

DESPISTAJE METABOLICO DE ALTO RIESGO: RESULTADOS DE LOS DOS PRIMEROS AÑOS DE ESTUDIO EN MARACAIBO

Humberto Moreno Fuenmayor, Blanca González y Miriam Suárez-Muñoz*

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en los dos primeros años de estudio sobre despistaje metabólico en una población de alto riesgo.

Los resultados preliminares parecen indicar una mayor incidencia de cistinuria en la población de Maracaibo, basados en la positividad de la prueba del nitroprusiato de sodio y en hallazgos en la cromatografía unidimensional descendente.

INTRODUCCION

Para los genetistas y bioquímicos interesados en los aspectos moleculares de la herencia, está claro que toda la patología hereditaria puede explicarse en forma simple en base a alteraciones del material hereditario, únicas o múltiples, puntiformes o extensas; afectando uno o varios genes en el mismo o diferentes cromosomas.

Los errores ingénitos del metabolismo (EIM), constituyen el ejemplo clásico de mutaciones en el ADN (o a cualquier otro nivel en los mecanismos de síntesis protéica), las cuales dan origen a una patología hereditaria variada y cada vez más importante.

* *Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1154. Maracaibo, Venezuela.*

Las aberraciones cromosómicas son conspicuas, no sólo al estudio microscópico de las mismas, sino también por la severa afectación de la morfogénesis que ellas producen en el individuo. Sin embargo, existen también trastornos morfogenéticos hereditarios graves, los cuales hasta el momento no pueden explicarse ni por un trastorno cromosómico evidente por las técnicas de análisis actuales, ni por un fenotipo definido, que ponga de manifiesto la mutación subyacente sospechada. Es probable que ello se deba a que la alteración enzimática afecta enzimas del desarrollo, cuya acción es corta y finita durante la vida intrauterina sobre mecanismos de migración y diferenciación celular importantes en morfogénesis. Siguiendo a otros autores, sería lícito llamar a este grupo de malformaciones congénitas, sobre todo aquellas que exhiben mecanismos de herencia mendeliana, los errores ingénitos de la morfogénesis (21).

Es conocido el hecho de que ciertos trastornos enzimáticos o endocrinos influyen sobre la morfología del individuo en la vida extrauterina: las mucopolisacaridosis, la aciduria arginosuccínica, las lisinurias, el síndrome adrenogenital congénito. En otros casos, el problema metabólico que afecta la morfogénesis es evidente al nacimiento o tempranamente después de él; tal ocurre en las mucopolisacaridosis. Más aún, en algunos síndromes morfogenéticos se han observado ciertas alteraciones metabólicas, al parecer no directamente implicadas, pero que apuntan hacia una relación importante entre ellas y el defecto morfológico: en algunos pacientes con síndrome de Soto (gigantismo cerebral), se ha observado un aumento de la concentración plasmática de aminoácidos esenciales; la razón glicina/prolina y otras proporciones entre aminoácidos no esenciales y esenciales son tales, que permiten distinguir los pacientes de los controles (1). En el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, se ha encontrado hiperaminoacidemia (aspartato, glutamina, serina y prolina) (24), y aminoaciduria en otro caso (15). En algunas formas de displasia ectodérmica, se han encontrado alteraciones de las inmunoglobulinas (5). En el síndrome de Cornelia de Lange, se ha descrito alteraciones de la actividad de transferasa de uridín difosfogalactosa (3). Los aspectos mencionados, sin embargo, no contribuyen grandemente en la caracterización bioquímica de estos síndromes todavía, con ciertas excepciones, como en el síndrome adrenogenital congénito; pero es básico el desarrollo de técnicas de apoyo para la investigación de ellos en centros de genética humana de diferentes partes del mundo.

Los errores ingénitos del metabolismo sí han sido ampliamente estudiados por diversos autores, desde Garrod (1908) (4, 6, 9-13, 16-20, 23); y la metodología para el diagnóstico y prevención, así como el tratamiento de algunos de ellos, ha sido discutida desde hace más de 20 años. Si bien no siempre es posible evidenciar fácilmente la mayoría de los EIM, muchos

de ellos son susceptibles de detección temprana, o son fácilmente diagnosticables por métodos sencillos de laboratorio. Este hecho y la posibilidad de tratar algunos de ellos junto con la de prevenir, a través de métodos diversos, la repetición del problema en las familias a riesgo, han obligado al desarrollo de centros de despistaje en diversas partes del mundo.

Programas de despistaje de enfermedades metabólicas hereditarias.— Los programas elaborados, pueden separarse en dos grandes grupos:

1— Programas de detección temprana en población general (6, 7, 11, 12, 16). Estos persiguen fines preventivos de vigilancia epidemiológica y permiten descubrir los niños afectados con EIM dentro de los primeros días subsiguientes al nacimiento; semanas o meses antes de que se presente la patología evidente del trastorno e inclusive antes de que se presente el primer caso en la familia.

2— Programas de detección en poblaciones de alto riesgo. Estos persiguen fines principalmente diagnósticos, aunque de acuerdo a la edad a la cual se realicen, pueden también tener fines preventivos. Se usan en poblaciones de pacientes hospitalizados o en la consulta externa hospitalaria, en parientes cercanos de pacientes afectados de metabopatías hereditarias, y en las instituciones para retrasados mentales, con fines diagnósticos.

En nuestro medio se han hecho tímidos intentos de averiguar la incidencia poblacional, pero hasta la fecha no existía un programa estructurado a tal efecto. Nuestro programa fué inicialmente estructurado para despistaje en poblaciones; sin embargo, hasta la fecha ha funcionado como programa de detección en poblaciones de alto riesgo.

En Latinoamérica el único programa que conocemos, de despistaje en poblaciones, es el del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (Velásquez, A. Comunicación personal).

MATERIAL Y METODOS

Nuestro programa de detección en poblaciones de alto riesgo, utiliza como metodología la cromatografía de aminoácidos urinarios uni o bidimensional (4, 22).

Para cromatografía unidimensional ascendente se colocan muestras de orina (sin desalar), en capa fina (Kodak 13255, celulosa), aproximada-

mente unos 3 μ l, y se colocan en tanques de cromatografía, utilizando como solventes (calidad analítica), butanol: ácido acético: agua (Bu: Ac: A, 120,30,50, v/v, a temperatura ambiente. Luego de 3 a 4 horas, cuando el frente de solvente haya recorrido unos 15 centímetros, los cromatogramas se extraen, secan y colorean con ninhidrina al 0,2% en acetona, calentando posteriormente a 60-90°C, para acelerar el revelado. Los cromatogramas se leen inmediatamente sobre un negatoscopio y luego a las 24 horas, después de permanecer en el congelador a -20°C.

Cuando los resultados parecieran dudosos, las muestras se corren en el mismo sistema de solventes, pero utilizando como base papel Whatman # 3. El solvente se deja correr toda la noche (16 horas), en forma descendente, recorriendo aproximadamente 50 centímetros (11). Al cabo de este tiempo, se procede en la misma forma como en el caso de capa fina. Previamente se observan los cromatogramas con luz UV de onda larga. En ocasiones, y cuando el caso así lo amerite, se utiliza el método de sobrerivelado con ácido sulfanílico y reactivo de Ehrlich (11, 19, 22). Finalmente, cuando la identificación del aminoácido se haga difícil, aún después de la cromatografía descendente, se procede a realizar cromatografía en 2 dimensiones sobre cuadros de 20 x 20 de papel Whatman # 3, utilizando como primer solvente, piridina: acetona: 15 N amoníaco: agua (PAA) (90:60:25:25, v/v); como segundo solvente 2-propanol: 89% ácido fórmico: agua (1F) (80:10:10, v/v) (18).

Todos los cromatogramas sobre papel se observan, previa tinción con ninhidrina, con luz UV de onda larga (Black Ray, B-100, Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, California, U.S.A.).

Los resultados de la cromatografía se apoyaban con las pruebas coloradas para aminoácidos siguientes: cloruro férrico, 2-4 dinitrofenilhidrazina, nitroprusiato de sodio y nitrosonaftol (19, 23). A veces se procede a realizar cromatografías especiales, como en los casos en los cuales se sospechare histidinuria o hiperprolinuria. En el primer caso se realiza la cromatografía de extractos alcalinos de piel queratinizada, para detectar la presencia de ácido urocánico (10). En el segundo caso se realiza el método de inclusión de isatina en el solvente, colorante que tiñe intensamente de azul la prolina e hidroxiprolina (20). Para la detección de glúcidos se utiliza la prueba de Benedict y para la de mucopolisacáridos se usa como prueba de despistaje la prueba de Berry (2), y posteriormente la electroforesis sobre acetato de celulosa (14), de los mucopolisacáridos extraídos con etanol después de precipitados con cloruro de cetilpiridinium (8). Dado el hecho de que nuestras técnicas son cualitativas, en la mayoría de los casos la sospecha diagnóstica debe complementarse con estudios especiales bien en orina o en sangre. Para la cuantificación hemos

requerido de la ayuda de otros laboratorios. En la figura 1 se esquematiza la metodología arriba discutida.

Los pacientes estudiados provienen de la Consulta Externa de la Unidad de Genética del Hospital Universitario de Maracaibo; de la Consulta Pediátrica del mismo hospital y otros de la localidad; y de pacientes referidos a nosotros de otras consultas hospitalarias y privadas de la ciudad y áreas de influencia. La mayoría de ellos lo constituyen niños con distinto tipo de síndromes malformativos y de retraso psicomotor, pero también se reciben muestras de pacientes que ingresan a la consulta por asesoramiento prenupcial, así como otros con diferente tipo de patología renal (p. ej. litiasis).

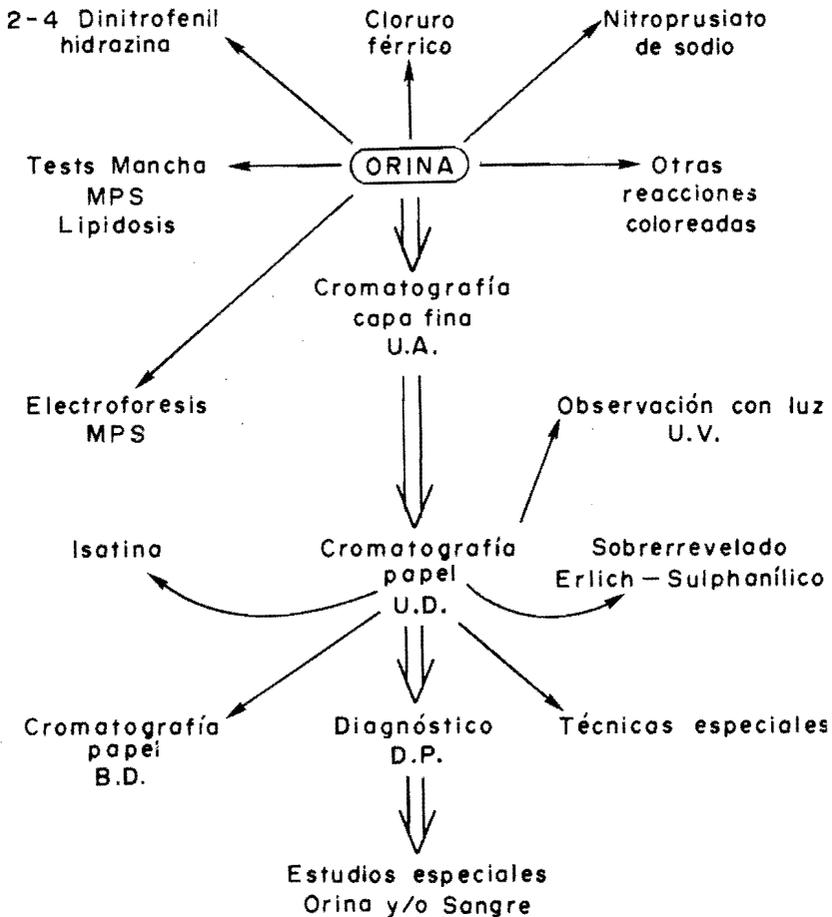


Fig. 1.— Esquema de la metodología utilizada. UA: Unidimensional ascendente; UD: Unidimensional descendente; BD: Bidimensional; MPS: Mucopolisacáridos; D: Definitivo; P: Presuntivo.

Como población control en este estudio utilizamos 100 muestras de orina recogidas al azar de la Sección de Uroanálisis del Hospital Universitario de Maracaibo, obtenidas de pacientes del bloque de Pediatría, y de los Servicios de Medicina, Cirugía y Consulta Externa de adultos.

RESULTADOS

Los resultados de la primera cromatografía son dudosos en muchas ocasiones, por la presencia de compuestos ninhidrina positivos; sobre todo en lactantes y en pacientes hospitalizados. Los leches a las cuales se les añade D,L-metionina, ocasionan que el lactante excrete en exceso D-metionina, la cual migra a la misma altura que la forma levógira (11). Este dato es a veces difícil de obtener en la primera ocasión, pero debe considerarse previo a emitir cualquier diagnóstico. Los pacientes hospitalizados reciben diferentes tipos de medicamentos, los cuales (o sus metabolitos), pueden aparecer como compuestos ninhidrina positivos (ampicilina, gentamicina, cefaloridina), o como compuestos altamente fluorescentes en la cromatografía sobre papel. La orina de pacientes que han ingerido aspirina, dá una característica reacción violeta-escarlata con el cloruro férrico.

La identificación de estos compuestos es a veces imposible por estos métodos y se prefiere repetir el estudio después de tener al paciente libre de medicamentos por lo menos durante 3 días. La dieta puede ser importante para evaluar ciertas aminoacidurias (histidina, triptofano, otras).

Los compuestos fluorescentes normalmente observados con luz ultravioleta de onda larga son varios. El triptofano puede identificarse bien. Existen otros compuestos que aparecen constantemente, cuya naturaleza está en estudio. Los beneficios de esta técnica no se han analizado todavía.

Hasta el momento de este reporte se han analizado 199 muestras de orina de la población arriba mencionada. Los resultados, listados por diagnóstico, se muestran en las tablas I y II.

De las orinas analizadas de la población control, a las cuales se les practicó la prueba del nitroprusiato de sodio, 9% de ellos dieron la prueba positiva. La positividad se evaluó de 0 - 4 cruces: 7% fueron (+) y 2% (++) .

DISCUSION

Puede observarse, que el 19,9% de los casos estudiados corresponden al diagnóstico de mucopolisacaridosis. Estos están desglosados por diagnós-

tico clínico en la tabla II. La mayor incidencia de estas enfermedades, como grupo, puede deberse al error de muestreo ocasionado por su conspicuidad, y al hecho de que estamos analizando precisamente una población de alto riesgo.

Entre las aminoacidurias detectadas, nos llama la atención el que existan 5 individuos (2,5% del total escrutado y 29,4% del total de aminoacidurias) con excreción aumentada de cistina (1+, 2+), y con o sin dibá-

TABLA I

AMINOACIDURIAS DETECTADAS EN 199 MUESTRAS

Beta amino isobutrico aciduria (BAIA)	1
Fenilcetonuria	1
Homocistinuria	2
Histidinuria	2
BAIA + alaninuria	1
Cistinuria (adultos)	5
Cistinuria (niños)	1
Hidroxiprolinuria	1
Síndrome de Fanconi	2
Inmunoglicinuria	1
Mucopolisacariduria y/o Berry (+) con/sin signos clínicos de mucopolisacaridosis	10
Total	27

TABLA II

**MUCOPOLISACARIDURIAS O BERRY POSITIVOS +
(SOSPECHA CLINICA)**

(Hunter) MPS tipo II	1
(Morquio) MPS tipo IV	2
(Marateaux-Lamy) MPS tipo VI	2
No identificados clínicamente	5
Total	10

sico aminoaciduria (prueba del nitroprusiato de sodio positiva y evidencia cromatográfica). Además, recientemente se ha detectado un paciente con cistinuria. Levy (9), señala una frecuencia de cistinuria de 1:17.738, según resultados del programa del Laboratorio del Estado de Massachusetts, Departamento de Salud Pública. Desconocemos hasta ahora la frecuencia (incidencia + prevalencia) de cistinuria en nuestra población. Sin embargo, se reporta una alta incidencia de calculosis renal en la consulta de nefrourología de este Hospital (García-Ramírez, R. y Rodríguez-Iturbe, B.: Comunicación personal).

En la población control (orinas obtenidas de la sección de uroanálisis), se practicó la prueba del nitroprusiato de sodio (23), obteniéndose un 9% de resultados positivos: 7%, 1+; y 2%, 2+. Podríamos suponer se trate de heterocigotos para cistinuria tipo II y III (17). Los heterocigotos tipo I no podrían ser detectados por este método, ya que no excretan cistina.

De acuerdo con los hallazgos de Levy y colaboradores (9), en la población de Massachusetts se estima una frecuencia de heterocigotos de 1,5%. Nosotros, aplicando la prueba del nitroprusiato de sodio, observamos una frecuencia de 9% de supuestos heterocigotos, excluyendo los tipo I. Podríamos concluir a priori, que es sugestivo por estos resultados, que la incidencia de cistinuria en nuestra población podría ser superior a la de otras. Pero este tipo de conclusiones parecería precipitada, si se basa solamente en la positividad de la prueba del nitroprusiato. La prueba es positiva cuando la concentración de cistina excede 75 mg/litro. La reacción no es específica para cistina, homocistina, y cualquier compuesto que contenga grupos sulfidrilos libres puede darla. Lewis (13), encontró que la orina de 1:600 jóvenes asintomáticos dieron positiva la prueba del nitroprusiato. Este resultado es muy diferente del encontrado por nosotros, aunque nuestra muestra control es pequeña y muy seleccionada.

Debemos pues afirmar, que son necesarios mayores estudios para comprobar estos hallazgos. La cuantificación de la excreción de cistina en pacientes y controles con la prueba del nitroprusiato positiva, es imperativa.

Concluimos en que el despistaje metabólico de alto riesgo, permite orientar mejor el diagnóstico en diferentes tipos de problemas médicos observados en la consulta hospitalaria. En cuanto a conclusiones relativas a la incidencia poblacional de cierto tipo de errores genéticos del metabolismo en esta ciudad, sólo serán válidas cuando se concluyan los estudios esbozados más arriba. El conocimiento de esta incidencia es importante para poder jerarquizar las necesidades de investigación médica en el área en cuestión.

Es sugestivo, a la luz de estos resultados preliminares, que cistinuria y las diferentes formas de mucopolisacaridosis, deben estar entre las dos primeras enfermedades a estudiar en esta población.

Nota: Recientemente hemos detectado otra familia, en la cual el propósito (30 años) presenta calculosis renal y una prueba del nitroprusiato positiva (3+). Dos hermanos y el padre son también formadores de cálculos renales. En otros dos pacientes de sexo femenino con nefrolitiasis, se encontró solamente un marcado aumento de histidina, cuya relación con la patología renal observada está en estudio.

ABSTRACT

High risk metabolic screening: results of first two years studies in Maracaibo. *Moreno-Fuenmayor H., González B., Suárez-Muñoz M. (Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela). Invest Clín 18(4): 186-196, 1977.* Metabolic screening has been performed on the in and out patient population of a General Hospital in Maracaibo, following a previously published methodology which is discussed. These preliminary results seem to indicate a greater incidence of cystinuria in this population, based on the positivity of the sodium nitroprusiate test and chromatographic findings.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BEJAR RL, SMITH GF, PARK S, SPELLACEY WN, WOFLSON SL, NYHAM WC: Cerebral gigantism: concentrations of amino acids in plasma and muscle. *J Pediat* 76: 105-111, 1970.
- 2- BERRY H, SPINANGER J: Screening test for Hurler's syndrome. *J Lab Clin Med* 55: 136, 1960.
- 3- DAHLQUIG AA, HALL B, KALLEN BB: Blood glucose-galactose-1-fosphate uridin transferase activity in dysplastic patients with and without chromosomal aberrations. *Hum Heredity* 19: 628, 1969.
- 4- EFRON ML, YOUNG D, MOSER HW, MACCREADY RA: A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of aminoacid metabolism. *New Eng J Med* 270: 1378-1383, 1964.
- 5- FAMILUSI JB, JAIYESIMI F, OJO CD, ATTAH ED.B: Hereditary anhidrotic ectodermal dysplasia. Studies in a Nigerian family. *Arch Dis Child* 50: 642-647, 1975.

- 6- GUTHRIE R: Screening for inborn errors of metabolism in the newborn infant: a multiple test program. In: Human Genetics. Bergsma ed. Birth Defects: Original Article Series Vol. IV, N° 6, The National Foundation March of Dimes, 1968.
- 7- GUTHRIE R: Mass screening for genetic disease. In: Medical Genetics, Chap. 22, McKusick V, Clairborne R, eds. H.P. Publishing Co. Inc., 1974.
- 8- HUMBEL R, MARCHAL C, FALL M: Differential diagnosis of mucopolysaccharidosis by means of thin layer chromatography of urinary acidic glycosaminoglycans. *Helv Ped Acta* 24: 648-650, 1969.
- 9- LEVY HL: Genetic screening. *Human Genetics* 4: 1-104, 1973.
- 10- LEVY HL, BADEN HP, SHIH VE: A simple indirect method of detecting the enzyme in histidinemia. *J Pediat* 75: 1056-1058, 1969.
- 11- LEVY HL, MADIGAN PM, SHIH VE: Massachusetts metabolic disorders screening program. I. Technics and results of urine screening. *Pediatrics* 49: 825-836, 1972.
- 12- LEVY HL, SHIH VE, MACCREADY RA: Massachusetts metabolic disorders screening program. In: *Early Diagnosis of Human Genetics*. Harris M, ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1972, pp. 47-66.
- 13- LEWIS HB: The occurrence of cistinuria in healthy young men and women. *Ann Intern Med* 6: 183-192, 1932.
- 14- OMURA K, HIGAMI S, ISSIKI G, NISHIZAWA K, TADE K: Prenatal diagnosis of the Hurler Syndrome: Mucopolysaccharide pattern in amniotic fluid. *Tohoku J Exp Med* III: 87-91, 1973.
- 15- OPITZ JM, ZURHEIM GM, VITALE L: The Zellweger syndrome (cerebro-hepato-renal syndrome). In: *Birth Defects: Original Article Series. Part II. Malformations Syndromes*, Bergsma D, ed. National Foundation March of Dimes, New York. Vol. V (2): 144, 1969.
- 16- SCRIVER CR: Screening newborns for hereditary metabolic disease. *Pediat Clin N Amer* 12: 807-821, 1965.
- 17- SCRIVER CR, ROSENBERG LE: Nature and disorders of cystine and dibasic aminoacid transport. In: *Amino Acid Metabolism and its Disorders*. Chap. 7. Vol. X en la Serie Major Problems in Clinical Pediatrics. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1973.

- 18- SHAW KNF, GUTENSTEIN M, JACOBS ED, BLASKOVICS JC: Biochemical screening and monitoring of patients with phenylketonuria and variant forms of hyperphenylalaninemia. In: Phenylketonuria. Bickel, Hudson, Wolf, eds. 1972. pp. 163-180.
 - 19- SHIH VE: Laboratory techniques for the detection of hereditary metabolic disorders. Chap. 7. CRC Press, 1973.
 - 20- SHIH VE, MADIGAN PM: Improved paper-chromatographic method for aminoacids. Incorporation of isatin, a color reagent, into developing solvents. Clin Chim Acta 24: 481-482, 1969.
 - 21- SMITH DW: Recognizable patterns of human malformations. Major problems in clinical pediatrics. W.B. Saunders Company. 1973.
 - 22- SMITH I: Aminoacid, amines and related compounds. In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. I. William Heinemann, Med Books Ltd., London. 1960.
 - 23- THOMAS GH, HOWELL RR: Selected screening tests for genetic metabolic diseases. Year Book Med Pub Inc. Chicago, 1972.
 - 24- ZELLWEGER H: Cerebrohepatorenal syndrome. In: Birth Defects, Atlas & Compendium. Chap. 112. Bergsma D, ed. The National Foundation March of Dimes. 1973.
-