva.

**SENSIBILIDAD**            5 a 10 mg. por 100 ml'

**ESPECIFICIDAD:**

El Ac. beta-Imidazol pirúvico es la única substancia, además del Ac. - Fenilpirúvico que da el típico color VERDE, observado en esta reacción con - el cloruro férrico.

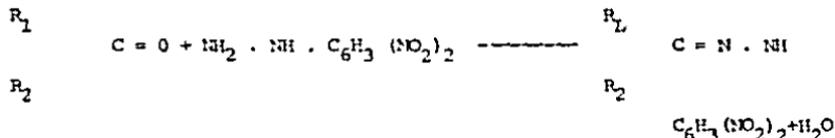
PRUEBA: DINITROFENILHIDRAZINA.

(Penrose and Quastel)

Esta plenamente establecido de que existen muchos Errores Innatos del Metabolismo (EIM) asociados con un marcado incremento en la excreción de 1 ó más cetoácidos orgánicos en la orina. Estos grupos de compuestos carbonílicos incluyen ambos alfa-cetoácidos aromáticos como se encuentran por ejemplo en la fenilcetonuria, tirosinosis y enfermedad de la orina de miel de maple que se encuentran alfa-cetoácidos alifáticos.

REACCIONES QUIMICAS:

La discusión se limitará a la reacción de estos compuestos con el reactivo 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH). Este compuesto ha sido utilizado como reactivo experimental por varios años, ya que forma hidrazonas cristalinas relativamente insolubles con una variedad de compuestos carbonílicos alifáticos, cíclicos y aromáticos de importancia médica. Esta reacción procede de la siguiente manera:



Así como esta reacción resulta en un producto insoluble, un precipitado amarillo o amarillo-blanco insoluble se formará después de la adición de este compuesto a muestras de orina que contienen cantidades excesivas de una variedad de ceto compuestos. Estos resultados son fácilmente distinguibles de los obtenidos en orinas normales en la cual no se forma precipitado puede utilizarse como una prueba experimental rápida para pacientes con condiciones patológicas asociadas con un aumento en la concentración de cetoácidos.

HALLAZGOS NORMALES:

Debe notarse que la orina de los controles normales no está completamente carente de alfa-cetoácidos. Con métodos suficientemente sensibles puede demostrarse, la presencia de varios alfa-cetoácidos en las muestras, el más abundante es el ácido pirúvico y el ácido alfa-cetoglutarico. Estos compuestos están presentes en cantidades relativamente pequeñas en condiciones normales, la prueba con DNPH rutinariamente da resultados negativos con muestras de controles normales.

Una posible excepción a esta generalización, se encuentra en las muestras de niños recién nacidos. Synderman por ejemplo reporta que la DNPH, es moderadamente positiva durante los primeros días de vida, como resultado de un aumento en la excreción de ácido alfa-cetoglutarico y ácido acetoacético.

Debe tomarse en cuenta, que las muestras de orina que contienen cuerpos cetónicos, van a dar un resultado positivo, con la prueba de DNPH. Los cuerpos cetónicos, ácido acetoacético, ácido beta-hidroxiacético y acetona, se encuentran generalmente en cantidades excesivas cuando la mayor fuente de energía metabólica se obtiene del cambio de la utilización de carbohidratos por grasas.

El aumento en la utilización de grasas produce formación y acumulación excesiva de ácido acetoacético. Este compuesto puede entonces ser convertido a acetona y ácido beta-hidroxiacético. Estos 3 compuestos se excretan en la orina, más se ha visto que el ácido acetoacético es el principal responsable de los resultados positivos de la prueba de DNPH. Así como la producción de este compuesto puede ocurrir en cualquier disturbio metabólico, en el cual los carbohidratos son mal utilizados, puede obtenerse un resultado positivo en las muestras de orina de pacientes que sufren cualquiera de las enfermedades específicas y no específicas asociadas con la producción de cuerpos cetónicos.

ENFERMEDAD DE LA ORINA DEL JARABE DE MAPLE  
( M S U D )

Los niños con la forma clásica de la enfermedad de la orina del jarabe de maple o cetoaciduria de cadena ramificada, emiten un olor característico que nos recuerda al jarabe de maple a los pocos días de nacidos, los bebés presentan vómitos, hipetonía, convulsiones y muerte. Una forma intermitente menos severa puede aparecer en niños más grandes; ellos se tornan letárgicos con vómitos y emiten el típico olor, cuando son sujetos a stress por infecciones, cirugías o ingesta excesiva de proteínas, ambas formas de la enfermedad pueden ser tratadas por una dieta con restricción de proteínas.

El bloqueo metabólico se debe a una falla en descarboxilación oxidativa de los alfa-cetoácidos hacia ácidos grasos por una serie de enzimas.

Los alfa-cetoácidos y sus aminoácidos antesores, valina, leucina e isoleucina, se acumula en la sangre, con desbordamiento o derrame de orina. En la forma intermitente las anomalías se encuentran solamente durante las exacerpciones.

La forma clásica es detectable rápidamente después del nacimiento, por una prueba de inhibición bacteriana, por exceso de niveles de leucina en manchas secas de sangre, similar a la empleada para el tamiz de recién nacidos en fenilcetonuria. Las concentraciones séricas de leucina, isoleucina y valina, son medidas cuantitativamente por cromatografía en columna. La alfa-ceto aciduria se detecta por la reacción de Dinitro-Fenil-Hidrazina (DNPH), y los alfa-cetoácidos individuales se identifican por cromatografía en papel.

PRUEBA DE DINITRO-FENIL-HIDRAZINA (DNPH)  
(Para alfa-cetoácidos en orina)

**Fundamento:** Los alfa-cetoácidos derivados de las cadenas ramificadas de aminoácidos y cetonas, forman hidrazonas insolubles coloreadas en la orina acidificada por reacción de los grupos carbonilo con la DNPH.

**Método:**

- Disolver 0.7 gr. de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 250 ml. de Ácido Clorhídrico 1 N., con calentamiento.

- Enfriar a temperatura ambiente y guardarlo en frasco ambar.
- Filtrar la muestra de orina, si esta turbia.
- Agregar 1 ml. de orina a 1 ml. de DNPH.
- Mezclar.
- Observar color y precipitado.

Resultados e Interpretación.

POSITIVO: Precipitado blanco lechoso abundante.

NEGATIVO: Ausencia total de precipitado.

Esta prueba se realiza contra un standar de ácido-alfa-cetoglutarico - 100 mg/100 ml de agua destilado. Mantener el reactivo standar en congelación de 0 a 5°C.

Se ha reportado para esta prueba una especificidad de detección de ácido fenilpirúvico tan pequeñas como 5 a 10 mg.

## HOMOCISTINURIA

El cuadro clínico de la homocistinuria, una aminoacidopatía heredada - en forma recesiva, simula un padecimiento heredado en forma dominante y sin marcadores bioquímicos específicos, Síndrome de Marfan. Ambos tipos de pacientes son altos y delgados para su edad, tienen dedos largos (aracnodactilia), y dislocación del cristalino. Los niños con homocistinuria habitualmente presentan tromboembolias, tienen convulsiones y pueden ser retrasados. Los pacientes jóvenes con síndrome de Marfan por otro lado, habitualmente - tienen mala visión y falla cardíaca.

Los signos clínicos de homocistinuria pueden ser prevenidos mediante - tratamiento en la infancia con dietas especiales. Los niños más grandes tam- bién se benefician por restricción de la ingestión de proteínas que contie- nen metionina, muchos pero no todos, también mejoran con terapia de vitami- na B<sub>6</sub>.

Pacientes con homocistinuria clásica tienen poco o nada de la sintetasa cistationina, una enzima encontrada en el hígado. El sustrato para la en- zima homocistina, es un intermediario en el metabolismo de la metionina y es- ta normalmente ausente en los fluidos corporales. En ausencia de sintetasa sin embargo, homocistina y metionina se acumulan en la sangre y se excretan- por la orina. Algunos pacientes homocistinúricos tienen poco o nada de la - enzima; otros tienen sintetasa que requiere una coenzima, vitamina B<sub>6</sub>.

Algunos portadores obligados del homocistinuria clásica, pueden ser -- identificados a través de la persistencia de niveles altos de metionina en - suero, después de una dosis de carga. Sus leucocitos pueden ser inducidos a formar solamente pequeñas cantidades de sintetasa en respuesta a la estímulo ción por fitohemaglutina, y sus niveles de sintetasa en el hígado también -- pueden ser menor que lo normal.

La homocistinuria es demostrable en orina por la reacción de Ciano-ni- troprusiato de Brand's. Una modificación de iones plata de la reacción es - específica. La homocisteína y su producto de oxidación más estable, homocis- tina, son medidos en forma precisa por cromatografía en columna. Un procedi- miento especialmente valioso cuando se siguen los efectos de una terapia dié- tética o por vitaminas.

## HOMOCISTINA EN ORINA

**Fundamento:** El reactivo de cino-nitroprusiato de Brand's para compuestos sulfidrilos, modificado por la adición de nitrato de plata amoniacal, — convierte a esta prueba en específica para homocistina urinaria. La acción-estabilizante de la plata reduce a la homocistina a la forma tíol más rápido de lo que lo hace la cistina; con el cianuro como un captador de iones, el - grupo sulfidriilo de la homocistina reacciona inmediatamente con nitroprusiato, mucho antes que los grupos reactivos de la cisteína.

### Método:

- Colocar una gota de orina en un papel filtro.
- Agregar una gota de la solución de Nitrato de Plata al 1% (en hidróxido de amonio al 3%)
- Reposar 1 minuto.
- Agregar 1 gota de Nitroprusiato de sodio al 1% en solución acuosa.
- Agregar 1 gota de Cianuro de Sodio al 0.7%.
- Observar desarrollo de color.

### Resultados e Interpretación:

NEGATIVO: color AMARILLO

POSITIVO: ROJO inmediatamente.

Las muestras que contienen homocistina se torna rosa o púrpura inmediatamente, el color debe permanecer estable por lo menos 1 minuto.

## C I S T I N U R I A

Cistinuria, una causa rara de formación de cálculos, usualmente se inicia en la infancia temprana o en la adolescencia. Una vez reconocida la enfermedad, puede ser controlada frecuentemente por hidratación, alcalinización o complementación con agentes quelantes. En algunos casos, los cálculos del riñón aislados pueden ser removidos. Recientemente el tratamiento incluye trasplante renal, si el paciente presenta falla renal.

El defecto básico es aparente en el transporte de aminoácidos a través de la membrana. En particular, los tubulos renales fallan para reabsorber la cistina y los ácidos aminados dibásicos. Tres tipos de cistinurias y las combinaciones de ellos han sido reconocidas. El Dr. Harry Harris y cols. — (1953- 1955) reconocieron una forma temprana completamente recesiva y una forma incompleta recesiva, basados en diferentes patrones de excreción de los portadores. Posteriormente el Dr. Rosenberg (1966) delinea 3 formas: - El tipo I en la cual la excreción del portador es normal por ejemplo completamente recesiva, y tipo II y III que representan un grupo recesivo incompleto de Harris. Estos portadores son bioquímicamente cistinuricos, el portador tipo II y aún más el tipo III. Los formadores de cálculos homocigotos de los tres tipos y sus combinaciones por tanto aparecen más o menos similares.

El defecto tubular renal en pacientes homocigotos para cistinuria tipo I y II son acompañados por defectos en la absorción intestinal epitelial, — el efecto clínico por lo cual son aparentemente despreciables.

La cistinuria bioquímica también ocurre en la enfermedad de Hartnup y de Wilson's y en el síndrome de Lowe. Es encontrada comúnmente en retrasados mentales, indicando una expresión de un estado de portador cistinurico — no recesivo, en una población que es más frecuentemente tamizada que la población general.

La cistinuria bioquímica en cistinosis, es una manifestación de un exceso sistémico de cistina.

El diagnóstico bioquímico de cistinuria se realiza por observación microscópica de cristales típicos, reacción positiva de la orina con la prueba de nitroprusiato o una excreción urinaria excesiva de cistina, lisina, arginina y ornitina. El progreso terapéutico puede también ser seguido a través

de cromatografía en columna, determinación de residuos de cistina y comple--  
hos de cistina quelada.

La zigocidad y las formas genéticas en una familia, pueden ser postula--  
dos de los datos bioquímicos derivados de las tasas de excreción cuando exis--  
te un portador obligado, en la familia.

#### CISTINA EN ORINA

Fundamento: El nitroprusiato reacciona con disulfuros urinarios, cista--  
tina y homocistina, reduciendolos a compuestos sulfídricos y cianuro.

La prueba de mancha de nitroprusiato es solo una adaptación de la prue--  
ba de Ciano-nitroprusiato de Brand's para cistina en pequeños volúmenes.

Método: Prueba de Ciano-nitroprusiato.

- 1 ml. de orina.
- Agregar 3 gotas de solución de  $CN^Na$  al 5% en solución alcoholada.
- Reposar 15 minutos.
- Agregar 1 gota de Nitroprusiato de Sodio al 5% en solución alcoholada de etanol al 95% en 100 ml.

Resultados e Interpretación:

POSITIVO: La muestra se tornará rojo púrpura, esto indica cantidades --  
excesivas de cistina (10 mg/100 ml. o más) y homocistina --  
(5 mg/100 ml. o más).

NEGATIVO: Las muestras normales permanecen Amarillas

Cualquier compuesto con una cadena disulfuro puede dar una reacción po--  
sitiva. Usualmente orinas normales concentradas, pueden dar una reacción de  
bilmente positiva.

Esta prueba es de particular ayuda en el diagnóstico de Homocistinuria,  
ya que sin ella, homocistina no puede ser detectada.

La obtención de una reacción positiva, nos esta indicando, que estan --  
en combinación con homocistinuria cuando menos otros dos desórdenes metabóli--  
cos, en el cual un disulfuro es excretado. Estos son: Cistinuria y beta-mer--  
captolactato-cisteina disulfiduria.

Puede presentarse interferencia con una droga N-acetilcisteina, cuando  
esta es dada como inhalante al paciente, ya que se excreta como Acetilcisti--  
na y Acetilcisteina-cisteina que es una mezcla disulfuro, por lo que amos con--  
puestos reaccionan con el reactivo de Ciano-nitroprusiato.

PRUEBA DE NITROSONAFTOL para determinar concentraciones elevadas de -  
catholitos p-hidroxifenólicos en orina.

PRINCIPIO:

En un reporte de Perry y Cols. se describen un número de pruebas selectivas en orina, proporcionando detalles sobre el uso de nitroso-naftol, como un recurso para detectar pacientes con tirosinemia. El uso de este compuesto para detectar tirosina parece haberse originado en los reportes de Gerngross, Voss y Herfeld, en los cuales se estableció que la tirosina y el 1-nitroso 2-naftol en la presencia de ácido nítrico reacciona para formar un color rojo púrpura.

tirosina+ nitroso-naftol \_ ácido nítrico -----> rojo púrpura

Este grupo proporcionó evidencias de que la reacción es específica para fenoles sustituidos en posición para, los cuales la posición orto no es -sustituida o bien tiene un grupo metilo. Posteriormente Thomas modificó. - el procedimiento aumentando la acidez con HCl; diluyendo el ácido nítrico y controlando la temperatura y de este modo evitar la inestabilidad, del color lo cual era una seria objeción en el procedimiento original.

En otros intentos para evitar la inestabilidad del complejo rojo Underfried y Cooper; calentaron la solución de compuestos para-fenolicos (tirosina o tiramina) en la presencia de ácido nítrico y reactivo de nitroso-naftol durante un lapso de 30 minutos. Este procedimiento tiene como resultado la conversión de un complejo rojo inestable aun complejo amarillo estable el -cual después de la separación del exceso de nitroso-naftol podría ser medido en un espectrofotómetro.

Underfried y Cooper también agregan pequeñas cantidades de nitrito de sodio a la mezcla de la reacción para evitar la inhibición de la reacción la cual ocurre bajo ciertas condiciones con filtrado libre de proteínas usando el ácido tricloro-ácetico como agente precipitante. Perry y Cols. usaron -nitrito de sodio en la reacción, pero no usaron el calentamiento. La reacción llevada a cabo en esta modalidad en la cual la presencia de compuesto -para-hidroxilados dan como resultado la formación de un color rojo naranja. Debido a que la prueba del nitroso-naftol para hidroxifenilos da la forma--ción de un compuesto color rojo en el procedimiento anterior de Perry, no es necesaria la separación del nitroso-naftol que no reacciona para interpretar el resultado de la prueba.

## PRUEBA DE NITROSONAFTOL:

## REACTIVOS:

Acido nítrico 2.63 N: añadir 10 ml. de  $\text{HNO}_3$ , conc. a 50 ml. de agua destilada.

Nitrito de sodio al 2.5%

1-nitroso-2-naftol a 0.1%: Disolver 100 mg. de nitroso-naftol en etanol al 95% y diluir a un volumen final de 100 ml. con etanol al 95%.

NOTA: Almacenar las soluciones de nitrito de sodio y nitroso-naftol en refrigeración, esta no debe ser menor de 5°C.

La solución de nitroso-naftol debe almacenarse en frasco ámbar, por un tiempo de 2 meses.

## METODO:

En un tubo de ensaye, poner 1 ml. de ácido nítrico 2.63 N.

Añadir al tubo 1 gota de nitrito de sodio.

Añadir 0.1 ml. de reactivo de nitroso-naftol.

Mezclar por agitación, y añadir 0.15 ml. de orina.

Mezclar por agitación y observar la presencia de color, pasados 5 min.

## RESULTADOS:

La aparición de un color ROJO-NARANJA indica una prueba positiva.

La persistencia de un color AMARILLO indica una prueba negativa.

Los resultados siguientes han establecido que:

COMPUESTO	CONCENTRACION	COLOR DE REACCION
p-hidroxifenilacético	100 mg	rojo
p-hidroxifenilpirúvico	200 mg.	rojo
p-hidroxifenil láctico	100 mg.	rojo
o-hidroxifenilacético	100 mg.	café (negativo)
fenilpiruvato de sodio	100 mg.	negativo
metabolitos del ácido-acetilsalicílico en orina.	-	negativo

## REFERENCIAS:

- Perry, T.L. Hansen, S., y Mac Dougall L.: Jour Canad. Med. Assn., -- 95:89, 1966.
- Mc. Cormick, B. Young, S.K., and Woods, M.N. Clin. Chim. Acta 12:216, 1965.
- Uden Friend. S. Titus, E. and Weiss bach, H.: J. Biol. Chem., 216:499, 1965.

## FUNDAMENTO E INTERPRETACION:

Perry y Cols, describen el uso de nitrosoaftol, como un recurso para detectar pacientes con tirosinemia. El uso de este compuesto carece haberse originado en los reportes de Gerngross, Voss y Herfeld, en los cuales se estableció que la tirosina y el nitrosoaftol en presencia de ácido nítrico -- reacciona para formar un color rojo púrpura, este grupo proporcionó evidencias de que la reacción es específica para fenoles sustituidos en posición para, posteriormente Thomas modificó el procedimiento aumentando la acidez con HCl; diluyendo el ácido nítrico y controlando la temperatura de éste, -- para evitar la inestabilidad del color, lo cual era una seria objeción en el procedimiento original.

Se demostró desde estudios iniciales que esta reacción no es específica, para tirosina, ahora se sabe que metabolitos derivados de tirosina, también reaccionan con esta prueba, tales como Ac. p-hidroxifenilpirúvico, -- p-hidroxifenil láctico, p-hidroxifenilacético.

**PRUEBA DE MILLON:****Material y Método:**

- Esta es una prueba cualitativa que nos mide tirosina y sus derivados para-hidroxifenólicos.
- El reactivo de Millon se prepara disolviendo 10 gr. de mercurio en 11 ml. de Acido Nítrico concentrado, y diluyendolo a 22 ml. con agua destilada.
- Mezclar 2 gotas de orina con 4 gotas del reactivo de Millon en una placa de porcelana blanca.

**Resultados e Interpretación:**

**POSITIVO:** El desarrollo de un color rojo a rojo cereza.

- En orinas normales solamente una pequeña cantidad de tripsina se encuentra presente. En la tirosinemia hereditaria (ó tirosinosis), — neonatal transitoria y deficiencia de ácido ascórbico se encuentran hipertirosinuria e hipertirosiluria. La orina de pacientes con hiperaminoaciduria generalizada dan una reacción de millon positiva como resultado de la excreción aumentada de tirosina.

**PRUEBA CUALITATIVA PARA SUSTANCIAS REDUCTORAS EN ORINA.**

**Método de BENEDICT:**

**Fundamento:** El  $Cu^{++}$  del reactivo cualitativo de Benedict, es reducido por la glucosa y otras sustancias reductoras y precipita como  $Cu_2O$  amarillo o rojo.

**Reactivos:**

Reactivo cualitativo de Benedict: Disolver 17.3 gr. de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  en 100 ml. de agua caliente. Con la ayuda de calor, disolver 173 gr. de Citrato de Sodio, y 10 g. de Carbonato de Sodio anhidro en 800 ml. de agua, al enfriarse poner la segunda solución en la primera.

**Procedimiento:**

Poner 5.0 ml. de reactivo de Benedict y 8 gotas de orina en un tubo de ensaye y mezclar. Hervir por 3 minutos en baño maría a ebullición, leer inmediatamente después del calentamiento.

**Interpretación:**

La sensibilidad de la prueba bajo condiciones óptimas es de 50-80 mg. de glucosa por 100 ml. Las concentraciones de glucosa en orinas que dan una reacción verde más un precipitado amarillo, caen en el rango de 100-500 mg. por 100 ml.

Se recomienda que la reacción sea reportada e interpretada como sigue:

Reacción	Reportada como	Concentración promedio aprox. de glucosa (mg/100ml.)
Azul claro u opacidad verde sin precipitado	0	menos de 100
Verde con precipitado amarillo	1+	250

Amarillo a Oliva	2+	800
Café	3+	1,400
Anaranjado a rojo	4+	2,000 ó más

Notas: Tres minutos en un baño de agua hirviente, equivalen a calentar por -  
2 minutos a la flama.

Estabilidad: la glucosa en orina es estable si se previene el crecimiento microbiano. Sin agregar preservativo, 4 horas a 30°C o 24 hrs. a temperatura de refrigerador, (no se debe exceder antes del análisis).

Exactitud: Substancias que se han reportado dan una prueba positiva con el reactivo de Benedict están la Fructosa, Lactosa, Galactosa, Maltosa, Arabinosa, Xilosa, Ribosa, Acido Urico, creatinina, cuerpos cetónicos, ciertos aminoácidos, ác. oxálico, sustancias fenólicas, ác. hipúrico, ác. homogentísico, ácido glucurónico, glucuronatos conjugados, caronamida, cloral, formaldehído, isoniazida, ác. p-aminosalicílico, salicilato y ác. salicílico, ác. ascórbico a una concentración de 50 mg/100 ml. La terramicina, estreptomicina, clorotetraciclina y cloromicetina, causan pruebas falsas positivas a concentraciones altas (10 mg. por ml.). Ni la Penicilina, ni la Sulfanilamina interfieren.

Valores normales:

Las pruebas en orina de niños y adultos normales son Negativas. Los niños normales durante los primeros 5 días de vida pueden excretar suficiente galactosa para dar una prueba positiva.

#### Bibliografía:

- Benedict S.R.: J. Am. Med. Assoc. 57:1194-1911.
- Bickel H.: J. Pediat. 59:641, 1961.
- Free A.H., Adams E.C., Kercher M.L., Free H.N., Cook M.H.: Clin. Chem. 3:163, 1957.

**PRUEBA DE ANTRONA:** (Prueba para medir carbohidratos)

**Fundamento:** Esta prueba da una reacción positiva en presencia de carbohidratos, tanto reductores como no reductores, por lo que no nos define -- la naturaleza del carbohidrato y es necesaria la confirmación de la naturaleza del carbohidrato por pruebas más específicas.

**Reactivos:** Antrona al 0.2% (P/V) en  $H_2SO_4$  conc.

**Método:** Agregar 0.2 ml. de orina a 2.0 ml. del reactivo y mezclar.

**Interpretación y resultados:**

Esta es una prueba sensitiva pero no específica, un color verde a azul-verde es considerado como una reacción positiva, la cual nos indica la presencia de carbohidratos.

**NOTA:** Berry t Cols. han modificado el método como una prueba de mancha, reduciendo solamente la cantidad de muestra y reactivos.

**Método:** En una placa de porcelana blanca poner 3 gotas de orina y -- agregar 12 gotas de reactivo de antrona al 0.2% (P/V) en Acido Sulfúrico, -- mezclar con una varilla de vidrio.

**Resultado e Interpretación:** Un color verde o azul-verde es una reacción positiva, que indica la presencia de carbohidratos.

**Bibliografía:**

Harper, H.A., Review of Physiologic Chemistry, 12th ed., Los Altos CA, Lange Medical Publications, 1969.

PRUEBA DE SELLWANOFF RESORCINOL.

Fundamento:

La presencia de fructosa en orina se detecta al reaccionar esta con el alcohol en presencia de ácido clorhídrico.

Para la detección de fructosa en orina.

Reactivos: Resorcinol 0.5% (P/V) -----	3.5 ml.
H Cl conc. -----	12.0 ml.
Agua, cbp. -----	35.0 ml.

La mezcla de los reactivos arriba descritos, deben ser preparados el día que se van a utilizar.

Método:

En un tubo de ensaye poner 1 ml. de orina y agregar 5 ml. de mezcla de reactivos. Poner el tubo de ensaye a baño maría hirviente por 10 mi.

Resultados e Interpretación.

El desarrollo de una color Rojo Cereza indica la presencia de fructosa. Trazas de color pueden encontrarse en orinas normales.

Bibliografía:

- Harper, H.A., Review of Physiologic Chemistry, 12th. ed., Lange Medical Publications, Los Altos, California. 1969, 11.

**PRUEBA DE OBERMAYER:****Fundamento:**

El Indican urinario es de origen exógeno; es un derivado de un producto de la hidrólisis del triptofano por las bacterias intestinales. El Indol producido por las bacterias intestinales a partir del triptofano es absorbido, oxidado a Indoxil y conjugado con el sulfato para formar el Indican. -- Una persona con enfermedad de Hatnup, mala absorción intestinal o constipación, puede excretar cantidades aumentadas de Indican en orina. Sin embargo un resultado negativo, no descarta la enfermedad de Hatnup.

**Reactivos:**

$\text{FeCl}_3$  al 0.2% en HCl conc. (P/V).

Cloroformo.

**Método:**

Agregar 5 ml. de reactivo de  $\text{FeCl}_3$  a 4 ml. de orina mezclar invirtiendo el tubo repetidas veces, enseguida agregar 2 a 3 ml. de cloroformo, mezclar invirtiendo el tubo varias veces.

**Resultados e Interpretación:**

El desarrollo de un color azul en la capa de cloroformo indica una -- reacción positiva, y la presencia de Indican en orina.

**Bibliografía:**

Lenvison, S.A., and Mofate, R.P., Obermayer Test in Clinical Laboratory Diagnosis, Lea & Febieger, 1960,559.

**PRUEBA DE SCREENING PARA TIOSULFATO.****REACTIVOS:**

- Azida de sodio al 3% en yodo 0.2 N. (P/V)

**METODO:**

Poner en una placa de porcelana blanca, un pequeño disco de papel filtro --  
agregar 1 gota de crina al disco de papel más 1 gota del reactivo.

**RESULTADOS:**

Un burbujeo inmediato y la decoloración, indican una reacción positiva.

**INTERPRETACION:**

Un paciente con deficiencia de sulfito-oxidasa excreta una cantidad excesiva de tiosulfato, así como de sulfito y S-sulfocisteína. Ya que el sulfito es inestable la presencia de tiosulfato puede resultar ser más confiable en hacer el diagnóstico.

**BIBLIOGRAFIA:**

Fiegl, F., Spor Test un Inorganic Analysis, 5th ed., Elsevier, New York, --  
318, 1958.

## PRUEBA DE SCREENING PARA EL ACIDO METILMALONICO

## REACTIVOS:

- p-nitroanilina 0.1% (P/V) en HCl 0.16 N.  
Estable por lo menos 6 meses cuando se almacena en frasco ambar de vidrio.
- $\text{NaNO}_2$  0.5% (P/V)  
Estable por lo menos 4 meses cuando se almacena a 4°C.
- Buffer Acetato de Sodio 1 M. pH 4.3.  
Disolver 13.6 gr. de acetato de sodio-trihidratado en agua destilada, aforar a 100 ml. Agregar a esta solución 158 ml. de ácido acético 1 M. ajustar pH a  $4.3 \pm 0.2$ . Estable de 2 a 3 meses cuando se almacena a 4°C.
- NaOH, 8N.  
Disolver 32 gr. de NaOH en agua destilada y aforar a 100 ml.
- Solución Standar.  
Preparar solución de ácido metilmalónico 0.025 M. disolviendo 147.5 mg. en 50 ml. de agua destilada, agregar 1 gota de HCl 6 N para aumentar la estabilidad de la solución. Estable 6 meses a 4°C.

## METODO:

En un tubo de ensaye poner 1 gota de orina y agregar 15 gotas de p-nitroanilina 0.1 N más 5 gotas de solución  $\text{NaNO}_2$  0.5%. Agitar el tubo brevemente, la p-Nitroanilina se decolora parcialmente o totalmente. Agregar 20-gotas de buffer acetato pH 4.3, para el desarrollo óptimo de color.

Poner el tubo a baño maría por lo menos 1 min. Períodos de 2 a 3 min. no tienen un efecto apreciable sobre el desarrollo de color. La solución se alcaliniza inmediatamente por la adición de 5 gotas de NaOH 8N. Ocasionalmente se requiere del doble de NaOH. La reacción colorida no se nota inmediatamente.

Con cada serie de muestras de orinas, incluir para comparación un blanco de reactivos (una gota de agua en lugar de orina) y un standar de ácido metilmalónico.

## RESULTADOS:

Desarrollo inmediato de un color VERDE ESPEALDA después de la alcalinización indica una reacción positiva.

NOTA: El color es estable por lo menos de 10 a 15 min.

**INTERPRETACION:**

El ácido metilmalónico es detectable en orina en concentraciones de - 60 mg/100 ml. de orina.

Una muestra de orina que no contiene ácidometilmalónico da un color ca foso en muestras negativas agregar gotas adicionales de NaOH 8 N para asegurar el pH de la solución que debe ser arriba de 2.5.

Los ácidos malónico y etilmalónico dan un color similar, pero más debil que el metilmalónico a la misma concentración.

Algunas drogas reaccionan con el diazo-reactivo para dar un color cafeoso y esto disminuye la sensibilidad de la prueba, si se obtiene un resultado dudoso deberá repetirse la muestra por menos 3 días después de que el paciente ha dejado de tomar el medicamento.

El ácido metilmalónico no es detectable en orinas normales por esta -- prueba de screening, por lo que su presencia es anormal.

**BIBLIOGRAFIA:**

Giorgio, A.J., and Lubby, A.L., A rapid screening test for the detection of congenital methylmalonic aciduria in infancy, Am. J. Clin. Phatol. 52, 374,- 1969.

## PRUEBAS DE TAMIZAJE PARA ACIDO HOMOGENTISICO

Fundamento: El ácido homogentísico presente en orinas de pacientes con alcaptonuria, reduce inmediatamente una solución amoniacal de nitrato de plata a un precipitado negro de plata.

Método: Agregar 5 ml. de solución de nitrito de plata al 3% a 0.5 ml. de orina.

Mezclar.

Agregar 3 gotas de Hidróxido de Amonio al 10%.

Observar la aparición del color.

Resultados e Interpretación:

Positivo: La mezcla se torna negra inmediatamente.

Negativo: No se observa ningún cambio de color en la mezcla.

La enfermedad es rara y se hereda en forma autosómica recesiva, algunos pocos portadores obligatorios, se sabe que excretan pequeñas cantidades de ácido homogentísico en orina, la mayor parte de ellos sin embargo no han sido identificados por medicos bioquímicos.

Las pruebas bioquímicas de la enfermedad dependen principalmente de la identificación del ácido homogentísico en orina mediante sus propiedades reductoras y movilidad cromatografica.

Si la prueba aquí descrita nos diese positiva, se debe proceder a su confirmación cromatografica.

C A P I T U L O   I I I

## METODOLOGIA DIAGNOSTICA:

Con los avances científicos y tecnológicos de las últimas décadas, actualmente es posible aplicar una batería de procedimientos de laboratorio — cualitativos y cuantitativos, para la identificación de un gran número de errores innatos del metabolismo.

Dos de las principales consecuencias de un bloqueo metabólico, impuesto por una deficiencia enzimática genéticamente determinada son: la acumulación de los metabolitos anteriores al bloqueo metabólico y la deficiencia de los metabolitos posteriores. E para la identificación de los metabolitos específicos presentes en concentraciones anormales en la sangre y orina se utilizan básicamente 3 tipos de métodos:

1.- PRUEBAS QUIMICAS CUALITATIVAS: de color, turbidez y precipitación. En la mayoría de las pruebas los reactivos se agregan a la orina líquida o ésta se agrega a un disco de papel filtro impregnado con los reactivos. Por medio de estas pruebas se pueden identificar múltiples desordenes genéticos que afectan el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y mucopolisacáridos.

2.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL: esta metodología es particularmente útil para el estudio de los EIM de aminoácidos. Las muestras biológicas utilizadas son orina líquida o plasma sanguíneo. El método básico consiste, en la aplicación de la muestra en una tira de papel filtro; la separación cromatográfica de los aminoácidos, se efectúa usando determinados solventes. Después del corrimiento cromatográfico, se seca el papel filtro y se aplica un spray de ninhidrina para revelar la posición de los diferentes aminoácidos, los cuales se visualizan por la aparición de manchas color púrpura.

Un sistema que ofrece una excelente separación y resolución de los aminoácidos consiste en la combinación de cromatografía con electroforesis en papel filtro.

3.- PRUEBAS MICROBIOLOGICAS: a) Ensayos de inhibición bacteriana. El-

principio de esta prueba consiste en que la inhibición del crecimiento bacteriano producida por un inhibidor puede ser prevenida por un aminoácido, -- las estructuras químicas del inhibidor y del aminoácido que se pretende identificar son similares. Estas pruebas son estandarizadas de tal manera que en presencia de concentraciones normales del aminoácido no ocurre crecimiento bacteriano pero si los niveles de dicho aminoácido están elevados se previene la inhibición el crecimiento. Sobre una placa de medio mínimo de agar, inoculada con esporas de *B. subtilis* y que contiene el inhibidor, se colocan pequeños discos de papel filtro impregnados con sangre capilar. Después de un tiempo de incubación determinado, el diámetro de una zona de crecimiento bacteriano alrededor del disco es una medida de la concentración -- del aminoácido de la muestra. Actualmente se dispone de ensayos de inhibición bacteriana para fenilalanina, metionina, leucina, tirosina, histidina y lisina, los cuales son utilizables para la detección de hiperfenilalaninemia, enfermedad de la orina de jarabe arce, tirosinosis, histiremia e hiperlisinemia respectivamente.

b) Una prueba microbiológica particularmente útil para la identificación de galactosa es la de Paigen, que utiliza una cepa de *E. coli* que es -- resistente a la destrucción por una bacteriófago en presencia de galactosa o lactosa; en este caso ocurrirá crecimiento bacteriano alrededor de los discos impregnados con sangre provenientes de un individuo con galactosemia.

4.- PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS DE TAMIZAJE POR FLOUORESCENCIA: Estos procedimientos son ensayos enzimáticos cualitativos diseñados para la identificación de defectos enzimáticos específicos por fluorescencia usando eritrocitos como material de estudio. Existen procedimientos de tamizaje por -- fluorescencia para la identificación de los siguientes EIM: a) galactosemia por deficiencia de la transferasa o de la epimerasa de galactosa; b) inmunodeficiencia combinada grave por deficiencia de adenosina desaminada; c) hiperargininemia por deficiencia de arginasa; d) metahemoglobinemia por deficiencia de metahemoglobina reductasa; e) 10 de los 14 EIM del eritrocito asociados con síndromes hemolíticos. Por la gravedad del cuadro clínico y por la posibilidad de terapia, la detección temprana en las primeras tres enfermedades.

La función primaria de todos los procedimientos señalados anteriormente es de selección, un resultado positivo en cualquiera de las pruebas constituye una indicación para la ejecución de estudios bioquímicos confirmatorios. Las grandes ventajas de estos procedimientos son su sencillez, facilidad de implementación y bajo costo, características tales que hacen posible la aplicación de estos métodos a un número elevado de individuos con el objeto de tamizar para EIM. Esta metodología se utiliza básicamente en dos tipos de poblaciones: recién nacidos de la población general para detección temprana y pacientes de consulta hospitalaria con sospecha de enfermedad hereditaria, con fines diagnósticos y terapéuticos.

5.- PRUEBAS CONFIRMATORIAS: La identificación del metabolito presente en cantidades anormales o la positividad para un ensayo enzimático cualitativo conducen al reconocimiento del ciclo del bloqueo metabólico y a la confirmación del mismo por dos tipos de procedimientos: a) cuantificación del o los metabolitos y b) cuantificación de la actividad de la enzima afectada en eritrocitos, leucocitos u otros tejidos obtenidos por biopsia.

Varias proteínas no enzimáticas (hemoglobina, aptoglobinas, inmunoglobinas, albúmina, transferrina, fibrinógeno, alfa-1-antitripsina, seruloplasmina, etc.), involucradas en desordenes genéticos pueden ser identificadas por técnicas electroforéticas frecuentemente los signos y síntomas de los diferentes EIM son inespecíficos, lo que dificulta el establecimiento del diagnóstico y consecuentemente el tratamiento; por esta razón, la búsqueda de anomalías metabólicas en pacientes con enfermedades (probablemente genéticas) no diagnosticadas debe ser una práctica médica sistemática.

Si bien puede efectuarse un elevado número de procedimientos para la detección de los EIM en laboratorios con recursos técnicos, la metodología cuantitativa para la confirmación de defectos específicos requiere equipo y recursos sofisticados, disponibles únicamente en centros hospitalarios de concentración, los que pueden funcionar como centros de referencia. La medicina institucional ofrece las condiciones óptimas para este tipo de actividades asistenciales.

## DIAGNOSTICO PRE-NATAL.

Múltiples EIM pueden ser detectados en el feto in utero a través de la cuantificación de actividades enzimáticas específicas en células fetales obtenidas mediante la aspiración transabdominal de líquido amniótico del útero (amniocentesis). Otro enfoque para el diagnóstico prenatal de EIM implica el análisis del DNA de células fetales con endonucleasas de restricción. -- Estas enzimas son endonucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas en el DNA: dichas secuencias normalmente están compuestas de 4 a 6 pares de bases y cada enzima de restricción reconoce una secuencia específica y corta el DNA en un sitio preciso de esa secuencia. Las endonucleasas de restricción generalizan fragmentos de DNA de diferentes longitudes, los cuales se pueden separar por electroforesis de acuerdo a su peso molecular, posteriormente los fragmentos de DNA, que contienen determinados genes, pueden ser identificados por la técnica de hibridación con DNA complementario o con secuencias de RNA de composición conocida marcados con un isótopo radioactivo; finalmente la localización de fragmentos específicos de DNA es por medio de autorradiografía. Con este tipo de metodología es posible diagnosticar EIM independientemente de que los productos de los genes mutantes no se expresen en las células del líquido amniótico y el diagnóstico puede hacerse por el análisis directo de la estructura del gen anormal o por análisis de ligamiento.

### Análisis directo de la estructura del gene anormal:

Los primeros desórdenes genéticos diagnosticados prenatalmente por análisis directo de la estructura del gen anormal fueron las alfa-talasemias, anemias hereditarias caracterizadas por una síntesis disminuida o ausente de las cadenas alfa de la hemoglobina. La causa más común de las alfa-talasemias es por delección. La delección de uno, dos, tres o cuatro genes alfa origina el estado portador silencioso, el caso de alfa-talasemia, la enfermedad de hemoglobina H respectivamente. Por la gravedad del padecimiento el diagnóstico prenatal está indicado solo para la hidrocefalia fetal por medio del análisis de DNA de células fetales para determinar la presencia o ausencia de genes alfa. El diagnóstico debe incluir el análisis del DNA del feto y de sus padres. Este tipo de estrategia diagnóstica es aplicable a todos -

aquellos desórdenes genéticos, siempre y cuando se disponga de DNA complementarios específicos para determinar la distribución de secuencias específicas en los fragmentos de DNA por hibridación molecular.

#### Análisis por ligamiento.

Se ha descubierto que el DNA que no está implicado directamente en funciones codificadoras o regulatorias es polimórfico y que este polimorfismo a nivel de secuencia de nucleótidos (no reconciliable fenotípicamente) puede alterar sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción o cambiar el tamaño de un fragmento de restricción. Los polimorfismos en sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, adyacentes a genes que conducen a enfermedades, se pueden usar como marcadores genéticos para el diagnóstico prenatal de EIM. Así por ejemplo, el descubrimiento de un polimorfismo en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HpaI, estrechamente ligado al gen estructural que codifica para las cadenas beta de la hemoglobina, se utilizó por primera vez en 1978 como marcador genético para el diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes. La distrofia muscular tipo Duchenne y la fenilcetonuria clásica son otros ejemplos de EIM, que han sido diagnosticados prenatalmente usando como marcadores genéticos -- polimorfismos en sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, estrechamente ligados al gen de la distrofia muscular y al gen de la enzima fenilalanina hidroxilasa.

C A P I T U L O    I V

DATOS CLINICOS A CONSIDERAR EN UN PACIENTE SIFOCIONADO PARA TAMIZ METABOLICO.

- Retraso psicomotor: leve
  - moderado
  - profundo
- Retraso de crecimiento
- Vómitos recurrentes
- Consanguinidad de los padres.
- Antecedentes familiares (especifique)
- Colapso neonatal.
- Hepatomegalia
- Esplenomegalia
- Hepatomegalia en menor de un año (especifique)
- Manifestaciones neurológicas: Convulsiones
  - Neuropatías
  - Ataxia
  - Hipo/Hipertonía
- Manifestaciones cutáneas: Angioqueratoma difuso
  - Alopecia
  - Dermatitis
- Litiasis renal
- Olor peculiar
- Manifestaciones oculares: mancha rojo cereza
  - degeneración retineana
  - dislocación del cristalino
  - opacidad corneal
- Facies toscas
- Sordera
- Hipertrofia gingival
- Manifestaciones óseas (especifique).

## CRITERIOS DE SELECCION PARA TAMIZ METABOLICO

- a) Se estudiarán muestras de orina de:
- 1.- Niños con retardo mental de causa desconocida.
  - 2.- Niños con problemas de lenguaje.
  - 3.- Niños hiperactivos sin antecedentes de problemas perinatales.
  - 4.- Niños con cetoacidosis y retardo en el crecimiento (acidemia metil-malónica).
  - 5.- Todos los casos en que se sospeche una aberración congénita del metabolismo.
  - 6.- Niños con ataxia cerebral intermitente (Enfermedad de Hartnup).
  - 7.- Niños hiperactivos que ocasionalmente presenten ausencias (Enfermedad de Hartnup).
- b) La muestra de orina deberá ser cuando menos de 20 ml.
- c) Después de su obtención se mandará inmediatamente a la Unidad de Genética-clínica, en un frasco adecuado rotulado debidamente; la muestra debe ir acompañada de la forma adjunta debidamente escrita en la que a datos médicos se refiere.
- d) Si no se manda luego, se deberá mantenerse congelada y en este estado se enviará a la Unidad de Genética Clínica.

CAPITULO V

### EJEMPLOS CLINICOS:

La edad de inicio de las manifestaciones clínicas es una variable que - permite hacer una clasificación gruesa de los Errores Innatos del Metabolismo. Si bien el defecto básico está presente desde la concepción y durante toda la vida del paciente, las manifestaciones clínicas no necesariamente inician al nacimiento o persisten durante toda la vida del paciente.

Así por ejemplo, mientras que el albinismo por deficiencia de tirosinasa, se manifiesta al nacimiento, otros EIM, como algunas hiperlipoproteínas - solo se manifiestan en edad juvenil o adulta. La edad de inicio también ha - permitido identificar variantes de una misma enfermedad, en otras palabras, - las manifestaciones clínicas de un mismo EIM pueden iniciarse en los neonatos (variante infantil), en los escolares (variante juvenil) o en los adultos - (variante tipo adulto).

Un ejemplo de este EIM, es la gangliosidosis tipo I ó GM1 en la que se han descrito, las 3 variantes: Infantil, Juvenil y Adulta.

Independientemente de las manifestaciones clínicas en los recién nacidos dependerá del EIM en cuestión, algunas de las manifestaciones, tales como ictericia, hipoglicemia, diarrea, vómitos y trastornos neurológicos, son comunes a diferentes Errores Innatos del Metabolismo.

En lo que se refiere a la severidad de las manifestaciones clínicas, algunos EIM son asintomáticos y no tienen consecuencias, tal es el caso de la - pentosuria esencial, en tanto que otros letales como lo es la gangliosidosis - tipo II ó GM2. En varios EIM la severidad de las manifestaciones clínicas de - penderá de la interacción del paciente con el medio ambiente, ejemplo Galacto - semia Clásica y Feniloaceturia.

Virtualmente el defecto de cualquier vía metabólica conduce a retraso - mental. Así, se han descrito EIM que afectan al metabolismo de los aminoáci - dos, de carbohidratos y de lípidos, así como de moléculas complejas, de pro - teínas plasmáticas, bilirrubinas, vitaminas, electrolitos y elementos traza,-

que son causa de retraso mental.

El cuadro de severidad del daño al sistema nervioso central (S.N.C.), - es diferente de enfermedad a enfermedad y de paciente a paciente con la misma enfermedad. Por ejemplo en fenilcetonuria clásica el cuadro está caracterizado por daño fundamentalmente en la capacidad intelectual, sin afección o solamente en forma breve, del sistema extrapiramidal y del sistema nervioso periférico, en contraste con la enfermedad de Wilson, la cual comúnmente inicia - con síntomas extrapiramidales o psicóticos, mientras que el retraso mental se instala más tardíamente. La diferencia en la severidad del daño se ejemplifica con las variantes de la enfermedad de la orina del jarabe de arce; en el tipo intermitente, el curso de la enfermedad es relativamente benigno, en tanto que en la variedad clásica o aguda el deterioro del S.N.C. es progresivo - y grave. También existen diferencias en la conducta de los pacientes. Por ejemplo, la conducta plácida y aún amigable es frecuentemente observada en pacientes con mucopolisacaridosis tipo Hurler, mientras que una conducta agresiva es común en los pacientes con síndrome de Lesch-Nyhan.

La mayoría de los EIM conocidos, son debidos a defectos enzimáticos intracelulares ó a anomalidades de transporte a nivel de membrana celular.

En esta sección se incluyen, los siguientes ejemplos clínicos: Fenilcetonuria, como ejemplo de un EIM, debido a defectos enzimáticos intracelulares; Cistinuria, como ejemplo de EIM, debido a anomalidades de transporte a nivel de la membrana celular; los substratos afectados en cistinuria son metabolitos pequeños (aminoácidos); y finalmente incluiremos aquellas enfermedades para las cuales se realizaron las pruebas montadas para esta tesis.

**FENILCETONURIA:** Es un EIM, que se produce como consecuencia de la deficiencia genéticamente controlada del sistema fenilalanina hidroxilasa, el cual cataliza la conversión de la fenilalanina en tirosina en el hígado, está constituido por 2 enzimas; fenilalanina-4-hidroxilasa y la dihidropterina reductasa, y se requiere la participación de la coenzima tetrahidrobiopterina.- La falta de cualquiera de estos tres componentes da lugar a un defecto en la hidroxilación de la fenilalanina y, por tanto, ocasiona fenilcetonuria.

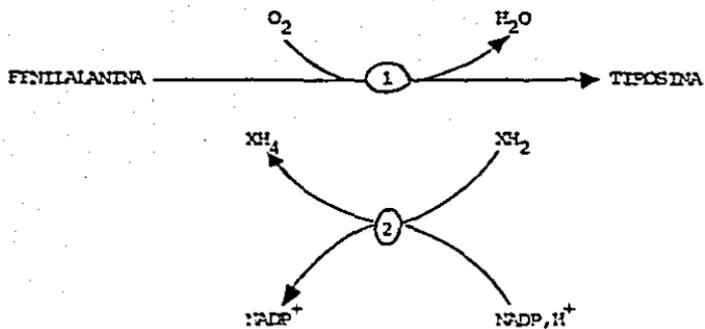


Fig. 1. Sistema fenilalanina hidroxilasa

- 1) Fenilalanina 4-hidroxilasa, y
- 2) dihidropteridina reductasa

En fenilcetonuria clásica, el defecto en la actividad fenilalanina 4-hidroxilasa origina una acumulación de fenilalanina (Valdivieso y Cols., 1977), y como consecuencia, un incremento de la concentración de sus productos metabólicos: -fenilpiruvato, -fenilactato, fenilacetato, OH-fenil-acetato y feniletilamina, entre los principales- en todos los tejidos y fluidos fisiológicos de los pacientes no tratados. El tratamiento con una dieta de bajo contenido en fenilalanina disminuye sus niveles y previene los síntomas clínicos de la enfermedad. En las hiperfenilalaninemias malignas (deficiencia en tetrahydrobiopterina), sin embargo, el déficit en la actividad dehidropteridina reductasa o en la concentración de dihidropteridina da lugar a la falta de respuesta clínica a la dieta baja en fenilalanina.

Las características clínicas de la enfermedad son: retraso mental profundo, microcefalia, hipopigmentación y una serie de síntomas neurológicos y de conducta, tales como convulsiones, hiperactividad, agresividad, agitación y anomalías en el electroencefalograma. La mayoría de estos síntomas desaparecen con la dieta, sin embargo, otros como el retraso mental son irreversibles una vez producidas.

Desde el punto de vista bioquímico se puede interpretar que los síntomas clínicos irreversibles reflejan daños estructurales permanentes, mientras que los reversibles son debidos a defectos funcionales transitorios.

A pesar del gran número de estudios sobre la patogenesis de la fenilcetonuria, el mecanismo por el que la fenilalanina y/o sus derivados metabólicos producen disfunción cerebral es aún objeto de investigación. Varias líneas de evidencia experimental sugieren dos causas principales de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria: mielinización defectuosa y alteración de la síntesis de aminas neurotransmisoras.

#### Mielinización defectuosa:

El fenilcetonúrico nace mentalmente normal y va sufriendo una pérdida progresiva de inteligencia durante los primeros años de vida, precisamente cuando se está produciendo el proceso de mielinización del sistema nervioso central.

Puesto que parece probable la formación de complejos proteína-colesterol-fosfolípidos como precursores de las mielinas (fig. 2), las alteraciones en la composición y estructura de las mielinas observadas en pacientes fenilcetonúricos, pueden deberse a la interferencia en la síntesis de cualquiera de sus componentes.

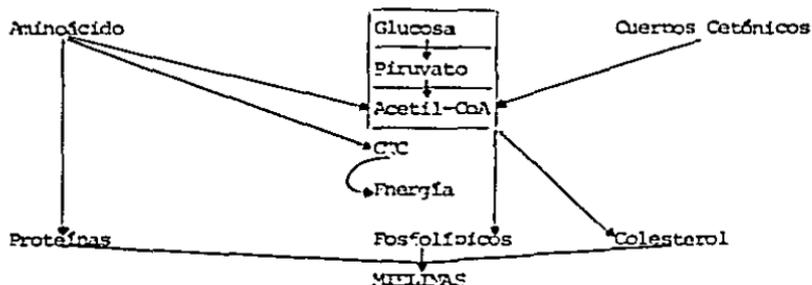


Fig. 2. Esquema de la síntesis de mielina.

La fenilalanina interfiere con la síntesis de proteínas en el cerebro -

a través, al menos, de dos vías diferentes: disminución del contenido de amino ácidos libres debida a la inhibición de sus mecanismos de transporte (Valdiviasos y Col., 1977), y la reducción del  $\text{TRNA}$  iniciador.

Los estudios realizados en ratas con fenilcetonuria experimental han demostrado que las altas concentraciones de fenilalanina circulante interfieren con la glucólisis, dando lugar a un descenso de los niveles de piruvato (Giménez y Col., 1974). La inhibición de la glucólisis en el cerebro puede ser un factor importante en la patogénesis de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria, debido a la disminución en la cantidad de acetil-CoA disponible para la síntesis de lípidos en el cerebro. Por otra parte, la inhibición de la 3-hidroxiúbutirato deshidrogenasa hepática por el fenilpiruvato, dando lugar a la disminución de las concentraciones de 3-hidroxiúbutirato en sangre puede contribuir en este mismo sentido (Giménez y Col., 1977).

Los cuerpos cetónicos (3-hidroxiúbutirato y acetato), que son producto del metabolismo hepático de los ácidos grasos, son utilizados activamente por el cerebro en desarrollo. Los estudios realizados sobre los efectos de la fenilalanina y sus metabolitos sobre las enzimas de la cetólisis en el cerebro de ratas lactantes han demostrado que, especialmente, el fenilpiruvato inhibe las actividades 3-hidroxiúbutirato deshidrogenasa y 3-oxoácido CoA - transferasa, que son las enzimas claves en el proceso de utilización de los cuerpos cetónicos en el cerebro inmaduro (Benavides y Col., 1976). Esta inhibición da lugar a una disminución de la acetil-CoA disponible para la respiración en la mitocondria, así como para la síntesis de colesterol y ácidos grasos en el citosol (figura 3). Puesto que los procesos de mielinización y cetólisis son paralelos durante el período de desarrollo del cerebro, cualquier inhibición de la utilización del cuerpo cetónico durante las primeras etapas del desarrollo pueden tener efectos perjudiciales sobre la mielinización.

Se puede afirmar que la inhibición de la utilización de cuerpos cetónicos, junto con la de glucólisis y la disminución de las concentraciones de aminoácidos en el cerebro, puede explicar la patogénesis del retraso mental característico de la fenilcetonuria, mediante un mecanismo que implica la formación defectuosa de mielinas durante el período de desarrollo del cerebro, -

lo que presumiblemente puede dar lugar a defectos permanentes en el sistema nervioso.

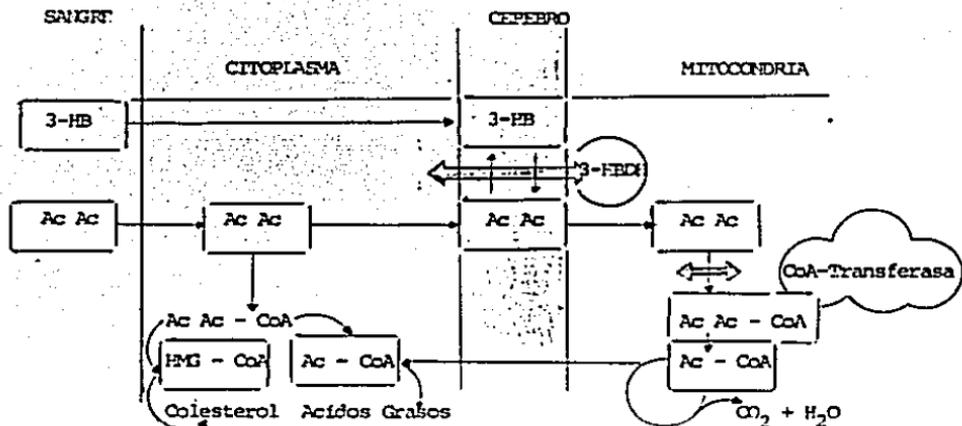


Fig. 3. Utilización de los cuerpos cetónicos en el cerebro en la fenilcetonuria.

Alteraciones de la síntesis de las aminas neurotransmisoras:

La disminución de las concentraciones de las aminas neurotransmisoras relacionadas con los altos niveles de fenilalanina, también ha sido propuesta como una causa de la patogénesis de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria.

La tirosina, que es precursora de las catecolaminas dopamina y norepinefrina, entra en la neurona presináptica desde la sangre mediante un sistema de transporte dependiente de sodio (Aracón y Col., 1981). Después, por la acción de la tirosina hidroxilasa, se convierte en 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA), la cual se descarboxila para dar dopamina. La norepinefrina se forma, finalmente, por la acción de la dopamina beta-hidroxilasa, figura 4.

Se ha observado que la fenilalanina inhibe la tirosina hidroxilasa, el fenilpiruvato, la DOPA descarboxilasa, y el producto de la condensación de la dopamina con el fenilpiruvato inhibe la dopamina beta-hidroxilasa. Por otra parte, la fenilalanina inhibe marcadamente el transporte de tirosina a través de la membrana presináptica (Aragón y Col., 1982). Puesto que, según parece, el transporte es el paso limitante en la síntesis de catecolaminas, esta inhibición puede ser la causa más probable de la disminución de estas aminas en la fenilcetonuria.

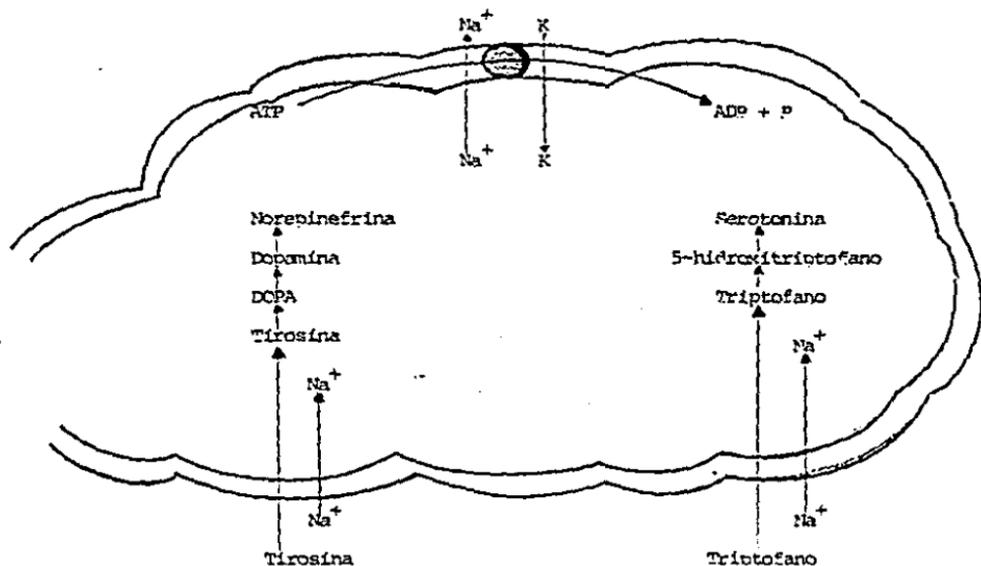


Fig. 4. Síntesis de amina neurotransmisoras en la neurona presináptica.

El 5-hidroxitriptófano, el cual se forma en el cerebro por acción de la triptófano-hidroxilasa, es el precursor de la monoamina neurotransmisor serotonina (5-hidroxi-triptamina). Estudios experimentales han demostrado que la fenilalanina inhibe la síntesis de serotonina, por acción sobre la hidroxilación del triptófano y la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano. Pero al igual que con las catecolaminas, el paso limitante de la síntesis de la sero-

tonina es el transporte del aminoácido precursor. El transporte del triptófano a través de la membrana presináptica se realiza también mediante un sistema osmótico dependiente de sodio que se inhibe por la fenilalanina (Herrero y Col., 1982).

La alteración de la síntesis de las aminas neurotransmisoras puede ser responsable de una serie de síntomas neurológicos y de conducta, característicos de la fenilcetonuria, y que en la mayoría de los casos son irreversibles. Sin embargo en las hiperfenilalaninemias malignas, como la tetrahydrobiopterina es también coenzima de la tirosina hidroxilasa y de la triptófano hidroxilasa, el déficit en la coenzima origina una disminución de las concentraciones de dopamina y serotonina, que persisten incluso cuando se somete al paciente, a una dieta con bajo contenido de fenilalanina.

Aunque hasta cierto punto, aún tiene validez la idea de Menkes (1967), de que nos encontramos lejos de explicar completamente la patogénesis de la anomalía cerebral en la más frecuente de las aminoacidopatías, parece razonable, sin embargo, concluir que el conjunto de anomalías bioquímicas descritas, conducentes a alteraciones del retraso mental y de los síntomas neurológicos y de conducta característicos de la fenilalanina.

TIROSINOSIS (TIROSINEMIA TIPO I, TIROSINEMIA HEREDITARIA CONGENITA).

Modo de transmisión: Autosómico Recesivo.

Descrita por Meades 1932.

Tirosinemia transitoria es un hallazgo frecuente sobre todo en niños -- prematuros (aparece con frecuencia en la deficiencia de vitamina C (escorbuto). Esta puede revertirse mediante la administración de vitamina C.

La tirosinosis es una enfermedad fatal.

Pruebas de diagnóstico: Prueba de Millon (la cual mide al ácido parahidroxifenilpiruvico y ácido para-hidroxifenil láctico).

Manifestaciones frecuentes:

- Insuficiencia de desarrollo.
- Vómitos.
- Diarrea
- Distensión abdominal.
- Hepatomegalia
- Hip glucemia
- Raquitismo
- Vitamina D-resistente entre los primeros meses y 4 años de edad.
- Hepatoesplenomegalia
- Cirrosis nodular del hígado

Puede presentarse también:

- Trombocitopenia y pigmentación de la piel.

La forma aguda produce la muerte en el primer año de edad.

La forma crónica algunos pacientes llegan a adultos.

Es un defecto hereditario de la Hidroxilasuccetoacetato (FAA) y de la - Hidroxilasa maleil acetoacetato (GWA).

Prevalencia en cuanto a sexo: Mujer 21:16 Hombres.

En la Orina encontramos: Succinil acetona y succinil acetoacetona, aminoaciduria generalizada, fosfatos, glicosuria y uricosuria.

Distribución mundial, con prevalencia en Quebec (Canadá).

Terapia: Dieta combinada de tirosina, fenilalanina y metionina bajas --  
complementar con cisteína.

## HOMOCISTINURIA.

Modo de Herencia: Autosómico Recesivo.

Descrita por Carson y Neill 1962.

- El trastorno casi iguala a la fenilcetonuria en importancia numérica.
- La enfermedad se asocia a las anomalías del tejido conjuntivo, trombosis y retraso mental. Es frecuente la dislocación del cristalino.
- Existe deficiencia de la Cistationina Sintetasa en el paso metabólico desde la Metionina a la Cistina.

Hallazgos Biológicos Característicos: Niveles altos de homocistina y - disulfuro mixto en orina y plasma a menudo acompañado de hipermetioninemia.

Características Clínicas:

- Dislocación del Cristalino
- Osteoporosis
- Trombocitopenia
- Cabello fino y escaso
- Algún grado de deficiencia mental.

- La dislocación del cristalino se presenta después del primer año de edad y la trombosis arterial y venosa son frecuentes y pueden causar la muerte desde la infancia hasta la mitad de la vida adulta.

Fisiopatología: Deficit de la actividad de la cistationina sintetasa - en el hígado.

- La cistina llega a ser un factor dietético esencial para la formación de las proteínas estructurales y enzimáticas cuando su síntesis por la vía de la cistationina está bloqueada.

Diagnóstico: En pacientes con síndrome semejante a Marfan y padres normales.

- Una prueba de selección útil es la Nitroprusiato de Plata en orina -- después de positiva la prueba de Ciano-nitroprusiato.

Tratamiento: Suplemento de dieta pobre en metionina con cistina, puede ser necesario para un crecimiento normal, y suplemento de la dieta con homocistina y cistina.

## ENFERMEDAD DE LA ORINA DEL JARABE DE MAPLE.

Descrita por Menkes Hurst y Craig 1954.

- La enfermedad se caracteriza por un exceso de Valina, Leucina o Iso-leucina y sus correspondientes cetoácidos en plasma y orina.
- El nombre de la enfermedad se deriva de un olor característico de la orina y sudor, atribuido a un derivado no identificado de la isoleucina.

### Características Clínicas:

- En los primeros días de vida se observa normalmente, dificultades en la nutrición, letargia, anorexia, rigidez episódica y a veces convulsiones, rigidez de descerebración.

Modo de Herencia: Autosómico Recesivo, afecta a ambos sexos.

### Fisiopatología:

- Deficiencia de la actividad de la descarboxilasa de la cadena ramificada cetoácida, el grado de elevación de la leucina es mayor que el de otros aminoácidos involucrados.

- Estructuralmente el cerebro muestra una formación defectuosa de mielina en la sustancia blanca, astrocitosis y descenso en la oligodendrogalia.

Diagnóstico: Por la demostración del exceso de leucina, isoleucina y valina en la orina y sangre y por la cetoaciduria.

\*\* El olor anormal de la orina parecido al Jarabe de Maple.

\*\* La prueba del cloruro férrico normalmente es Positiva.

\*\* La prueba de D.N.P.H. normalmente da un precipitado inmediato y copioso en la orina.

### Pronóstico y Tratamiento:

- Terapia dietética: Suplemento de gelatina con cistina y otros aminoácidos esenciales distintos de la Leucina, Isoleucina y Valina.
- Los niños que presentan la forma intermedia o transitoria se tratan con una dieta baja en proteínas.
- Terapia Intravenosa con soluciones glucosadas deben aplicarse durante el estado agudo de la enfermedad.

**ALCAPTONURIA:**

Modo de Transmisión: Autosómico Recesivo.

Características Clínicas: No presentan síntomas manifiestos.

- Casi todos los pacientes sufren síntomas artríticos en su segunda ó tercera década.

- Durante los primeros años la única manifestación es el oscurecimiento de la orina, debido a la eliminación de alcaptona la cual en contacto con el aire se oxida y le confiere a la orina un color negro ó marrón oscuro permanente.

- En ausencia de la oxidasa del ácido homogentísico, este se excreta en orina en cantidades considerables.

Pronóstico y Tratamiento:

- Dieta baja en proteínas y dosis liberales de vitamina C.

- El pronóstico es bueno cuando no existen complicaciones raras.

## MUCOPOLISACARIDOSIS

Los mucopolisacáridos forman parte de la sustancia fundamental del tejido conectivo. Existen varios tipos de ellos:

Mucopolisacáridos del tejido conectivo:

Mucopolisacáridos

Sitio donde se encuentran

NO SULFATADOS:

Condrotín

Cornea

Acido Hialurónico

Humor vitreo

Fluidos sinovial

Cordón umbilical

SULFATADOS:

Queratosulfato

Cornea

Cartilago

Nucleos pulposos

Heparitan sulfato

Aorta

Condrotín sulfato A

Cornea

Cartilago

Condrotín sulfato B

Piel

Corazón

Aorta

Condrotín sulfato C

Cartilago

Tendón

Heparina

Todos los enumerados anteriormente son polímeros de alto peso molecular formado por unidades de hexosaminas y ácidos hexaurónicos que se unen formando cadenas largas.

El estudio químico de estas sustancias fue iniciado por Kruckenberg en 1894, quien aisló un mucopolisacárido de cartilago con hidróxido de sodio diluido. Schmiedeberg dedujo que este material estaba unido a proteínas y el término de mucopolisacárido fue sugerido por Meyer en 1939 para describir a polisacáridos de origen animal que contenían hexosamina y que podían ocurrir en estado puro o bien conjugados con proteínas. El término sigue usándose en la actualidad a pesar de que se han propuesto distintas nomenclaturas.

El conocimiento de los mucopolisacáridos tuvo poco interés clínico hasta en 1952, en que Hurler describió por primera vez a un enfermo con un Error -- Congénito del metabolismo que denominó "Gargolismo" y que atribuyó a una mucopolisacaridosis. De esa fecha al presente, se han descrito varios tipos de errores congénitos del metabolismo de los mucopolisacáridos que se caracterizan por una acumulación excesiva de estas sustancias en distintos tejidos y órganos, así como por una excreción aumentada de mucopolisacáridos en orina.

Las diferencias entre los distintos tipos de mucopolisacaridosis son -- tanto clínicas como bioquímicas, aceptándose en la actualidad que existen -- cuando menos 6 variedades que se describen a continuación:

**TIPO I. (Síndrome de Hurler).**

Se caracteriza clínicamente por retraso mental profundo, alteraciones -- esqueléticas mas o menos típicas, opacidad corneal progresiva, hepatomegalia y habitualmente muere antes de los 10 años.

En orina se excretan cantidades anormales de condroitín sulfato y heparitín sulfato.

Se hereda en forma autosómica recesiva.

**TIPO II. (Síndrome de Hunter).**

Desde el punto de vista clínico es similar al síndrome de Hurler, pero -- tiene un curso más benigno y se presenta exclusivamente en varones.

En orina se excretan los mucopolisacáridos condroitín sulfato y heparitín sulfato.

Se transmite en forma recesiva al cromosoma X.

**TIPO III. (Síndrome de Sanfilippo).**

Se caracteriza por retraso mental profundo, escasas malformaciones es-- queléticas, no hay opacidad corneal y la hepatomegalia es moderada.

Excretan heparitín sulfato en orina y es autosómica recesiva.

**TIPO IV. (Síndrome de Morquio).**

Se presentan importantes deformidades esqueléticas, siendo el intelecto normal, no hay hepatomegalia y la cornea se opacifica tardíamente.

En orina excretan queratosulfato.

Se hereda en forma autosómica recesiva.

**TIPO V. (Síndrome de Scheie).**

Clínicamente son sujetos afectados tienen inteligencia normal, trastor-

nos esqueléticos moderados, e importantes alteraciones oculares con te-  
tinitis pigmentosa e intensa opacidad de la córnea.

En orina excretan condroitín sulfato B.

Se hereda en forma autosómica recesiva.

TIPO VI. (Síndrome de Marateaux-Lamy).

Se presenta con importantes alteraciones esqueléticas y corneales, sien-  
do la inteligencia normal. Hay hepato-esplenomegalia importante.

En orina se excretan Condroitín sulfato B.

Se hereda en forma autosómica recesiva.

El diagnóstico de estos padecimientos se puede sospechar sobre bases —  
clínicas, y se confirma demostrando excreciones aumentadas de mucopolisacá-  
ridos en orina, particularmente si se estudia en la niñez ya que hay evidencia-  
de que pasado el tiempo, algunos enfermos dejan de excretar cantidades anoma-  
les de mucopolisacáridos en la orina. Este método de diagnóstico es evidente-  
mente el único práctico de realizar en estudio de población, ya que la otra -  
forma de hacerlo, demostrando la presencia de gránulos metacromáticos en cul-  
tivo de fibroblastos es muy complicada y no aplicable a estudios en masa.

En relación a la base bioquímica de estos cuadros, recientemente se ha-  
demostrado la deficiencia de una enzima labil galactosidasa en el hígado y ri-  
ñón de pacientes con los 3 primeros tipos de mucopolisacaridosis. La B-galac-  
tosidasa es una enzima degradable que actúa sobre la hexosidasa y es posible-  
que su deficiencia pudiera explicar la alteración de los mucopolisacáridos.

En México únicamente se han descrito casos esporádicos de familias con-  
pacientes de esta naturaleza y como uno de los síntomas que produce es el re-  
traso mental, se ha investigado su prevalencia en grupos de niños con dicha -  
alteración.

CAPITULO VI

te las pruebas colorimétricas de turbidez y mancha, la confirmación de los casos tanto positivos como negativos, se basó exclusivamente en datos clínicos y pruebas radiológicas. Todos los casos positivos para aminoácidos fueron reconfirmados en el Instituto Nacional de Pediatría por la técnica de Cromatografía en Capa Fina, donde además se efectuaron 70 tamizajes más, para el control de calidad de las técnicas colorimétricas de tamiz metabólico. En esta Institución nos fué proporcionada la información sobre el control y tratamiento básicamente dietético de los desórdenes genéticos más comunes.

A continuación se desglosan los resultados obtenidos para cada prueba de las que integran el conjunto de tamiz metabólico en función de su sensibilidad y especificidad, teniendo por entendido que Sensibilidad es el porcentaje de falsos negativos que ocurren en los eventos, y especificidad corresponde al porcentaje de falsos positivos que se encuentran en las pruebas de tamiz.

PRUEBA: NITROSONAFTOL

(Perry y cols).

Aminoácido: Tirosina

Sensibilidad: 6.55%

Especificidad: 4.76%

PRUEBA: NITROPRUSIATO DE SODIO.

(Brand)

Aminoácido: Cistina y Homocistina .

Sensibilidad: 0.0 %

Especificidad: 0.6 %

PRUEBA: CLORURO FERRICO

(Renuart)

Sensibilidad: 0.0 %

Especificidad: 2.8 %

**RESULTADOS:**

Se realizaron 578 pruebas de tamiz metabólico, a 60 personas sin sintomatología es decir, personas clínicamente sanas, para probar la sensibilidad y especificidad de las técnicas a implementar, donde pudimos comprobar que - las pruebas colorimétricas, tienen un bajo porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, por lo que son específicas y confiables, únicamente como - pruebas iniciales en la detección de un Error Innato del Metabolismo, sin embargo hay que aclarar que todas estas pruebas, deben ser confirmadas por métodos más específicos, que corroboren el diagnóstico como es la cromatografía de Capa Fina, la electroforesis de alto voltaje y la historia y datos clínicos del paciente.

Aquí solo se mencionaran las pruebas, para las cuales se obtuvo un resultado positivo:

Prueba de Nitrosonaftol (mide tirosina)

Positivos por pruebas cualitativas 15

Positivos por Electroforesis de Alto Voltaje 6

Negativos por ambos métodos 563

Nota: Los 6 pacientes positivos por Electroforesis fueron corroborados por - la técnica de cromatografía de capa fina en el Instituto Nacional de - Pediatría de la ciudad de México, y se lleva un control de los mismos - para su tratamiento en dicha institución.

Pruebas de Ciano-Nitroprusiato, Plata- Nitroprusiato y Nitroprusiato de Sodio de Brand. (miden Cistina y Homocistina en orina)

Positivos por pruebas cualitativas 2

Positivos por Electroforesis de Alto Voltaje 2

Positivos por Cromatografía de Capa Fina 2

Negativos 576

Pruebas de Dinitrofenilhidrazina y Cloruro Férrico

Positivos para fenilalanina y derivados por métodos colorimétricos en el caso de Cloruro Férrico 3, con DNPH 1

Positivos por Electroforesis de Alto Voltaje 2, de los cuales 1 presentó amincaciduria generalizada y el otro fenilalanina aumentada.

Positivo por Cromatografía de Capa Fina 2.

Negativos 575

ESTA TESIS DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

MUCOPOLISACARIDOS :

PRUEBA: TURBIDEZ DE ALBUMINA ACIDA.

(Dorfman)

Sensibilidad: 0.0 %

Especificidad: 10.71 % \* estudios especificos realizados en la unión americana establecieron un 17.32 % .

PRUEBA: CLORURO DE CETIL PIRIDINIUM (CPC)

(Pennock).

Sensibilidad: 10.0 %

Especificidad: 15.47 %

PRUEBA: AZUL DE TOLUIDINA (Pba. de Mancha)

(McKusick)

Sensibilidad: 0.0 %

Especificidad: 14.29 %

Se presenta una tabla donde son mencionados los resultados de 29 pacientes que resultaron anormales para las pruebas de Mucopolisacáridos, de las 168 muestras estudiadas de niños, en los que se sospechaba de un error congénito del metabolismo. Estos 29 niños fueron citados días después, y se les repitió la prueba en orina y se encontró que 21 de ellos dieron de nuevo las pruebas positivas, esto se confirmó de acuerdo al diagnóstico clínico, junto con las radiografías de los pacientes y además se les realizó la prueba de linfocitos vacuolados que dió positiva en la mayoría de ellos y que es una prueba confirmatoria para mucopolisacáridosis.

Se observó de acuerdo a los resultados obtenidos, que la prueba de turbidez de Albúmina Ácida, resultó ser la más confiable y sensible, ya que fué la única donde no se encontraron pacientes falsos positivos, así como tampoco falsos negativos. Lo cual en primer término nos señala que la prueba es reproducible, ya que en una segunda muestra demostró su confiabilidad obteniéndose los mismos resultados que en la primera muestra, por otro lado en ningún caso, se vio que las muestras consideradas anormales en la primera muestra, fueran normales en la segunda.

En relación al hecho de que 29 de las muestras estudiadas por los 3 métodos aquí utilizados, hayan resultado positivos para mucopolisacáridos urinaarios no puede interpretarse en el sentido de que 17.32 % de los niños estudiados tengan mucopolisacáridosis. En 1968, se realizó un estudio, en el que se investigaron varias de las pruebas de laboratorio utilizadas para identificar mucopolisacáridosis, en el cual se encontró que el 17.2 % de los individuos sin estos padecimientos, muestran cifras elevadas con las pruebas utilizadas en esta tesis. Por otro lado, hacen alusión también que la prueba de Turbidez de Albúmina Ácida, da pocas falsas negativas ya que en un más de 90% de enfermos con Síndrome de Hurler el resultado es anormal.

Para poder determinar si alguno de los 29 casos aquí descritos presenta realmente mucopolisacáridosis, el primer paso es repetir la prueba con una nueva muestra de orina, ya que como se ve en la tabla aquí descrita en algunos de los casos hubo unas pruebas positivas por x método, que por los otros resultaron negativas. Por consiguiente, aquellos casos en los que se corrobore el resultado, deben de ser revisados desde el punto de vista clínico y estudiados por métodos bioquímicos más complejos, que nos permitan obtener resultados cuantitativos e identificación de los diferentes mucopolisacáridos excretados.

RESULTADOS DE 3 PRUEBAS REALIZADAS EN LA MISMA ORINA DE 29 INDIVIDUOS QUE  
 DIERON POSITIVAS, PARA MUCOPOLISACARIDOS.

CASO	EDAD	METODO TURBIDEZ ALB. AC.	C.P..C	PRUEBA DE MANCHA
2	10 a.	POSITIVA ++	+	+
9	6 a.	" +	+	+
10	7 m.	NEGATIVO	+	+
11	2 m.	"	+	+
12	4 m.	POSITIVA +	+	+
30	4 a.	" ++	++	++
39	7 a.	" +++	++	++
44	4 m.	NEGATIVO	+	+
47	2 a.	"	+	+
51	5 m.	POSITIVA +	+	+
73	2 a.	" +	+	+
74	5 a.	POSITIVA ++	+++	++
78	1 a.	" +	+	+
80	8 m.	NEGATIVO	+	+
82	7 a.	POSITIVA +	+	+
90	7 m.	" ++	++	++
94	9 m.	" +	+	+
99	4 a.	" +	+	+
100	1 a.	" +	+	+
103	1 a.	" +	+	+
111	2 a.	NEGATIVO	+	+
115	3 a.	POSITIVA +	++	+
118	5 a.	" +++	+++	+++
119	2 a.	" +++	+++	+++
120	1 a.	NEGATIVO	++	NEGATIVO
122	3 a.	POSITIVO +	+++	++
123	3 a.	POSITIVO ++	+++	+++
136	2 a.	" ++	+++	++
146	2 m.	NEGATIVO	+	NEGATIVO

El poder precisar quienes de los niños estudiados, padecen realmente-- alguna forma de mucopolisacaridosis, presentan dos puntos de vista de gran - interés.

En primer lugar, el de conocer, la incidencia en nuestro medio de mucopolisacaridosis, como una causa frecuente de retraso mental moderado en niños y , en segundo lugar, permitirá informar a los padres de los niños afectados, de los riesgos de recurrencia del padecimiento. En efecto, ya hemos-- señalado, que estas enfermedades son de naturaleza hereditaria y, por lo tanto, se puede calcular con precisión la posibilidad de que otros hijos de estas parejas salgan afectados.

CAPITULO VII

## DISCUSION :

Dentro de la problemática general de los programas de detección masiva de Errores Innatos del Metabolismo, la fecha idónea para la toma de muestras es un punto importante que está muy relacionado con la infraestructura sanitaria de cada país. La permanencia de las madres en las Maternidades y Hospitales de nuestro país, por espacio de un tiempo medio inferior a las 72 horas, ha imposibilitado la toma de muestras de los recién nacidos antes de abandonar el centro hospitalario. Las muestras de orina tomada una semana después del nacimiento, es la fecha más adecuada para la detección de fenilcetonuria y otras aminoacidopatías y aminoacidurias.

Sin embargo existen otras aminoacidopatías que, por su rápida evolución y gravedad, escapan de este tiempo de selección. Por otra parte la sintomatología que acompaña precozmente a estas enfermedades es casi siempre inespecífica, aunque muy frecuentemente asociada a una afectación neurológica grave. Esto a hecho que con mucha frecuencia, estos neonatos hayan sido considerados por el clínico como posibles traumas intracraneales con hemorragia o parálisis cerebral, y en la mayoría de los casos han pasado a engrosar el número de muertes perinatales de causa desconocida o no bien establecida.

De lo anterior hemos concluido que el estudio de estos errores innatos del metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos intermediarios, azúcares y mucopolisacáridos, han demostrado que la rapidez, tanto en la sospecha por parte del médico, como, por supuesto el estudio metabólico, son la clave del éxito en el diagnóstico y tratamiento. Cabe aclarar que es muy importante la relación que se establezca entre el grupo médico y el de bioquímica especializada, ya que existen variantes de estas enfermedades, que por razones que se desconocen a nivel bioquímico, y que con frecuencia no dependen de la actividad enzimática residual, dan lugar a cuadros clínicos mucho más suaves, con menor riesgo de mortalidad, pero desgraciadamente, con una morbilidad que lleva inherente un daño cerebral irreversible.

Algunas de estas enfermedades son difíciles de tratar, y en algunos casos el diagnóstico prenatal y el consejo genético son la ayuda básica que se puede ofrecer por el momento. Sin embargo existen otras igualmente graves, pero donde el tratamiento consiste en la simple administración de ciertas vitaminas en dosis farmacológicas, tal es el caso de la acidemia metilmalónica, en la que el defecto congénito no está en la proteína enzimática sino en -

la síntesis de la coenzima necesaria para que el sistema funcione.

En vista de lo expuesto, podemos deducir que tanto el diagnóstico rápido y preciso de estas anomalías congénitas como el estudio de su mecanismo de acción a nivel molecular, son imprescindibles para el tratamiento correcto y la prevención adecuada de las mismas.

El objetivo principal en la implementación de las técnicas es el de -- que sean fácil de realizar, aplicables a un gran número de muestras, pero al mismo tiempo específicas y de alta sensibilidad para que el número de falsos negativos sea lo más reducido posible.

Quando una anomalía persiste en la segunda muestra, se pone en conocimiento del Pediatra, para la obtención de nueva muestra, así como para una revisión pediátrica del niño, en algunos casos, en que la primera muestra es claramente anormal y requiere de un tratamiento urgente, se les comunica por teléfono o telegrama a los padres para que acudan a la consulta, para la confirmación de la alteración metabólica.

C A P I T U L O    V I I I

BIBLIOGRAFIA :

- Rosenberg, L.E. INBORN ERRORS OF METABOLISM, En: Bondy, P.K. y Rosenberg, L. E. (eds) , Metabolic Control and disease. W.B. Saunders, Filadelfia, 1980.
- Rosenberg, L.E. y Scriver. Ch. R. DISORDERS OF AMINO ACID METABOLISM. En: - Bondy, P.K. y Rosenberg, L.E. (eds.), Metabolic Control and Disease. W.B., - Saunders, Filadelfia , 1980.
- Segal, S. y Thier. S.O. CYSTINURIA. En: Stanbury, J.B., Myngaarden, J.B., -- Fredrickson, D.D., Golstein, J.L. y Brown, M.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, New York, McGraw Hill, 1983.
- Shih, V.E. LABORATORY TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF HEREDITARY METABOLIC-DISORDERS., Cleveland, C.R.C. Pres , 1973.
- Stanbury, J.B. y Cols. INBORN ERRORS OF METABOLISM UN THE 1980's . En: Brown M.S. , Wyngaarden, J.B. , Fredrickson, D.S. Goldstein, J.L. y Brown, M.S. - ( eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, Nueva York, McGraw-Hill, 1983.
- Weisberg, R.A. y Leder, P. FUNDAMENTALS OF MOLECULAR GENETICS . En: Stanbury, J.B. Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. - ( eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, Nueva York, McGraw-Hill, 1983.
- Blau, K., En: AROMATIC AMINO ACID HYDROXYLASES AND METAL DISEASE., Youdin-M.B.H., Chichester, ed. John Wiley, 1979.
- Woo, S.L.C. y Cols. PRENATAL DIAGNOSIS OF CLASSICAL PHENILKETONURIA BY MAPPING, JAMA, 251: 1998-2002, 1984.
- George, H. Thomas, Ph.D. , R. Rodney Howell, M.D. SELECTED SCREENING TESTS-- FOR GENETIC METABOLIC DISEASES., United States of America, Year Book Medical Publishers, 1973.

Sally Kelly, Ph. D., M.D. BIOCHEMICAL METHODS IN MEDICAL GENETICS, Illinois U.S.A., Publisher Charles C. Thomas, 1977.

HeCl<sub>3</sub> ( PKU ) : modificación del método de Penuart., A. W. SCREENING FOR IN BORN ERRORS OF METABOLISM ASSOCIATED WITH MENTAL DEFICIENCY OR NEUROLOGICAL DISORDERS OR BOTH NEW ING., J. Med. 274:384-387,1966.

Brand Test: (modificación de Brand et al. ), Brand.E.M., Harris M. and Bilon, S. CYSTINURIA: EXCRETION OF CYSTINE COMPLEX WHICH DECOMPOSES IN URINE WITH LIBERATION OF FREE CYSTINE, J. Biol. Chem. 86:315, 1930.

Nitrosopnhtol Test: (Modificación of method of Perry et al) Perry, T.L., Hansen. S. and Mac Dougall, L. URINARY SCREENING TEST IN PREVENTION OF MENTAL DEFICIENCY, Chad. M.A.J. 95:39-95, 1966.

Sweetman L., Hoffmann G., Aramaki S.: NEW DIAGNOSTIC TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF ORGANIC ACIDEMIAS, Enzyme 38:124-131, 1987.

Nyhan, William L. HERITABLE DISORDERS OF AMINO ACID METABOLISM, U.S.A., Ed. J. Wiley & Sons Inc, 1974.

Aragón, M.C., Gímenez. C. y Valdivieso, F.J., PHENILKETONURIA, Neurochem, - 39:1185-1187, 1982.

C A P I T U L O IX

## RESUMEN:

La identificación precisa de un Error Innato del Metabolismo en un individuo (recién nacido de la población general o paciente de la consulta hospitalaria), conduce al estudio de la familia del paciente con fines de diagnóstico, manejo médico y prevención primaria mediante asesoramiento genético este último procedimiento tiene por objeto el informar a los padres del paciente o al paciente, de los riesgos que tienen de procrear un hijo con la misma enfermedad, así como el de ayudar a llevar a cabo las decisiones emanadas de dicho asesoramiento genético es un proceso de comunicación relacionado con problemas humanos que se generan con la ocurrencia de una enfermedad hereditaria en una familia o su riesgo de recurrencia. Lleva implícita la intervención de una ó más personas debidamente capacitadas para ayudar a la familia o individuos en los siguientes aspectos:

1.- Comprender los hechos médicos, inclusive el diagnóstico, la historia natural de la enfermedad y atención o tratamiento disponible.

2.- Entender los mecanismos hereditarios por los que se produce el padecimiento y el riesgo de recurrencia en parientes específicos.

3.- Conocer diversas opciones encaminadas a evitar la recurrencia.

4.- Elegir el curso de la acción que el consultante o los consultantes consideren apropiado de acuerdo a sus riesgos y metas familiares, y actuar de acuerdo con esa decisión.

- Realizar la mejor adaptación posible del sujeto afectado; y determinar los riesgos de recurrencia del padecimiento en estudio para el resto de sus familiares.

Al mismo tiempo que se educa o informa al consultante sobre estos puntos, se hace lo posible por cambiar actitudes, comportamiento, esquemas cognoscitivos y de entendimiento intelectual teniendo como meta específica modificar las funciones cognoscitivas y afectivas de la persona al grado de que su conducta sea más "eficiente" y el individuo se sienta "mucho mejor". Sin embargo, aunque el procedimiento, las fases y las metas del asesoramiento genético parecen fáciles de alcanzar, en la práctica, al conocerse en una familia el diagnóstico de una enfermedad hereditaria se produce una serie de reacciones, en ocasiones patológicas, en el paciente o sus familiares. Por lo que es vital tratar estos casos desde un aspecto psicológico, ya que las soluciones posibles a la crisis inicial dependerá en buena parte de las "bases familiares" del propósito y del impacto producido por la enfermedad; ya-

que este impacto puede ser tan grande que el asesoramiento genético puede -- llegar a tener que derivarse por completo a psicología clínica, trabajo social o psiquiatría.

Los problemas genéticos pueden afectar la imagen social de los progenitores (auto-estima) o su estabilidad personal, llegando incluso a producir-- discordia en la pareja, divorcio, disfunciones sexuales y hasta impotencia,-- relaciones extramaritales o aumento de alcoholismo. Es necesario recalcar a los progenitores que no descarguen el cuidado del enfermo o los enfermos a los hermanos sanos, ya que pueden producirles daño psicológico; a tal grado que no es raro que hermanos de pacientes con enfermedades hereditarias lleguen a la farmacodependencia o al psiquiatra. La detección de este tipo de problemas hace necesario que el asesoramiento genético sea impartido por un grupo multidisciplinario.

Ya que la mayoría de los EIM conocidos tienen un modo de herencia autosómico recesivo, los padres del individuo afectado tienen un riesgo de 25% de tener un hijo con el mismo EIM. Si el EIM en cuestión se puede diagnosticar prenatalmente, pueden ser posibles varias opciones tales como: (a) terapia fetal si el desarrollo de la patología tisular empieza in utero, mediante la administración a la madre de dosis farmacológicas de vitamina B<sub>12</sub>, (b) terapia inmediatamente después del nacimiento. Por ejemplo: dieta con un bajo contenido de fenilalanina para el tratamiento de la fenilcetonuria clásica. (c) aborto terapéutico si trata de un EIM letal o grave para el cual no existe una terapia. Por ejemplo: la enfermedad de Tay-Sachs. Después del asesoramiento genético, la pareja dispone de la información necesaria para decidir sobre su futuro reproductivo. Considerados individualmente, la mayoría de los EIM son poco frecuentes; sin embargo, como grupo constituyen un problema importante de salud, lo que justifica la búsqueda sistemática de individuos con estos desórdenes hereditarios. La búsqueda de una población de individuos que tienen ciertos genotipos que se conoce que están asociados con o predisponen a enfermedad en los individuos o en sus descendientes, se denomina TAMIZ GENÉTICO.

El tamiz genético se lleva a cabo básicamente en: (a) recién nacidos de la población general para detección temprana (antes del inicio de los -- síntomas clínicos) de EIM tratables, por ejemplo, fenilcetonuria, galactosemia, etc. (b) poblaciones de alto riesgo con el propósito de conocer portadores de genes deletéreos; por ejemplo típico es la enfermedad de Tay-Sachs, -- EIM que está delimitado principalmente a una población definida: 1:30 judíos

Ashkenazi son portadores del gen para la enfermedad de Tay-Sachs. A los portadores identificados se les imparte asesoramiento genético antes de que nazca un individuo afectado para que decidan informadamente sobre su futuro reproductivo.

Los métodos para el tratamiento de los EIM están dirigidos a :

1.- Reducir la concentración de los metabolitos acumulados antes del bloqueo metabólico.

a) Por restricción dietética. Ejemplo: dieta con un bajo contenido de fenilalanina en pacientes con fenilcetonuria clásica.

b) Por depleción. Ejemplo: remoción de cistina con D-penicilamina en la cistinuria.

c) Por reducción en su síntesis. Ejemplo: inhibición de la enzima xantina-oxidasa con alopurinol para reducir la concentración de ácido úrico en pacientes con gota primaria.

2.- Suministrar concentraciones adecuadas de los metabolitos posteriores al bloque metabólico. Ejemplo: administración de nicotinamida a pacientes con enfermedad de Hartnup.

3.- Amplificar la actividad de la enzima o reemplazar la proteína mutada.

Muchas reacciones enzimáticas requieren cofactores (una vitamina o un metabolito derivado de la vitamina) para actividad catalítica normal. Varios EIM son el resultado de mutaciones que afectan la capacidad de la apoenzima para combinarse con su cofactor o la biosíntesis de la forma activa del cofactor ; la suplementación con el cofactor específico puede aumentar la actividad catalítica residual de la apoenzima. Actualmente se conocen más de 25 EIM que responden a suplementos de vitaminas o a un cofactor específico.

La terapia por reemplazamiento de enzimas intracelulares se ha intentado básicamente en los EIM por asesoramiento lisosomal, y en términos generales los resultados terapéuticos han sido poco favorables. Otros recursos terapéuticos incluyen el trasplante y la remoción quirúrgica.

Teóricamente, la curación ideal de los EIM consistiría en la inserción de un segmento normal de DNA que codifique para la Síntesis del producto génico normal (terapia génica); pero este tipo de terapia actualmente no es disponible. Sin embargo, en los últimos años se han logrado avances espectaculares en la metodología de recombinación in vitro de ácidos nucleicos y en las técnicas de clonación molecular de DNA. Estos recursos metodológicos, están englobados en el término de Ingeniería Genética Molecular.