

Cribado neonatal ampliado: “Prueba del talón”



Esther Fernández Grande
BIR A.C.L.

Índice

- Concepto de CN
- Muestras
- Hipotiroidismo y Fibrosis Quística por **Autodelfia**
- Fundamento MS/MS
- Patologías:
 - PKU
 - MSUD
 - HCY
 - Tyr
 - Ciclo de la Urea
 - Acidémias orgánicas
 - Ácidos grasos
 - Perfil de carnitinas
- Confirmación por HPLC de intercambio iónico

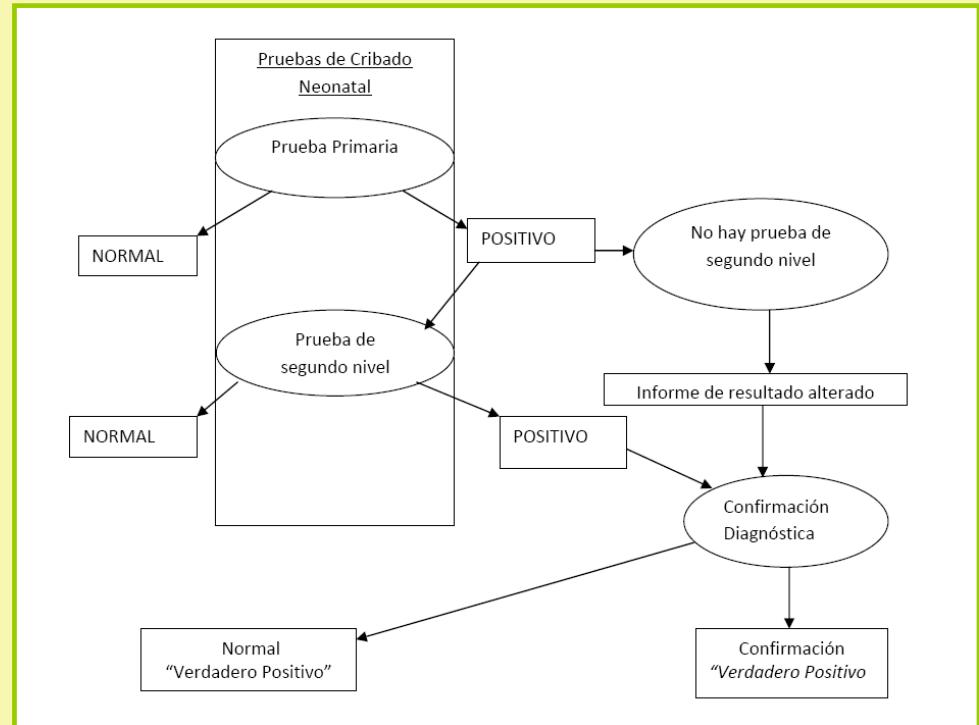


Cribado neonatal

- Concepto de **cribado**: es la aplicación sistemática de una prueba para identificar a individuos con un riesgo suficientemente alto de sufrir un determinado problema de salud como para beneficiarse de una investigación más profunda o una acción preventiva directa, entre una población que no ha buscado atención médica por síntomas relacionados con esa enfermedad.
- Requisitos para introducir una patología en el programa de cribado:
 1. La **prevalencia** justifica el coste del cribado.
 2. El trastorno **no se identifica con una exploración física**.
 3. La enfermedad causa **graves** complicaciones.
 4. El diagnóstico y tratamiento precoz **mejora** el pronóstico de la enfermedad.
 5. La prueba para la detección debe ser **sensible, específica y económica**.



- Los métodos de cribado **no son diagnósticos**. Son pruebas capaces de descartar a un alto porcentaje de la población estudiada, de manera que el número de falsos negativos por una baja sensibilidad y de falsos positivos por escasa especificidad, sean mínimos.
- En los individuos que se obtenga un resultado positivo se realizaran procedimientos diagnósticos posteriores para confirmar la enfermedad y, en su caso, recibir tratamiento



Situación en España 2013

Determinaciones obligatorias a partir de 2015

¿Qué informo?



GRUPOS DE ENFERMEDADES	Sevilla (1)	Andalucía	Aragón (2)	Asturias	Baleares	Canarias	Cantabria	Castilla la Mancha	Castilla y León	Cataluña	Extremadura	Galicia	La Rioja	Madrid	Murcia (3)	Navarra	País Vasco	Comunidad Valenciana	Valencia	Alicante	Valenciana	
	Málaga																					
Técnica analítica: espectrometría de masas en tandem																						
TRASTORNOS METABOLISMO AMINOACIDOS																						
Fenilcetonuria	X	X	X																			X
Enfermedad de orina con olor a jarabe de Arce	X	X	X																			X
Tirosinemia	X	X	X																			X
Citrulinemia	X	X	X																			X
Aciduria Argininosuccínica	X	X	X																			X
Homocistinuria	X	X	X																			X
TRASTORNOS METABOLISMO ACIDOS ORGANICOS																						
Acidemia propiónica	X	X	X																			X
Acidemias metilmalónicas	X	X	X																			X
Acidemia isovalérica	X	X	X																			X
Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa	X	X	X																			X
Deficiencia de 3-OH-3-metilglutaril-CoA liasa	X	X	X																			X
Deficiencia de β -cetolitasa	X	X	X																			X
Aciduria glutárica tipo I	X	X	X																			X
TRASTORNOS METABOLISMO ACIDOS GRASOS																						
MCAD (def. acil-CoA deshidrogenasa de cadena media)	X	X	X																			X
VLCAD (def. acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga)	X	X	X																			X
LCHAD (def. 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga)	X	X	X																			X
TFP (def. de proteína trifuncional mitocondrial)	X	X	X																			X
CPT-1 (camitina palmitoiltransferasa 1)	X	X	X																			X
CPT-2 (camitina palmitoiltransferasa 2)	X	X	X																			X
MADD (def. múltiple d' acil-CoA deshidrogenasa)	X	X	X																			X
CUD (def. en la captación celular de la camitina)	X	X	X																			X
Otras técnicas analíticas																						
Fenilcetonuria																						X
Otras enfermedades																						X
Síndromes falciformes																						X
Hipotiroidismo congénito	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Deficiencia de Biotinidasa																						X
Galactosémia clásica																						X
Fibrosis Quística	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Hiperplasia adrenal congénita																						X

(1) Incluye la Ciudad Autónoma de Ceuta; (2) Incluye la Rioja (3) Incluye la Ciudad Autónoma de Melilla

Obtención de la muestra

- La sangre debe ser obtenida de la porción lateral de la superficie planar del talón entre el **3º-5º** día de vida, ya que para que la muestra sea válida, es necesario que el bebé haya ingerido alimentación proteica.
- La punción debe realizarse sobre el pie masajeado y en una zona previamente **desinfectada**. Con una lanceta estéril, se realiza una incisión de 2 mm. Desechada la primera gota de sangre, se dejan fluir las gotas para que caigan sobre el papel.
- La sangre debe **impregnar** bien el papel (también por detrás) y se debe dejar secar a temperatura ambiente y fuera de luz solar directa.



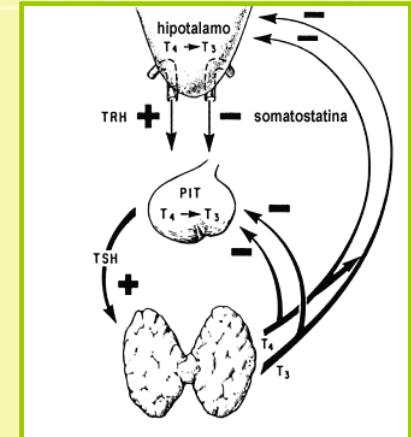
Índice

- Concepto de CN
- Muestras
- **Hipotiroidismo y Fibrosis Quística por Autodelfia**
- Fundamento MS/MS
- Patologías:
 - PKU
 - MSUD
 - HCY
 - Tyr
 - Ciclo de la Urea
 - Acidémias orgánicas
 - Ácidos grasos
 - Perfil de carnitinas
- Confirmación por HPLC de intercambio iónico



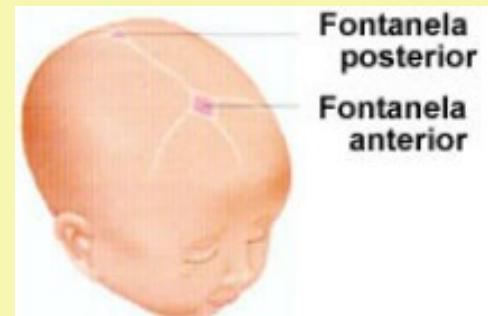
Hipotiroidismo congénito

- El hipotiroidismo congénito (HC) es el resultado de:
 - La ausencia o falta de desarrollo del tiroides.
 - Su destrucción.
 - La falta de estimulación de la misma por la hipófisis.
 - Síntesis defectuosa de las hormonas tiroideas (HT).
- Como consecuencia se produce una disminución de la actividad biológica de dichas hormonas a nivel tisular desde los primeros momentos de la vida dando lugar a **retraso mental**.
- **Patrón de herencia:** las disgenesias generalmente tienen un carácter esporádico. Las dishormonogénesis se heredan de forma **autosómica recesiva** y un pequeño porcentaje **autosómica dominante**.
- El HC se da más en el sexo femenino que en el masculino (2:1). En España se da 1/2.500 aprox (mayor frecuencia en niños con S. Down).



Clínica

- Los síntomas no son visibles hasta pasados unos meses del nacimiento.
- El índice de Letarte evalúa los síntomas y signos clínicos más frecuentes en éstos niños que en los normales. Se valora con:
 - **1 punto:** hernia umbilical, hipotonía muscular, macroglosia, estreñimiento, hipoactividad, piel moteada, problemas de alimentación.
 - **1.5 puntos:** piel seca, fontanela posterior amplia.
 - **3 puntos:** facies cretínica.
- Patológico > 4 puntos*.
- En niños no tratados aparece retraso mental grave, macroglosia, hernia umbilical, pelo ralo, piel seca, retraso de crecimiento y enanismo.

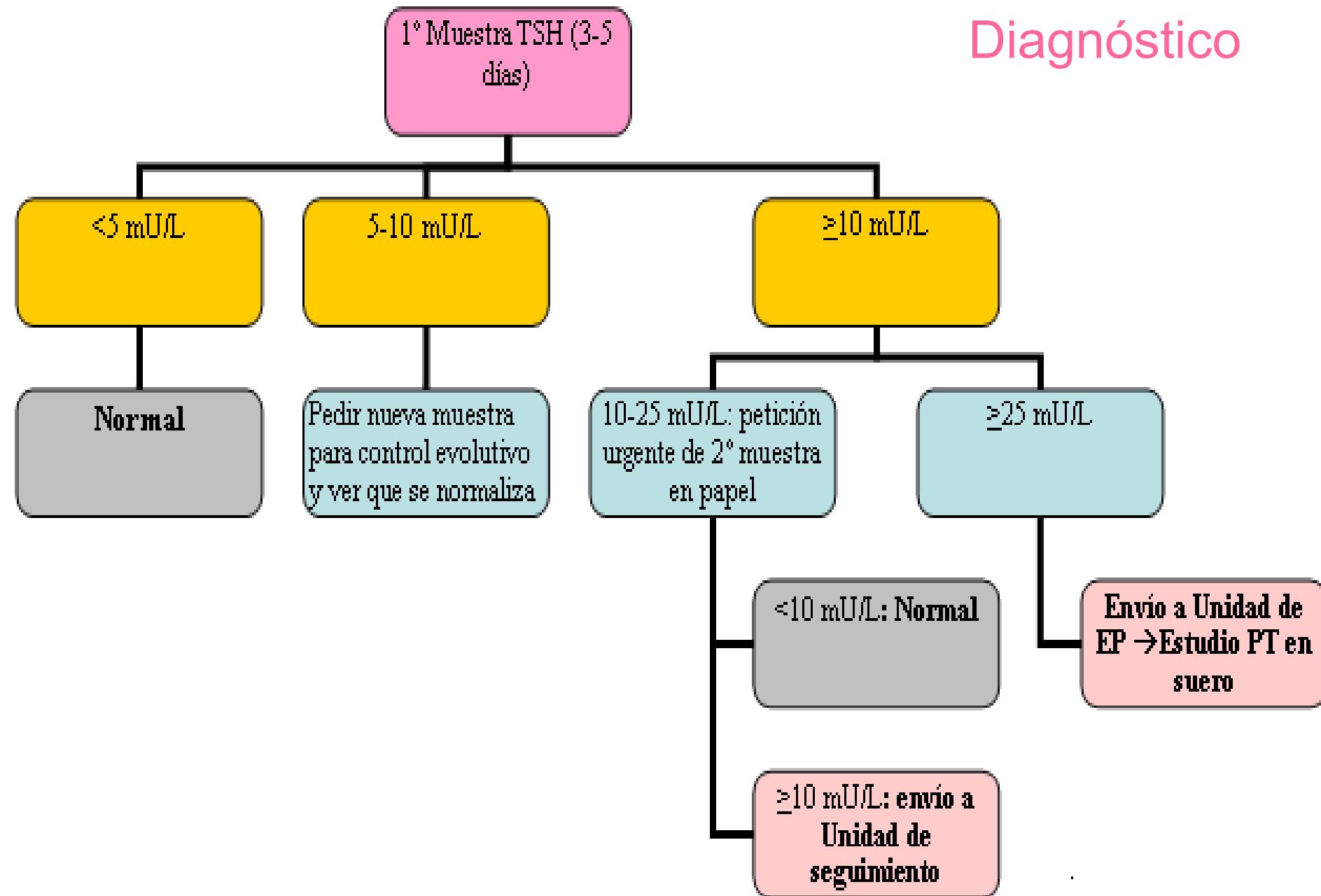


Diagnóstico

- Sangre seca en papel **a partir de 48 h**, ya que en las primeras 24 h se produce una elevación fisiológica de los niveles de TSH, posiblemente en respuesta a la exposición al frío (FP).
- Se recomienda repetir la prueba a las dos semanas de vida en (**2º muestra**):
 - **Gemelos**, debido a la posibilidad de una transfusión feto-fetal.
 - Recién nacidos de **bajo peso** (<2.5kg) y **prematuridad** (<36 sem): evitar FN por inmadurez hipotálamo-hipofisaria (elevación tardía de TSH).
 - **Síndromes de Down**.
- Se recomienda repetir la prueba (**3º muestra**) al alta o al alcanzar los 2.5 kg:
 - Recién nacidos de **muy bajo peso** (<1.5kg) y **extrema prematuridad** (<32 sem).



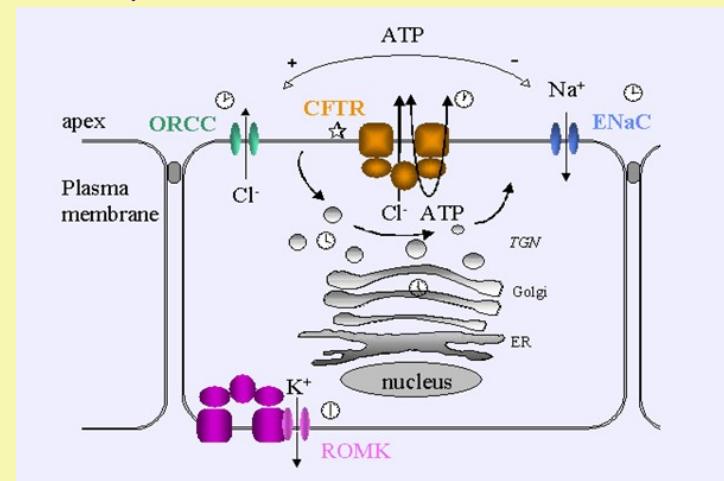
Diagnóstico



La sensibilidad del método de TSH para el HC primario es del 97,5% y la especificidad del 99%.

Fibrosis Quística

- Es AR y la incidencia estimada entre 1/4.500 nacidos vivos.
- En los 80, Knowles demostró que la anomalía en la composición del sudor se debía a un defecto en la secreción del cloro a nivel del conducto excretor de la glándula sudorípara.
- La FQ está causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulato, CFTR) situado en q7.
- El resultado es un flujo alterado de iones Cl^- y Na^+ , y de agua. Las secreciones en los órganos, son anormalmente espesas y deshidratadas provocando la obstrucción de los conductos del páncreas, gl. salivares, epidídimo, intestino, bronquios y bronquiolos.

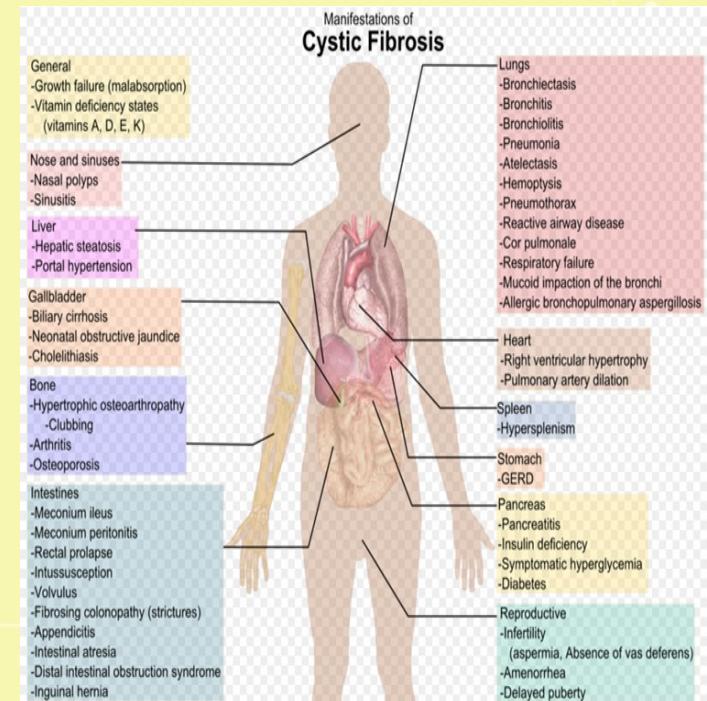


Correlación genotipo-fenotipo.

Clase	Defecto	Tipos de mutaciones	Ejemplo	Efecto sobre el fenotipo
I	Defecto en la síntesis de proteína CFTR	<i>Nonsense</i> <i>Frameshift</i> <i>Splicing</i>	p. G542* p. R553* p. W1282* c.489+1G>T p.Phe316Leufs*12 p.Lys1177Serfs*15 c.1585-1G>A	Insuficiencia pancreática grave Afectación respiratoria grave Test del sudor positivo (elevado)
II	Defecto en el procesamiento de proteína CFTR	<i>Missense</i> Deleciones de aminoácidos	p. F508del p.Ile507del p.Asn1303Lys p.Ser549Asn p.Gly85Glu	Insuficiencia pancreática grave Afectación respiratoria grave Test del sudor positivo (elevado)
III	Defecto en la regulación del canal CFTR	<i>Missense</i>	p. G551D p.Arg560Thr	Insuficiencia pancreática grave Afectación respiratoria grave Test del sudor positivo (elevado)
IV	Defecto en la conducción de iones en el canal CFTR	<i>Missense</i>	p. R117H p.Arg334Trp p.Arg347Pro	Suficiencia pancreática leve Afectación respiratoria grave o moderada Test del sudor límite
V	Síntesis reducida de proteína CFTR funcional	<i>Missense</i> <i>Splicing</i> alternativo	c. 621 + 1G>T c.3718-2477C>T c.2657+5G>A p.Ala455Glu	Suficiencia pancreática leve Afectación respiratoria grave o moderada Test del sudor límite o elevado

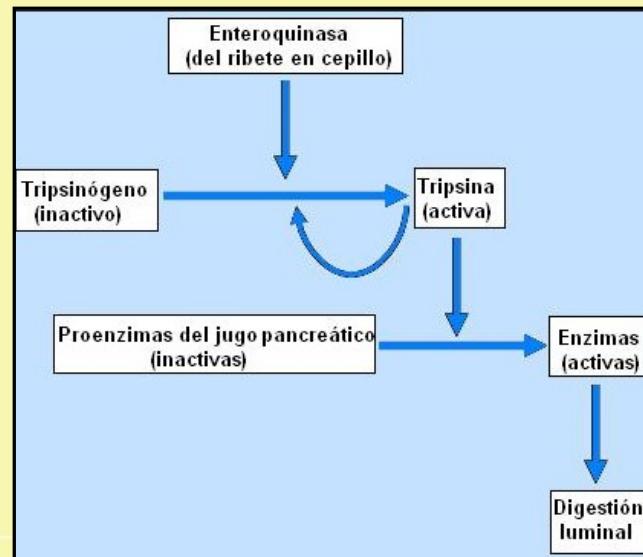
Clínica

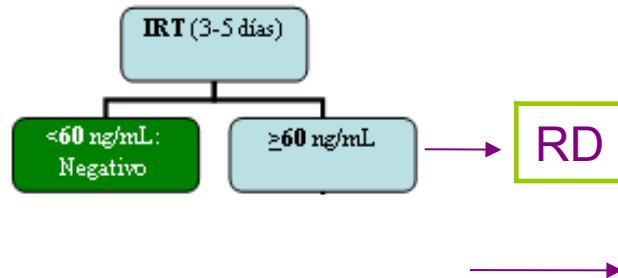
- Anomalía **exocrina** generalizada, con una anormal viscosidad de todas las secreciones exocrinas
- A nivel **respiratorio**: **bronconeumopatia crónica, sinusitis y poliposis nasal**. En la adolescencia o la tercera década: **tos persistente, asociada a infección crónica por P. aeruginosa**. Posteriormente afectación del parénquima pulmonar produciendo **lesión del tejido y fibrosis extensa**. Las lesiones pulmonares evolucionan hacia insuficiencia respiratoria y hacia el *cor pulmonale*.
- En el tracto **digestivo** se produce en muchos casos **ileon meconial** en el periodo neonatal, **insuficiencia pancreática con esteatorrea y desnutrición**, alteraciones hepáticas con fibrosis y, finalmente **cirrosis biliar**.
- En el aparato **reproductor** masculino se produce una **azoospermia** o agenesia de los vasos deferentes.



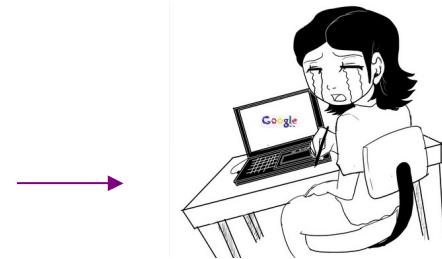
Diagnóstico: tripsinógeno inmunorreactivo (TIR)

- El **tripsinógeno** es el precursor inactivo de la tripsina. Se sintetiza en el páncreas y pasa al ID donde se activa dando **tripsina**.
- Las personas con FQ producen tapones mucosos que obstruyen los conductos pancreáticos, impidiendo que el tripsinógeno llegue al intestino, imposibilitando así la degradación de las proteínas de los alimentos.
- Los niveles en suero de TIR son más altos en los recién nacidos con FQ que en los no afectos. Esto puede ser debido al bloqueo de los conductos pancreáticos exocrinos.
- En otras enfermedades, como la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas, la lesión del tejido pancreático puede causar un bloqueo impidiendo que el tripsinógeno alcance el intestino delgado.





Diagnóstico

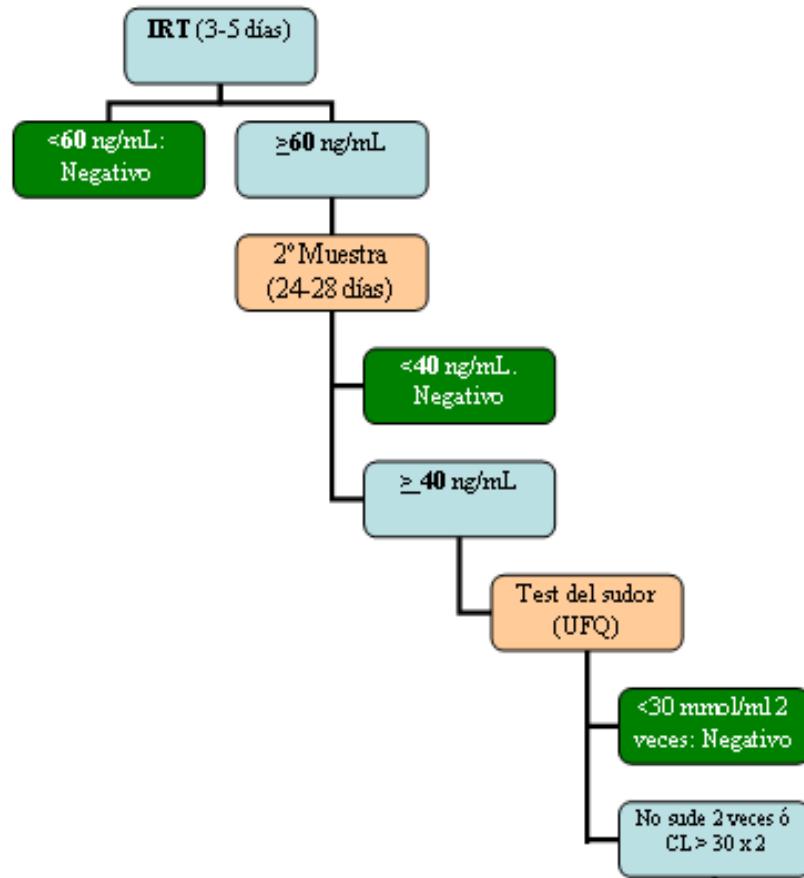


Test del Cloro en sudor

Se realiza mediante **iontoforesis cuantitativa con pilocarpina**.

- Se estimula localmente la sudoración con pilocarpina, se mide la cantidad de sudor y se determina la concentración de Cloro en el mismo.
- La muestra debe obtenerse en el plazo máximo de 30 minutos. Un mayor tiempo de recogida se asocia a riesgo de falsos negativos debido a una estimulación subóptima de las glándulas sudoríparas.
- Los falsos negativos son raros, pero posibles en los pacientes con edema e hiponatremia o cuando las cantidades de sudor recogidas son insuficientes.
- Los falsos positivos suelen estar relacionados con errores técnicos o con el uso de un equipo inadecuado.

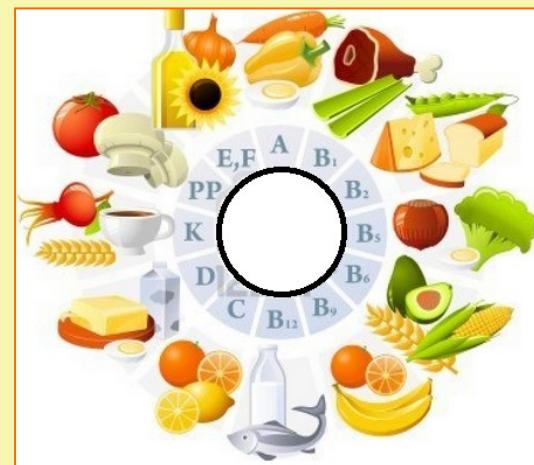




Tratamiento

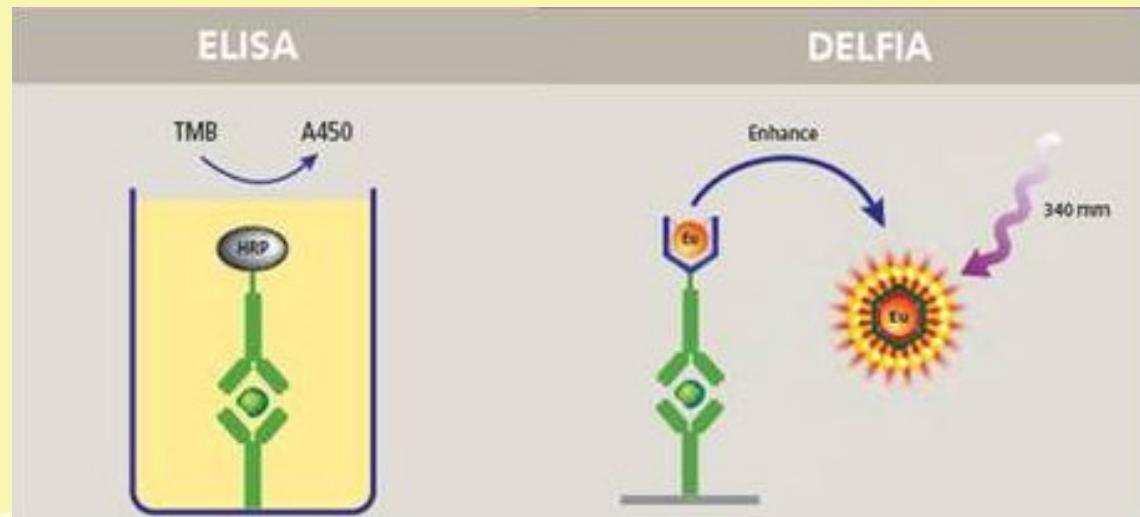
No existe una terapia específica y curativa para la FQ. El tratamiento está basado en tres pilares fundamentales que son:

- 1.- Conseguir una nutrición adecuada.
- 2.- Utilizar medicamentos contra la infección e inflamación respiratoria.
- 3.- Realizar terapia física consistente en fisioterapia respiratoria, ejercicios de fortalecimiento de la musculatura del tórax para prevenir deformidades, así como la práctica de algún deporte.



Determinación en Autodelfia (Perkin-Elmer)

- La muestra se añade a un pocillo con Ac para el analito a determinar.
- Lavado para eliminar los restos de la muestra no unidos.
- Añadimos otro anticuerpo unido a Europio que se unirá al complejo antígeno-anticuerpo formado anteriormente.
- Tras lavar, se añade solución de realce o intensificación para que el ión Europio se disocie del Ac y se compleje dando lugar a un quelado fluorescente
- El Europio es excitado a 320-340 nm y la fluorescencia medida a 615 nm. La señal emitida será directamente proporcional a la cantidad de analito de la muestra



Índice

- Concepto de CN
- Muestras
- Hipotiroidismo y Fibrosis Quística por **Autodelfia**
- **Fundamento MS/MS**
- Patologías:
 - PKU
 - MSUD
 - HCY
 - Tyr
 - Ciclo de la Urea
 - Acidémias orgánicas
 - Ácidos grasos
 - Perfil de carnitinas
- Confirmación por HPLC de intercambio iónico



Espectrofotometría de masas en tandem (MS/MS) 3200 ABsciex

Suministrar información sobre:

- a) La composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas.
- b) Las estructuras y composición de especies moleculares complejas.
- c) Las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras.

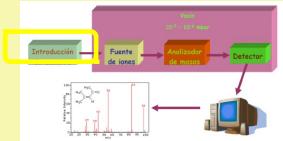




- a) Introducción de la muestra en fase gaseosa.
- a) Conversión de los átomos o moléculas en iones.
- a) Separación de los iones formados según su m/z.
- a) Recuento de los iones de cada tipo o medida de la corriente iónica producida cuando los iones inciden en un detector.
- e) Procesamiento de los datos para obtener un **espectro de masas**.



Introducción de la muestra por sonda directa

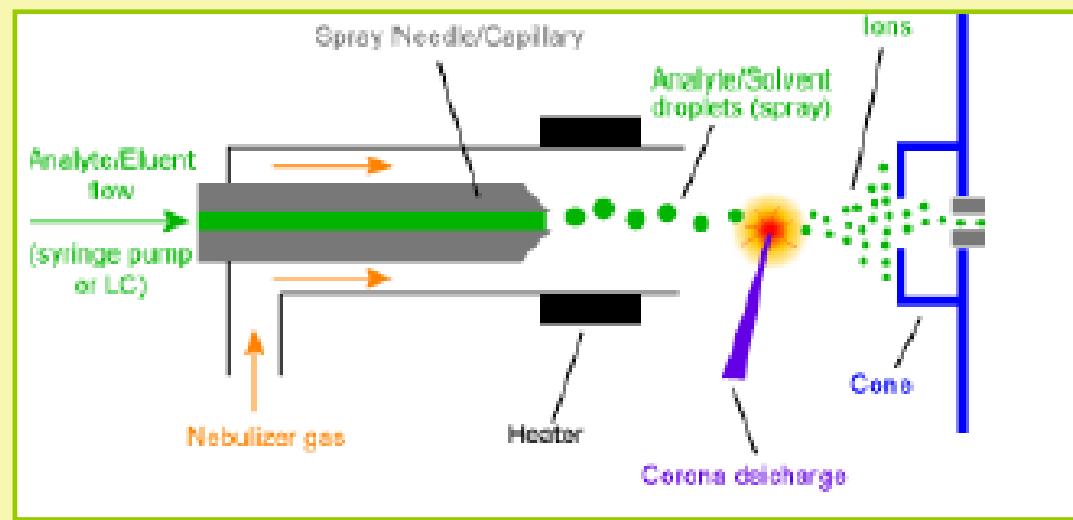


- Para muestras líquidas o sólidas no volátiles introducidas directamente en la fuente de ionización mediante un soporte para la muestra o sonda. También cuando la cantidad de muestra es limitada.
- Muestra: sangre en papel
- Tratamiento previo: extracción con solventes orgánicos en placa y **derivatización** con butanol.



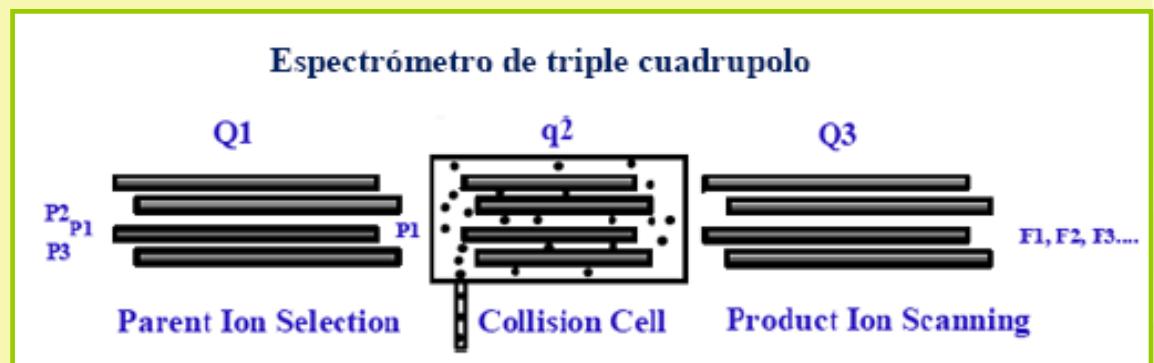
Ionización por Electrospray (ESI)

- El analito pasa por el capilar. Se aplica una tensión de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el electrodo cilíndrico que rodea al capilar, provocando que la muestra al salir forme un aerosol de pequeñas gotas con carga eléctrica en superficie.
- Debido a la elevada temperatura en la fuente ESI y/o del gas, a medida que las gotas atraviesan el espacio entre el capilar y el cono, van reduciendo su tamaño, por evaporación del solvente.
- El campo eléctrico provoca que las gotas cargadas alcancen un punto crítico en el cual la tensión superficial no es capaz de mantener la carga (**límite de Rayleigh**), por lo que se produce una "**explosión Coulombica**" y la gota se rompe en gotas mas pequeñas.

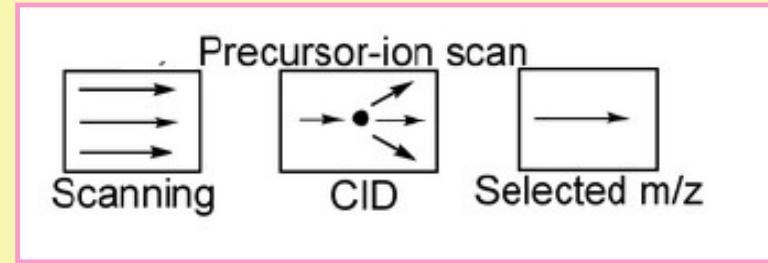
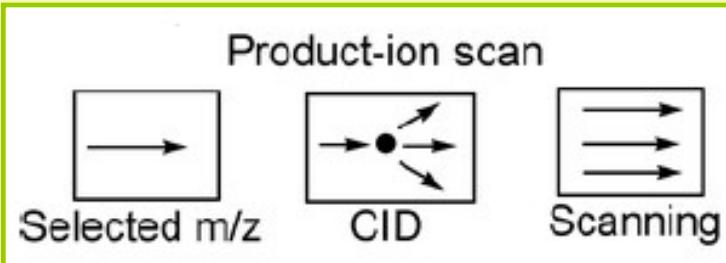


Analizadores de masa: triple cuadrupolo

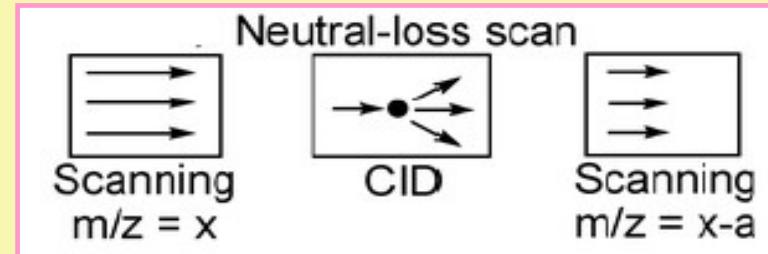
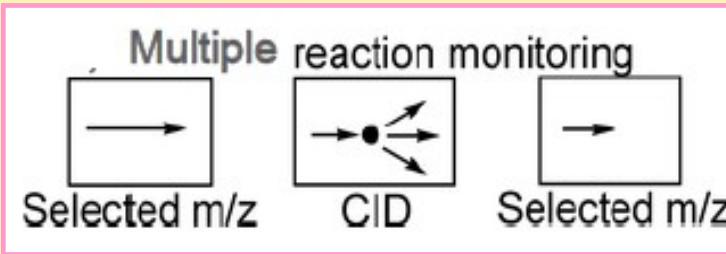
- **1 cuadrupolo:** 4 barras paralelas que actúan como electrodos. Las barras se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par al negativo. Se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna. Los iones son acelerados a través del cuadrupolo y sólo los que tienen una determinada relación m/z pasan al detector, el resto colisiona con las barras.
- Los cuadrupolos pueden trabajar en dos modos:
***SIM:** solo pase un ión con una determinada m/z.
***SCAN:** se hace un barrido de masas entre un intervalo de m/z.
- Q1 y Q3 actúan como filtro de masas en SIM o SCAN, mientras que el segundo se denomina celda de colisión. En esta celda se introduce una pequeña cantidad de gas de forma que los iones que entran, colisionan con los mismos fragmentándose. Los iones pasan al Q3 para finalmente ser analizados.



La combinación de Q1 y Q3 permite trabajar en cuatro modos diferentes:



Acilcarnitinas en sangre



Aminoácidos butilados, ornitina y la citrulina.

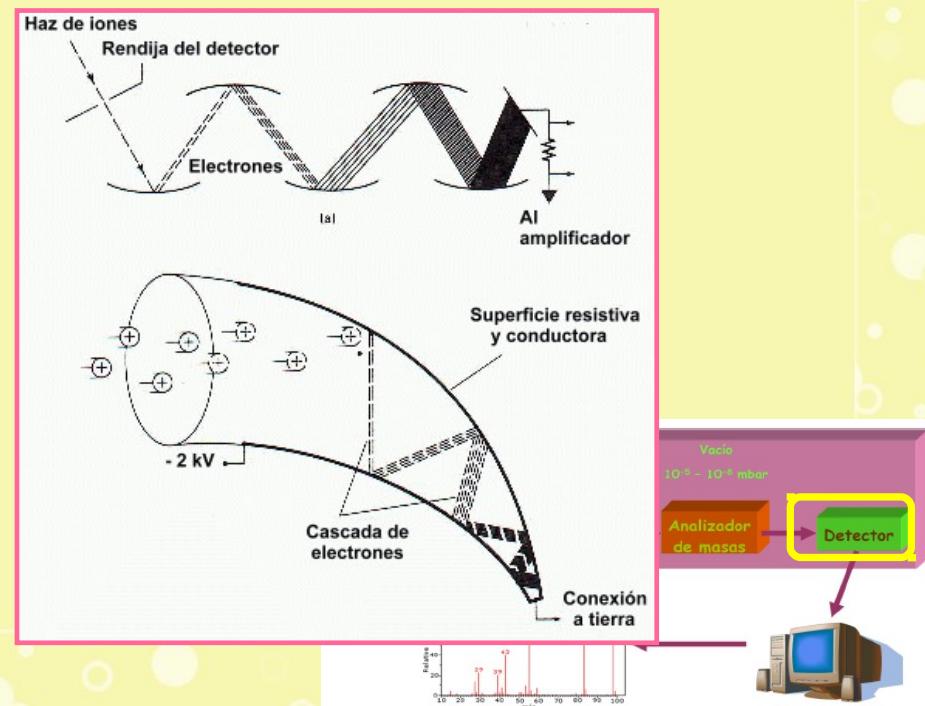
Se realizan 35 ciclos por muestra. Cada ciclo consta de:

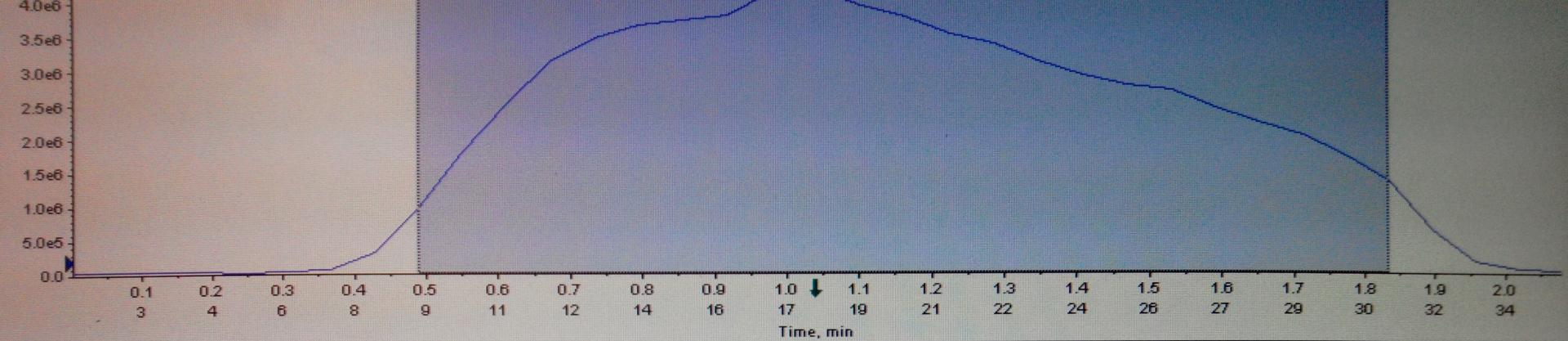
- 1 experimento en modo ión precursor de 2 seg.
- 1 experimento neutral Loss Scan de 1 seg.
- 1 experimento en modo MRM de 0,67 seg.



Detector: Canales electromultiplicadores

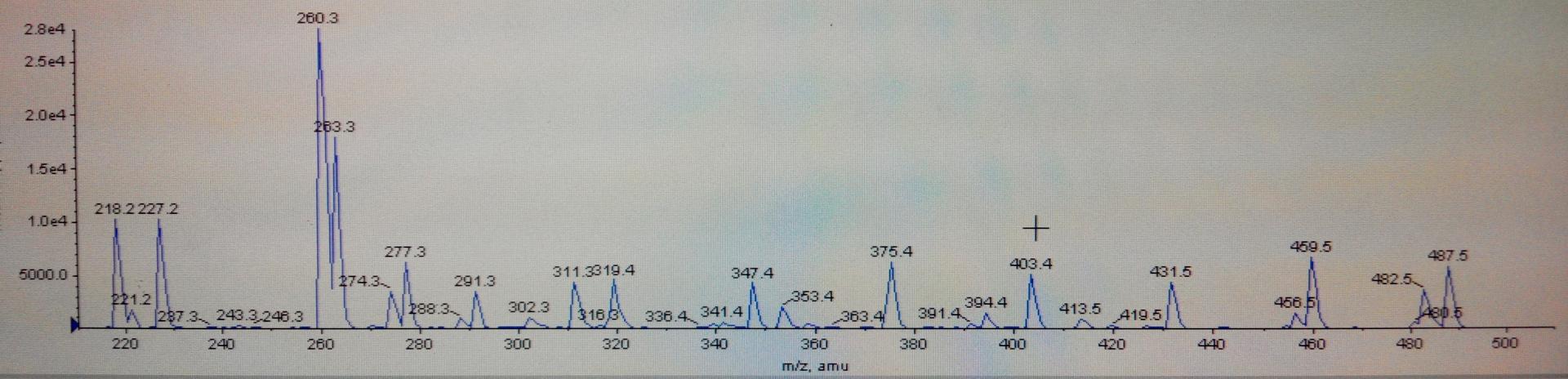
- Genera una corriente eléctrica proporcional al número de iones que llegan al mismo. Los detectores que utilizamos son **canales electromultiplicadores**.
- Se basan en la energía cinética de los iones que impactan en la superficie del detector. Consta de una serie de díodos de forma que cada díodo se mantiene a un potencial más alto que el anterior. Cuando la superficie de un díodo es alcanzada por un ión se produce la emisión de varios electrones, los cuales son acelerados hacia el siguiente díodo de forma que cada electrón es capaz de provocar la emisión de varios electrones en dicho díodo, y así sucesivamente, consiguiéndose ganancia de corriente de hasta 10^8 .





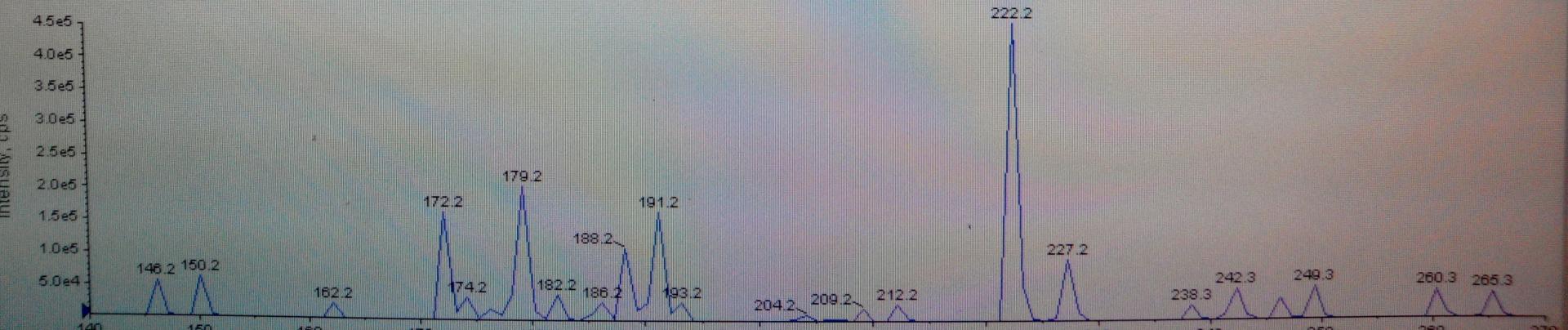
+Prec(85.00): Exp 1, 0.489 to 1.835 min from Sample 33 (2014-3168474) of 14.11.14A(2).wiff (Turbo Spray)

Max. 2.8e4 cps



+NL(102.10): Exp 2, 0.523 to 1.869 min from Sample 33 (2014-3168474) of 14.11.14A(2).wiff (Turbo Spray)

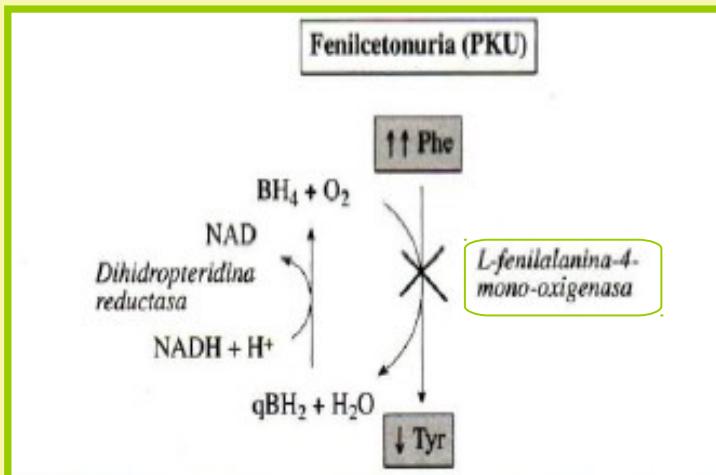
Max. 4.5e5 cps



Determinaciones en MS/MS

• Aminoácidopatías:

- Fenilcetonuria y hiperfenilalaninemias (AR) son ACM de la Phe que cursan un aumento de esta en sangre debido a una alteración enzimática en el paso de fenilalanina a tirosina.



Se manifiesta de diversas formas clínicas, según la actividad residual de la enzima:

-**Grave o PKU clásica:** Phe >1200 μM .

-**PKU moderada:** Phe 600-1200 μM .

-**PKU leve:** Phe 360-600 μM .

-**HPA (Hiperfenilalaninemia):** Phe 150-360 μM

Además el metabolismo alternativo de Phe por decarboxilación o transaminación da lugar a metabolitos que se excretan por la orina: ácidos fenilacético, fenilpirúvico y feniláctico.

MS/MS: Phe > 120 μM y Tyr
Cociente Phe/Tyr : 2

Confirmación: aa por HPLC de intercambio iónico



Clínica

*Neonatos-6 meses: normales.

>6 meses: **retraso psicomotor y mental**. Si $\text{Phe} > 1200 \mu\text{M}$: **lesiones dérmicas** similares a un eczema, orina y el sudor con olor característico “a ratón” debido al ácido fenilacético.

*A partir de 2-3 años: **retraso mental**, trastorno del desarrollo y psiquiátrico, convulsiones, hiperactividad.

- Las PKU **embarazadas**: $< 180 \mu\text{M}$ ya que es **teratógena**.
- El feto comienza a tener actividad PAH a las 28 semanas de gestación, por ello, dependiendo de los niveles de Phe en la sangre materna, puede presentar alteraciones morfológicas y neurológicas muy graves: **retraso mental, microcefalia, cardiopatía y neuropatía**.



Tratamiento.

El tratamiento de la PKU es dietético:

- Restricción de Phe.
- Administración simultánea de una fórmula especial libre de Phe, que contiene los demás aminoácidos (Tyr) y micronutrientes.

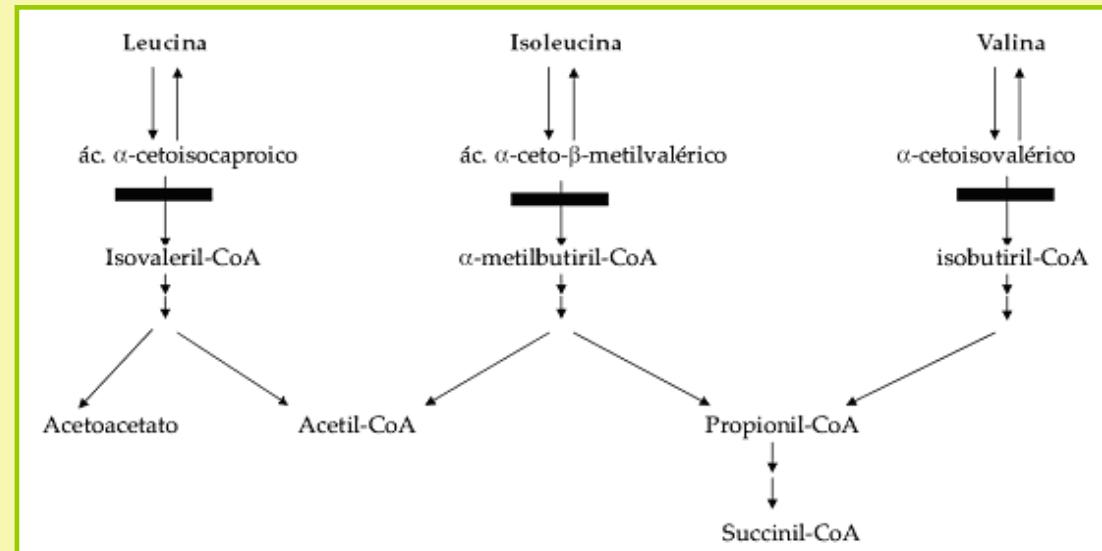
La mayoría de los niños afectos alcanzan un desarrollo normal si son sometidos precozmente al tratamiento adecuado.

Se recomienda que:

- Pacientes - 6 años $\text{Phe} < 360 \mu\text{M}$
- Pacientes 6-10 años $\text{Phe} < 480 \mu\text{M}$
- Pacientes +10 años $\text{Phe} < 600 \mu\text{M}$

Aminoacidopatías: Jarabe de Arce (MSUD)

- La enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (AR) es un trastorno en el metabolismo de los aminoácidos ramificados debido a la deficiencia del **complejo multienzimático deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada (BCKD)**.
- Aumento en plasma de **leucina, isoleucina y valina**. La presencia de **aloisoleucina** es patognomónica de MSUD.
- Excreción urinaria de los cetoácidos correspondientes.
- La orina de estos pacientes tiene un olor similar a los extractos de hojas de arce debido a un compuesto denominado sotolona.
- Prevalencia 1/185.000 RN.



Se diferencian 5 subtipos clínicos en función de la edad y la clínica de presentación, la tolerancia proteica y el nivel de actividad enzimática

Diagnóstico por MS/MS mide:
valina + (leucina + isoleucina +
aloisoleucina + hidroxiprolina),
compuestos de igual masa molecular
(m/z = 132).

La confirmación incluye la separación
cromatográfica en plasma de estos
isómeros con el fin de excluir
resultados para permitir el ajuste
individual de Leu, Ile y Val en la dieta.

Fenotipo	Clínica		Bioquímica	
	Inicio	Síntomas	BCAA, BCKA	Leucina (μ M)
Clásica	1 ^a -2 ^a semana de vida	Rechazo alimentación Letargia, hipotonía Convulsiones Cetoacidosis	↑↑ Aloisoleucina	> 500
Intermedia	6 meses – 7 años	Desmedro Retraso psicomotor Ataxia Convulsiones	↑↑ Aloisoleucina	400 - 2000
Intermitente	Lactante – adulto	Crecimiento normal Desarrollo psicomotor normal Infección/estrés catabólico: ataxia, convulsiones y/o cetoacidosis	Normal (fase asintomática)	50 - 4000
Sensible a tiamina	Lactante	Similar a forma "intermedia" Desarrollo psicomotor normal (±)	↑↑ ↓ con vitaminoterapia	> 50
Deficiencia E3	Lactante	Inicio similar a forma "intermedia" Progresivo y rápido deterioro neurológico Acidosis láctica	↑↑	> 400

E3: dihidrolipoil deshidrogenasa

BCAA: aminoácidos de cadena ramificada

BCKA: cetoácidos de cadena ramificada

Tratamiento. Los objetivos son:

*Mantener concentraciones plasmáticas de los BCAA cercanas a los valores normales.

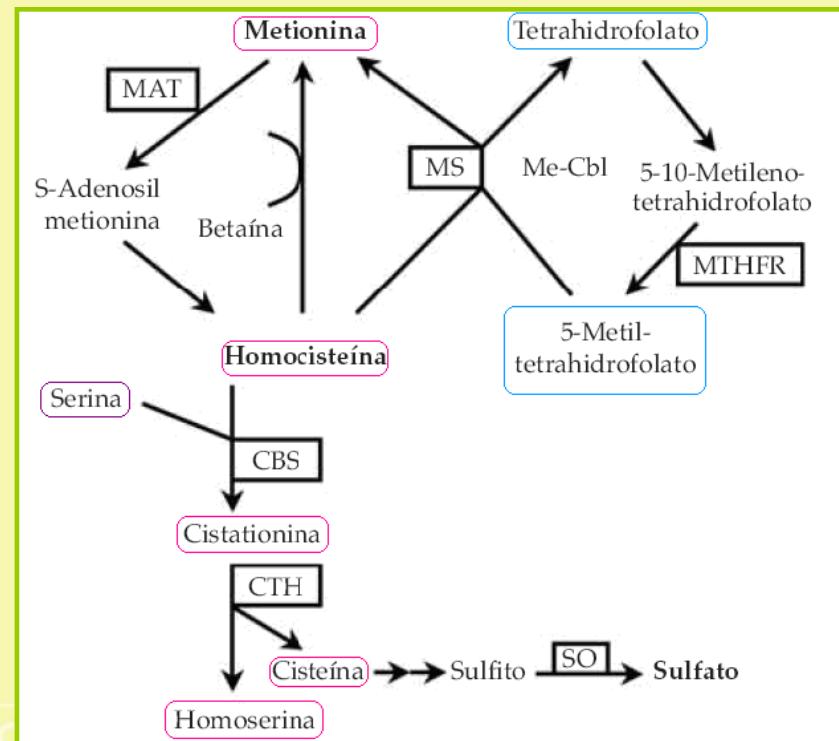
*La leucina (**neurotóxico**) es el aminoácido "guía" del tratamiento. Se recomienda mantener valores plasmáticos entre 300-500 μ M.

Existen grandes diferencias individuales de tolerancia por ello, los aportes de BCAA en cada paciente deben basarse en sus concentraciones plasmáticas, suplementando isoleucina y valina si es preciso. Se recomienda además suplemento de tiamina para todas las formas de MSUD.



Aminoacidopatías: Homocistinuria (Hcy)

- Es AR y se caracteriza por concentraciones elevadas de homocisteína en sangre y en orina.
- La homocisteína es un aminoácido azufrado, no esencial, que se origina a partir de la metionina.
- Incidencia aproximada basada en el cribado neonatal: 1/200.000-300.000 recién nacidos vivos



Características clínicas de la homocistinuria por déficit de CBS

	<i>Más frecuentes</i>	<i>Menos frecuentes</i>
<i>Sistema Nervioso Central</i>	Retraso mental Síntomas psiquiátricos	Convulsiones Signos extrapiramidales
<i>Ojos</i>	Ectopia lentis Miopía	Glaucoma Cataratas Atrofia óptica
<i>Esqueleto</i>	Osteoporosis Hábito marfanoides Escoliosis Vértebras bicóncavas	Aracnodactilia Genu valgum Pies cavos
<i>Vascular</i>	Oclusiones	Flujo malar Livedo reticularis



Diagnóstico

Ante un valor elevado de metionina es necesario determinar:

- **Aa en plasma y orina (HPLC)**
- **Homocisteína en plasma (HPLC)**
- **Acilcarnitinas en sangre (MS/MS)**
- **Ácidos orgánicos en orina (CG/MS, HPLC/MS, ...)**

De este modo se realiza el diagnóstico diferencial de las homocistinurias

Tratamiento

El objetivo es disminuir la Hcy plasmática ($< 50 \mu\text{M}$) y disminuir el riesgo de trombosis:

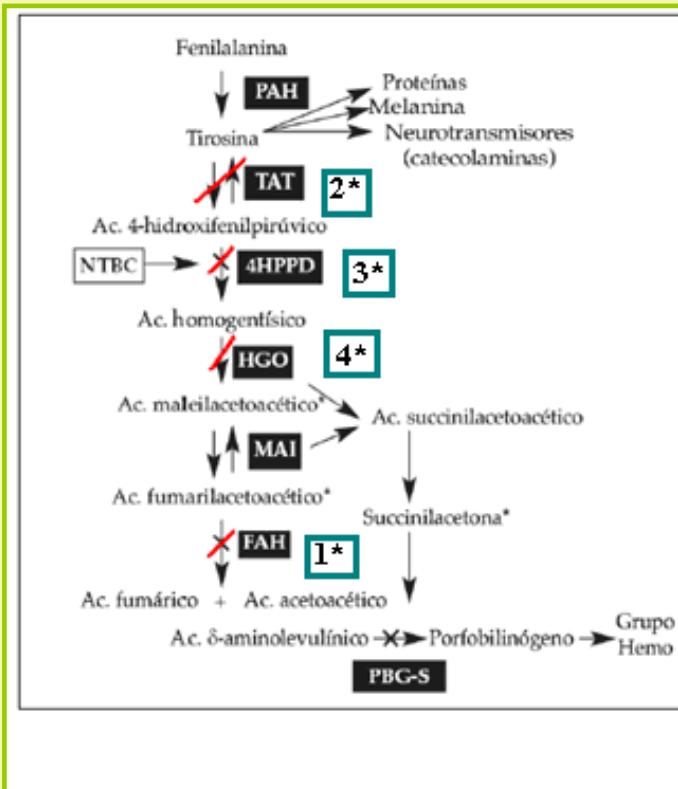
-Aumento de la actividad enzimática residual, administrando **piridoxina** para valorar respuesta al cofactor.

-Tratamiento dietético. dieta restringida en Met y suplementada con L-cistina. La dieta se ajusta en función de los niveles de Hcy y demás aa.

- Betaína. Disminuye Hcy pero puede elevar en exceso la metionina (disminuir si Met $> 1000 \mu\text{M}$)

Aminoacidopatías:Tirosinemias

La tirosina es un aminoácido no esencial que se obtiene a partir de la dieta o por hidroxilación de la fenilalanina. Participa en la síntesis de proteínas, es precursor de la biosíntesis de neuerotransmisores (dopamina, noradrenalina, adrenalina), hormonas tiroideas (tiroxina, T3) y otras sustancias como la melanina.



Enzimas:

PAH	Fenilalanina hidroxilasa
TAT	Tirosina aminotransferasa
4-HPPD	4-Hidroxifenilpiruvato dioxygenasa
HGO	Ácido homogentisico oxidasa
MAI	Maleilacetoacetato isomerasa
FAH	Fumarilacetoacetato hidrolasa
PBG-S	Porfobilinógeno sintasa

(*) Metabolitos tóxicos

Enfermedad	Cribado MS/MS	AA por cromatografía de intercambio iónico	AAOO por CG/MS	Diagnóstico confirmatorio
Tipo I ó hepática	Tirosina Succinilacetona	Plasma: ↑ Tirosina ↑ Metionina ↑ Fenilalanina Orina: ↑ Tirosina ↑ Metionina ↑ δ aminolevulónico	↑ Succinilacetona ↑ fenilpirúvico ↑ fenilláctico ↑ fenilacético	Mutaciones gen FAH Ens. enzimáticos: - Actividad PBG sintasa - Actividad FAH
Tipo II u ocular	Tirosina	Plasma: ↑ Tirosina	↑ fenilpiruvato ↑ fenillactato ↑ fenilacetato ↑ N-acetiltirosina ↑ P-tiramina	Mutaciones gen TAT
Tipo III	Tirosina	Plasma: ↑ Tirosina	↑ fenilpiruvato ↑ fenillactato ↑ fenilacetato.	Mutaciones gen HPD
Alcaptonuria			Ác. Homogentísico	Mutaciones gen HPD

Clínica

Tirosinemia tipo I:

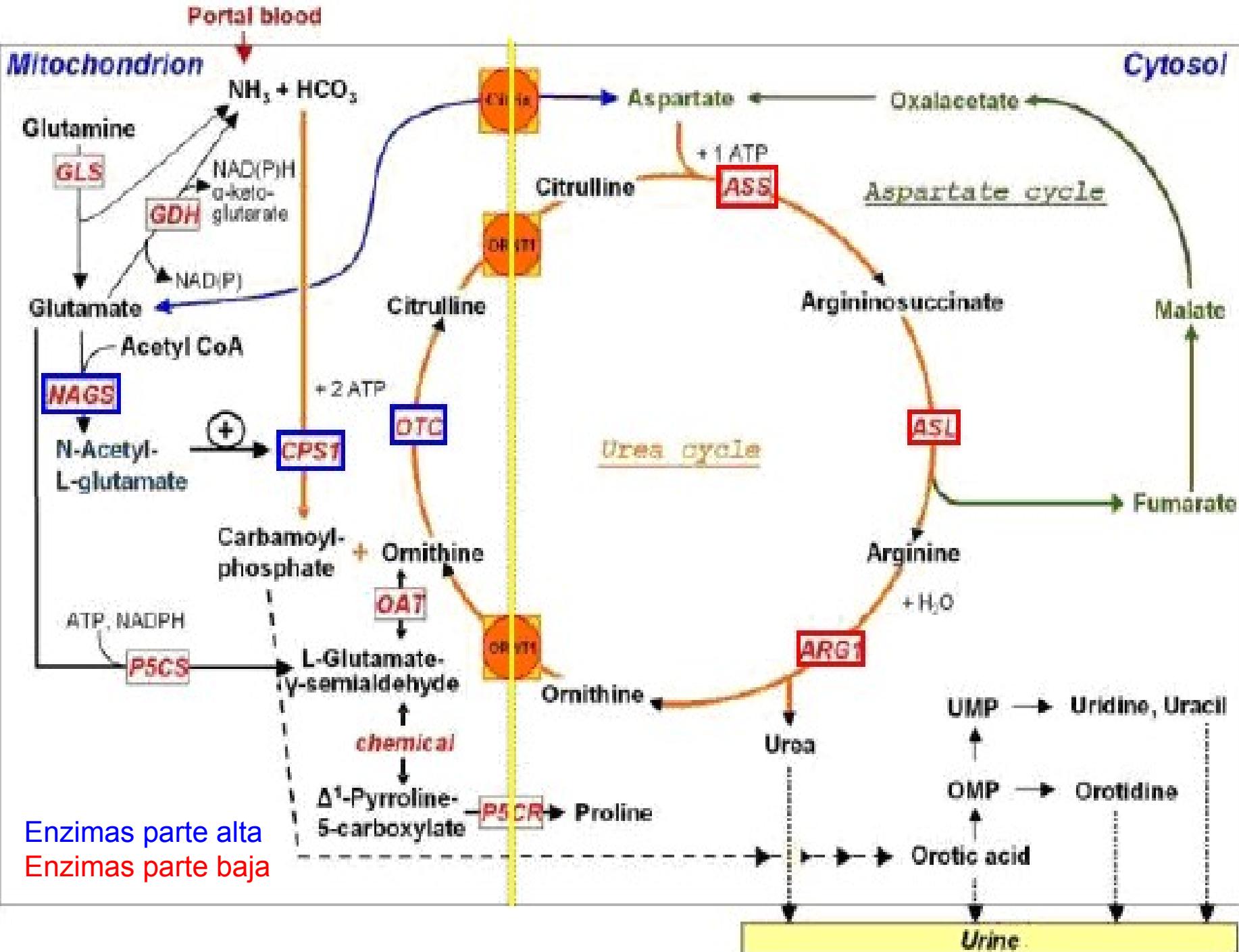
- **Aguda** (neonatal o infancia): fallo hepático agudo, vómitos, sangrado, hipoglucemia y disfunción tubular renal. Además está afectada la capacidad de síntesis hepática, con presencia de coagulopatía importante.
- **Crónica**: Hepatomegalia, retraso de crecimiento, raquitismo, cirrosis, tubulopatía, neuropatía, carcinoma hepatocelular, crisis neurológicas, porfiria-like.

Tirosinemia tipo **II**: afectación ocular, lesiones cutáneas y complicaciones neurológicas con algún grado de déficit intelectual.

Tratamiento

- TYR I: restricción dietética Tyr y Phe manteniendo niveles plasmáticos 200-400 de Tyr y 30-70 μ M de Phe. La nitisinona (NTBC), inhibe la enzima 4-HPPD, previniendo la degradación de Tyr y la formación de metabolitos tóxicos.
- El trasplante hepático: en pacientes críticos que no muestran mejoría con NTBC y en aquellos que desarrollan carcinoma hepatocelular.





Se conocen 6 defectos enzimáticos hereditarios de este ciclo que dan lugar a una hiperamonemia:

-Parte intramitocondrial: son formas hipocitrulinémicas.

-Parte citoplasmática: cursan con diferentes grados de hipercitrulinemia.

El diagnóstico vendrá determinado por el patrón de aminoácidos alterados. La arginina se encuentra disminuida en todos los déficits excepto en la argininemia. Por otra parte, dos de los déficits más frecuentes corresponden a la parte alta del ciclo (OTC y CPS) y presentan niveles bajos de citrulina, siendo determinante para el diagnóstico diferencial la cuantificación del ácido ~~orótico en orina, que estará aumentado en la OTC.~~

Tratamiento: amonio < 80 μM y Gln < 800 μM .

Durante las crisis hiperamonémicas:

***Supresión ingesta proteica** (no +24-48 h)

***Aumento del aporte energético** (glucosa y lípidos)*

***Utilizar fármacos quelantes** (benzoato sódico, fenilbutirato sódico) favorecen la eliminación del amonio.

*Si/amonio/>400 mol \rightarrow **detoxificación extracorpórea.**

Hiperamonemia ($\text{NH}_4 \geq 50 \mu\text{mol/L}$; en neonatos $\geq 110 \mu\text{mol/L}$)

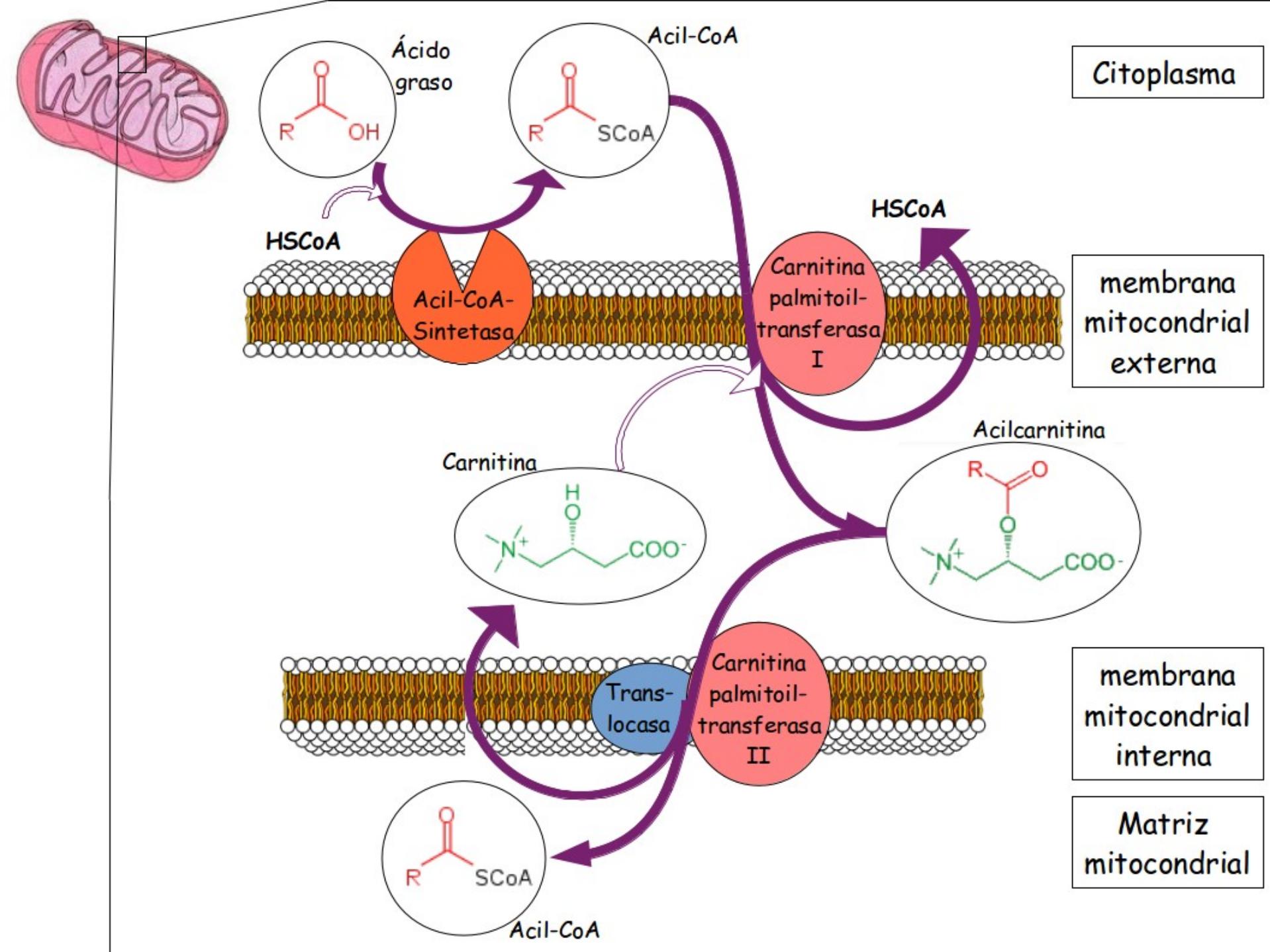
Patrón de aminoácidos específico

- ➡ **Gln**, Ala, Gly, Asn (almacenamiento de N) normalmente ↑ plasma
- ➡ **Cit** ↑ def. ASS, ASL, AS ↓ def. NAGS, CPS I, OTC
- ➡ **Arg** ↑↑ def ARG ↓ En los demás
- ➡ **Ac argininosuccínico** ↑↑ def ASL

Ácido orótico (y uracilo) en orina (derivado de exceso de carbamilfosfato, que entra en la vía de las pirimidinas)

- ↑ def OTC (y posteriores a la formación de CPS)
- N def CPS I, NAGS (muy poco frecuente)

Herencia AR, excepto la deficiencia en OTC ligada al cromosoma X. Presentan una incidencia entre 1/10.000 -50.000 RN.



Alteraciones

Deficiencia	Perfil de Acilcarnitinas	Cocientes
Primario de carnitina (OCTN)	$\downarrow \mathbf{C0}$ $\downarrow \text{C2,C3,C16,C18,C18:1}$	$\downarrow \mathbf{C3/\text{Metionina}}$ $\downarrow \text{C0+C2+C3+C16+C18/Citrulina}$
Deficiencia de CPTI	$\uparrow \mathbf{C0}$ $\downarrow \text{C16,C18,C18:1}$	$\uparrow \mathbf{C0/C16+ C18}$ $\downarrow \text{C16+C18:1/C2}$
Deficiencia de CPTII y CACT	$\downarrow \mathbf{C0, C2}$ $\uparrow \text{C16,C18,C18:1}$	$\uparrow \mathbf{C16+C18:1/C2}$ $\downarrow \text{C0/C16+C18}$



C0	Carnitina libre
C2	Acetilcarnitina
C3	Propionilcarnitina
C16	Palmitoilcarnitina
C18	Estearoilcarnitina
C18:1	Oleoilmarnitina

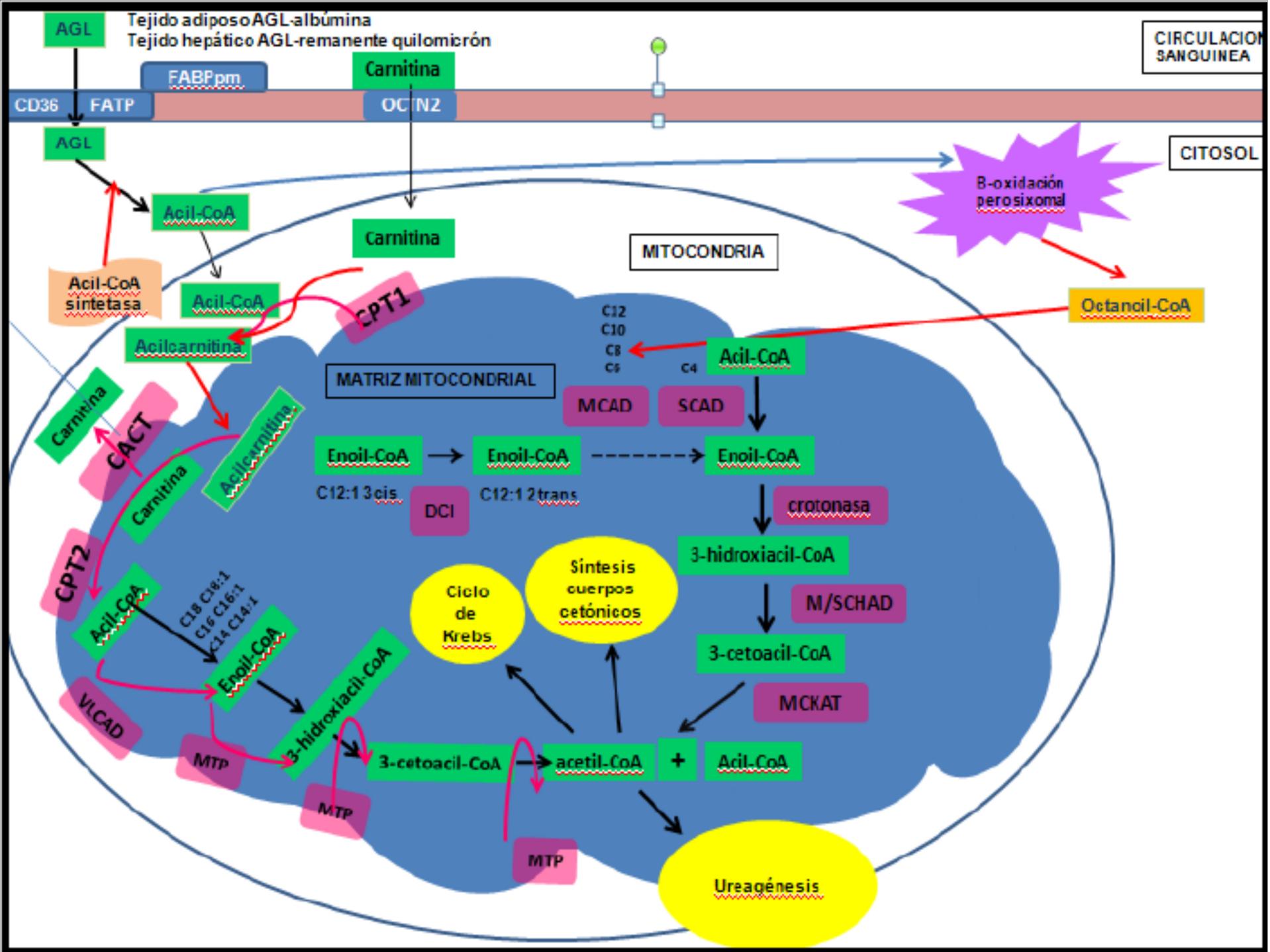
Clínica.

- **Presentación infantil:** alteración hepáticas, miotonía, miocardiopatía dilatada, hipoglucemia hipocetósica, hiperamoniemia, hipertransaminasemia y encefalopatía hepática. Los factores desencadenantes son ayuno y/o infecciones comunes.
- **Presentación en adultos:** rabdomiolisis, disminución de la tolerancia al ejercicio físico, anemia, debilidad muscular y estrés respiratorio.

Tratamiento

- **Dietético:** mantener la glucemia sin requerir la oxidación de los ácidos grasos.
- En las deficiencias de CPT I, CPT II y CACT debe realizarse la restricción de triglicéridos de cadena larga.
- **Farmacológico:** se administra L-carnitina en la deficiencia primaria. Los niveles plasmáticos de carnitina libre deben estar en torno a 25-50 μmol .





Acrónimo	Acilcarnitinas	Ac. orgánicos	Bioquímica
SCAD	↑ C4	DCB, Ácidos atípico, etilmalónico y metilsuccínico	↑ amonio y academia láctica.
MCAD	↑ C6, C8,C10 ↓C0	3-fenilpropionilglicina, ácido hexanoico y 7-octanoico, DCB	↑ amonio, GOT, LDH, ácido úrico, octanoico y cis-4-decenoico
VLCAD	↑ C14, C14:1, C14:2, C16, C18:1 ↓C0	DCB de cadena media y larga	↑ CK, mioglobina y ácido tetradecenoico
SCHAD	C4OH	Ácido dodecanedioico, butírico y glutárico	↑ CK, transaminasas, mioglobina y CC
LCHAD	↑ C16:OH, C16:1OH,C18OH, C18:1OH, C18:2OH ↓C0	DCB y DCB de cadena larga	↑CK, amonio, láctico, mioglobina ↓pH
MADD	↑ C4, C5, C8, C10,C16 ↓C0	Metilbutirilgliceina, ácido glutámico, butírico, hexanoico y etilmalónico.	↑ amonio ↓pH
MTP	↑ C16, C16OH, C16:1OH, C18, C18OH, C18:1OH	DCB	↑ CK
MCKAT	↑ C5OH, C5:1	Tg, Ac. Butírico, metilacetoacético, butanona, metiltiouracilo	↑ Amonio, CC, glicina en sangre ↓CC en orina

Clínica

- En función del defecto enzimático (hepatopatia, miopatia,signos neurológicos, mioglobinuria..)

Tratamiento

- Va dirigido a evitar el catabolismo de los ácidos grasos aumentando el aporte de carbohidratos, restringiendo el aporte de grasas y evitando la lipólisis.
- En lactantes el ayuno debe ser inferior a 4 horas. En niños puede alargarse hasta 6 horas, consumiendo hidratos de carbono de absorción lenta antes de acostarse.
- La restricción de grasas no es absoluta, pudiéndose administrar triglicéridos de cadena media (MCT) en las deficiencias de LCHAD y VLCAD o triglicéridos de cadena larga y muy larga en las deficiencias de MCAD.
- Por el contrario, los MCT están **contraindicados** en las deficiencias de SCAD, SCHAD, MCAD y MAD.

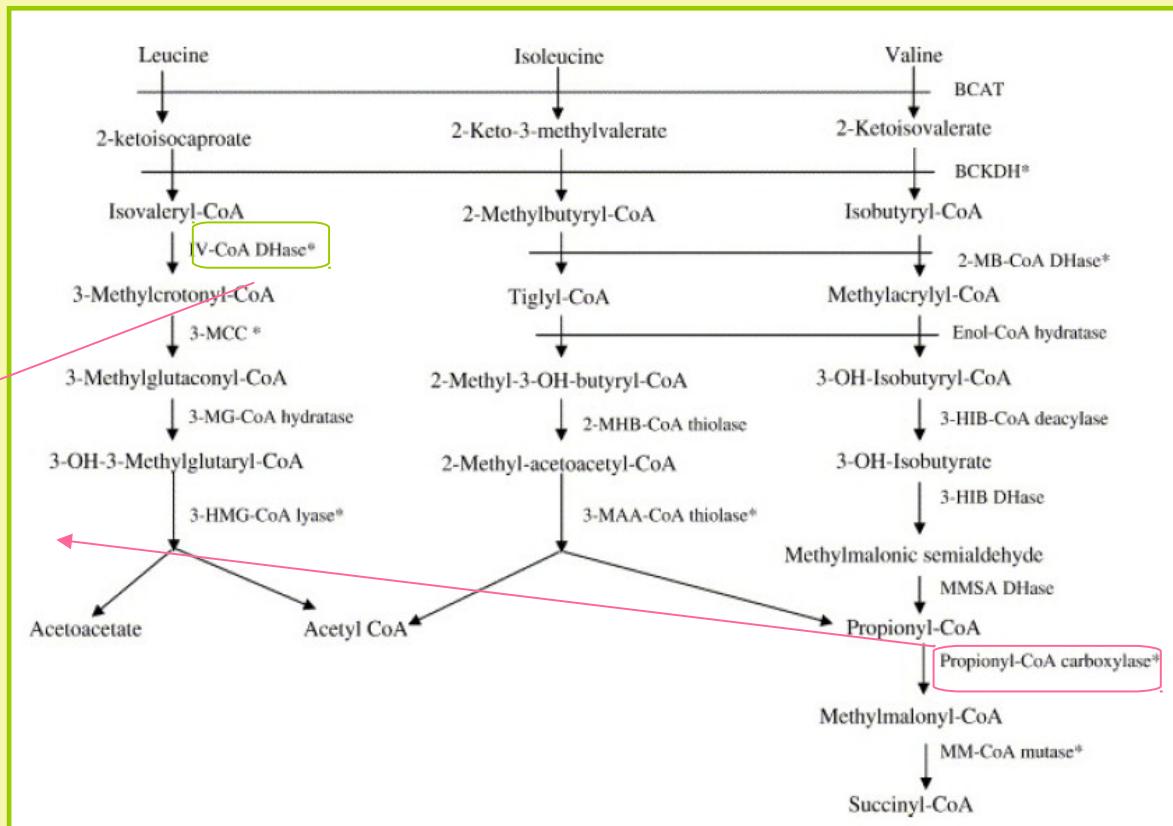


Acidemias orgánicas

Grupo de enfermedades que se caracterizan por una excreción aumentada de ácidos orgánicos no aminados en la orina.

Acidemia isovalérica

Acidemias metilmalónicas



Método de cribado

Patología	Perfil de carnitinas elevadas en el cribado	Rangos de normalidad
Academia isovalérica	C5	0.39-0.48 μ M
Academias propiónica y metilmalónica	C3	4.36-5.50 μ M
	C3/C2	0.17-0.20 μ M
	C3/C16	1.70-2.00 μ M



Manifestaciones clínicas

En la forma **neonatal** aparece un cuadro tipo intoxicación con anorexia, vómitos y somnolencia, seguido de letargia, convulsiones, coma e incluso muerte.

Bioquímicamente: hiperamonemia, acidosis metabólica con anión GAP aumentado, cetonemia, cetonuria, trombocitopenia, neutropenia y/o anemia.

Las crisis agudas son las que van a marcar el **deterioro neurológico-cognitivo** de la enfermedad.

Tratamiento

1. Suprimir el aporte proteico y favorecer el anabolismo con soluciones glucosadas y lípidos.
1. Incorporar proteínas de forma escalonada, evitando leucina en las AIV y aminoácidos propiogénicos (ile, val, met y thr) en las MMAUs y AP.
1. Hidratar y forzar la diuresis para la eliminación de metabolitos tóxicos y la corrección de la acidosis administrando bicarbonato endovenoso.

-Para corregir la hiperamonemia:

*Leve-moderada: depuradores (benzoatosódico).

*Severas: carbamilglutamato para la activar el ciclo de la urea. Como detoxificador se emplea la carnitina y en la AIV también glicina.

Confirmación mediante perfil de aminoácidos por HPLC intercambio catiónico

- Primero eluyen los aminoácidos básicos y luego los ácidos. Después de la separación se realiza la derivatización postcolumna con ninhidrina.
- Los aa pueden ser detectados en el ultravioleta, ya que absorben a entre 190-210 nm. Sin embargo, en esta región del espectro también absorben los disolventes y otros componentes de la muestra, por lo que se recurre a la formación de derivados detectables a otras longitudes de onda o fluorescentes.
- Con los aa primarios forma un complejo morado que absorbe a 570 nm (enlace amino + ninhidrina), y con los aa secundarios (Pro e Hidroxiprolina) forma un complejo amarillo que absorbe a 440 nm.

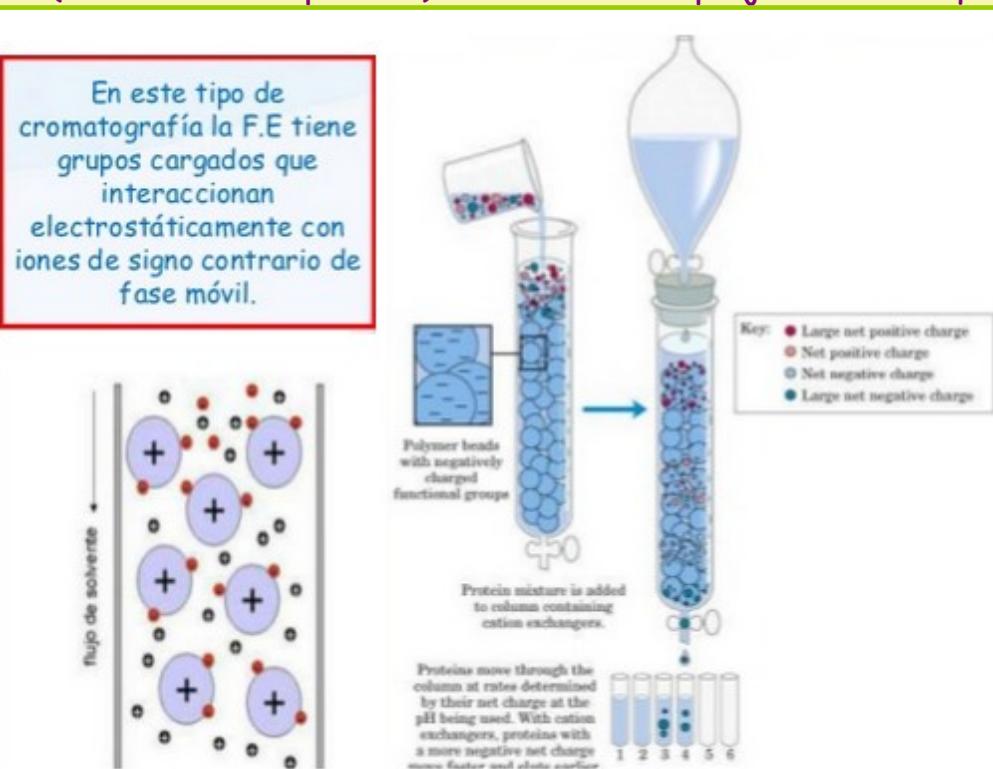
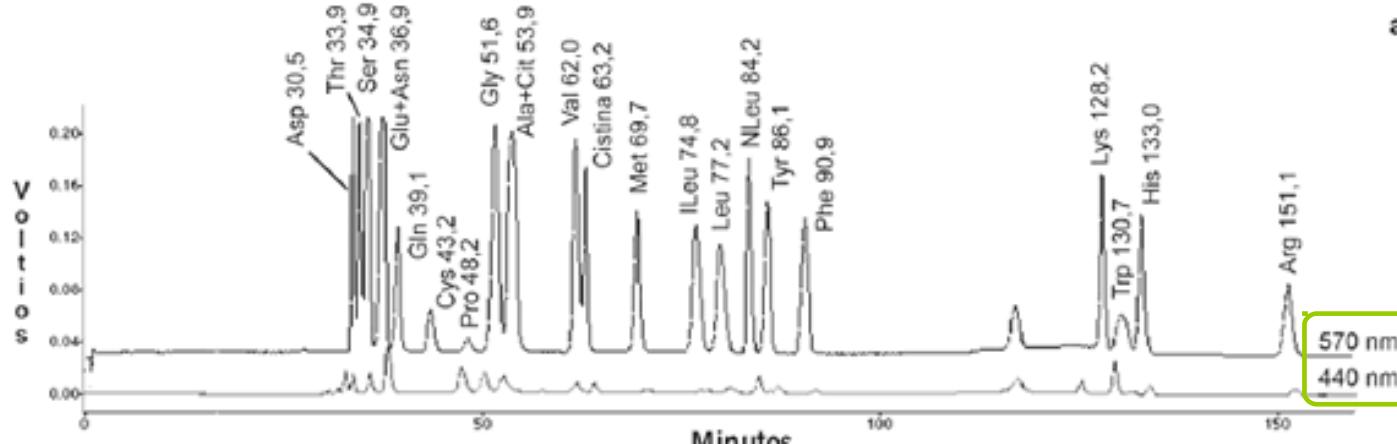


Tabla II. Tiempos de retención (TR) y sus coeficientes de variación (CV), según el orden de elución de los aminoácidos puros. La ventana de elución fue ajustada con respecto al CV para la máxima resolución de los picos.

Orden de elución	Amino ácido	TR (min)	Ventana de elución (min)	CV Intraensayo para el TR	CV Interensayo (precisión)	Linealidad (R^2)
1	Asp	30,5	2,0	3,3	4	0,9463
2	Thr	33,9	2,0	1,4	6	0,9853
3	Ser	34,9	2,1	1,4	16	0,8501
4	Glu+Asn	36,9	2,5	2,0	13	0,9070
5	Gln	39,1	2,5	2,0	4	0,9198
6	Cys	43,2	4,2	2,1	2	0,6560
7	Pro	48,2	2,5	1,6	4	0,8107
8	Gly	51,6	3,4	1,4	28	0,9597
9	Ala-Cit	53,9	3,5	1,4	4	0,9222
10	Val	62,0	1,0	0,8	6	0,9332
11	Cistina	63,2	4,4	0,8	30	0,9565
12	Met	69,7	2,0	1,0	22	0,9323
13	ILeu	74,8	4,6	0,7	5	0,9329
14	Leu	77,2	4,6	0,7	5	0,9158
15	Tyr	86,1	4,8	0,5	6	0,9130
16	Phe	90,9	5,3	0,5	8	0,9206
17	Lys	128,2	5,6	0,2	8	0,9387
18	Trp	130,7	7,3	0,4	7	0,9027
19	His	133,0	8,0	0,3	6	0,9012
20	Arg	151,5	7,6	0,3	4	0,9391





A red thought bubble is located in the upper right corner of the image. It contains the text 'Muchas Gracias' in a red sans-serif font. The thought bubble has a wavy, cloud-like shape with a red outline.