

SESION DE POSTERS II

Metabolopatías

POSTER Nº 27

APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CONTINUA A LA SEPARACION, IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE AZUCARES DE INTERES METABOLICO EN MUESTRAS DE ORINA Y SANGRE IMPREGNADAS EN PAPEL. J.R. Alonso-Fernández; C. Parrado; M.D. Bóveda; C. Rey; J.L. Barreiro; J. Peña; J.M. Fraga. Laboratorio de Alteraciones Metabólico-Genéticas y Nutricionales. Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

En otro Congreso de nuestra Sociedad presentamos un método para detectar la presencia de sustancias reductoras en muestras de orina impregnadas en papel, basado en la reducción de vanadio pentavalente a tetravalente en medio sulfúrico.

Para la identificación y cuantificación de azúcares de interés metabólico en estas muestras y en la de sangre del mismo sujeto también impregnada en papel desarrollamos un procedimiento de cromatografía en capa fina continua que presentamos ahora. La deposición de la muestra se hace eluyendo directamente del papel en que está impregnada a la placa. Se hace un estudio de la influencia del tiempo de evaporación sobre los RF. de los azúcares ensayados utilizando patrones disueltos en orina exenta de sustancias reductoras. Se estudia también la influencia del tipo de papel empleado en la recogida de la muestra (Whatman 3 MM y Schleicher and Schül 903).

Se muestran resultados obtenidos de pacientes galactosémicos y con diabetes neonatal.

POSTER Nº 28

MEDICION DIRECTA E INDIRECTA DE TIROXINA LIBRE Y SU DEPENDENCIA DE LAS PROTEINAS DE TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS. J. Ordóñez, M.D. Solans, M. Cortés, J. Rodríguez, J. Gómez. Servicio de Bioquímica. Hospital de la Sta Cruz y San Pablo. Avda S. Antonio María Claret, 167. Barcelona (25).

El objeto del presente trabajo ha sido el estudio de la utilidad de varios métodos directos e indirectos de medida de tiroxina (T4) libre, así como el estudio de su dependencia de las alteraciones de los niveles de proteínas de transporte (PT) de hormonas tiroideas.

El estudio comprendió 85 sujetos: 20 controles (en los que se obtuvieron los rangos de referencia), 45 con patología extratiroidea (34 con niveles bajos de PT y 11 con niveles normales) y 20 embarazadas. En todos los casos se determinó: T4 total, TBG-TBPA-Albúmina (electroinmunodifusión), captación de T3 en resina y T4 libre según 3 métodos de radioinmunoensayo (C.Assays, Damon y Amersham). Así mismo se calcularon: índice de T4 libre (FT4I) según las fórmulas de Clark&Horn y Hamada, la razón T4/TBG y la T4 libre de acuerdo con la ley de acción de masas.

El estudio de correlación de los diversos parámetros con los niveles de PT, mostró que los valores de T4 libre C.Assays y Damon eran prácticamente independientes de las PT, mientras que la T4 libre calculada mostraba la mayor correlación de entre los parámetros estudiados. Las medidas indirectas (FT4I y T4/TBG) presentaban una dependencia intermedia. Igualmente se estudió el % de sujetos con valores anormales para cada parámetro y grupo. Los mejores resultados globales se obtuvieron con la T4 C. Assays (12.3% de valores anormales); en tanto que en el grupo de patología extratiroidea con PT bajas la T4 libre C. Assays (5.9%), en el grupo de PT normales la T4 libre Damon y T4/TBG (0.0%) y en embarazadas la T4 libre C. Assays (20.0%) resultaron los parámetros de máxima validez.

POSIBILIDAD DE UTILIZAR LA TINCION CON ACRIDINA PARA EL DESPISTAJE NEONATAL DE ORGANICO ACIDURIAS ESTUDIO COMPARATIVO CON LA TINCION DE FAST GARNET.

J.R. Alonso-Fernández; M.D. Bóveda; C. Rey; C. Parrado; J. Peña; J.M. Fraga.
Laboratorio de Alteraciones Metabólico-Genéticas y Nutricionales. Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

Las muestras de orina impregnadas en papel (Whatman 3 MM o Schleicher and Schül 903) y los patrones de ácidos orgánicos de interés metabólico disueltos en agua o en isopropanol acuoso (10-50%) e impregnados en los mismos papeles se cromatografan usando la cromatografía en papel ascendente con n-butanol, ácido acético, agua (12:3:5). Durante aproximadamente 4 horas y media.

Discos de muestras y patrones, de 6 mm de diámetro se insertan a 2 cm. del borde del papel cromatográfico (Whatman 3 MM) de 19 cm. de alto. El desarrollo se hace en tanques cilíndricos.

Se comparan los resultados obtenidos con los dos reactivos de tinción-FAST GARNET y Acridina- estudiando los límites de detección para los ácidos ensayados, facilidad de interpretación y la información obtenida en cada caso.

Se estudian muestras de pacientes con acidemia metilmalónica, láctica y oxálica.

ESTUDIO DE MUCOPOLISACARIDOSIS MEDIANTE SEPARACION DE GLICOSAMINOGLICANOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CONTINUA.

C. Parrado; J.R. Alonso-Fernández; M.D. Bóveda; J.A. Cocho; J.M. Fraga; J. Peña.
Laboratorio de Alteraciones Metabólico-Genéticas y Nutricionales. Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

Se realiza un estudio de separación de siete glicosaminoglicanos por cromatografía en capa fina continua. Sobre placas de sílica gel.

Las muestras de orina fueron tomadas de pacientes con mucopolisacaridosis, recogiendo la orina de 24 h. con mertiolato al 1%.

Se hace un estudio sistemático de la influencia en los valores de Rf. de la composición del líquido de desarrollo, tiempos de evaporación y formación de sales de los mucopolisacáridos.

Se propone un método con el que se puede realizar el análisis cualitativo y semicuantitativo de los distintos mucopolisacaridos y tipificar la enfermedad.

ESTUDIO DE TRES CASOS, EN UNA MISMA FAMILIA, CON HIPERORNITINEMIA, HIPERAMONEMIA Y HOMOCITRULINURIA.

M. Rodés; L. Alvarez; M.A. Vilaseca; A. Ribes y J. Sabater.
Dpto. Metabolopatías; Inst. Bioquímica Clínica; Apartado de Correos, 145. CERDANYOLA (Barcelona)

Clinicamente los pacientes presentaron: Intolerancia a proteínas con vómitos esporádicos; Déficit intelectual moderado; Alteraciones del comportamiento importantes y trastornos motores con signos piramidales y paraparesia espástica.

La alteración básica de metabolismo de esta enfermedad todavía no se conoce exactamente, probablemente se trata de un defecto en el transporte de ornitina a nivel de mitocondria, responsable del aumento de ornitina en plasma y de NH_4^+ en sangre, permaneciendo sin explicación la gran eliminación de homocitrulina en orina.

En los tres pacientes, el índice de aclaramiento renal para ornitina y aminoácidos relacionados es normal; Las concentraciones de ornitina y demás aminoácidos, en eritrocitos, están alteradas; En el ensayo de incorporación de ornitina C^{14} en proteínas, realizado en cultivo de fibroblastos, se ha encontrado una gran disminución de dicha incorporación. Se han ensayado los efectos de: sobrecarga de ornitina; dieta restringida en proteínas y dieta restringida de proteínas más sobrecarga de ornitina, en los niveles de ornitina, amonio y homocitrulina, encontrándose que una dieta restringida en proteínas junto con sobrecarga de ornitina consigue disminuir los niveles de amonio en sangre y la eliminación de homocitrulina en orina.

Incorporación de ornitina C^{14} en cultivo de fibroblastos realizado por F.X. Coudé, según la metodología de V. Shih y cols.: J. Inher. Met. Dis (1981) 4, 95-96.

HIPERGLICINEMIA CETOTICA CAUSADA POR DEFICIENCIA DE PROPIONIL-CoA CARBOXILASA

M.D. Suárez, J. L. Periago, M. Loscertales, J. Maldonado y F. Sánchez-Medina.
Dpto. Bioquímica. Universidad de Granada.

Se comunica el estudio y diagnóstico de un paciente (J.M.U.) con hiperglicinemia cetótica de bido a un déficit de propionil-CoA carboxilasa de leucocitos.

El paciente fue hospitalizado a los dos meses y medio debido a una intensa crisis acidótica. Las determinaciones de aminoácidos en ausencia de aporte proteico mostraron niveles altos de glicocola en suero y orina (3.79mg/dl y 2.80g/g creatinina) mientras que el resto de aminoácidos permanecía dentro de los valores normales. Al alimentarle con una dieta normoproteica (2.20 g proteína/kg peso/día) las concentraciones de glicocola en suero y orina aumentaron (22.16mg/dl y 5.94g/g creatinina) y el paciente sufrió una nueva crisis acidótica. Se sospecho que podría tratarse de una hiperglicinemia cetótica debido a carencia de propionil-CoA carboxilasa por lo que se le suministró una dieta hipoproteica (0.75 g proteína/kg peso/día) con un elevado contenido en triglicéridos con ácidos grasos de cadena media par. Al mes de recibir esta dieta se determinó la actividad propionil-CoA carboxilasa de leucocitos de sangre periférica y se encontró una diferencia sustancial entre la actividad del paciente (7.4 pmoles/min/mg proteína) y de un control adulto normal (51.4 pmoles/min/mg proteína). Los análisis de aminoácidos que se han realizado posteriormente tras la alimentación con esta dieta suplementada con biotina (10 mg/kg peso/día) han mostrado valores normales en suero (5.29 mg/dl) y orina (4.48 g/g creatinina), y el paciente ha mejorado considerablemente desde el punto de vista clínico.

DETERMINACION ANALITICA DE AMINOACIDOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA ALTA EFICACIA.

Dr. J.M. ESCOLA y Dr. J. REMON

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS, RESIDENCIA SANITARIA NUESTRA SRA. PERPETUO SOCORRO, BADAJOZ

Unidad Bioquímica Metabólica.

En estos momentos la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia está imponiendo como técnica de gran importancia para la resolución eficaz y rápida de múltiples problemas de identificación y valoración de parámetros bioquímicos en Química Clínica.

En nuestro Laboratorio de la Residencia Sanitaria de la S.S. se dispone de un equipo WATER de dos bombas con fluorímetro y microprocesador para programación de gradientes y un registrador integrador automático para la cuantificación de los resultados, con inyección manual, y que en estos momentos está resolviendo problemas de Bioquímica Metabólica y especialmente la Cualificación y Cuantificación de Aminoácidos en fluidos biológicos.

La operación se realiza con una previa preparación de la muestra comenzando por una precipitación de las proteínas con ácido sulfosalicílico, seguido de centrifugación y filtrado del líquido sobrenadante.

La muestra obtenida se derivatiza con orto-phtal-dialdehído para conseguir un producto fluorescente.

La derivatización se realiza precolumna y se inyecta en el cromatógrafo.

La columna empleada es de fase reversa, empleando el tipo de compresión radial.

Se aplica gradiente binario con cambio tanto en la fase móvil como en el flujo consiguiendo la terminación del cromatograma en 45 minutos.

La reproductividad de los datos obtenidos sobre los AA. Tirosina, Fenilalanina, Leucina, Isoleucina, Arginina y Glicocola dan un C.V. da aproximadamente el 1%.

Los límites de detección por este procedimiento son superiores que los que emplean la Ninhidrina.

- DETERMINACION ANALITICA DE FENILALANINA; TIROSINA; ASI COMO SUS METABOLITOS; FENIL-PIRUVICO, FENIL-LACTICA Y HOMOGENTISICO EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS POR ISOTACOPRESIS Y EN UNA SOLA APLICACION.

- Dr. J.M. ESCOLA y Dr. J. REMON

- SERVICIO ANALISIS CLINICOS RESIDENCIA SANITARIA Ntra.Sra.PERPETUO SOCORRO. BADAJOZ

- JEFE UNIDAD BIOQUIMICA METABOLICA.

Cada día es mayor la importancia de la determinación de Fenil-alanina y Tirosina así como sus metabolitos porque cada día es mayor su incidencia clínica. Han sido varios los métodos analíticos sugeridos pero todos ellos van encaminados a su determinación por separado, no existiendo en la actualidad, que conozcamos un método que los pueda determinar en una sola operación o proceso y sin derivatización.

Disponemos en nuestra Institución del TACOFOR 2127 de LKB equipado con detector termal y uno de ultravioleta de 254 nm, con columna de teflon de 620 mm. termostaticada a 25°C, por lo que se ha abordado este problema a nuestro entender con éxito, empleando un leaden electrolito a pH 9.7 y un terminales electrolito a pH 10.

La preparación de la muestra se realiza precipitando las proteínas con ácido sulfosalicílico. centrifugación posterior y filtrado y se inyecta el líquido sobrenadante una vez filtrado.

De los resultados obtenidos sacamos la conclusión de que con esta metodología obtenemos resultados repetitivos con una variación menor del 2% y pudiendo detectar concentraciones muy suficientes para detectar enfermedades congénitas de Fenil-alanina y Tirosina.

ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y TERAPÉUTICOS EN UN CASO DE HIPERGLICINEMIA NO CETÓSICA

L. Alvarez, M. Rodes, M. Pineda. Servicio Bioquímica. Hospital San Juan de Dios. Carretera Esplugas, s/n. Barcelona-34.

La hiperglicinemia no cetósica es una enfermedad metabólica congénita debida a un defecto de la división de la glicina en CO₂, NH₄⁺ y N⁵, N¹⁰-metilmetiltetrahidrofolato, especialmente en cerebro, hígado, LCR, plasma y orina.

El paciente presentó en el período neonatal convulsiones que no cedieron al tratamiento habitual mostrando un trazado hipsarrítmico en el EEG. Desarrolló episodios de vómitos, letargia y coma en varias ocasiones. Era evidente un retraso psicomotor y de su curva pondo-estatural. Al inicio del ensayo mostraba una tetraparesia atetósica con grave hipotonía, nulo contacto con el ambiente y ausencia de persecución ocular.

En el estudio bioquímico destacaron los altos niveles de glicina encontrados en orina (1690 µM/24 h.), plasma (1.468 µM/ml) y LCR (0.122 M/ml).

Para su tratamiento se han intentado distintas terapias con el fin de reducir la acción tóxica de la glicina a nivel cerebral. Hemos realizado el siguiente ensayo terapéutico:

- 1.- A: Dieta hipoproteica: 1.5 g/Kg peso/día, sin glicina.
- 2.- A+ B: metionina, 150 mg/Kg peso/día.
- 3.- A+B+ C: GABA, 3 g/día.
- 4.- A+B+C+ D: ácido fólico, 20 mg/día + piridoxina, 1 g/d
- 5.- A+B+C+D+ E: salicilato sódico, 600 mg/día.

La duración de cada período ha sido de 10 días, al término de los cuales se ha realizado una valoración clínica, EEG y analítica.

Se discuten los resultados obtenidos con este ensayo terapéutico.