

REPORTE DE CASOS

Instituto de Neurología y Neurocirugía
Centro Nacional de Genética Médica
Centro Nacional de Investigaciones Científicas

ESTUDIO BIOQUIMICO DE UN PACIENTE CON ENFERMEDAD LISOSOMAL HEREDOMETABOLICA

Lic. Caridad Menéndez,* Lic. Leonardo Dávila,** Lic. Jesús Castro,** Dra. Edelsia Rojas,** Dr. Joaquín Pascual**** y Dr. Carlos Pascual*****

RESUMEN

Se reporta el caso de una niña de 18 meses de edad que presenta características fenotípicas de tipo "hurleroide", a la cual se le realizó la determinación de las enzimas relacionadas con el metabolismo de los mucopolisacáridos (MPS), así como la caracterización cinética de la enzima denominada alfa-L-iduronidasa, cuya deficiencia condujo al diagnóstico de dicha enfermedad.

INTRODUCCION

Las lisosomopatías o enzimopatías lisosomales constituyen un grupo de enfermedades por almacenamiento debido al defecto en la síntesis o alteración de las hidrolasas ácidas o sus precursores que conducen a la acumulación de ciertos metabolitos en las células de diferentes tejidos, y producen un deterioro progresivo de las funciones del sistema nervioso central (SNC) con alteraciones neurológicas severas e irreversibles.

Dentro del grupo de las enfermedades lisosomales se encuentran las mucopolisacaridosis, las cuales se caracterizan en sentido general, por alteraciones esqueléticas (disostosis múltiples), presencia de retraso mental severo y la excreción aumentada de glucosaminoglicanos (GAG) en orina.

La mucopolisacaridosis tipo I o síndrome de Hurler (MPS IH/IS) está caracterizada por la deficiencia de la enzima alfa-L-iduronidasa, con un patrón de herencia autosómico recesivo. En

* Aspirante a Investigadora. Instituto de Neurología y Neurocirugía.

** Aspirante a Investigador. Centro Nacional de Genética Médica.

*** Especialista de II Grado en Pediatría. Instituto de Neurología y Neurocirugía.

**** Doctor en Ciencias Médicas. Instituto de Neurología y Neurocirugía.

***** Investigador Titular. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

algunos países la incidencia se considera entre 1-2: 100 000 nacidos vivos,¹⁻⁴ con una frecuencia de portadores de 1/150 personas.⁵

El presente trabajo tiene como objetivo la comprobación diagnóstica de una paciente con sospecha clínica de mucopolisacaridosis, a la cual se le realizó la determinación de las enzimas relacionadas con el metabolismo de las MPS, así como la caracterización cinética de la alfa-L-iduronidasa leucocitaria.

MATERIAL Y METODO

Presentación del caso

Paciente Y.S.T. de 18 meses de edad, nacida de parto fisiológico, producto de un embarazo normal y padres no consanguíneos.

Ingresa en el Instituto de Neurología y Neurocirugía de Ciudad de La Habana por presentar retraso en el desarrollo psicomotor, melanosis cutánea, facies tosca, puente nasal aplanado, nariz y fosas nasales anchas, hernia umbilical y labios gruesos que se mantienen abiertos.

Se realizaron pruebas metabólicas en orina, consistentes en azul de toluidina⁶ y bromuro de cetil-trimetil amonio (BCTA).⁷

Para la cuantificación de mucopolisacáridos totales en orina de la primera micción de la mañana se utilizó el método del azul cian.⁸

Para las pruebas metabólicas se utilizaron 15 mL de orina de la primera micción de la mañana y se siguió el procedimiento descrito por Perry et al.⁹

Los leucocitos fueron obtenidos a partir de 20 mL de sangre heparinizada, tratada con una mezcla de ACD-dextrán-glucosa en una proporción (1,5-5;0-3,5) (v/v).¹⁰ Se resuspendieron en aproximadamente 500 μ L de agua destilada, y se congelaron y descongelaron varias veces

para facilitar su desintegración y resuspensión.

En la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Lowry.¹¹

Posteriormente se realizó el estudio enzimático leucocitario de las enzimas alfa-L-iduronidasa, arilsulfatasa B y beta-glucuronidasa a la paciente, madre y control supuestamente sano,¹ cuya sangre fue obtenida del Banco del Instituto de Oncología y Radiobiología y procesada en las mismas condiciones que las muestras. Se utilizaron métodos fluorimétricos (metilumbiferil derivados) y colorimétricos (nitrocatecol derivados).²

En la determinación de la enzima alfa-L-iduronidasa se utilizó como sustrato una solución 2 mM de 4-metilumbiferil-alfa-L-iduronido disuelto en tampón formato de sodio 100 mM pH 3,5. Se tomaron 20 μ L de sustrato, 20 μ L de tampón y 20 μ L de homogenato de leucocitos con una concentración de proteínas correspondiente a 3 μ g/ μ L, y se incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo por adición de 1 mL de tampón glicinato de sodio 100 mM, pH 10,4. Las lecturas de intensidad fluorescente se determinaron en un espectrofluorímetro Shimadzu, modelo 540, a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 448 nm, sensibilidad 2, escala 5.

La caracterización de la alfa-L-iduronidasa leucocitaria se realizó mediante el estudio de la estabilidad térmica a 48 °C y determinación de los parámetros cinéticos Km (constante de Michaelis) y Vm (velocidad máxima).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las pruebas cualitativas de azul de toluidina y BCTA para la detección de mucopolisacáridos urinarios se verificaron positivas.

Se realizó la cuantificación de mucopolisacáridos totales en orina de la primera micción de la mañana por el método

do del azul cian, y resultó un valor de 1 750 mg de mucopolisacáridos/g de creatinina (rango normal de 25 a 420 mg MPS/g de creatinina).¹²

En la tabla 1 se muestran los resultados de las actividades de 3 enzimas lisosomales relacionadas con el metabolismo de los mucopolisacáridos. Se observa una marcada disminución de la actividad de la enzima alfa-L-iduronidasa de la paciente con respecto al control, lo cual es indicativo de MPS IH o síndrome de Hurler.

TABLA 1. Actividad específica de la alfa-L-iduronidasa (MPS IH/IS), arilsulfatasa B (MPS VI) y betaglucuronidasa (MPS VII)

Enzima (Enfermedad)	Actividad específica*	
	Paciente	Control
MPS IH/IS	1,1 (7,8)	14,1 (100)
MPS VI	76,2 (95,1)	80,1 (100)
MPS VII	40,3 (71,2)	56,7 (100)

* La actividad específica se expresa en: nanomoles/h⁻¹/mg de proteína⁻¹. Los valores entre paréntesis se refieren al tanto por ciento con respecto al control.

Para el estudio de heterocigóticos se realizó la determinación de la actividad de la enzima alfa-L-iduronidasa a la madre, que presentó el 50 % de actividad con respecto al control, lo cual demuestra el carácter heterocigótico obligado de los padres de la paciente que coincide con el patrón de herencia de dicha enfermedad (figura 1).

Con la finalidad de caracterizar bioquímicamente la enzima alterada se realizó una curva de estabilidad térmica (figura 2) a 48 °C. El comportamiento de la enzima procedente de la paciente es indicativo de una actividad residual extremadamente baja y puede ser a causa de la presencia de una actividad inespecífica o a una enzima residual de mayor estabilidad.

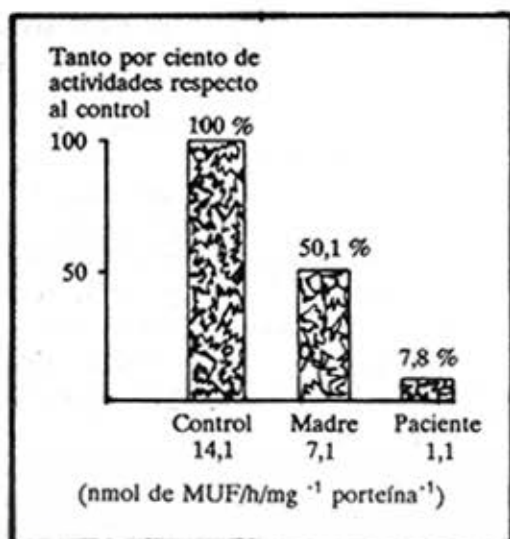


FIGURA 1. Actividad enzimática de la alfa-L-iduronidasa leucocitaria.

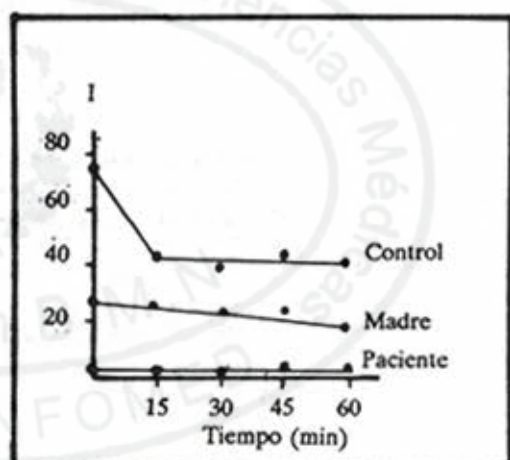


FIGURA 2. Estabilidad a 48 °C de alfa-L-iduronidasa. Las muestras de extractos de leucocitos son incubadas a 48 °C durante los tiempos indicados e inmediatamente se determina la actividad de la enzima alfa-L-iduronidasa tal como se indica en Material y Método. En la abscisa se indican los valores de intensidad fluorescente.

Debe resaltarse que la madre, al presentar el 50 % de actividad de la enzima con respecto al control, manifiesta una discreta disminución de la estabilidad térmica en el transcurso del tiempo, mientras que la actividad del control disminuye bruscamente en los primeros 15 minutos de incubación.

En la tabla 2 se observan los valores de Km y Vm de los casos analizados por los métodos cinéticos de Hofsteen y Hanes. Aunque existe diferencia entre los valores de Km de la paciente, madre y control, esta diferencia, no obstante, no es tan marcada como para atribuir este efecto a una alteración en la afinidad por el sustrato. la Vm del paciente se encuentra marcadamente disminuida y la madre presenta aproximadamente el 50 % del valor de Vm con respecto al control¹³ (tabla 2).

TABLA 2. Km y Vm por los métodos de Hanes y Hofstee. Los valores de Km se expresan en mM y los de Vm en intensidad fluorescente/mg⁻¹/hora⁻¹

	Hanes		Hofstee	
	Km	Vm	Km	Vm
Paciente	3,95	2,39	0,19	0,58
Madre	0,48	31,45	0,56	33,34
Control	0,36	69,14	0,41	71,90

SUMMARY

The case of a 18-month old patient presenting with phenotypical characteristics of "Hurler's syndrome" who underwent the determination of enzymes related to the metabolism of mucopolysaccharides (MPS), as well as the kinetic characterization of the enzyme called alpha-L-iduronidase, is reported. The deficiency of alpha-L-iduronidase led to the diagnosis of this disease.

RESUME

On présente un cas d'une fille de 18 mois d'âge avec caractéristiques phénotypiques de type "hurleroïde" chez qui on a déterminé les enzymes en rapport avec le métabolisme des monopolysacchariques (MPS), ainsi que la caractérisation cinétique de l'enzyme alpha-L iduronidase, dont sa déficience a conduit au diagnostic de cette maladie.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Watts RW, Gibbs DA. Lysosomal storage diseases: Biochemical and clinical aspects. Philadelphia: Taylor & Francis eds. 1986:119-36.
2. Galjaard H. Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal analysis. North-Holland: Elsevier, 1980:82-91.
3. Ryoji M et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate from the liver of a patient with Hurler syndrome: high performance liquid chromatography of their degradation products after incubation with alfa-L-iduronidase deficient fibroblasts. Clin Chim Acta 1984; 137:179-87.
4. Mc Kusick V et al. Allelism, non-allelism and genetic compound among the mucopolysaccharidosis. Lancet 1972; 1:993.
5. Matalon R. Musculoskeletal diseases of children. Ed. Guene & Shatton, Inc., 1983:381-45.
6. Berry KH. Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry Spot Test. Clin Biochem 1987; 20:365-71.
7. Lynch R. Medical laboratory technology and clinical pathology. Second edition. La Habana: Instituto del Libro, 1972:1108-9.
8. Whitcman P. The quantitative measurement of alcian-blue glycosaminoglycan complexes. Biochem J 1973; 131:343-50.
9. Perry TH et al. Urinary-screening test in the prevention of mental deficiency. Can Med Assoc 1966; 95:89.
10. Keledry M. Obtention of leucocytes. Clin Chim Acta 1976; 70:247-57.
11. Lowry OH et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-68.
12. Nielsen JB et al. Normal excretion of urinary acid mucopolysaccharides in a boy with iduronate sulphatase deficiency, Hunter phenotype and alfa-antitrypsin deficiency. Eur J Pediatr 1986; 145:572-75.