

Proyecto FIND: La importancia de un diagnóstico precoz

C. Colón Mejeras

Unidade de Diagnóstico e Tratamento das Enfermidades Conxénitas do Metabolismo. Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (A Coruña)

Resumen

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo heterogéneo de enfermedades lisosomales ocasionadas por la deficiencia de las enzimas responsables de la degradación de los glucosaminoglicanos (GAG).

Gracias a los actuales avances terapéuticos y al hecho de que un diagnóstico y tratamiento precoces implican una mejor evolución clínica, nos hemos planteado el proyecto FIND. El objetivo es realizar un cribado selectivo para detectar posibles casos de MPS en niños. Para ello se facilita a los pediatras que deseen participar, un kit como herramienta diagnóstica en el que se suministra la información y el material necesario para la obtención de muestras de orina y sangre impregnadas en papel analítico.

Sobre la muestra de orina se mide la concentración de GAG y creatinina urinarias. A aquellas muestras con una concentración elevada de GAG, se podrá realizar la cuantificación de la actividad enzimática presente en la muestra de sangre, con la finalidad de identificar el posible defecto enzimático.

©2015 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Mucopolisacaridosis, enfermedades lisosomales, glucosaminoglicanos, niños, proyecto FIND.

Introducción

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias que se incluyen dentro de las enfermedades de depósito lisosomal. Son un grupo heterogéneo de trastornos multisistémicos y progresivos que son resultado de la deficiencia individual de distintas enzimas lisosomales implicadas en la degradación secuencial de glucosaminoglicanos (GAG). Como consecuencia de ello, los GAG se acumulan en los tejidos aumentando su excreción urinaria (heparán sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y condroitín sulfato)

Existen 11 enzimas en la ruta de degradación de los GAG, cuyo defecto dará lugar a los seis tipos actualmente aceptados de MPS. En función del defecto enzimático se produce la acumulación de un tipo u otro de GAG, lo que permite realizar una aproximación al diagnóstico diferencial mediante el estudio

Abstract

Title: The FIND project: The importance of early diagnosis

The mucopolysaccharidoses (MPS) are a heterogeneous group of lysosomal diseases caused by the enzymatic deficiency of glycosaminoglycans (GAG) degradation.

Due to recent treatment advances and the fact that early diagnosis and treatment implicate a better clinical outcome, we have started the FIND project. This project is a selective screening to detect possible MPS cases in children using urine and blood samples impregnated in analytical paper, easily obtained in the Pediatrician consultation and supplied in the FIND kit.

We carry out the GAG determination on urine sample. Over those urine samples with an elevated GAG concentration; we can perform the enzymatic activity on the blood sample, in order to identify the possible enzyme defect.

©2015 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Mucopolysaccharidoses, lysosomal diseases, glycosaminoglycans, children, FIND project.

cualitativo de su eliminación en la orina. La acumulación de GAG no degradados en los lisosomas provoca una disfunción progresiva de diferentes vías celulares que activan mecanismos de apoptosis y llevan a la muerte celular. A esto se añade la puesta en marcha de fenómenos inflamatorios que participan de forma significativa en el daño tisular progresivo.

Se trata, así pues, de un grupo heterogéneo de enfermedades, tanto por la edad de inicio de las manifestaciones clínicas (las más precoces tienen peor pronóstico) como por la gravedad de los signos y síntomas que presentan (formas graves y atenuadas). En la mayoría de las MPS se producen unas formas severas y otras atenuadas, que se distinguen principalmente por la edad de presentación, la progresión de la enfermedad y el grado de afectación neurológica.

Se han identificado siete tipos clínicos y diversos subtipos de MPS (tabla 1). Aunque cada una se diferencia clínicamente,

TABLA 1

Clasificación de las mucopolisacaridosis

MPS	Epónimo	Enzima	Glicosaminoglicanos elevados	Prevalencia (1 caso por número de RN)	Locus
I	Hurler-Scheie, HS	Alfa-L-iduronidasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato	80.000	4p16.3
II	Hunter	Iduronato sulfatasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato	125.000 varones	Xq28
IIIA	Sanfilippo A	Heparán-N-sulfatasa	Heparán sulfato	100.000	17q25.3
IIIB	Sanfilippo B	Alfa-N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato	196.000	17q21
IIIC	Sanfilippo C	Acetil-CoA-alfa-glucosaminida acetil transferasa	Heparán sulfato	905.000	8p11.1
IIID	Sanfilippo D	N-acetilglucosamina 6-sulfatasa	Heparán sulfato	1.028.000	12q14
IVA	Morquio A	Galactosa 6-sulfatasa	Queratán sulfato Condroitín 6-sulfato	270.000	16q24.3
IVB	Morquio B	Betagalactosidasa	Queratán sulfato	714.000	3p21.33
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa B)	Dermatán sulfato	380.000	5q13-q14
VII	Sly	Betaglucuronidasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato Condroitín 4-, 6-sulfato	1.263.000	7q21.11
IX		Hialuronidasa	Ácido hialurónico		3p21.2-p21.3

MPS: mucopolisacaridosis; RN: recién nacidos.

la mayoría de los pacientes suelen presentar un periodo de desarrollo normal seguido por una disminución del funcionamiento físico y/o mental.

Las prevalencias individuales son bajas, como las de todas las enfermedades encasilladas bajo la denominación de «raras», pero en conjunto presentan una prevalencia lo suficientemente significativa como para ser consideradas un auténtico problema de salud pública. Así, la menos prevalente es la recién descrita MPS IX, de la que se identificó el primer caso en 1999¹, y la más prevalente es la MPS III (Sanfilippo), que se estima que afecta a 1 de cada 70.000 nacimientos, prevalencia similar e incluso superior a la de otras patologías detectadas por el «Programa galego para a detección precoz de enfermedades endocrinas e metabólicas» en el periodo neonatal², como por ejemplo la tirosinemia, la homocistinuria, las acidemias propiónica, metilmalónica o glutárica, el déficit de biotinidasa, etc.

En los últimos años las posibilidades terapéuticas han experimentado un avance tan importante que cada día es posible el tratamiento de un mayor número de estas enfermedades y las opciones terapéuticas específicas son cada vez más efectivas. Existe además una relación directa entre el momento de inicio de las medidas terapéuticas y la buena respuesta al tratamiento, por lo que resulta imprescindible establecer un diagnóstico precoz.

Los beneficios de la detección precoz de los niños afectados durante el periodo neonatal mediante cribado pueden ser muy grandes^{3,4}, particularmente en las MPS que se inician con for-

mas rápidamente progresivas. En esos casos se ha demostrado eficaz el trasplante alogénico hematopoyético de células madre⁵, cuyos resultados son mejores cuanto más precozmente se encuentre a un donante y se realice el trasplante^{6,7}. Algunos estudios sugieren que el trasplante de células de cordón umbilical tiene resultados similares a los del trasplante de médula ósea⁸, y en la actualidad en Estados Unidos se está desarrollando un ensayo clínico para confirmarlo⁹. Ello permite un empleo adecuado y eficaz del banco de cordón que gestiona actualmente el Centro de Transfusiones de Galicia, creado en 1993.

La terapia génica experimental en animales parece demostrar un fuerte impacto curativo en algunos de los signos y síntomas más importantes de la enfermedad¹⁰, pero todavía queda mucho camino por recorrer.

Actualmente, la terapia de sustitución enzimática¹¹⁻¹³ está demostrando su eficacia, sobre todo si el inicio del tratamiento es precoz¹⁴, y en ella se centran la mayoría de los tratamientos.

Objetivos y principios del método

Detectar los posibles casos de MPS y su prevalencia real en nuestro medio mediante un cribado selectivo en la población pediátrica de riesgo.

Dadas las bajas prevalencias individuales de estas patologías, cualquier método de detección precoz debe enfocarse

hacia una identificación global de todas las MPS. El método debe ser lo suficientemente específico para su detección con pequeños tamaños de muestra y con un coste lo suficientemente bajo para que permita integrarse en un futuro dentro de los programas de detección precoz neonatal.

Se ha optado por la determinación de GAG en orina, que ya ha demostrado ser útil para el cribado de ciertas MPS^{15,16}. En caso de ser positivo, se puede identificar qué GAG se encuentran elevados mediante análisis en electroforesis monodimensional.

Pero la confirmación diagnóstica se establece mediante el análisis de la actividad enzimática en una muestra de sangre impregnada en papel, que puede ser suministrada simultáneamente con la prueba en orina.

En caso de posible positividad, se ofrece la posibilidad de realizar la confirmación en muestra de sangre líquida, cuantificando la actividad enzimática sobre leucocitos para las MPS en que esté disponible.

Para el desarrollo del proyecto se cuenta con la colaboración de la asociación MPS España y el aval de la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER).

Método

En España se ha puesto en marcha el proyecto FIND, para el diagnóstico precoz de las MPS. Se trata de una herramienta puesta a disposición de los pediatras para ayudar a identificar los posibles casos de MPS.

Ante la sospecha clínica de un posible caso de MPS, el pediatra puede remitir una muestra de orina y sangre en el soporte diseñado para este proyecto al laboratorio Unidad de Diagnóstico e Tratamiento das Enfermedades Conxénitas do Metabolismo (Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela). Para ello, basta con solicitar los *kits* diagnósticos por correo electrónico (find.mtbl.santiago@sergas.es), indicando los datos profesionales de contacto del médico (nombre y apellidos, centro de trabajo y dirección) donde enviar los *kits* solicitados.

Cada *kit* consta del material para la toma de muestra, las instrucciones y un esquema de los signos y síntomas que el pediatra debería tener en consideración para identificar un posible candidato para realizar el estudio.

Nos hemos basado en la muestra de orina, ya que la mayoría de los casos de MPS cursan con una elevación de los GAG. Además, es una muestra fácil de obtener en un consultorio, es indolora y no precisa personal ni material específico para su obtención, con la excepción del papel para impregnar.

Nuestro centro ya tiene amplia experiencia en el manejo de las muestras de orina, en el que se ha constatado que los GAG son muy estables y fácilmente extraíbles a partir del papel Whatman 903, que es el empleado en la mayoría de los criba-

dos neonatales. Si el pediatra así lo desea, puede enviar simultáneamente una muestra de sangre para cuantificar la actividad enzimática si sospecha un tipo de MPS en concreto o para acelerar el proceso de confirmación en sangre.

Para analizar la orina hemos establecido un método sencillo mediante un test espectrofotométrico, que permite detectar a los pacientes cuyas concentraciones de GAG se encuentren por encima de los valores de referencia (punto de corte) de nuestra población, establecidos como los niveles que superen el percentil 99 agrupados por edad y calculados previamente. Estos valores se refieren a la concentración de creatinina presente en la orina, medida en la misma muestra mediante un método espectrofotométrico (adaptación del conocido método de Jaffé).

Se ha adaptado el método que emplea el reactivo azul cloruro 1,9-dimetilmetileno (*dimethylmethylene blue* [DMB]), que pasó de la histología a la colorimetría en 1974¹⁷, gracias a su reacción con los GAG.

La base del proyecto es la reacción descrita en 1989 por Whitley et al.¹⁸, pero con importantes modificaciones para su adaptación a la muestra de orina impregnada en papel y, por tanto, con la necesidad de un menor volumen de orina (menos de la décima parte de la descrita en caso de orina líquida).

En la reacción colorimétrica se producirá un descenso de absorbancia a 595 nm, tal como describieron Thuy y Nihan¹⁹.

Sobre una recta de calibrado de condroitín sulfato de 1,5 hasta 50 mg/mL se mide la absorbancia de las muestras cribadas. Con la finalidad de minimizar la precipitación del complejo DMB-GAG, se trabaja a una dilución 1:7 y a un tiempo de lectura de 15 minutos.

Sobre una placa de microtitulación de 96 tazas, alta, se troquelan 4 discos de 6 mm de diámetro, que se eluyen con 300 UL de agua destilada. De esta forma, a cada disco le corresponden 75 UL de agua (2,27 veces más dilución que en el procedimiento de Whitley).

Se adaptan los volúmenes de eluato, reactivo DMB y su concentración de trabajo en el tampón fórmico-formiato sódico 0,2 mol/L. Esta dilución es importante para poder medir el descenso en la absorbancia a 595 nm, de tal forma que, siendo la dilución del reactivo DMB de trabajo de 1:7 con respecto a la disolución *stock* propuesta en el trabajo de partida de Whitley (200 UL de reactivo de trabajo DMB y 20 UL de eluato), se aumenta la sensibilidad de la prueba, ya que estamos incrementando la diferencia en el descenso de absorbancia a esta longitud de onda.

La mayor parte de los métodos propuestos para la detección precoz neonatal de trastornos lisosomales emplean la muestra de sangre. Entre los propuestos están: los inmunoanálisis para determinar las proteínas de las membranas lisosomales; los inmunoanálisis para determinar las proteínas enzimáticas; los métodos que miden las actividades enzimáticas, determinando los productos de la actividad sobre sustratos sintéticos, me-

diente espectrometría de masas en tándem, después de eliminadas las sales de los tampones; o los métodos que utilizan sustratos que dan productos fluorescentes y miden la fluorescencia. Estos últimos, desarrollados por el Dr. Néstor Chamoles²⁰ en Buenos Aires, son los que empleamos para los estudios de confirmación diagnóstica; nos parecen más fáciles de ejecutar que los que se emplean actualmente en la espectrometría de masas en tándem, son más económicos y, además, contamos con experiencia en ellos desde 2005.

En dichos ensayos se añade un sustrato específico para cada enzima que se cuantifica, marcado con 4-metil-umbeliferona que, a pH alcalino, produce una fluorescencia directamente proporcional a la actividad de la enzima.

En todos los ensayos se rechaza el resultado de las muestras con un coeficiente de variación superior al 15% (los valores se expresan en $\mu\text{mol/L/h}$).

Ante la sospecha de una MPS específica dentro del proyecto, se podría llevar a cabo sobre una muestra de sangre impregnada en papel la determinación de las actividades enzimáticas de las MPS I, II, IIIB, IVA, IVB, VI y VII.

Conclusiones

El proyecto FIND pone a disposición de los pediatras una herramienta analítica que permite identificar los posibles casos de MPS en los pacientes con una sintomatología compatible con estas enfermedades.

El procedimiento de obtención de muestras es sencillo, ya que se emplean orina y sangre impregnadas en papel analítico, que son fáciles de obtener en una consulta (basta una micción y una punción de sangre capilar).

Los resultados positivos requerirán estudios posteriores para su confirmación. Los resultados negativos no excluirán de forma taxativa el padecimiento de estas enfermedades, ya que, como en todos los programas selectivos de cribado, se pueden producir falsos positivos (identificar como sospechoso a un niño sano) y falsos negativos (identificar como sano a un niño afectado).

Bibliografía

1. Triggs-Raine B. Mutation in *HYAL1*, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 6.296-6.300.
2. Xunta de Galicia. Actualización do programa galego para a detección precoz de enfermidades endócrinas e metabólicas en período neonatal. Resultados 1995-2004. Guías de Saúde Pública. Serie II Informes do Estado de Saúde. 2006.
3. Sauer M, Grewal S, Peters C. Hematopoietic stem cell transplantation for mucopolysaccharidoses and leukodystrophies. *Klin Padiatr*. 2004; 216(3): 163-168.
4. Meikle PJ, Fietz MJ, Hopwood JJ. Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004; 4(5): 677-691.
5. Soper BW. Nonablative neonatal marrow transplantation attenuates functional and physical defects of β -glucuronidase deficiency. *Blood*. 2001; 97(5): 1.498-1.504.
6. Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, et al. Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood*. 2002; 99: 1.857-1.859.
7. Krivit W. Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. *Springer Semin Immunopathol*. 2004; 26(1-2): 119-132.
8. Lee V. Umbilical cord blood transplantation for Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26(4): 455-458.
9. Phase II Study of Allogeneic Bone Marrow or Umbilical Cord Blood Transplantation in Patients with Mucopolysaccharidosis I (Hurler Disease). Fairview University Medical Center. Identificador: NCT00005899. 2006.
10. Hartung SD. Correction of metabolic, craniofacial and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human α -L-iduronidase gene. *Mol Ther*. 2004; 9(6): 866-875.
11. Harmatz P. Direct comparison of measures of endurance, mobility and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Pediatrics*. 2005; 115(6): e681-689.
12. Gliddon BL, Hopwood JJ. Enzyme-replacement therapy from birth delays the development of behavior and learning problems in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Pediatr Res*. 2004; 56(1): 65-72.
13. Brady RO, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol*. 2004; 3(12): 752-756.
14. Auclair D. Replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy. *Mol Genet Metab*. 2003; 78(3): 163-174.
15. Abdi M, Hakhamaneshi MS, Alaei MR, Azadi NA, Vakili R, Zamanfar D, et al. Validation of urinary glycosaminoglycans in Iranian patients with mucopolysaccharidase type I: the effect of urine sedimentation characteristics. *Iran J Child Neurol*. 2014; 8(4): 39-45.
16. Chuang CK, Lin HY, Wang TJ, Tsai CC, Liu HL, Lin SP. A modified liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for predominant disaccharide units of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 2(9): 135.
17. Humbel R, Etringer S. A colorimetric method for the determination of sulphated glycosaminoglycans. *Rev Roum Biochemistry*. 1974; 11: 21-24.
18. Whitley CB, Draper KA, Dutton CM, Brow PA, Serverspn SL, France LA. Diagnostic test for mucopolysaccharides (II). Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on paper matrix. *Clin Chem*. 1989; 35(10): 2.074-2.081.
19. Thuy LP, Nyhan WL. A new quantitative assay for glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta*. 1992; 212: 17-26.
20. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem*. 2001; 47(12): 2.098-2.102.