

Artículo de revisión

Interpretación del tamiz metabólico. Análisis de los carbohidratos (IV de IV partes)

Dra. Marcela Vela, Enfra. Isabel Cicerón,* QFB Martha Pérez,* QFB Joel Ortiz,* M en C Isabel Ibarra,* M en C Zazil Olivares,* T. Lab. Ricardo Morales,* QC Claudia González,* Biol. Salvador Gamboa,* Dr. José Rivera**

Los carbohidratos son moléculas de tres o más carbonos que pueden clasificarse en tres grupos principales: monosacáridos, que consisten en unidades simples de tres a siete carbonos; oligosacáridos, que constan de dos a cuatro monosacáridos; y los polisacáridos, constituidos por largas cadenas o polímeros de monosacáridos.¹ Por ejemplo, la lactosa es un oligosacárido compuesto de una unidad de glucosa y una de galactosa, y el almidón es un polímero de la glucosa.

El tamiz metabólico que se realiza en el laboratorio del Instituto Nacional de Pediatría es limitado en lo referente al diagnóstico de los trastornos de los carbohidratos, pero es muy útil para los casos de fructosuria, glucosuria renal, y galactosemia. Además de la detección de azúcares reductores, descrita en la primera parte de esta serie, se realiza una cromatografía de azúcares, se cuantifica la galactosa y se determina la actividad de la galactosa 1P uridiltransferasa (prueba de Beutler). Estas pruebas se detallan a continuación.

a) Cromatografía de azúcares en papel²⁻⁴

Es una prueba cualitativa con la que se puede detectar en la orina las concentraciones de azúcares reductores por arriba de los 100mg/dL y se realiza después de obtener una prueba de Benedict positiva. Este método bioquímico es muy sensible y permite separar los distintos monosacáridos y disacáridos de la orina.

La técnica consiste en depositar la muestra de orina en un papel filtro de 46 x 57 cm, que se corre en un sistema compuesto de agua-acetato y piridina, que se realiza en forma descendente por un periodo de 16 a 18 horas. Posterior-

mente, se seca y se revela con una mezcla de anilina, ácido acético, ácido fosfórico y acetona; se deja secar este revelador y se hornea a 100 °C hasta la completa visualización de los azúcares. La glucosa, la galactosa y la lactosa aparecen como manchas cafés. La fructosa, la xilosa y la xilulosa son de color rojo púrpura. El color se mantiene estable por varias semanas. La fructosa y otras cetosas tiñen ligeramente y la sacarosa no muestra ninguna reacción.

Para evitar falsos negativos, la muestra de orina debe ser colectada después de que el paciente haya ingerido por lo menos 12 tomas de leche materna o maternizada; es decir, cuando menos 48 horas después de iniciada la lactancia. La orina debe mantenerse congelada hasta su procesamiento.

Interpretación de la cromatografía de azúcares

Una persona normal puede excretar pequeñas cantidades de hexosas y pentosas (5mg de glucosa/dL ó 3 mg de xilosa/dL). Cuando se obtiene una prueba positiva es necesario realizar la cuantificación específica del azúcar con otro método. Cuando la prueba es positiva para galactosa se pueden hacer otros exámenes más específicos, tales como el Beutler.⁵

Los neonatos, particularmente los prematuros, pueden excretar en la orina pequeñas cantidades de glucosa y de galactosa durante las primeras semanas de vida.^{6,7} En las mujeres embarazadas o lactando es ocasional la lactosuria. Los azúcares no utilizables pueden aparecer en la orina cuando su ingestión es excesiva.

En la mayoría de las enfermedades metabólicas de los azúcares (con excepción de algunos trastornos de la glucosa) los síntomas clínicos y los hallazgos de laboratorio se detectan sólo cuando se ingiere el azúcar involucrado. Por ejemplo, la galactosuria de la galactosemia sólo se hace evidente hasta que el niño afectado consume leche con lactosa y la intolerancia hereditaria a la fructosa se manifiesta hasta que el infante recibe azúcares provenientes de las frutas.⁸

* Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría.

Correspondencia: Dra. Marcela Vela. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, 04530, México, DF.

Recibido: julio, 2001. Aceptado: febrero, 2002.

Las grandes cantidades de galactosa en la orina sugieren la posibilidad de un defecto metabólico de la galactosa, ya sea una deficiencia de galactosa-1-P-uridiltransferasa (conocida como galactosemia clásica), o una de galactoquinasa o epimerasa. Esta prueba debe considerarse como sistemática para todos los recién nacidos con ictericia.⁹

La presencia de fructosuria y galactosuria, además de una historia clínica sugestiva de hipoglicemia, fundamentan el diagnóstico de galactosemia o de intolerancia a la fructosa. Los disacáridos (sucrosa y lactosa) en la orina pueden acompañarse de síntomas gastrointestinales, como el vómito y la diarrea. La eliminación de dichos azúcares de la dieta puede aliviar los síntomas. Los niños con intolerancia a la lactosa también pueden padecer aminoaciduria generalizada, que suele corregirse al modificar la dieta. Debido a que la lactosa no se excreta en cantidades suficientes para ser detectadas con la prueba de Clinitest, los pacientes con sintomatología sugestiva de intolerancia a los disacáridos deben someterse a una cromatografía de azúcares. Los niños intolerantes a todos los carbohidratos dietéticos pueden tener un raro síndrome denominado malabsorción de glucosa-galactosa. Estos dos azúcares se pueden encontrar en las evacuaciones y la glucosa en la orina³ (cuadro 1).

Cuadro 1. Interpretación de la cromatografía de azúcares

Glucosuria	Alimentaria benigna. Diabetes, ciertas lesiones cerebrales, "diabetes esteroidea", nefrosis y distrofias renales tubulares primarias y secundarias.
Lactosuria	Alimentaria benigna, especialmente en los niños que reciben alimentos infantiles que contienen lactosa por arriba de los 30mg/dL; gastroenteritis, esteatorrea y hepatitis.
Lactosuria, galactosuria, fructosuria	Se ha informado como hallazgo en casos de hepatitis aguda, gastroenteritis, raquitismo y estenosis pilórica.
Fructosuria	Si se detecta en lactantes, en rangos de 20mg/dL, se puede considerar normal. Se pueden detectar cantidades anormales en pacientes con diabetes, hepatitis, enfermedad de Wilson y envenenamiento por mercurio. En la edad preescolar puede manifestarse en síndromes que cursan con vómito, hipoglicemia, sudoración excesiva, variable aminoaciduria, albuminuria e hipofosfatemia.
Galactosuria	Puede ser un dato normal en los lactantes si es leve. Puede ocurrir con la hepatitis. En los pacientes con galactosemia suelen encontrarse concentraciones mayores de 15mg/dL de orina, después de una carga de galactosa.
Sucrosuria	Se puede dar en los niños con una alimentación rica en sucrosa (dentro de los rangos de 15mg/dL). Se ha descrito también en pacientes con pancreatitis.

Modificado de O'Brien³

b) Prueba de Beutler para galactosemia clásica¹⁰

Se usa para medir la actividad de la enzima galactosa-1-fosfato-uridil transferasa (Gal-1-P) en los eritrocitos. Es una prueba sencilla de fluorescencia, desarrollada por Beutler y Baluda,¹⁰ que consiste en tomar un disco de 3/8" con un perforador, de una muestra de sangre recolectada en papel filtro Schleicher & Schuell 903TM; el disco se pone en contacto con una mezcla de galactosa-1-fosfato (sustrato), UDPG y NADP (cofactores). Esta mezcla se incuba a 37 °C durante 120 min. Cada 30 min se toma una gota de la mezcla y se deposita en un papel filtro; se deja secar y luego se estudia dentro de una cámara oscura con luz ultravioleta, donde se observa la presencia o ausencia de un halo fluorescente alrededor de la gota. Ya que algunos medicamentos producen fluorescencia es necesario hacer un control del paciente, que consiste en usar la misma mezcla reactiva, pero sin el sustrato. Si la actividad de la enzima galactosa transferasa es normal, la galactosa 1P se convertirá en galactosa 6P y el NADP se transformará en NADPH; este compuesto es muy fluorescente y su formación nos indica si la actividad enzimática es buena, deficiente o nula. Como el control no tiene sustrato no podrá transformar el NADP en NADPH y, por lo tanto, no será fluorescente; si hubiera fluorescencia sería debido a la acción de algún medicamento.

Toma de la muestra para la prueba de Beutler

Se pincha el talón del pie (en caso de neonatos y lactantes pequeños) o un dedo de la mano (en el caso de niños mayores) para obtener seis gotas uniformes de sangre y se depositan en un papel filtro Schleicher & Schuell 903TM. Se debe de vigilar que el área del círculo quede completamente llena con la sangre y verificar que la gota haya traspasado hasta la parte posterior del papel. Sólo se colocará una gota de sangre por cada círculo, de lo contrario se sobresaturará la muestra y dará un resultado erróneo. También hay que tener la precaución de no tocar con los dedos los círculos del papel filtro para evitar su contaminación. Se recolectará una muestra control, preferentemente de un individuo de la misma edad y dieta del paciente.

Las muestras deben secarse por tres horas a temperatura ambiente y procesarse inmediatamente, ya que la enzima transferasa se degrada con rapidez. De no procesarse el mismo día de la toma, la muestra debe guardarse en refrigeración dentro de una bolsa de papel encerado o de aluminio

con bolsitas de material hidrosκόpico para evitar la humedad. No deben almacenarse por más de ocho días.

Es muy importante tener presente que en vista de que este estudio se realiza en eritrocitos del paciente, éste *no deberá ser transfundido con sangre o sus derivados antes de la toma de la muestra* pues, en ese caso, se medirá la actividad enzimática del donador. Para realizar esta prueba en un individuo que ha sido transfundido se debe esperar 90 días.

En los niños prematuros con probable galactosemia clásica, la prueba se debe repetir dos semanas después de alimentarse con leche materna o maternizada, para evitar el riesgo de falsos negativos.⁵

Resultados e interpretación

En una muestra normal, la fluorescencia aparece en forma intensa desde los 30 min de incubación. En las muestras de los pacientes con galactosemia clásica no hay fluorescencia en ningún momento (120 minutos). En la variante de Duarte y en el heterocigoto de galactosemia hay fluorescencia hasta los 60 minutos, aunque es de menor intensidad; y, en el heterocigoto para la variante de Duarte hay fluorescencia a los 30 minutos, aunque de menor intensidad que la de un control normal.

Si la muestra no es fluorescente a los 30 min, quiere decir que la actividad enzimática es menor del 25%. En la variante de Duarte, un homocigoto tiene el 50% de la actividad y un heterocigoto un 25%. No se han descrito resultados falsos negativos con esta prueba. Los resultados falsos positivos (ausencia de fluorescencia) se pueden deber a que las muestras se mantuvieron a temperaturas extremas (calor o humedad).¹¹ La anemia severa modifica los resultados de esta prueba, debido a que la disminución de la hemoglobina es directamente proporcional a la concentración de la enzima.

c) Cuantificación de galactosa

En el laboratorio del Instituto Nacional de Pediatría, la galactosa se cuantifica con reactivos comerciales, mediante la técnica de ensayo inmunoenzimático, después de la extracción ácida de la galactosa en la sangre depositada en un papel filtro. Para que la prueba sea válida, el paciente debe haber recibido cuando menos 12 tomas de leche con lactosa, o bien, 48 horas después del inicio de la lactancia.

Los valores normales esperados para neonatos no deben exceder una concentración de galactosa de 6.0 mg/dL.¹²⁻¹⁴

REFERENCIAS

1. Dunger DB, Holton JB. Disorders of carbohydrate metabolism. En: Holton JB ed. The inherited metabolic diseases. 2nd ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1994;pp:49-50.
2. Thomas GH, Howell RR. Selected screening tests for genetic metabolic diseases. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1973;pp:43-9.
3. O'Brien D, Ibbot FA, Rodgerson D. Laboratory manual of pediatric microbiological techniques. 4th ed. New York: Hoeber Medical Division, 1968;pp:102-4.
4. Shih VE. Laboratory techniques for the detection of hereditary metabolic disorders. Cleveland: CRC Press, 1973.
5. Roe T, Ng WG. Disorders of carbohydrate and glycogen metabolism. En Blau N, Duran M, Blaskovics ME, ed. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. London: Chapman & Hall Medical, 1996;pp:277-94.
6. Woolf LI. Large-scale screening for metabolic disease in the newborn in Great Britain. En: Phenylketonuria and allied metabolic diseases. Proceedings of a Conference Held at Washington, DC, April 6-8, 1966.
7. Donnell GN. Clinical aspects and historical perspectives of galactosemia. In: Donnell GN Ed. Galactosemia: New Frontiers in Research. VS Department of Health and Human Services. NIH Pub. 1993; pp1-18
8. Seagal S, Berry GT. Disorders of galactose metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. 7th ed, New York: Mc Graw-Hill Inc, 1995;pp:967-1000.
9. Gitzelmann R. Disorders of galactose metabolism. En: Fernández J, Saudubray JM, van den Berghe G, eds. Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995;pp:87-93.
10. Beutler E, Baluda M. A simple spot test for galactosemia. J Lab Clin Med 1966;137:68.
11. Shih VE, Levy HL, Karolkewicz V, Houghton S, Efron ML, Iseélbacher K, Beutler E, and Mac Cready RA. Galactosemia screening of newborns in Massachusetts, N Engl J Med, 1971;284:753.
12. Grenier A, Laberge C. Rapid method for screening for galactosemia and galactokinase deficiency by measuring galactose in whole blood spotted paper. Clin Chem 1973;19:463.
13. Fujimara Y, Ishii S, Kawamura M. Microdetermination of galactose and galactose-1 phosphate in dried blood spots. Annal Biochem 1981;117:197.
14. Hochella NJ, Hillt JB. Fluorometric screening procedures for galactosemia utilizing the autoanalyzer. Clin Chem 1969;15:949.