

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona Departament
de Bioquímica i Biologia Molecular



Hospital Sant Joan de Déu
Servicio de Bioquímica Clínica
Unidad de Metabolopatías



Centro de Investigación Biomédica
en Red de Enfermedades Raras

Aplicaciones de la Electroforesis Capilar en el estudio de Errores Congénitos del Metabolismo

Mercedes Casado Río

Barcelona 2014

Programa de Doctorado de Bioquímica Clínica i
Biología Molecular, Departamento de Bioquímica i
Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Memoria para optar al grado de Doctor por la
Universitat Autònoma de Barcelona

Presentada por:
Mercedes Casado Río

Visto bueno:

Dr. Jordi Ordóñez Llanos
Servicio de Bioquímica
Hospital de la Sant Creu i Sant Pau
Tutor de la tesis

Dr. Rafael Artuch Iriberry
Servicio de Bioquímica
Hospital Sant Joan de Déu
Director de la tesis

Mercedes Casado Río
Servicio de Bioquímica
Hospital Sant Joan de Déu
Interesada

Barcelona 2014

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
- ELECTROFORESIS CAPILAR	11
• Introducción	11
• Instrumentación	13
• Fundamentos de la electroforesis capilar	14
• Modos de separación	16
- DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN (CDG)	19
• Introducción	19
• Defectos de la N-glicosilación	19
• Cribado de los CDG	21
- GABA	25
• Vía metabólica	25
• Defectos primarios	27
• Alteraciones secundarias	27
• Determinación de GABA en LCR	28
- OLIGOSACARIDOSIS	31
• Enfermedades lisosomales	31
• Oligosacaridosis	32
• Cribado de las oligosacaridosis y enfermedades relacionadas	33
JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS	37
- JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA	39
- HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	43
- OBJETIVO GENERAL	45
- OBJETIVOS CONCRETOS	45
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	47
- PACIENTES	51
• Población de estudio para la determinación de sialotransferrina	53

• Población de estudio para la determinación de GABA en LCR	55
• Población de estudio para el cribado de oligosacaridosis	57
• Aspectos éticos	58
- MÉTODOS ANALÍTICOS	59
• Análisis del perfil de glicosilación	61
- CE-UV	61
- Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida	65
- Isoelectroenfoque en geles de agarosa	66
- HPLC	66
- Diagnóstico enzimático y molecular de CDG-1a	67
• Análisis de GABA en LCR	68
- Determinación de GABA mediante MECK-LIF	68
- Métodos de diagnóstico diferencial en alteraciones del metabolismo del GABA	75
- Análisis de la excreción de GHB mediante GC-MS	75
- Estudio del gen ALDH5A1	78
• Análisis de oligosacáridos en orina	79
- Cromatografía en capa fina	79
- CE-LIF	81
- Métodos para el diagnóstico diferencial de las oligosacaridosis	84
- Análisis del perfil de excreción de aminoácidos mediante cromatografía de intercambio iónico	84
- Análisis de la excreción de GAGs mediante espectrofotometría	87
- MÉTODOS ESTADÍSTICOS	90
• Validación de procedimientos	92
- Procedimientos cuantitativos	92
- Procedimientos cualitativos	94
• Análisis estadístico de datos	95
RESULTADOS	97
1. Estandarización y evaluación de la determinación de sialotransferrina por CE con detección ultravioleta para el estudio de defectos congénitos de la glicosilación. Aplicación de la determinación de sialotransferrina en el diagnóstico de casos con fenotipos leves	101

2. Estandarización de la determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser: evaluación del procedimiento y establecimiento de valores referencia. Aplicación de la determinación de GABA en LCR como biomarcador para el estudio de pacientes pediátricos con enfermedades neurológicas	113
3. Estandarización y evaluación de un nuevo procedimiento para la determinación de oligosacáridos en orina por CE y detección de fluorescencia inducida por láser en el cribado de oligosacaridosis y enfermedades relacionadas	127
DISCUSIÓN CONJUNTA	157
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO	191

ABREVIATURAS

APTS	8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato
Asn	Asparagina
β -CD	β -ciclodextrina
BSTFA	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CDG	Defecto congénito de la glicosilación
CE	Electroforesis capilar
CMC	Concentración micelar crítica
COG	Complejo oligomérico del Golgi
CV	Coefficiente de variación
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
DMB	1,9-azul de dimetilmetileno
ECM	Errores congénitos del metabolismo
EOF	Flujo electroosmótico
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
Fuc	Fucosa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	Glutamato decarboxilasa
GAGs	glucosaminaglicanos
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas
GHB	Ácido γ -hidroxibutírico
Glc	Glucosa
Glc4	6- α -D-glucopiranosil-maltotriosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IEF	Isoelectroenfoque

LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIF	Fluorescencia inducida por láser
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
Man	Manosa
MECK	Cromatografía electrocinética micelar
MS	Espectroscopía de masas
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NDA	Naphthalenedialdehido
OPA	O-phtaldehido
PMM	Fosfomanomutasa
RE	Retículo endoplasmático
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Ser	Serina
SIM	Selected Ion Monitoring
SSADH	Semialdehidosuccínico deshidrogenasa
Tf	Tranferrina
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina
TOF	Tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta
Vis	Visible

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

- ELECTROFORESIS CAPILAR

- Introducción
- Instrumentación
- Fundamentos de la electroforesis capilar
- Modos de separación

- DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN (CDG)

- Introducción
- Defectos de la N-glicosilación
- Cribado de los CDG

- GABA

- Vía metabólica
- Defectos primarios
- Alteraciones secundarias
- Determinación de GABA en LCR

- OLIGOSACARIDOSIS

- Enfermedades lisosomales
- Oligosacaridosis
- Cribado de las oligosacaridosis y enfermedades relacionadas

ELECTROFORESIS CAPILAR

Introducción

La separación mediante electroforesis tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las moléculas en solución bajo la acción de un campo eléctrico. En la electroforesis capilar (CE), la separación tiene lugar en un capilar de pequeño diámetro, lo que le confiere una serie de ventajas respecto a otros métodos de separación. Entre sus ventajas podemos destacar una alta resolución, corto tiempo de separación, bajo coste de análisis, pequeño volumen de muestra requerido y bajo consumo de reactivos. Además de éstas ventajas, cabe destacar la gran versatilidad de esta tecnología, ya que permite la separación de una gran variedad de compuestos iónicos o neutros, tanto polares como apolares. También se puede aplicar a compuestos de diferente peso molecular, desde pequeños iones hasta biomoléculas de gran tamaño. Todo ello, hace que la electroforesis capilar compita y complemente otras técnicas de separación más establecidas como la electroforesis convencional o la cromatografía.

La electroforesis convencional fue descrita por el bioquímico sueco Arne Tiselius en 1937, por lo cual le fue concedido el premio Nobel de Química en 1948, y desde entonces se ha utilizado como técnica de separación. El uso de capilares como soporte electroforético no se llevó a cabo hasta 1967, cuando Stellan Hjertén empleó capilares de 3 mm de diámetro interno. Más tarde, en la década de los 70, Virtanen y Mikkers mediante el uso de capilares de 200 μm de diámetro interno, demostraron algunas de las ventajas de utilizar capilares como soporte de electroforesis: se evitaba el calentamiento por el efecto Joule y esto permitía trabajar a altos voltajes, mejorando así la resolución y el tiempo de análisis. En el año 1981, Jorgenson describió separaciones utilizando por primera vez un tubo capilar de 75 μm de diámetro interno y voltajes más elevados. En capilares de tan pequeño diámetro interno se da el fenómeno de electroósmosis, que permite el movimiento de los compuestos a lo largo del capilar con mucha menor dispersión de la que se observa en la cromatografía líquida. En este trabajo quedó patente el gran potencial de separación de esta técnica, y tan solo ocho años después apareció el primer aparato comercial de electroforesis capilar. Desde entonces se ha desarrollado exponencialmente el uso de esta técnica,

hecho que queda reflejado en el número de publicaciones en revistas científicas que utilizan esta técnica como principio de separación, que desde el año 2000 supera las 1000 publicaciones anuales (PubMed). En los años posteriores se llevaron a cabo innovaciones en cuanto a los sistemas de detección y al desarrollo de diferentes modos de separación de electroforesis capilar, lo que ha convertido a esta tecnología en una poderosa herramienta de separación, especialmente para compuestos de interés biológico y farmacológico.

Diversas publicaciones de los últimos años muestran que la CE está siendo cada vez más empleada en el campo de los errores congénitos del metabolismo, sustituyendo en algunos casos a tecnologías más habituales. Debido a su gran versatilidad, los compuestos analizados son de muy diversa naturaleza, por ejemplo análisis de ácidos orgánicos, ácido orótico y catecolaminas en orina o el perfil de ácidos grasos libres en plasma mediante CE-UV o CE-LIF (Baena 2005, Tůma 2011), mejorando en muchos casos los largos pretratamientos de las muestras necesarios en los procedimientos habituales. También se han descrito diversos procedimientos para el análisis de aminoácidos en plasma u orina mediante CE-LIF (Lorenzo 2013, Zhang JB 2013) con un tiempo de análisis muy inferior al obtenido mediante el método convencional de cromatografía de intercambio iónico. A parte del gran número de publicaciones que describen procedimientos para el diagnóstico dirigido de los ECM, últimamente también se han desarrollado diversos procedimientos de CE-MS para el análisis de aminoácidos y acilcarnitinas en sangre seca en los programas diagnóstico precoz (Chalcraft 2009, Britz-McKibbin 2013). La ventaja de los procedimientos basados en CE es que permiten la resolución de isómeros no separables mediante el análisis por tándem MS, por lo cual se utilizan como segunda línea. La CE, principalmente acoplada a MS, también es una herramienta cada vez más empleada en estudios metabólicos para la búsqueda de nuevos biomarcadores (Ramautar 2013). En este sentido, queda patente que la CE, en sus diferentes modalidades, es una técnica complementaria a las técnicas habituales de análisis en el diagnóstico de ECM, y que sus características frente a los procedimientos habituales pueden hacer mejorar el proceso diagnóstico, tanto en tiempo de respuesta como en sensibilidad, identificando pacientes con enfermedades que podrían pasar desapercibidas por procedimientos convencionales.

Instrumentación

La instrumentación general de un aparato de electroforesis capilar se detalla en la figura 1. Básicamente, consta de un tubo capilar, dos viales, un detector y una fuente de alto voltaje. Los viales de entrada y salida contienen el tampón de separación. En dichos viales se introducen los extremos del capilar, que mediante una diferencia de presión se rellena con el tampón. Una vez relleno con el tampón de separación, se introduce el extremo del capilar de entrada en el vial de muestra para realizar la introducción de ésta. La inyección de la muestra en el capilar se puede realizar hidrodinámicamente estableciendo una diferencia de presión, o bien por inyección electrocinética mediante la aplicación de voltaje.

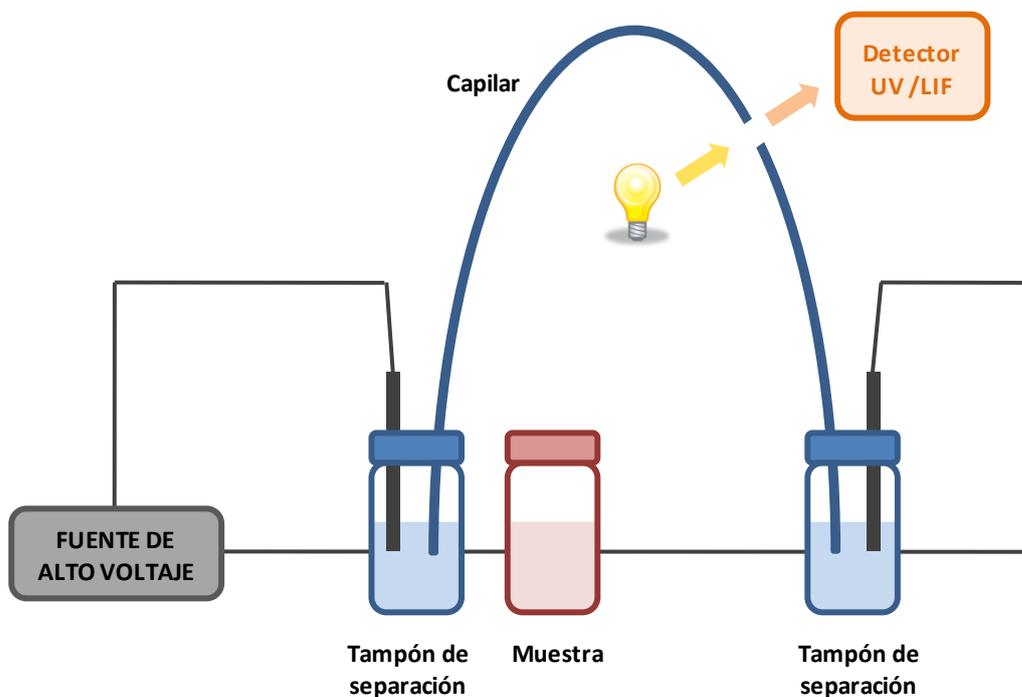


Figura 1. Representación esquemática de un sistema de electroforesis capilar.

Dentro de cada vial también se encuentran los electrodos, el positivo (ánodo) en el de entrada y el negativo (cátodo) en el de salida, siempre que trabajemos a polaridad normal. Estos electrodos están conectados a la fuente de alto voltaje, que genera potenciales de hasta 30 kV. El capilar tiene una ventana de detección, una zona sin recubrimiento que permite la transmisión de la señal que llegará al detector. El detector se encuentra acoplado a esta ventana, de manera que detecta los diferentes

compuestos separados por electroforesis a medida que van pasando por la ventana. La sensibilidad de un procedimiento de CE vendrá determinada por el tipo de detector utilizado. Los sistemas de detección más utilizados con sus límites de detección asociados se muestran en la tabla 1. El sistema de detección más ampliamente utilizado en electroforesis capilar es el de absorbanza en el rango UV-Vis, debido a que es posible detectar una gran número de compuestos y a su bajo coste. Su principal inconveniente es su menor sensibilidad respecto a otros sistemas de detección. Un sistema de detección con el que se consigue aumentar sustancialmente la sensibilidad es la detección de fluorescencia inducida por láser (LIF). En este sistema el haz de luz procedente de un láser incide sobre la ventana del capilar y un detector recoge la fluorescencia inducida sobre los compuestos a analizar. Este tipo de detector es altamente sensible. Tiene como inconveniente que su uso queda restringido a moléculas que posean fluorescencia nativa, o que sean susceptibles a ser derivatizadas mediante reacción con fluorógenos, de manera que puedan ser detectadas mediante este sistema.

<i>Sistema de detección</i>	<i>Límite de detección</i>
Absorción UV-Vis	$10^{-5} - 10^{-7}$ mol/L
Absorción UV-Vis indirecta	$10^{-4} - 10^{-6}$ mol/L
Fluorescencia	$10^{-7} - 10^{-9}$ mol/L
Fluorescencia indirecta	$10^{-6} - 10^{-8}$ mol/L
Fluorescencia inducida por láser	$10^{-9} - 10^{-12}$ mol/L
Espectrometría de masas	$10^{-8} - 10^{-10}$ mol/L

Tabla 1. Sistemas de detección más comúnmente utilizados en CE y límites de detección alcanzados (Khaledi 1998)

Fundamentos de la electroforesis capilar

La separación por electroforesis se basa en la diferencia de velocidad de los compuestos iónicos bajo un campo eléctrico. La velocidad a la que migrarán los compuestos es proporcional al campo eléctrico aplicado y a la carga del ión, e inversamente proporcional a la fuerza de rozamiento que se opone a su movimiento. Esta fuerza de rozamiento aumenta con la viscosidad del medio y con el tamaño de la molécula. Por lo tanto, en un mismo medio y bajo un mismo voltaje aplicado, aquellas

moléculas con mayor carga y menor tamaño presentaran una mayor velocidad electroforética y viceversa.

En la CE, además de la movilidad electroforética, hay que considerar el flujo electroosmótico, ya que el movimiento final de las moléculas es la suma de estos dos componentes. La electroósmosis es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un líquido que esté en contacto con una superficie cargada, como ocurre en la CE con el tampón de separación y la superficie del capilar. Los capilares de sílice fundida tienen grupos silanoles en su superficie (Si-OH) que se pueden ionizar según el pH del medio, dando lugar a una superficie cargada positivamente (Si-OH_2^+) a pH inferiores a 4 o negativamente (Si-O^-) a pH superiores ese valor. Generalmente la pared suele estar cargada negativamente, de manera que atrae a los cationes presentes en el tampón, formándose una capa inerte de cationes en la pared del capilar unida fuertemente a los grupos Si-O^- , denominada capa fija. Como estos cationes no son suficientes para compensar las cargas negativas de la pared, se forma otra capa de cationes sobre la anterior, que al estar a mayor distancia se ve atraída más débilmente por la pared con carga negativa, y por lo tanto está menos unida. Esta segunda capa de cationes se denomina capa móvil. Estas dos capas forman la estructura de doble capa difusa. Al aplicar un campo eléctrico, la capa móvil de cationes es atraída hacia el cátodo, y como estos cationes están altamente solvatados, arrastran con ellos el conjunto de la disolución, generando así lo que se conoce como flujo electroosmótico (EOF). Esta fuerza influye de igual modo en todas aquellas sustancias que se encuentren en el interior del capilar, independientemente de su carga o tamaño.

Una de las principales ventajas del EOF es que el flujo del líquido en movimiento sigue un régimen plano evitando la dispersión de solutos, frente al régimen laminar que se establece en el movimiento de un líquido por otros mecanismos, como por ejemplo por presión en cromatografía. Esto se traduce en unos

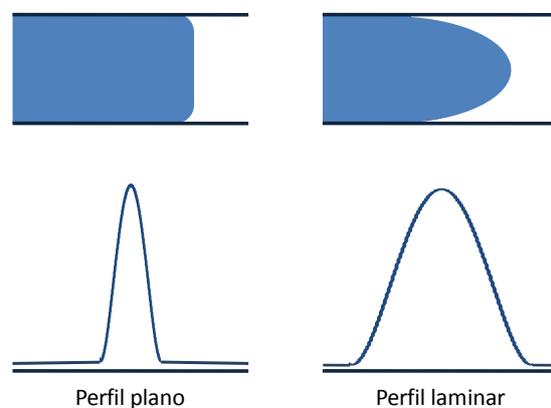


Figura 2. Esquema de flujo de un fluido: plano por EOF y laminar por presión.

picos mucho más estrechos, y por lo tanto con mayor eficacia de resolución, tal como se muestra en la figura 2.

Otra de las ventajas de la existencia del EOF durante una separación electroforética es que permite la separación de aniones, sustancias neutras y cationes. En una electroforesis convencional, al aplicar un campo eléctrico solo aquellas sustancias con carga positiva se dirigirán al cátodo. En cambio en la CE, el EOF arrastra todo el medio a una velocidad constante, y los diferentes compuestos de la solución se separan en función de su movilidad electroforética. (Figura 3)

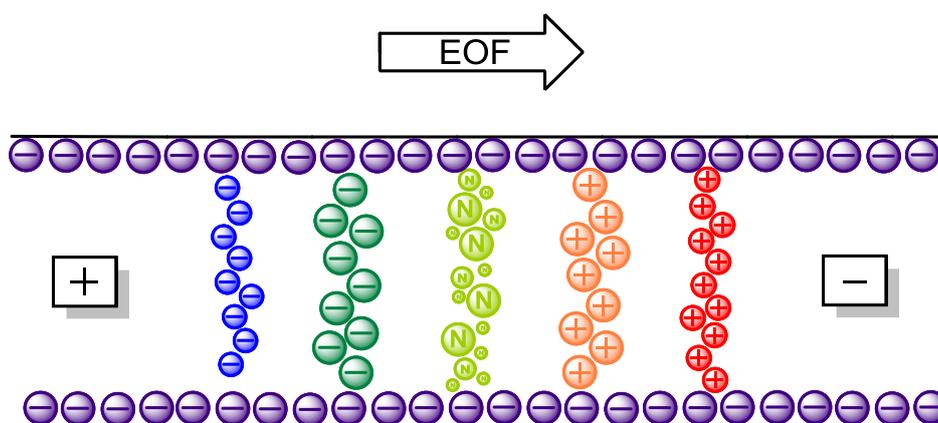


Figura 3. Separación de los diferentes compuestos de una solución en CE en función de su movilidad electroforética. Todos ellos son arrastrados a una velocidad constante por el EOF.

Las variables que influyen en la magnitud del EOF son varias, y deben ser controladas ya que afectarán directamente en la separación. A valores de pH muy altos, por ejemplo, el EOF puede ser demasiado elevado, dando lugar a la elución de los solutos antes de que ocurra la separación. Estas variables se optimizarán en función de la resolución requerida, por ejemplo, variando el campo eléctrico aplicado, el pH del tampón, la fuerza iónica del tampón de carrera, utilizando recubrimientos de la pared interna del capilar o utilizando modificadores orgánicos, tensioactivos, etc.

Modos de separación

Existen diversos tipos de separación en electroforesis capilar según cuál sea el principio de separación de los compuestos. Generalmente es suficiente con cambiar el tampón de carrera para cambiar de modalidad, lo cual hace a la electroforesis capilar altamente versátil, ya que es posible realizar varios métodos con diferentes modos de

separación sin cambiar el capilar. La separación anteriormente explicada, basada en la diferente movilidad electroforética de cada compuesto y en el EOF corresponde al primer modo de separación desarrollado en electroforesis capilar, la electroforesis capilar en zona libre (CZE). El principal inconveniente de este tipo de separación es que no es posible la separación de sustancias que no presenten carga al pH de separación, ya que éstas serán arrastradas únicamente por el EOF y presentarán el mismo tiempo de migración. Para superar este inconveniente se desarrolló la cromatografía electrocinética micelar (MEKC). En este tipo de separación se utilizan agentes tensioactivos en el tampón de separación con una concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC), de manera que en el interior del capilar se formarán micelas. Los compuestos sin carga interactuarán con la parte hidrofóbica de estas micelas según su coeficiente de partición a lo largo del capilar, separándose según sus características químicas. Los compuestos iónicos también variaran su separación respecto a un método de CZE, ya que también interactuarán con las micelas, en este caso con la parte más polar. El resultado es una separación híbrida entre electroforesis capilar y cromatografía, donde las micelas harían de fase pseudo-estacionaria. Otros aditivos como las ciclodextrinas también se usan con el fin de aumentar el poder resolutivo. Estas moléculas presentan una estructura con cavidades hidrofóbicas con las que interactúan los compuestos a su paso por el capilar, permitiendo la separación de compuestos de naturaleza química muy similar.

DEFECTOS CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN

Introducción

La glicosilación enzimática de las proteínas consiste en la unión mediante enlaces covalentes de oligosacáridos a residuos de aminoácidos situados en secuencias específicas de la proteína. Los glicanos añadidos a las proteínas intervienen en diversos procesos como en el correcto plegamiento, estabilidad, vida media y funcionalidad de las proteínas. Esta glicosilación tiene lugar en más de la mitad de las proteínas, hecho que explica la afectación multiorgánica que presentan los pacientes con Defectos Congénitos de la Glicosilación (CDG) (Jaeken 2001).

Existe una gran cantidad de defectos potenciales, debido al elevado número de proteínas y genes que intervienen en este proceso. En 1980 se reportó el primer caso de un trastorno congénito de glicosilación (Jaeken 1980), y desde entonces se han descrito unos 50 defectos más (Jaeken 2011). Éstos pueden afectar la vía de la N-glicosilación, en la cual un residuo de N-acetilglucosamina se une al grupo amina de una asparagina (Asn), o la vía de la O-glicosilación, en la que diversos residuos glucídicos se unen al grupo hidroxilo de una serina o una treonina.

Defectos de la N-glicosilación

Los defectos de glicosilación más frecuentes son aquellos que afectan a la N-glicosilación. Este proceso se lleva a cabo co- y post-traduccionalmente mediante diversas glicosiltransferasas, y ocurre en el citoplasma, retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi. En una primera etapa en el RE se inicia la síntesis del oligosacárido a partir de precursores citosólicos, y acaba con la unión de éste a la Asn. En caso de que haya un defecto en esta fase, el oligosacárido precursor no llegará a anclarse a la proteína. En la etapa posterior, el oligosacárido una vez ya transferido a la proteína, es procesado en el RE y principalmente en el Golgi. Si hubiera un defecto en esta última fase, la proteína sí tendría un número correcto de cadenas glucídicas, pero al no ser adecuadamente procesadas, su estructura será diferente a la cadena correctamente sintetizada (Freeze 2005).

Los CDG se clasifican según si el defecto es de síntesis del oligosacárido, CDG tipo 1; o de procesamiento, CDG tipo 2. En la figura 4 se muestran las dos etapas de la N-

glicosilación, así como los defectos enzimáticos descritos, que dan lugar a diferentes subtipos de CDG tipo 1 y 2. Estos trastornos afectan de forma variable a diversos sistemas, generalmente implicando a los sistemas nervioso central, músculo-esquelético, gastrointestinal y hematológico (Eklund 2006). En general, se debe descartar un defecto de la glicosilación siempre que se presente afectación multiorgánica, pero también se han ido describiendo formas más leves con afectación de un único órgano.

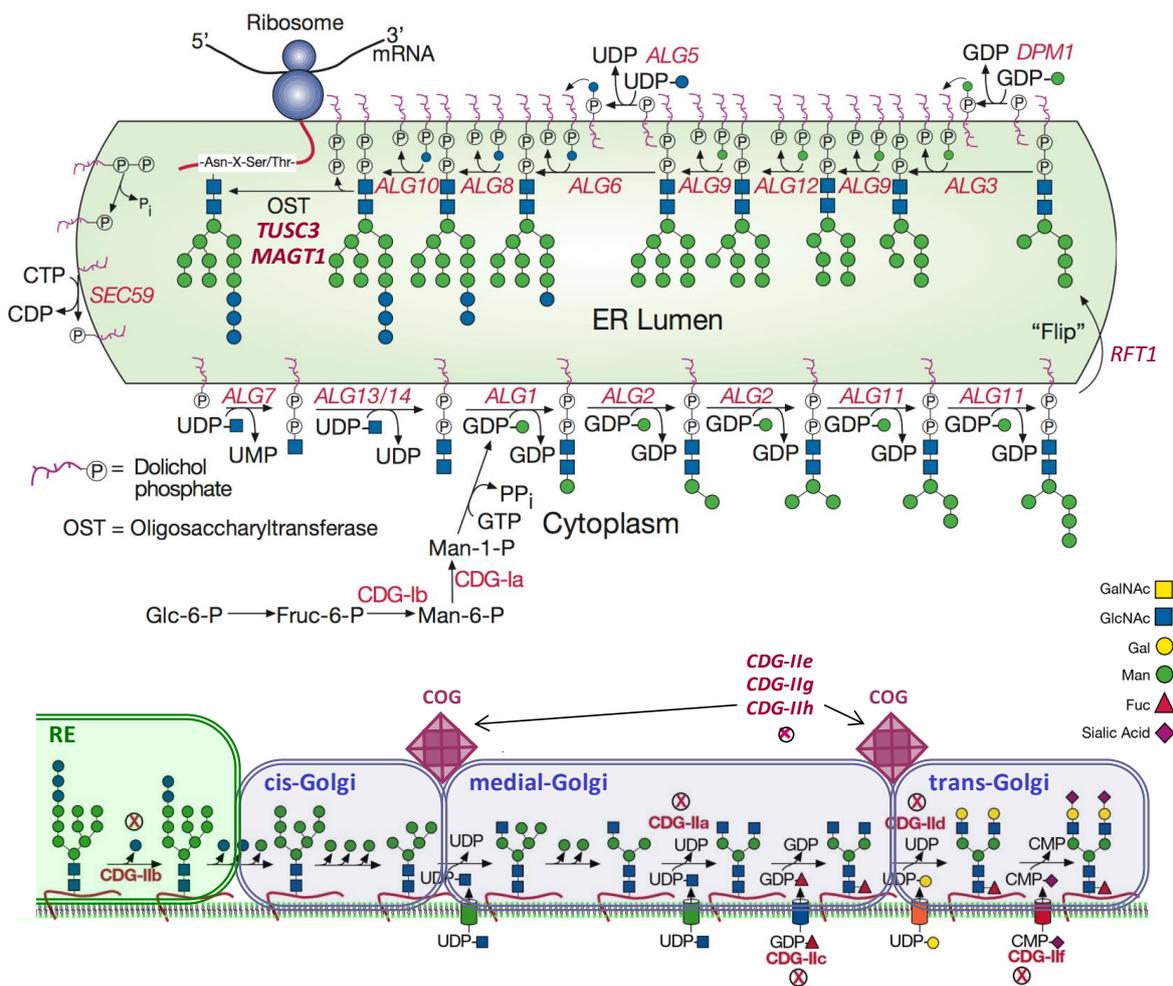


Figura 4. Vía de la N-glicosilación. Síntesis en el citosol y RE del precursor $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ unido al dolicol y transferencia de éste a la proteína. Procesamiento del oligosacárido ya unido a la proteína, que comienza en el RE y continúa en el Golgi. Se muestran algunos defectos de la N-glicosilación tipo 1 (de síntesis) y tipo 2 (de procesamiento). Modificada de Stanley P et al. N-glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009

Cribado de los CDG

El cribado inicial de los defectos de la N-glicosilación se realiza mediante el estudio del patrón de glicosilación de la transferrina sérica (Tf), identificando las diferentes glicofomas de esta proteína según su distinta carga eléctrica (Pérez-Cerdá 2008). La elección de esta proteína como biomarcador de los CDG no es por su implicación directa en la fisiopatología de la enfermedad, sino porque es una proteína fácilmente accesible, presente en sangre a concentraciones elevadas y altamente glicosilada. La estructura del oligosacárido producido en la N-glicosilación se muestra en la figura 5, al final de la vía de síntesis. En los dos extremos terminales se encuentra el ácido siálico, un monosacárido cargado negativamente, por lo tanto confiere dos cargas negativas por cada oligosacárido anclado a la proteína. La isoforma mayoritaria en el caso de la Tf es aquella con dos glicanos, que recibe el nombre de tetrasialotransferrina (tetrasialo-Tf), debido a que presenta cuatro residuos siálicos. También están presentes formas más sialiladas, penta-, hexa- y heptasialo-Tf, y en baja proporción formas menos sialiladas, di- y trisialo-Tf. Cuando existe un defecto en la vía de la N-glicosilación, se produce un aumento de estas formas hiposialiladas. Este aumento se traduce en un perfil alterado con un patrón tipo 1 o tipo 2, según si el defecto es previo o posterior al anclaje del oligosacárido a la proteína. En un defecto tipo 1 se producirán precursores glucídicos defectuosos que no serán correctamente reconocidos por la oligosacariltransferasa, y por lo tanto no transferidos a la proteína naciente. El perfil resultante se caracterizará por la ausencia de glicanos unidos a la proteína: una proporción de tetrasialo-Tf disminuida y un aumento de las formas hiposialiladas pares (di- y asialo-Tf). En cambio, en el perfil tipo 2 habrá un aumento de todas las formas hiposialiladas por igual, ya que el defecto se produce una vez ya anclado el oligosacárido a la proteína. En este caso la proteína sí tendrá todas las cadenas de oligosacáridos, pero éstas no se habrán procesado correctamente, impidiendo la unión final del ácido siálico. Hay que tener en cuenta que los defectos de los enzimas que causan síndromes CDG nunca son completos, porque esta situación sería incompatible con la vida. Siempre hay una actividad enzimática residual que permite que una fracción de las glicoproteínas se glicosile correctamente. De ahí que en el análisis de la sialotransferrina para el diagnóstico de pacientes con CDG, se observe una mezcla de formas totalmente glicosiladas con otras que lo están

parcialmente. En la figura 5 se muestran las diferentes estructuras de estas glicofomas.

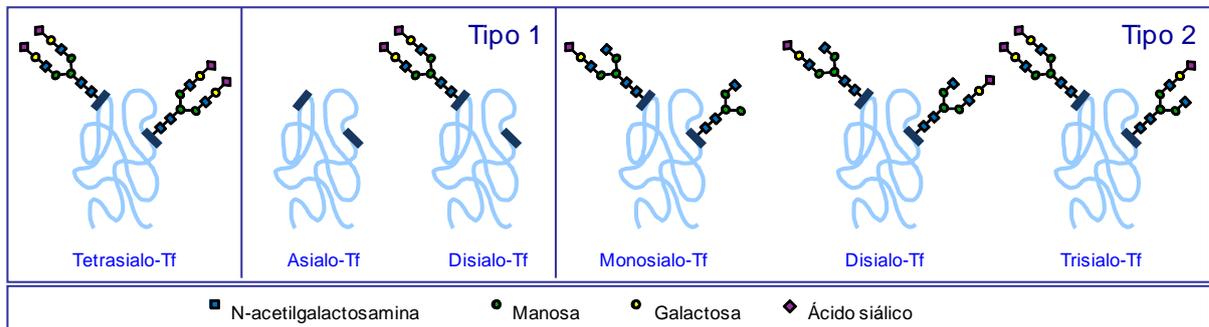


Figura 5. Representación de las glicofomas de la transferrina: forma principal Tetrasialo-Tf y formas hiposialiladas debidas a defectos en el procesamiento del precursor (Tipo 1) y a defectos en el procesamiento del glicano (Tipo 2)

Hay que considerar que existen otros trastornos genéticos o adquiridos que pueden alterar el patrón de glicosilación de esta proteína provocando falsos positivos, como la ingestión crónica de alcohol, la sepsis, la fructosemia y la galactosemia (Sturiale 2005, Quintana 2009). En estas alteraciones se restablece el perfil normal de glicosilación cuando se corrigen o se tratan los trastornos de base, cosa que no ocurre en la inmensa mayoría de los síndromes CDG, ya que no disponen de tratamientos efectivos. Existen diversos procedimientos para estudiar el patrón de glicosilación de la transferrina, todos ellos basados en la separación de las glicofomas según su contenido en ácido siálico. El más ampliamente utilizado en el cribado de las CDG es el isoelectroenfoque (IEF), método altamente específico pero muy laborioso y no automatizable. Con este procedimiento únicamente es posible el análisis de un pequeño número de pacientes por gel, con lo que impide ampliar el cribado. Además es un método cualitativo, la interpretación se realiza por inspección visual del gel, pudiendo llegar a ser una interpretación poco sensible en los casos con fenotipos bioquímicamente leves. Actualmente se han desarrollado procedimientos basados en técnicas semi-automatizadas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Helander 2003) y la electroforesis capilar zonal (CZE) (Carchon 2004), con las que se consigue una separación más reproducible y rápida. Por otro lado permiten el análisis de un elevado número de muestras, permitiendo así ampliar el número de pacientes candidatos al cribado. Asimismo, permiten una semicuantificación de cada isoforma,

facilitando así la interpretación de resultados, que se realiza por comparación con los intervalos de referencia. No es descabellado hipotetizar que con la aplicación de la CE o de procedimientos equivalentes, se identifiquen nuevos pacientes, cuyo cribado por la técnica de IEF habría arrojado resultados falsos negativos.

GABA

Tradicionalmente el estudio de la neurotransmisión del sistema nervioso central se ha basado en el estudio de los sistemas monoaminérgico y colinérgico. Sin embargo, en los últimos años, se ha evidenciado el papel relevante de los aminoácidos neurotransmisores, principalmente el del ácido γ -aminobutírico (GABA) y del glutamato.

Vía metabólica

El GABA es el principal neurotransmisor con actividad inhibitoria del sistema nervioso central, y sus funciones biológicas se extienden a más de un tercio de las sinapsis cerebrales. Su metabolismo se muestra en la figura 6. La síntesis se lleva cabo a partir del aminoácido neurotransmisor glutamato mediante el enzima glutamato

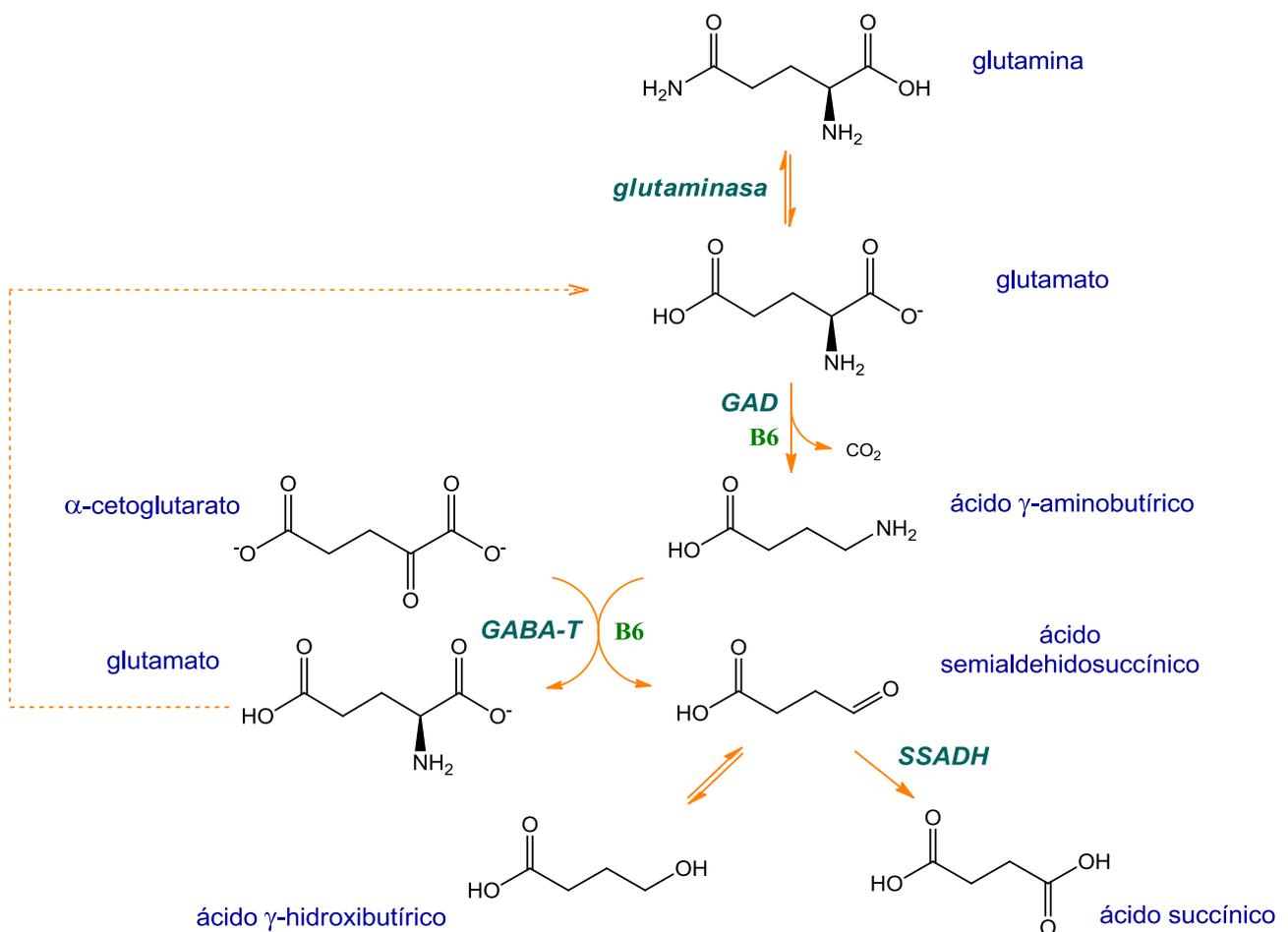


Figura 6. Metabolismo del GABA.

decarboxilasa (GAD: EC 4.1.1.15), que es dependiente de piridoxal-5-fosfato. Su degradación se produce mediante dos reacciones. En la primera el enzima GABA-transaminasa (GABA-T: EC 2.6.1.19) utiliza α -cetoglutarato proveniente del ciclo de Krebs, regenerando así una molécula de glutamato por cada molécula de GABA que metaboliza. De esta manera, las concentraciones de los dos neurotransmisores están íntimamente relacionadas. El producto del primer paso de degradación del GABA es el ácido semialdehidosuccínico, el cual es oxidado a succinato mediante la reacción catalizada por el enzima semialdehidosuccínico deshidrogenasa (SSADH: EC 1.2.1.16), compuesto que se incorpora al ciclo de Krebs regenerando así el α -cetoglutarato.

El metabolismo del GABA tiene lugar en las neuronas, y también en las células gliales adyacentes, donde se metaboliza el GABA recaptado en la hendidura sináptica tal como se muestra en la figura 7. El GABA recaptado es metabolizado en la célula glial a glutamato mediante la GABA-T y vuelve a la neurona como glutamina (ciclo GABA-glutamato-glutamina).

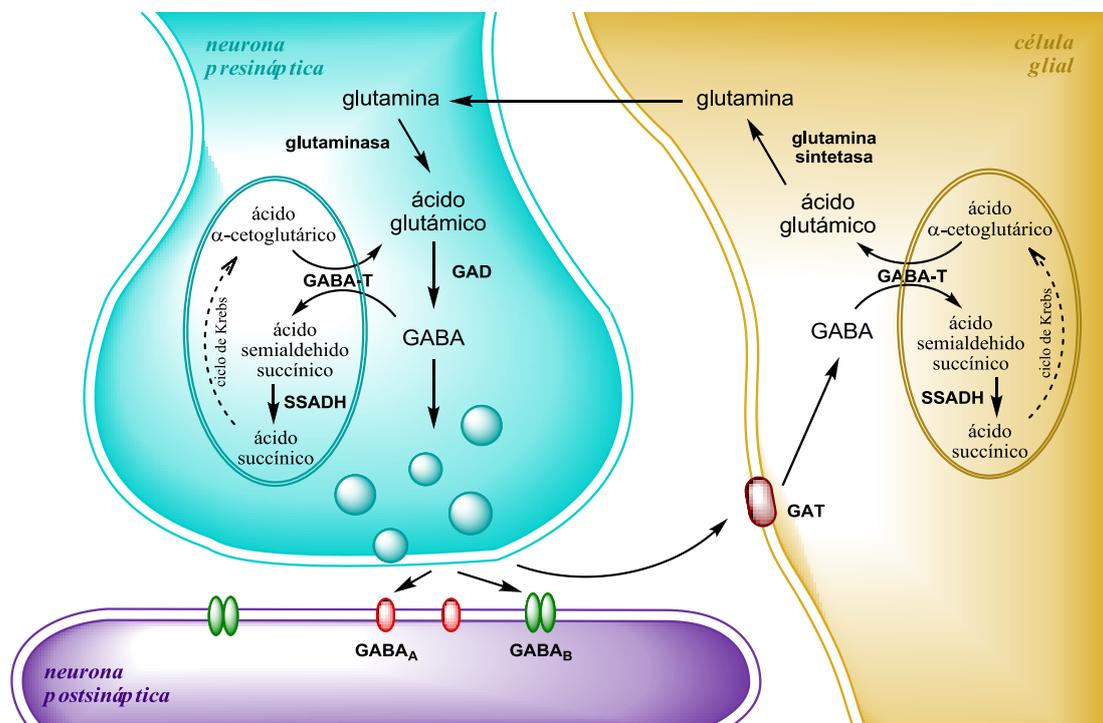


Figura 7. Ciclo GABA-glutamato-glutamina. La célula glial recapta el GABA liberado en la hendidura sináptica y lo metaboliza a glutamina, que será reutilizada por la neurona para sintetizar de nuevo GABA.

Defectos primarios

Hasta el momento se han descrito dos defectos congénitos de la degradación del GABA: la deficiencia del enzima GABA-T (OMIM 613163) y la deficiencia de SSADH (OMIM 271980). La primera se caracteriza por un desarrollo anormal, epilepsia y concentraciones altamente elevadas de GABA en líquido cefalorraquídeo. Es una enfermedad con una frecuencia extremadamente baja de la que hay apenas 3 casos descritos hasta el momento. La frecuencia del segundo defecto en el catabolismo del GABA también es muy baja, aunque el número de casos descritos supera los 500. La deficiencia de este enzima provoca una acumulación de ácido semialdehidosuccínico, que se transforma no enzimáticamente en ácido γ -hidroxibutírico, compuesto con actividad neuronal que se excreta en grandes cantidades en la orina, permitiendo así su diagnóstico. El espectro clínico es heterogéneo con distintas manifestaciones neurológicas, incluyendo discapacidad intelectual, hipotonía, hiporreflexia, ataxia, autismo, alteraciones del desarrollo del lenguaje y alteraciones de conducta. Hasta en la mitad de los casos se presentan crisis epilépticas.

Alteraciones secundarias

Además de los defectos primarios en el metabolismo del GABA, se han descrito diversas enfermedades neurológicas donde la transmisión GABAérgica se ve alterada, como en el Alzheimer, en la corea de Huntington o en la esquizofrenia. La epilepsia es el trastorno clínico en el que se hace más evidente la asociación con una disfunción GABAérgica. Existen numerosos fármacos antiepilépticos que actúan por medio de diferentes mecanismos sobre la neurotransmisión GABAérgica, aumentando las concentraciones de GABA o el efecto de éste sobre sus receptores. Los principales fármacos antiepilépticos que actúan sobre el metabolismo del GABA se muestran en la figura 8. Hay agonistas del receptor GABA_A como las benzodiazepinas y los barbitúricos, inhibidores de la recaptación de GABA que aumentan la concentración de este neurotransmisor en la hendidura sináptica como la tiagabina, potenciadores de la secreción vesicular como la gabapentina y los que modulan su metabolismo, como el ácido valproico y la vigabatrina. El ácido valproico aumenta la síntesis del GABA activando el enzima GAD e inhibe también su degradación inhibiendo la GABA-T y la SSADH. La vigabatrina inhibe irreversiblemente la GABA-T.

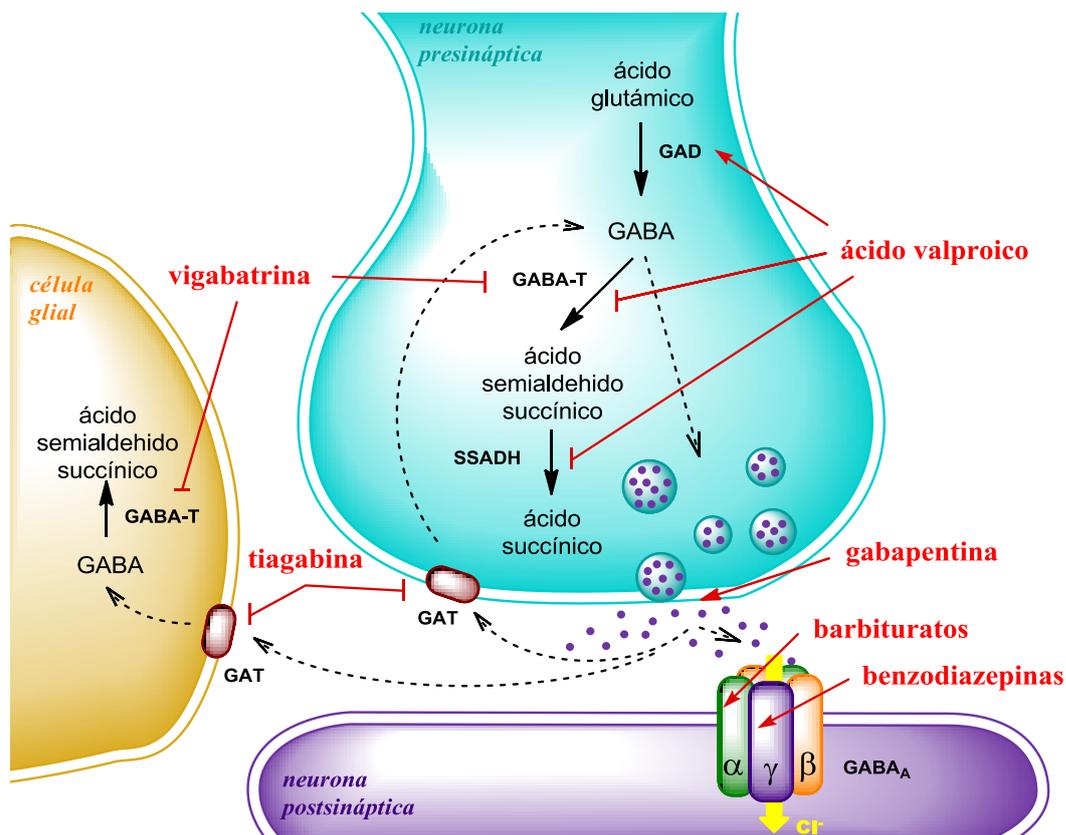


Figura 8. Efecto de diversos fármacos antiepilépticos (en rojo) sobre el metabolismo del GABA. Las flechas muestran el efecto activador (→) o inhibitorio (⊥) de cada fármaco sobre los diferentes puntos de acción.

Determinación de GABA en LCR

Hasta el momento se han descrito diferentes procedimientos para cuantificar GABA, basados en diversas tecnologías, como HPLC con detector de fluorescencia (Galindo 2004, Hernández 2003, Kodama 2003), cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) (Dhossche 2002, Kok 1993), electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) (Rada 1999, Chen 2001, Sauvinet 2003, Ehlen 2005, Klinker 2007, Bergquist 1994, Deng 2008, Lorenzo 2013, Kaul 2011, Shi 2012, Chang 2006) y cromatografía líquida acoplada a tándem masas (LC-MS/MS) (Song Y 2005, Eckstein 2008, Song P 2012). Los procedimientos basados en HPLC y la mayoría de los descritos de CE-LIF han sido desarrollados con el fin de determinar la concentración de GABA en determinadas áreas cerebrales de modelos animales mediante microdiálisis in vivo (Rada 1999, Chen 2001, Sauvinet 2003, Ehlen 2005, Klinker 2007, Lorenzo 2013, Kaul 2011, Shi 2012), donde la concentración de este

neurotransmisor es del orden de micromolar. Por regla general, estos métodos no tienen la sensibilidad requerida para hacer determinaciones en LCR humano, ya que la concentración en este medio es varios órdenes de magnitud inferior a la encontrada en las áreas GABAérgicas. De los escasos procedimientos basados en CE-LIF descritos para la determinación de GABA en LCR humano se desprenden unos resultados muy dispares, obteniéndose unos valores de referencia medios que van aproximadamente desde 100 nmol/L hasta valores superiores a 1 $\mu\text{mol/L}$ (Bergquist 1994, Deng 2008, Chang 2006, Song Y 2005, Eckstein 2008, Samakashvili 2011). Esto es debido probablemente a falta de sensibilidad junto al hecho de que las variaciones preanalíticas de la concentración de GABA son extraordinarias si no se sigue un protocolo riguroso de obtención, preparación y conservación de la muestra hasta el momento del análisis (Kok 1993). No obstante, existen lagunas en el conocimiento de qué variables preanalíticas pueden afectar a la concentración de GABA. Curiosamente, es uno de los pocos compuestos que aumenta notablemente su concentración por efecto de la temperatura (Grossman 1980), de ahí que la mayor parte de los intervalos de referencia descritos para el GABA libre sean inadmisiblemente elevados. Los procedimientos descritos de GC-MS que cuantifican GABA en LCR requieren un pretratamiento de la muestra laborioso y además un volumen de muestra elevado (Kok 1993). Esto último es un factor a tener en cuenta, ya que el volumen de muestra suele ser un factor limitante en los estudios de LCR en población pediátrica. Por último, cabe destacar que los métodos descritos de LC-MS/MS no requieren pretratamiento de la muestra y además cuentan con la alta sensibilidad requerida para el análisis de este neurotransmisor en LCR (Eckstein 2008, Song P 2012). El inconveniente de este tipo de tecnología es que a día de hoy su presencia en los laboratorios clínicos aún es escasa.

La electroforesis capilar acoplada a un sistema de detección LIF ofrece diversas ventajas en el análisis de fluidos biológicos, entre otras el bajo volumen de muestra requerido y su alta sensibilidad. Para la determinación de GABA mediante esta tecnología es necesaria su derivatización previa, ya que esta molécula no presenta fluorescencia de forma nativa. En el mercado hay disponibles diversos derivatizantes que reaccionan con aminas produciendo compuestos susceptibles de ser detectados mediante LIF. Uno de los más utilizados es el FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) debido

a que produce unos compuestos derivatizados que son estables y que presentan un máximo de absorbancia cercano a 488 nm. Esta longitud de onda es la característica del láser de Argón, que es el tipo de láser que se encuentra habitualmente acoplado a los aparatos de electroforesis capilar. Los inconvenientes que presenta este reactivo son el largo tiempo de incubación requerido en el proceso de derivatización y la generación de varios productos de hidrólisis que aparecen en el electroferograma y pueden interferir en la resolución del compuesto a analizar (Rada 1999, Zhang L 1998, Nouadje 1995, Zhang D 2011, Li YM 2001). Otros derivatizantes de aminas, como el O-phthaldehído (OPA) (O'Brien 2003) y el naphthalenedialdehído (NDA) (Kaul 2011, Chang 2006) tienen un tiempo de reacción corto y producen electroferogramas más limpios, pero producen derivatizados que absorben a 350 y 442 nm, respectivamente, haciéndolos incompatibles con el uso de un láser de Argón. Por último, el NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) es otro reactivo fluorogénico para derivatizar aminas que también requiere un corto tiempo de incubación, produciendo pocos compuestos de hidrólisis y con una longitud de onda de absorción de sus derivatizados de 488 nm (Klinker 2007, Shi 2012, Zhang H 2006, Zhu 2005, Aoyama 2004).

Por tanto, teniendo en cuenta las dificultades premetrológicas y metrológicas de la determinación de GABA en LCR, es necesario estandarizar el procedimiento e identificar todas aquellas variables que pueden alterar el resultado del análisis. Además, el papel crucial del GABA como neurotransmisor hace previsible que su estudio en pacientes neuropediátricos aumente el conocimiento de la fisiopatología de varias enfermedades y del efecto de los tratamientos aplicados, especialmente en el campo de la epilepsia.

OLIGOSACARIDOSIS

Enfermedades lisosomales

Los lisosomas son orgánulos celulares cuya principal función es la degradación de biomoléculas complejas, transformándolas en moléculas más sencillas. Para ello contienen en su interior diversos enzimas como son proteasas, nucleasas, glicosidasas, etc. En una enfermedad lisosomal existe un defecto de alguno de estos enzimas, lo que provoca una incapacidad para degradar el sustrato correspondiente y éste se acumulará en el interior de los lisosomas. Es este depósito de sustratos sin capacidad para ser degradados lo que en último término causa la enfermedad (Klein 2013). Se han descrito unas 40 enfermedades lisosomales de acumulación de sustratos que considerando subtipos y variantes superan las 50. Estas pueden ser debidas a defectos primarios de una enzima con actividad hidrolasa en concreto, pero también a otros defectos que secundariamente provoquen la disminución de la actividad de la hidrolasa en el lisosoma. Dentro de estas alteraciones secundarias existen enfermedades debidas a defectos en cofactores necesarios para el correcto funcionamiento del enzima, así como diversas enfermedades relacionadas con un tráfico deficiente de la hidrolasa desde su síntesis en el retículo endoplasmático hasta su destino final en el lisosoma. Clásicamente se clasifican en función del sustrato que se acumula: mucopolisacaridosis, por defecto en la degradación de mucopolisacáridos; oligosacaridosis (o glucoproteinosis), por defecto en la degradación de la porción glucídica de las glicoproteínas; esfingolipidosis, por defecto en la degradación de esfingolípidos; y otras enfermedades lisosomales con acumulación de varios tipos de sustratos (Neufeld 2001). Existe una variabilidad clínica importante, basada principalmente en la localización del depósito de sustratos. Esta acumulación se produce desde la edad fetal, y los síntomas aparecen cuando este depósito afecta la funcionalidad de los tejidos. Como síntomas generales se pueden nombrar afectación neurológica degenerativa, dismorfia, alteraciones óseas, afectación ocular o hepato/esplenomegalia, pero los fenotipos pueden ser mucho más amplios o circunscritos a pocos órganos (Leroy, 2007, Neufeld 2001).

Oligosacaridosis

Las oligosacaridosis son un grupo de enfermedades lisosomales causadas por defectos en la vía de degradación de la porción glucídica de las glicoproteínas. Todos los defectos descritos en esta vía presentan una herencia autosómica recesiva, y su clínica es similar a otros tipos de enfermedades lisosomales (Leroy 2007). En la figura 9 se muestra la vía de degradación del oligosacárido de una proteína N-glicosilada. La degradación de las glicoproteínas comienza por la acción de proteasas lisosomales que degradan la parte proteica de la proteína. Este primer proceso produce cadenas de oligosacáridos unidos al aminoácido Asn. A partir de aquí las glicosidasas específicas empiezan a degradar la cadena glucídica, generalmente por los extremos no-reductores acortando la estructura secuencialmente. Un defecto en esta vía provocará la acumulación del oligosacárido correspondiente o de los derivados de éste (Freeze 2009). En la tabla 2 se muestran los defectos descritos asociados a esta vía, con el enzima deficiente asociado. Hasta hace unos años no existía tratamiento posible para las oligosacaridosis, ni para las enfermedades lisosomales en general, y el diagnóstico tenía interés únicamente para ofrecer consejo genético y la posibilidad de diagnóstico prenatal a la familia. Actualmente se ha

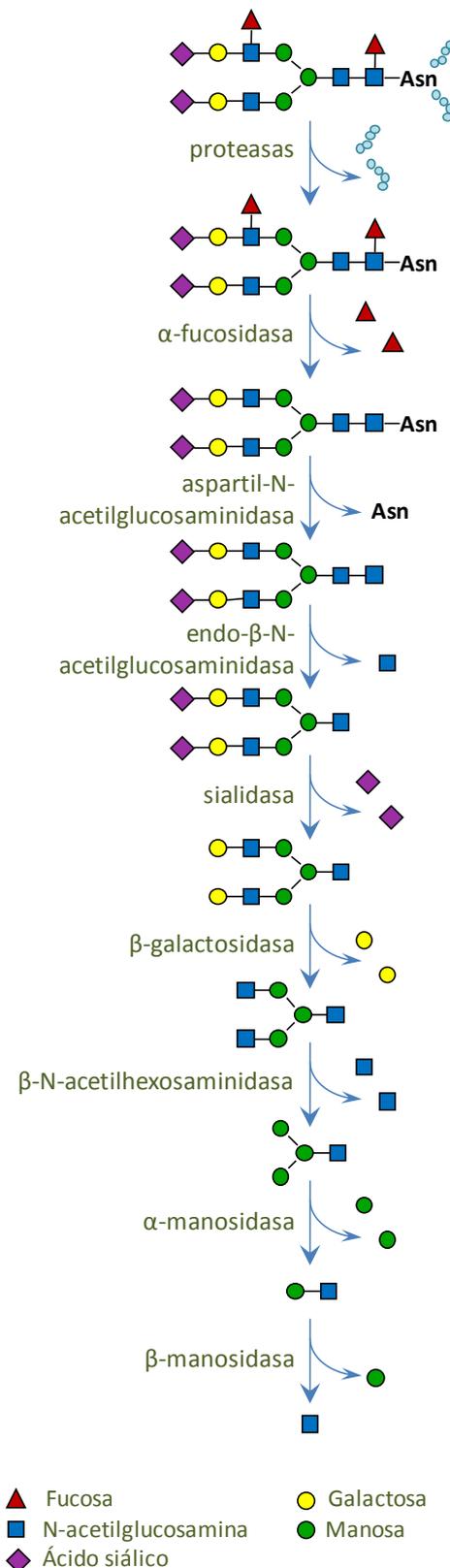


Figura 9. Vía de degradación de la porción glucídica de una proteína N-glicosilada

progresado mucho en el tratamiento de estas enfermedades, basado principalmente en el trasplante de médula ósea, el trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas o el tratamiento enzimático sustitutivo (Ortolano 2014). Generalmente, la efectividad de este tipo de tratamientos viene determinada por lo precoz que sea su instauración. Por esta razón, se hacen necesarios métodos de diagnóstico rápidos, precisos y que permitan estudiar a un gran número de pacientes.

Cribado de las oligosacaridosis y enfermedades relacionadas

Ante un paciente con clínica sugestiva de enfermedad de depósito se realizan dos determinaciones básicas en orina: excreción de glucosaminoglicanos (GAGs), aumentada en caso de mucopolisacaridosis; y perfil de oligosacáridos en orina, alterado en las oligosacaridosis y ciertos defectos relacionados. Los oligosacáridos no están presentes en orina en condiciones normales, o están presentes en muy baja cantidad. En el caso de las oligosacaridosis esta excreción es más elevada, aumentando unos u otros oligosacáridos según cuál sea el defecto enzimático (Leroy 2007). Además de las oligosacaridosis, hay otras enfermedades en las que también se acumulan oligosacáridos sin existir deficiencia alguna en la degradación de las glicoproteínas, como por ejemplo algunos tipos de gangliosidosis por incapacidad de degradar la parte glucídica de determinados gangliósidos y algunas glucogenosis, por defectos en el metabolismo del glucógeno que producen diferentes oligosacáridos (Andria 2003). Estas enfermedades se muestran en la tabla 2. Debido a que presentan oligosacariduria también serán susceptibles de ser diagnosticadas mediante un análisis de oligosacáridos en orina. El método clásico en la determinación de oligosacáridos en orina es la cromatografía en capa fina (TLC), mediante la cual los oligosacáridos urinarios se separan cromatográficamente y posteriormente se revelan mediante un reactivo que forma un complejo coloreado al reacciona con los glúcidos (Humbel 1975). Este método se ha mostrado eficaz hasta ahora en la detección de las oligosacaridosis y trastornos relacionados, pero es extremadamente laborioso y tiene lugar durante tres días de trabajo. Además como inconveniente, cabe destacar que únicamente es posible analizar un número muy pequeño de pacientes por placa. Actualmente, en laboratorios altamente especializados se están empezando a

desarrollar análisis de oligosacáridos en orina por métodos basados en tándem MS o MALDI-TOF, que establecen perfiles característicos de cada enfermedad (Sowell 2011, Ramsay 2005, Bruggink 2012, Xia 2013). Desgraciadamente este tipo de tecnologías aún tienen un elevado coste que no es asumible por la mayoría de los laboratorios clínicos. La CE-LIF se utiliza desde hace algún tiempo en análisis glicómicos debido a su alto poder resolutivo, que permite separar isómeros muy cercanos estructuralmente (Guttman 1996, Chen 1998). En este tipo de análisis se determinan los oligosacáridos de determinadas proteínas como por ejemplo inmunoglobulinas (Mechref 2005), y otras proteínas séricas (Ruhaak 2010), pero hasta el momento no se ha descrito ningún procedimiento basado en CE-LIF para el análisis de oligosacáridos en orina para el cribado de las oligosacaridosis. La mayor sensibilidad y reproducibilidad de los sistemas de CE-LIF frente a la TLC hacen previsible que se identifiquen nuevos pacientes que hubieran pasado desapercibidos con el procedimiento de cribado clásico. Además, la posibilidad de automatizar el análisis por CE-LIF permitiría estudiar series largas de pacientes. Con la llegada de la era de la secuenciación masiva como herramienta diagnóstica, se van a acumular cantidades ingentes de datos que harán necesario disponer de pruebas bioquímicas fiables que confirmen o descarten la patogenicidad de las variantes genéticas detectadas.

Oligosacaridosis		
Enfermedad	OMIM	Enzima/Proteína deficiente
α -manosidosis tipo 1	248500	α -manosidasa (EC 3.2.1.24)
α -manosidosis tipo 2		
β -manosidosis infantil	248510	β -manosidasa (EC 3.2.1.25)
β -manosidosis juvenil/adulto		
Fucosidosis	230000	α -fucosidasa (EC 3.2.2.51)
Sialidosis severa infantil	256550	α -neuraminidasa (EC 3.2.1.18)
Sialidosis infantil (Mucopolidosis 1)		
Sialidosis adulto		
Galactosialidosis infantil precoz	256540	Proteína protectora / Catepsina A (deficiencia secundaria de α -neuraminidasa y β -galactosidasa)
Galactosialidosis infantil tardía		
Galactosialidosis juvenil/adulto		
Aspartilglucosaminuria	208400	Aspartirglucosaminidasa (EC 3.5.1.26)
Enfermedad de Schindler	609241	α -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.49)
Enfermedad de Kanzaki	609242	
Otras enfermedades que también presentan oligosacariduria		
Enfermedad	OMIM	Enzima/Proteína deficiente
Gangliosidosis GM1 infantil precoz	230500	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23)
Gangliosidosis GM1 infantil tardía	230600	
Gangliosidosis GM1 adulto	230650	
Enfermedad de Sandhoff (Gangliosidosis GM2 variante 0 infantil)	268800	Subunidad α de los enzimas β -hexosaminidasa A y β -hexosaminidasa B
Mucopolidosis tipo 2	252500	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (EC 2.7.8.17) (deficiencia secundaria múltiple de hidrolasas por defecto de transporte al lisosoma)
Mucopolidosis tipo 3	252600	
Enfermedad de Pompe (Glucogenosis tipo 2)	232300	α -(1,4)-glucosidasa lisosomal (EC 3.2.1.20)
Glucogenosis tipo 1a	232200	Glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9)
Glucogenosis tipo 3	232400	Enzima desramificante (EC 2.4.1.25)
Glucogenosis tipo 4	232500	Enzima ramificante (EC 2.4.1.18)
Glucogenosis tipo 9a	306000	Subunidad α de la fosforilasa quinasa hepática (EC 2.7.11.19), herencia ligada al X

Tabla 2. Oligosacaridosis y otras enfermedades que también presentan oligosacariduria. Para cada enfermedad se muestra su número OMIM y el enzima deficiente causante de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son un grupo muy numeroso y heterogéneo de enfermedades de baja prevalencia. El diagnóstico selectivo se realiza analizando las alteraciones de diversos biomarcadores metabólicos que muestran los pacientes, previamente seleccionados mediante la sospecha clínica. Estas alteraciones se traducen generalmente en anomalías de los perfiles bioquímicos en líquidos biológicos (sangre, orina y, si es necesario, líquido cefalorraquídeo (LCR)), que orientan sobre las vías metabólicas afectadas y los puntos concretos del defecto enzimático, lo que permite confirmar dichos defectos mediante análisis enzimáticos y estudios genéticos. La gran heterogeneidad de estas enfermedades ha hecho necesario el desarrollo de diversas tecnologías que abarquen la detección de metabolitos muy diversos. La electroforesis capilar es una tecnología caracterizada por un alto poder resolutivo y una elevada sensibilidad, que permite la cuantificación tanto de metabolitos de diferente naturaleza química y que complementaría el estudio de ECM realizado mediante procedimientos habituales de separación, como el HPLC con diferentes sistemas de detección y la cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas. Hemos elegido 3 tipos de biomarcadores con características completamente diferentes para avalar la versatilidad de la electroforesis capilar en el estudio de enfermedades neurológicas en general y de algunos ECM en particular.

HIPÓTESIS

El desarrollo y aplicación de técnicas analíticas mediante electroforesis capilar permitirán mejorar la capacidad diagnóstica y de investigación en un laboratorio dedicado al estudio de los ECM. Los biomarcadores a analizar serán aquellos en los que no es posible el análisis con técnicas convencionales, ya sea por su baja concentración, o porque su naturaleza química impide una buena separación de otras moléculas. También se desarrollarán técnicas para el estudio de metabolitos que se analizan actualmente con técnicas manuales y laboriosas, con la idea de poder sustituir estas metodologías.

Concretamente, el análisis de sialotransferrina por electroforesis capilar con detección espectrofotométrica para el estudio de los defectos congénitos de la glicosilación mejorará la capacidad diagnóstica respecto a las pruebas convencionales (isoelectroenfoque) y permitirá la identificación de fenotipos leves. Por otro lado, la implementación de un procedimiento para el análisis cuantitativo del GABA en muestras de líquido cefalorraquídeo (electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser) abrirá un campo de investigación interesante en los defectos primarios y secundarios de este neurotransmisor. Por último, el análisis de oligosacáridos en orina mediante electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser para el cribado de oligosacaridosis y otras enfermedades relacionadas también mejorará el diagnóstico de estas enfermedades respecto al método tradicional de cribado (cromatografía en capa fina), al tratarse de un análisis más rápido y sensible.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

General:

Evaluación de la electroforesis capilar como herramienta de estudio de pacientes con errores congénitos del metabolismo.

Objetivos concretos:

- 1) Estandarización y evaluación de la determinación de sialotransferrina por CE con detección ultravioleta para el estudio de defectos congénitos de la glicosilación. Aplicación de la determinación de sialotransferrina en el diagnóstico de casos con fenotipos leves.
- 2) Estandarización de la determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser: evaluación del procedimiento y establecimiento de valores referencia. Aplicación de la determinación de GABA en LCR como biomarcador para el estudio de pacientes pediátricos con enfermedades neurológicas.
- 3) Estandarización y evaluación de un nuevo procedimiento para la determinación de oligosacáridos en orina por CE y detección de fluorescencia inducida por láser en el cribado de oligosacaridosis y enfermedades relacionadas.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

- **Población de estudio para la determinación de sialotransferrina**
- **Población de estudio para la determinación de GABA en LCR**
- **Población de estudio para el cribado de oligosacaridosis**
- **Aspectos éticos**

MÉTODOS ANALÍTICOS

- **Análisis del perfil de glicosilación**
 - **CE-UV**
 - **Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida**
 - **Isoelectroenfoque en geles de agarosa**
 - **HPLC**
 - **Diagnóstico enzimático y molecular de CDG-Ia**
- **Análisis de GABA en LCR**
 - **Determinación de GABA mediante MECK-LIF**
 - **Métodos de diagnóstico diferencial en alteraciones del metabolismo del GABA**
 - **Análisis de la excreción de GHB mediante GC-MS**
 - **Estudio del gen ALDH5A1**
- **Análisis de oligosacáridos en orina**
 - **Cromatografía en capa fina**
 - **CE-LIF**
 - **Métodos para el diagnóstico diferencial de las oligosacaridosis**
 - **Análisis del perfil de excreción de aminoácidos mediante cromatografía de intercambio iónico**
 - **Análisis de la excreción de GAGs mediante espectrometría**

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

- **Validación de procedimientos**
 - **Procedimientos cuantitativos**
 - **Procedimientos cualitativos**
- **Análisis estadístico de datos**

PACIENTES

Población de estudio para la determinación de sialotransferrina

Población control.

Se analizaron un total de 35 muestras de suero correspondientes a pacientes con edades comprendidas entre 2 meses y 18 años, que acudieron a nuestro hospital para alguna intervención quirúrgica menor. Los criterios de selección de estos pacientes como población de referencia fueron la ausencia de cualquier tipo de enfermedad aguda o crónica y que no siguieran ningún tratamiento farmacológico.

Pacientes y perfiles alterados estudiados en la evaluación del procedimiento.

Se analizaron 18 muestras de suero que correspondían a pacientes con diversas enfermedades caracterizadas por presentar una alteración en el perfil de glicosilación de la transferrina mediante IEF. Comprendían un rango de edad de 3 días a 35 años.

Este grupo de perfiles alterados estaba compuesto por 11 pacientes con un perfil de glicosilación tipo 1 y 7 pacientes con un perfil tipo 2.

Pacientes con perfil tipo 1:

- 5 pacientes con una deficiencia de PMM2 (CDG-1a; OMIM 601785)
- 1 paciente con deficiencia de PMI (CDG-1b; OMIM 154550)
- 1 paciente con deficiencia de DPM1 (CDG-1e; OMIM 603503)
- 1 paciente con galactosemia previo a tratamiento (OMIM 230400)
- 2 pacientes con intolerancia congénita a la fructosa (OMIM 229600)
- 1 paciente con abuso crónico de alcohol

Pacientes con perfil tipo 2:

- 1 paciente con deficiencia de COG8 (CDG-2h; OMIM 606979)
- 6 pacientes con CDG-2 tipo x, con un defecto de glicosilación tipo 2 cuyo origen es desconocido

Pacientes estudiados durante la aplicación del procedimiento.

Desde la instauración de este procedimiento se analizaron los sueros de 1320 pacientes con edades comprendidas entre 10 días y 21 años con clínica compatible con un defecto de glicosilación. Se diagnosticaron un total de 7 pacientes con defectos de glicosilación: 5 CDG-1a y 2 con una deficiencia de ATP6V0A2 (OMIM 219200). Dos de los pacientes CDG-1a fueron de más difícil diagnóstico, ya que mostraron un fenotipo bioquímico y clínico muy leve. En los resultados se incluye la información clínica, bioquímica y molecular de estos pacientes.

Población de estudio para la determinación de GABA en LCR

Población control

Se analizaron un total de 55 muestras de LCR correspondientes a pacientes con edades comprendidas entre 3 días y 16 años, que acudieron a nuestro hospital bajo sospecha de meningitis viral o bacteriana y encefalitis. Los criterios de exclusión de estos pacientes como población de referencia fueron la presencia de enfermedad crónica de base o el diagnóstico final de meningitis viral o bacteriana, o de cualquier otra infección del sistema nervioso central.

Pacientes en tratamiento con fármacos antiepilépticos

Se analizaron 38 muestras de LCR que correspondían a pacientes con diferentes enfermedades neuropediátricas y que estaban en tratamiento con fármacos antiepilépticos. Los pacientes se dividieron en dos grupos según el tratamiento farmacológico.

Pacientes en tratamiento con fármacos antiepilépticos que interfieren en el metabolismo del GABA. Comprendían un rango de edad de 3 meses a 26 años.

- 22 pacientes en tratamiento con valproato.
- 2 pacientes en tratamiento con vigabatrina.

Pacientes en tratamiento con fármacos antiepilépticos cuyo mecanismo de acción es independiente al metabolismo del GABA. Comprendían un rango de edad de 2 meses a 22 años.

- 6 pacientes en tratamiento con fenobarbital.
- 4 pacientes en tratamiento con carbamazepina.
- 2 pacientes en tratamiento con etosuximida.
- 1 paciente en tratamiento con lamotrigina.
- 1 paciente en tratamiento con fenitoína.

Pacientes neuropediátricos

Desde la instauración de este procedimiento se analizaron muestras de LCR de 96 pacientes con edades comprendidas entre 1 día y 26 años que presentaban clínica neurológica: encefalopatías epilépticas, trastornos del movimiento y síndrome de Rett. En este cribado se identificaron dos casos con deficiencia de SSADH (OMIM 271980), alteración genética del metabolismo del GABA.

Población de estudio para el de cribado de oligosacaridosis

Población control

Se analizaron un total de 30 muestras de orina correspondientes a pacientes con edades comprendidas entre 3 días y 16 años. El criterio de exclusión de estos pacientes como población de referencia fue la presencia de cualquier tipo de clínica neurológica.

Pacientes estudiados para la evaluación del procedimiento

Se analizaron 3 muestras de orina que correspondían a pacientes con diversas enfermedades caracterizadas por presentar una alteración en el perfil de oligosacáridos en orina.

- Fucosidosis (OMIM 230000)
- Glucogenosis tipo 3 (OMIM 232400)
- Enfermedad de Sandhoff (OMIM 268800)

Además de estas muestras, también se analizaron las muestras de orina del “Educational Oligosaccharide Kit” de el programa de Control de Calidad ERNDIM. Este kit estaba formado por muestras provenientes de pacientes afectos de diversas oligosacaridosis.

- Gangliosidosis GM1 (OMIM 230500)
- Enfermedad de Sandhoff (OMIM 268800)
- Enfermedad de Pompe (OMIM 232300)
- α -manosidosis (OMIM 248500)
- Aspartilglucosaminuria (OMIM 208400)
- Enfermedad de Schindler (OMIM 609241)

Pacientes con sospecha clínica

Desde la instauración de este procedimiento se analizaron las muestras de orina de 240 pacientes con edades comprendidas entre 15 días y 18 años con clínica compatible con oligosacaridosis. Hemos diagnosticado dos pacientes: uno afecto de enfermedad de Sandhoff y una mucopolidosis tipo 3. Anteriormente a la instauración en 2013 de este procedimiento, se realizó el cribado de 276 pacientes mediante TLC, detectándose

5 pacientes afectos de diversas enfermedades de acúmulo: fucosidosis, Sandhoff, Glucogenosis tipo 3 y aspartilglucosaminuria.

Aspectos éticos

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes o de sus familiares que participaron en el estudio y todas las investigaciones bioquímicas y genéticas siguieron los protocolos aprobados por los Comité de Ética del Hospital Sant Joan de Déu, según la Declaración de Helsinki. El Comité ético del Hospital Sant Joan de Déu aprobó los diferentes estudios de esta tesis.

MÉTODOS ANALÍTICOS

ANÁLISIS DEL PERFIL DE GLICOSILACIÓN

Muestras.

La determinación del perfil de glicosilación se realizó en muestras de plasma o suero. El paciente no requiere preparación previa, ya que el ayuno, el ejercicio y otras situaciones fisiológicas no alteran el perfil de glicosilación. Para la obtención del plasma/suero se extrajeron 0,5 mL de sangre venosa en tubos con EDTA o en tubos de gel, se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 x g y se separó el plasma/suero. Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento del análisis.

Reactivos

Reactivo		Datos del producto	Aplicación
CEofix-CDT kit Análisis	Lavado	Agua bidestilada	Solución de limpieza CE
	Acondicionador	Solución NaOH 0.2 M	Acondicionador capilar CE
	Iniciador	Tampón TRIS/fosfato pH 2.0	Iniciador capilar CE
	Tampón	Tampón TRIS/borato pH 8.5	Tampón de carrera CE
	Solución de Fe	Solución de citrato férrico	Pretratamiento muestra CE
PhastGel IEF		Amersham Biosciences 17054401	Gel poliacrilamida IEF
Citrato férrico		Sigma 22.897-4	Pretratamiento IEF
Keroseno		Sigma 60710	IEF
Ácido tricloroacético		Merck A-822342	Fijador de proteínas
Anticuerpo policlonal contra transferrina humana (de conejo)		DakoCytomation A-0061	Detección de transferrina
Azul brillante de Comassie R-250		Bio-Rad 161-0400	Revelado de proteínas
Ácido acético		Merck 100063	Componente de la solución decolorante
Etanol		Merck 1.00983.2500	Componente de la solución decolorante

Análisis del perfil de glicosilación mediante CE-UV.

El análisis mediante CE se basó en el método descrito por Carchon en el 2004.

Procedimiento

Se utilizó el kit CEofix-CDT kit comercializado para la detección de consumo crónico de alcohol. La muestra de plasma/suero no precisa pretratamiento, únicamente saturación de la transferrina con el ion férrico. Para ello se mezclan 15 μL de la muestra con 45 μL de citrato férrico.

Instrumentación

El análisis mediante electroforesis capilar se realizó en un sistema P/ACE™ System 2200 de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA), acoplado a un detector de absorbancia equipado con filtros de diversas longitudes de onda. Se utilizó el software 32 Karat 8.0 en el control del instrumento y en el análisis de los electroferogramas.

El capilar utilizado fue un capilar específico para el análisis de sialotransferrina (Analis, Suarléé, Belgium), con 67 cm de longitud total con una ventana a 50 cm que se acopla al detector de absorbancia y de 50 μm de diámetro interno. El capilar se mantiene a 30°C durante la separación. Previo a su primer uso se acondiciona con lavados a una presión de 20 psi de agua bidestilada durante 2 minutos, hidróxido de sodio 0,2 M 10 minutos, agua bidestilada 2 minutos y tampón de carrera durante 5 minutos. Entre muestra y muestra se lava con hidróxido de sodio 0,2 M, agua bidestilada, tampón iniciador y tampón de carrera a una presión de 25 psi durante 30, 20 y 40 segundos, respectivamente. La inyección de la muestra en el capilar se realiza hidrodinámicamente a una presión de 0,5 psi durante 10 segundos en el extremo anódico, y la separación se lleva a cabo del ánodo al cátodo. El voltaje aplicado se mantiene constante a 28 kV durante toda la carrera, generándose una corriente electroforética de 20 μA . El tiempo de análisis es de 10 minutos por muestra y su detección por lectura de absorbancia a 200 nm, longitud de onda adecuada para la detección del enlace peptídico.

Las muestras se almacenan refrigeradas en el instrumento a 10 °C hasta el momento del análisis.

Cálculo de resultados

Tras integrar el área bajo la curva de cada fracción se obtiene la cantidad relativa de cada isoforma respecto al total de transferrina, expresada en porcentaje. La interpretación de resultados se realiza por comparación de los porcentajes obtenidos con los intervalos de referencia establecidos en nuestro centro para cada isoforma, mostrados en la tabla 3. En la figura 10 se muestran varios perfiles de sialotransferrina obtenidos mediante CE-UV.

Asialo-Tf	Mono-Tf	Di-Tf	Tri-Tf	Tetra-Tf	Penta + Hexa-Tf
nd	nd	0,9 – 1,5	2,1 – 6,6	75,8 – 83,7	10,1 – 16,1

Tabla 3. Intervalos de referencia de sialotransferrina establecidos por CE-UV en 35 individuos control de edad pediátrica. Los valores se expresan como porcentaje respecto a la transferrina total. nd: no detectable.

Control de calidad

Control interno

Como control interno de la calidad se utilizaron muestras de suero de pacientes con diagnóstico de síndrome CDG con perfil tipo 1. Se realizaron alícuotas de 20 μ L que se conservan a -20°C , y se utilizan en cada serie analítica como control interno. Este control se valoró durante 10 series y se calcularon los porcentajes de cada isoforma con su intervalo de confianza $\pm 2\text{SD}$. La serie se acepta siempre que el valor obtenido para cada isoforma entre dentro de estos intervalos de control.

Evaluación externa de la calidad

La determinación de sialotransferrina en suero o plasma está incluida en el programa de evaluación externa de la calidad “CDG screening” organizado por la “European Research Network Inherited Disorders of Metabolism” (ERNDIM), con 8 determinaciones anuales.

Acreditación

La determinación del perfil de glicosilación mediante CE-UV es una técnica acreditada en nuestro laboratorio por ENAC desde el año 2010 (norma ISO 15189).

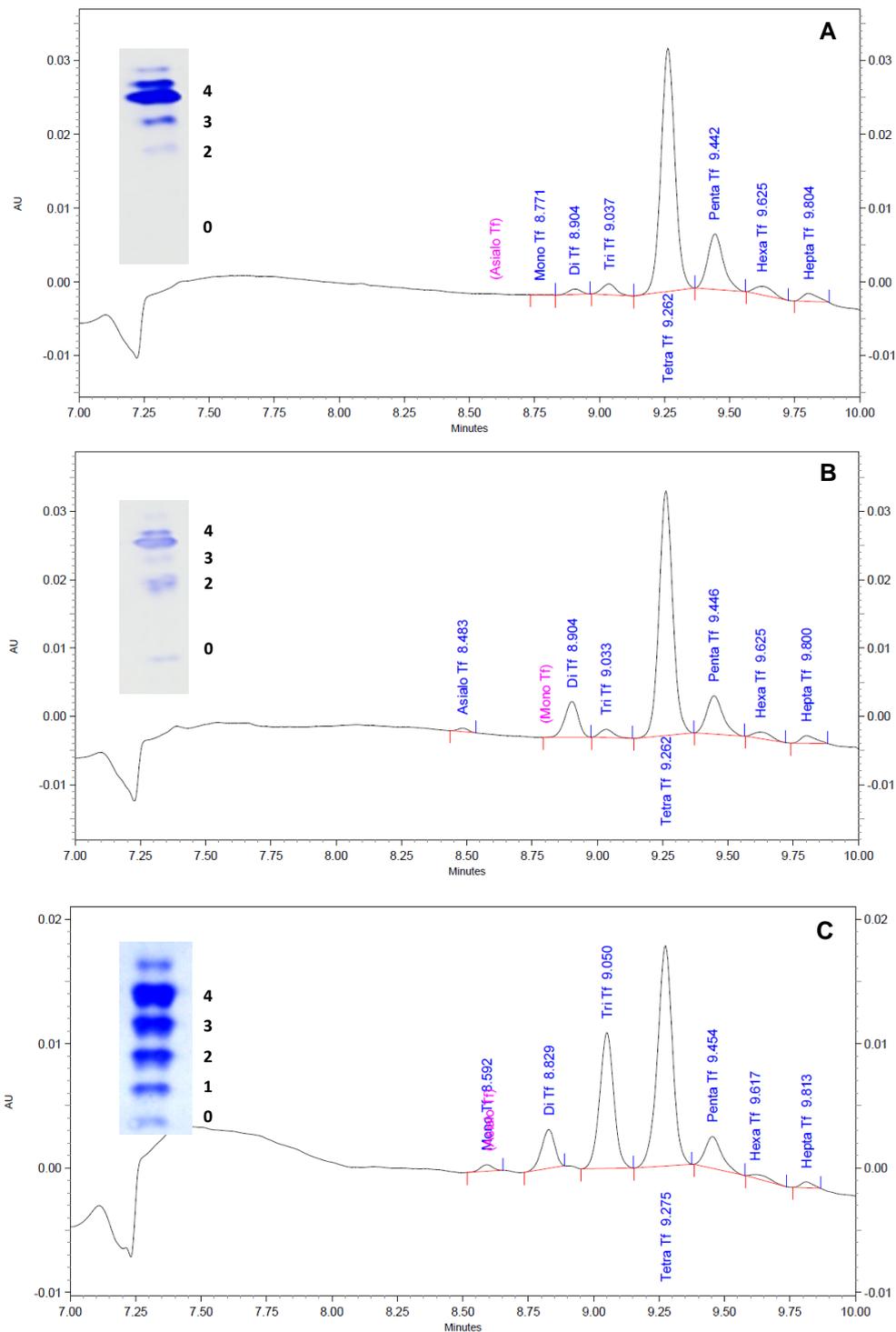


Figura 10. Perfiles de sialotransferrina obtenidos mediante CE-UV (electroferogramas) e IEF (izquierda). **A:** control; **B:** perfil tipo 1; **C:** perfil tipo 2. La numeración a la derecha del IEF indica el número de residuos siálicos correspondientes a cada isoforma (0, 1, 2, 3 y 4: a-, mono-, di-, tri- y tetrasialotransferrina, respectivamente).

Análisis del perfil de glicosilación mediante IEF en geles de acrilamida

El análisis mediante IEF esta basado en el método descrito por Van Eijk en 1983. Se parte de 15 μL de suero que se incuban durante 30 minutos con 70 μL de suero fisiológico y 15 μL de citrato férrico (24,4 mg/10 mL) con el fin de saturar la transferrina de ión férrico. Tras esta incubación las muestras se cargan en los geles mediante peines de carga de muestra de 1 μL . Las diferentes isoformas se separan por isoelectroenfoque mediante el sistema Phastsystem (Amersham Biosciences). Se añaden 70 μL de keroseno en cada lecho donde transcurre la electroforesis y se coloca el gel sobre el keroseno. El isoelectroenfoque transcurre durante 30 minutos a un voltaje de 200 V, tras un acondicionamiento previo de 10 minutos a 200 V. Una vez finalizado el isoelectroenfoque se incuba el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1/4 en suero fisiológico del anticuerpo anti-transferrina. Posteriormente, se lava durante toda la noche con suero fisiológico y después durante 30 minutos con agua bidestilada. Tras estos lavados se fijan las proteínas mediante una incubación de 30 minutos con una solución de ácido tricloroacético al 12%. Se elimina el tricloroacético y se lava con agua bidestilada durante 5 minutos. Por último, se tiñen las proteínas con la solución de azul de Comassie durante 15 minutos. La solución de revelado consiste en una dilución de 1,5 g de azul de Comassie en 300 mL de solución decolorante, compuesta por agua/etanol/ácido acético en proporción 650/350/100 (v/v/v). El exceso de tinte se retira mediante 3 lavados sucesivos de 20 minutos con la solución decolorante. El análisis del perfil en este caso es cualitativo tras inspección visual del gel. En la figura 11 se muestran los perfiles obtenidos mediante IEF.

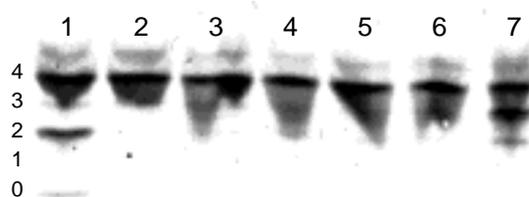


Figura 11. Perfiles de sialotransferrina obtenidos mediante IEF. **Carril 1:** perfil tipo 1, **Carriles 2 - 6:** controles, **Carril 7:** perfil tipo 2. La numeración a la derecha indica el número de residuos siálicos correspondientes a cada isoforma (0, 1, 2, 3 y 4: a-, mono-, di-, tri- y tetrasialotransferrina, respectivamente).

Análisis del perfil de glicosilación mediante IEF en geles de agarosa

Durante el transcurso de este trabajo también se utilizaron análisis de sialotransferrina realizados por IEF en geles de agarosa. Para la fabricación de los geles se mezclan 0,2 g de agarosa y 2,4 g de sorbitol en 18 ml de agua fría y se calienta esta disolución en el microondas hasta la completa disolución de la agarosa. Cuando la solución es totalmente homogénea se enfría en un baño de agua hasta los 73°C. En este punto se añaden 1,3 mL de la solución Preblended Ampholines pH 4,5 – 6,0 y se polimeriza entre dos vidrios dejando un grosor de 0,5 mm, se deja 15 minutos a temperatura ambiente y después como mínimo 1 hora en nevera (4 – 8 °C). En la preparación de la muestra se mezclan 50 µL de suero con 5 µL de citrato férrico 10 mmol/L, 5 µL de hidrogenocarbonato de sodio 0,1 mmol/L y 50 µL de NaCl al 0,9%. Esta solución se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se diluye 1:2 con NaCl al 0,9%. Las isoformas de la transferrina se separan mediante el sistema 2117 Multiphor (LKB, Stockholm, Sweden) a un voltaje de 1000V y después se detectan tras un procedimiento de inmunofijación con un anticuerpo de conejo anti-transferrina humana y tinción con azul de Coomassie. El análisis del perfil en este caso es cualitativo tras inspección visual del gel. Este tipo de IEF se llevó a cabo en el Institut de Bioquímica Clínica gracias a la colaboración de las Dras. Paz Briones, Marisa Girós y Esther Quintana.

Análisis del perfil de glicosilación mediante HPLC

El análisis mediante HPLC se basa en un método previamente descrito por Helander en el 2003. El tratamiento de la muestra sérica incluye una saturación de la transferrina con Fe⁺³ y una precipitación de los lípidos, para esto se parte de un volumen de suero de 100 µL, al que se adicionan 20 µL de una solución de FeNTA 10 mmol/L, 20 µL de una solución 1:1 (v/v) de CaCl₂ 1 mol/L y sulfato de dextrano al 2%. Esta mezcla, tras 30 minutos a 4°C, se centrifuga a 16000 x g durante 5 minutos a temperatura de 5°C. Por último, el sobrenadante se filtra mediante filtros Microcon YM-10 (Millipore, Bedford, USA). La separación de las diferentes glicofomas se lleva a cabo mediante HPLC (Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph) en una columna de

intercambio aniónico SOURCE 15Q PE 4.6/100 (Amersham Bioscience). Se inyectan 100 μL de la preparación anterior y la elución se produce mediante un gradiente salino durante 30 minutos. La detección se lleva a cabo mediante lectura espectrofotométrica a 470 nm, longitud de onda a la que absorbe el complejo Fe^{+3} -transferrina. Una vez obtenido el cromatograma se calcula la distribución relativa de cada isoforma por integración del área bajo la curva de cada pico. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Institut de Bioquímica Clínica en colaboración con la Dra. Paz Briones, Marisa Girós y Esther Quintana.

Diagnóstico enzimático y molecular de CDG-1a

Tras la obtención de un perfil alterado tipo 1 en el estudio de glicosilación de la transferrina se realizó el estudio enzimático y molecular del defecto tipo 1 más predominante, la deficiencia del enzima fosfomanomutasa (PMM). El estudio de la actividad enzimática del enzima fosfomanomutasa se realizó en leucocitos o fibroblastos según el procedimiento descrito por Vega en 2011. El gen *PMM2* está localizado en el cromosoma 16p13 y codifica para la proteína fosfomanomutasa. La búsqueda de mutaciones en este gen se realizó mediante secuenciación directa en cDNA y posterior comprobación en gDNA según el procedimiento descrito por Vega en 2009.

Ambos estudios fueron realizados en el Institut de Bioquímica Clínica y en el CEDEM (Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares) de Madrid en colaboración con la Dras. Paz Briones, Belén Pérez y Celia Pérez-Cerdá.

DETERMINACIÓN DE GABA MEDIANTE MECK-LIF EN LCR

Muestras.

La muestra de estudio fue LCR. La extracción de las muestras se realizó de forma rigurosa según el siguiente protocolo, ya que existen múltiples variables que influyen en la concentración de los diversos compuestos del LCR y que deben ser controladas (Ormazabal 2005).

La punción lumbar se realiza habitualmente de 7 a 9 de la mañana después de 12 horas de ayuno del paciente (en lactantes de 3-5 horas dependiendo de la edad). Si el paciente toma algún fármaco, éste se le administra tras la punción lumbar.

Se extrae simultáneamente sangre y LCR. En sangre se analizan hemograma, glucosa, lactato, piruvato, aminoácidos, creatinina, prolactina, folato y vitamina B12. En el LCR existe un gradiente rostrocaudal que puede ser significativo para algunos metabolitos, por lo que es importante seguir un orden a la hora de recoger la muestra en los diferentes tubos.

- Tubo 1 (5 gotas) → histoquímica y bioquímica (glucosa, lactato y piruvato)
- Tubo 2 (10 gotas) → neurotransmisores.
- Tubo 3 (10 gotas) → pterinas y 5-metiltetrahidrofolato
- Tubo 4 (10 gotas) → aminoácidos.
- Tubo 5 (10 gotas) → GABA.

Una vez obtenida la muestra, los tubos se introducen en hielo y se trasladan al laboratorio inmediatamente para almacenarlos a -80°C hasta el momento de su procesamiento. En aquellas punciones traumáticas que den lugar a contaminación hemática, se centrifuga el LCR y se separa el sobrenadante previamente a su congelación.

Reactivos.

<i>Reactivo</i>	<i>Datos del producto</i>	<i>Aplicación</i>
GABA	Sigma A5835	Estándar externo
Glutamina	Sigma G3126	Estándar externo
Ácido Bórico	Sigma 202878	Componente del tampón de carrera
SDS	Sigma L3771	Componente del tampón de carrera
β -ciclodextrina	Sigma C4767	Componente del tampón de carrera
NaOH	Merck 1.06498.1000	Acondicionamiento del capilar
HCl conc. 37%	Merck 1.00317.1000	Acondicionamiento del capilar
NBD-F	Sigma F5883	Reactivo derivatizante
Etanol	Merck 1.00983.2500	Solvente del reactivo derivatizante

Preparación de las soluciones patrón

Todas las soluciones patrón utilizadas se prepararon a partir de soluciones de stock de concentración 5 mmol/L. En la preparación de estas soluciones se pesaron las cantidades de sustancia pura detalladas a continuación y se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua bidestilada.

GABA → 5,2 mg

Glutamina → 7,3 mg

Las diluciones de trabajo se obtuvieron realizando diluciones intermedias de las soluciones de stock. Los patrones utilizados en la recta de calibración y en el estudio de linealidad se realizaron con una concentración constante de glutamina de 500 μ mol/L y diversas concentraciones de GABA según muestra la tabla 4.

<i>Concentración final estándar GABA</i>	<i>Concentración intermedia GABA utilizada</i>	<i>Volumen solución intermedia de GABA (μL)</i>	<i>Volumen solución glutamina 5 mmol/L (μL)</i>	<i>Volumen agua bidestilada (μL)</i>
2,5 nmol/L	100 nmol/L	25	100	875
5 nmol/L	100 nmol/L	50	100	850
10 nmol/L	100 nmol/L	100	100	800
20 nmol/L	1 μmol/L	20	100	880
40 nmol/L	1 μmol/L	40	100	860
75 nmol/L	1 μmol/L	75	100	825
100 nmol/L	1 μmol/L	100	100	800
150 nmol/L	1 μmol/L	150	100	750
200 nmol/L	1 μmol/L	200	100	700
500 nmol/L	1 μmol/L	500	100	400
1 μmol/L	10 μmol/L	100	100	800

Tabla 4. Soluciones y volúmenes utilizados para la preparación de la recta de calibración y estudio de linealidad.

Preparación de la solución derivatizante

El proceso de optimización de la derivatización se basó en la modificación de reacciones de derivatización previamente descritas (Klinker en 2007, Song en 2005, Zhu en 2005 y Aoyama en 2004). Durante este proceso se utilizaron diferentes concentraciones de derivatizante. La solución final de derivatizante utilizada fue una solución de NBD-F 20 mmol/L, que se preparó diariamente por disolución de 1,1 mg de NBD-F en 300 μL de etanol.

Preparación del tampón de carrera

En la optimización del método se partió de tampones previamente descritos (Zhang D en 2001 y Zhang H en 2006). Se utilizaron diversos tampones de separación, todos compuestos de borato a diversas concentraciones y preparados a partir de una solución de ácido bórico 500 mmol/L. Para la preparación de esta solución stock se pesaron 15,45 g de ácido bórico y se llevó a un volumen de 500 mL con agua bidestilada. Por dilución de ésta se obtuvieron las concentraciones utilizadas, que comprendieron concentraciones de 10 a 200 mmol/L. Se estudio un rango de pH de 8,5 a 10,5 que se obtuvo ajustando los tampones una vez preparados con NaOH puro.

Basándonos en procedimientos de cromatografía electrocinética micelar (Klinker en 2007, Zhu en 2005 y Zhou en 2007), también se estudio el efecto de la adición al tampón de diferentes cantidades de SDS y β -ciclodextrina, probándose concentraciones de SDS de 10 a 80 mmol/L y de β -ciclodextrina de 8,5 mmol/L. Estas concentraciones se obtuvieron por pesada y adición de la sustancia pura al buffer deseado previamente al ajuste de pH. El tampón más adecuado tras la optimización del procedimiento fue un tampón borato de concentración 200 mmol/L, 10 mmol/L de SDS, 8,5 mmol/L de β -ciclodextrina y pH 10, del cual se preparan 250 mL mediante 100 mL de la solución concentrada de ácido bórico 500 mmol/L, 0,721 g de SDS, 2,412 g de β -ciclodextrina y 150 mL de agua bidestilada, ajustando a pH 10. Todos los tampones utilizados se filtraron con membranas con un diámetro de poro de 0,45 μ m.

Procedimiento analítico

Durante el proceso de optimización del procedimiento se utilizaron diferentes condiciones de reacción de derivatización: proporción de derivatizante respecto al total de aminas de la muestra, pH, temperatura y tiempo de reacción. La solución final de derivatizante utilizada fue una solución de NBD-F 20 mmol/L. La reacción se lleva a cabo mezclando en un vial de vidrio 50 μ L de LCR o solución patrón, 7 μ L de la solución de NBD-F y 14 μ L de una solución de borato 100 mmol/L de pH 10. Esta mezcla de reacción se incuba en un termobloque a la temperatura deseada. La temperatura y tiempo de reacción óptimos fue de 75°C durante 5 minutos. La reacción de derivatización que tiene lugar se muestra en la figura 12. Tras la derivatización las muestras se colocan en un baño de agua con hielo, se filtran con filtros de membrana de 45 μ m y se diluyen 10 veces en agua bidestilada antes de ser inyectadas para su separación. Las muestras ya diluidas se colocan en el instrumento de electroforesis capilar, que las mantiene refrigeradas a 10 °C.

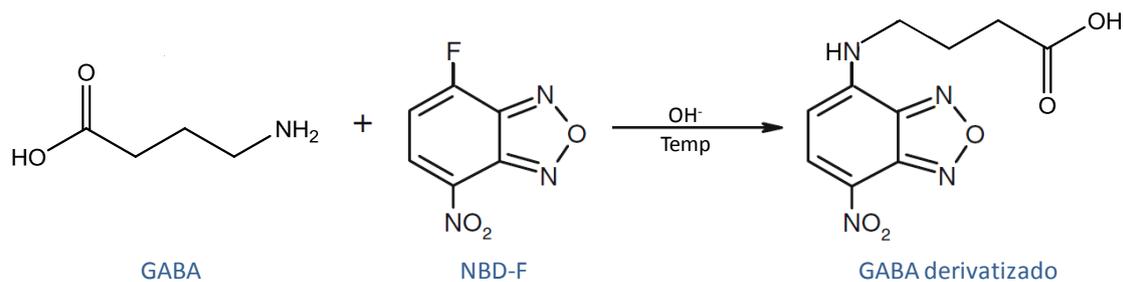


Figura 12. Reacción de derivatización entre el GABA y el NBD-F

Instrumentación

El análisis mediante electroforesis capilar se realizó en un sistema P/ACE™ System 2200 de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA), equipado con detector de fluorescencia y con un módulo de laser de argón de longitud de onda de emisión de 488 nm de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA). Se utilizó el software 32 Karat 8.0 en el control del instrumento y en el análisis de los electroferogramas.

El capilar utilizado fue un capilar de sílice sin recubrimiento eCap (Beckman Coulter, Inc.). La longitud total es de 57 cm con una ventana a 50 cm que se acopla al detector de fluorescencia y con un diámetro interno de 75 μm . El capilar se mantiene a 25°C durante la separación. Previo a su primer uso se acondiciona con lavados de HCl 0,1 mol/L durante 5 minutos, agua bidestilada durante 2 minutos y una solución de NaOH 0,1 mol/L durante 10 minutos. Previamente a cada inyección el capilar se lava con NaOH 0,1 mol/L, agua bidestilada y tampón de carrera a una presión de 30 psi durante 30, 60 y 30 segundos, respectivamente. La inyección de la muestra en el capilar se realiza hidrodinámicamente a una presión de 0,7 psi durante 12 segundos en el extremo anódico, lo que supone un volumen de 60 nL, y la separación se lleva a cabo del ánodo al cátodo. El voltaje aplicado se mantiene constante durante toda la carrera. Se utilizaron diversos voltajes de separación según cual fuera el tampón utilizado, entre 15 y 30 kV, siendo el más idóneo el de 20 kV. En la figura 13 se muestran electroferogramas típicos de una solución estándar y de una muestra de LCR.

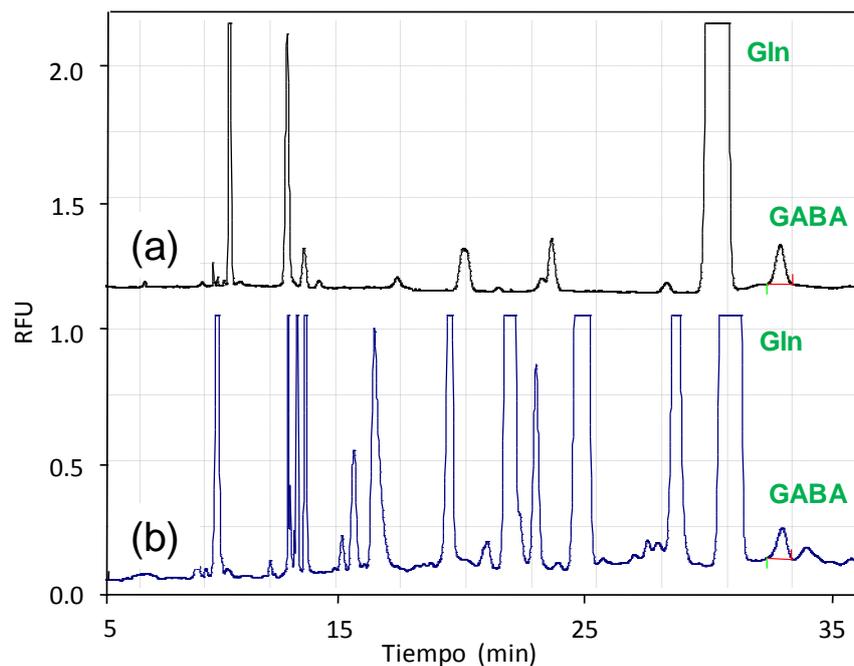


Figura 13. (a) Electroferograma de una solución patrón (Gln 500 $\mu\text{mol/L}$; GABA 200 nmol/L). (b) Electroferograma de una muestra de LCR.

Cálculo de resultados

Los resultados se calculan mediante integración del área bajo la curva y calibración externa con el programa de adquisición de datos 32 Karat Software de Beckman. Los resultados se expresan en nmol/L y se interpretan por comparación con los intervalos de referencia establecidos según la edad del paciente (Tabla 5).

<i>Edad</i>	<i>n</i>	<i>GABA (nmol/L)</i>
≤ 6 meses	19	16 – 88
> 6 meses	36	38 – 92

Tabla 5. Intervalos de referencia de GABA en LCR por CE-LIF establecidos en individuos control de edad pediátrica (*n*: número de individuos control utilizados en cada grupo).

Control de calidad

Control interno

Como control interno de calidad se utiliza un pool de muestras de LCR debido a que no existe control comercial de GABA en LCR. Para realizar este control se seleccionaron 20 muestras de LCR ya analizadas. Se mezclaron y se hicieron alícuotas de 70 μL que se conservan a -80°C hasta el momento del análisis. Este control se valoró durante 10

series y se calculó el intervalo de confianza como $\text{media} \pm 2\text{SD}$. La serie se acepta siempre que el valor obtenido para este control entre dentro de este intervalo de confianza.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL GABA

Análisis de la excreción de GHB mediante GC-MS

El método cromatográfico utilizado se basa en la extracción de los ácidos orgánicos de la orina mediante disolventes orgánicos (dietil éter y acetato de etilo), posterior derivación de los mismos mediante N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) y separación de los trimetilsilil derivados volátiles mediante una columna capilar sometida a temperaturas crecientes. A medida que se separan, los trimetilsilil derivados se cuantifican mediante un espectrómetro de masas por monitorización de un fragmento específico (SIM) del ácido γ -hidroxibutírico (Prieto 2007).

- *Muestras*

Para la cuantificación del ácido γ -hidroxibutírico tras una sospecha de deficiencia de SSADH, se recogió orina de una micción en un bote estéril y se conservó a -20°C hasta el momento del análisis.

- *Reactivos*

<i>Reactivo</i>	<i>Datos del producto</i>	<i>Aplicación</i>
GHB	Control externo ERNDIM	Estándar externo
Ácido undecanodioico	Sigma-Aldrich 94040	Estándar interno
NaCl	Merck 1.06404.0500	Reactivo extracción líquido-líquido
HCl concentrado	Merck 1.00317.1000	Reactivo extracción líquido-líquido
Acetato de etilo	Merck 1.09623.2500	Solvente extracción líquido-líquido
Éter dietílico	Merck 1.00921.1000	Solvente extracción líquido-líquido
BSTFA	Sigma-Aldrich 15222	Reactivo derivatizante
Piridina	Merck 9728	Solución derivatizante

- *Preparación de las soluciones patrón*

Se prepara una solución de estándar interno de 1 mg/mL por pesada de 10 mg del ácido undecanodioico y posterior dilución en 10 mL de etanol. Esta dilución es estable

durante 2 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o inferior. La solución de trabajo tiene una concentración $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ y se prepara diariamente por dilución $1/20$ de la solución anterior.

Como patrones externos se utilizan controles de concentración conocida. del programa de evaluación externa de la calidad “Quantitative Organic Acids ERNDIMQA” organizado por la “European Research Network Inherited Disorders of Metabolism” (ERNDIM)

- *Preparación de la solución derivatizante*

La solución derivatizante se prepara a partir de una botella de BSTFA de 1 mL a la que se le añade 1 mL de piridina. Se conserva a $+7^{\circ}\text{C}$ o inferior durante 1 mes.

- *Procedimiento*

Se dispone un volumen de muestra, control o calibrador de $150\text{ }\mu\text{L}$ en un tubo de vidrio con tapón de rosca hermético, posteriormente se añaden $1800\text{ }\mu\text{L}$ de una solución saturada de NaCl, $275\text{ }\mu\text{L}$ de HCl 4 N y $50\text{ }\mu\text{L}$ de estándar interno. Se añaden 2 mL de acetato de etilo y se agita durante 10 minutos. Tras la agitación se centrifuga a 1500 x g , se separa la fase orgánica y se evapora bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Se repite la extracción con 2 mL de éter dietílico. Se recoge la fase orgánica sobre el mismo vial de la primera extracción y se evapora de nuevo. Una vez totalmente evaporado se derivatiza con $40\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de BSTFA durante 30 minutos a 60°C .

- *Instrumentación*

Los extractos de orina una vez derivatizados se analizan en un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 7890A equipado con un detector de masas Agilent, modelo 5975C. La inyección de la muestra se realiza en modo splitless, con un volumen de inyección de $1\text{ }\mu\text{L}$ a una temperatura de 250°C . La separación se lleva a cabo en una columna capilar de sílice fundido HP-5MS (Agilent) de 60 metros de longitud, $0,25\text{ mm}$ de diámetro y $0,25\text{ mm}$ de espesor de película. El programa de temperaturas comienza a 70°C durante 1 minuto, con una rampa inicial de $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 250°C , más 5 minutos a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una rampa final de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniéndose a dicha temperatura durante 5 minutos, resultando un tiempo total de análisis de 43.5

minutos. La ionización se realiza mediante el modo de impacto electrónico. Para la determinación cuantitativa, se utiliza como ión cuantificador del GHB el fragmento m/z 233 y para el estándar interno el fragmento 345.

- *Características metrológicas del procedimiento*

Durante la validación de este procedimiento en nuestro laboratorio se establecieron las siguientes características metrológicas:

Intervalo de medida: 2 -165 $\mu\text{mol/L}$

CV interserie: 12 %

- *Interpretación de resultados*

La representación de las áreas de pico relativas al estándar interno frente a la concentración da lugar a una curva de calibrado lineal. Los resultados se calculan frente a esta curva de calibración externa en $\mu\text{mol/L}$ y se dividen por la concentración de creatinina, expresándose en mmol/mol de creatinina. Se considera patológica una excreción superior a 6 mmol/mol de creatinina, excreción de referencia establecida en nuestro laboratorio mediante el análisis de 35 orinas control de edad pediátrica.

- *Control de calidad*

Control interno

Como controles internos de la calidad se utilizaron 2 muestras de orina. El control negativo se realizó a partir de un pool de orinas de sujetos normales y el control positivo a partir de un pool de orinas de pacientes con diagnóstico de aciduria 4-hidroxibutírica. De ambos pools se realizan alícuotas de 170 μL que se conservan a -20°C o inferior, y se utilizan en cada serie analítica como controles internos. Estos controles se valoran durante 10 series y se calculan sus concentraciones de GHB con un intervalo de confianza $\pm 2\text{SD}$. La serie se acepta siempre que los valores obtenidos en ambos controles estén dentro de estos intervalos de control.

Evaluación externa de la calidad

La determinación de GHB en orina está incluida en el programa de evaluación externa de la calidad "Quantitative Organic Acids ERNDIMQA" organizado por la "European

Research Network Inherited Disorders of Metabolism” (ERNDIM), con 8 determinaciones anuales.

Acreditación

La determinación de la excreción de GHB mediante GC-MS es una técnica acreditada en nuestro laboratorio por ENAC desde el año 2010 (Norma ISO 15189).

Estudio del gen ALDH5A1

El diagnóstico definitivo de la aciduria 4-hidroxi-butírica se basó en la búsqueda de mutaciones en todos los exones del gen *ALDH5A1* (regiones codificante y no codificantes) mediante secuenciación directa. Este gen está localizado en el cromosoma 6p22 y tiene un tamaño de 38 kb repartidas en 10 exones.

El método utilizado en la búsqueda de mutaciones se basa en el descrito por Akaboshi en 2003. Brevemente, el procedimiento consiste en realizar una PCR específica para cada fragmento, purificar posteriormente el producto de la PCR, realizar una PCR de secuenciación con el *primer* específico de fragmento y Kit Big Dye Terminator v.3.1, precipitación del producto obtenido y por último, secuenciación del producto de PCR precipitado.

ANÁLISIS DEL PERFIL DE OLIGOSACÁRIDOS EN ORINA

Muestras

El espécimen adecuado para el análisis de oligosacáridos es orina procedente de una micción, preferiblemente la de primera hora de la mañana. También se puede realizar en orina de 24 horas, pero las dificultades para su recolección en pacientes neuropediátricos graves desaconseja su uso. Las muestras se congelan a -20°C o inferior hasta el momento del análisis.

Reactivos

Reactivo	Datos del producto	Aplicación
Placa Silica-gel	Merck 1.05553	Fase estacionaria TLC
Butanol	Merck 15.467-9	Componente fase móvil TLC
Ácido acético	Merck 1.00063.2500	Componente fase móvil TLC
Orcinol	Sigma O-1875	Reactivo de revelado TLC
Ácido sulfúrico	Merck 731.1000	Componente solución reveladora TLC
Sialilactosa	Sigma A-0828	Estándar TLC
Carbohydrate Labeling and Analysis Kit	Beckman-Coulter 477600	Análisis oligosacáridos CE-LIF
NaBH_3CN en THF (1M)	Sigma 296813	Reactivo para la derivatización CE-LIF

Análisis de oligosacáridos en orina mediante cromatografía en capa fina (TLC)

El análisis de oligosacáridos por cromatografía en capa fina se basó en el descrito por Humbel en 1975.

- *Preparación de la fase móvil:*

Se preparan 120 ml de una mezcla 2:1:1 (v/v/v) de butanol/ácido acético/agua bidestilada.

- *Preparación de la solución reveladora:*

El revelador es una solución de orcinol de concentración 2,5 g/L en ácido sulfúrico. Para su preparación se pesan 100 mg de orcinol, se disuelven en 4,4 mL de ácido

sulfúrico concentrado y posteriormente se añaden 36,6 mL de agua bidestilada. Esta solución es estable en nevera, protegida de la luz, durante 2 meses.

- *Procedimiento:*

Se marca en la placa la línea de aplicación de las muestras y del control positivo a 1,5 cm del extremo inferior. A 2 cm del extremo superior de la placa se realiza un surco que marca el fin del recorrido de la fase móvil.

El volumen de orina a aplicar en la placa depende de la concentración de creatinina de la misma y de la edad del paciente:

Niños < 6 meses: $70 / \text{creatinina (mmol/L)} = \text{volumen a aplicar (}\mu\text{L)}$

Niños \geq 6 meses: $120 / \text{creatinina (mmol/L)} = \text{volumen a aplicar (}\mu\text{L)}$

Se coloca una orina patológica y las muestras a analizar sobre la línea de aplicación. Posteriormente, se introduce la placa en la cubeta con la fase móvil y se mantiene a temperatura ambiente hasta que la fase móvil alcanza el surco superior, aproximadamente a las 5 o 6 horas. Se deja secar la placa y se repite el recorrido de la fase móvil 2 veces más. Se deja secar completamente la placa y se pulveriza con la solución reveladora. Por último, se incuba durante 5 minutos en la estufa a 120 °C. El análisis del perfil de oligosacáridos es cualitativo tras inspección visual de la placa. En la figura 14 se muestran perfiles obtenidos mediante cromatografía en capa fina. El procedimiento se completa tras 3 días de trabajo.

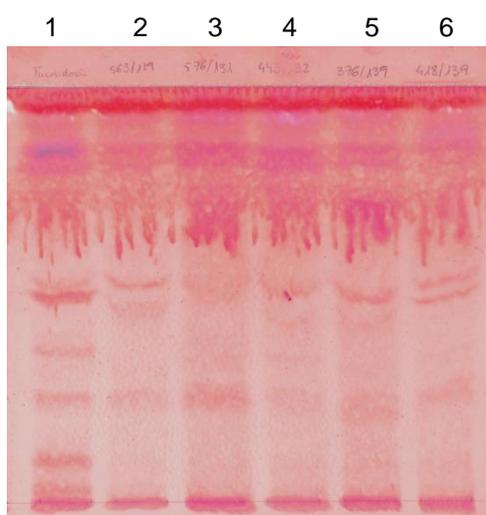


Figura 14. Perfiles de oligosacáridos en orina obtenidos mediante TLC.
Carril 1: fucosidosis, **Carriles 2 - 6:** controles.

Análisis de oligosacáridos en orina mediante CE-LIF

El método de análisis en orina de oligosacáridos se basó en la modificación de métodos previamente descritos para el análisis de glicoproteínas (Guttman en 1997).

- Derivatización

Para el análisis de oligosacáridos en orina mediante CE-LIF se utilizó el kit comercial Carbohydrate Labeling and Analysis Kit (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) diseñado para analizar oligosacáridos tras su liberación de glicoproteínas. Debido a que los oligosacáridos no emiten fluorescencia nativa es necesaria su derivatización con un reactivo fluorogénico previo a su análisis mediante CE-LIF. El reactivo de derivatización utilizado en este procedimiento es el 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS), reactivo que reacciona con el extremo reductor de los carbohidratos produciendo un derivatizado que es susceptible de ser detectado mediante LIF y con tres cargas negativas extras que aumentarán su movilidad electroforética. En la figura 15 se muestra esta reacción.

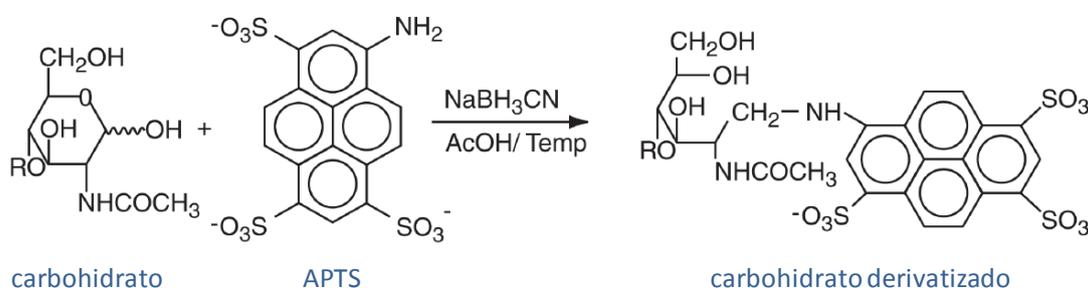


Figura 15. Reacción de derivatización entre un oligosacárido reductor y el APTS.

Se parte de un volumen de orina que contiene 150 nmoles de creatinina. Este volumen de orina se concentra a 50°C hasta que llega a un volumen final de $5\ \mu\text{L}$. Una vez concentradas las orinas se procede a su derivatización. Para ello, se añaden $2\ \mu\text{L}$ de la solución derivatizante y $2\ \mu\text{L}$ de la solución de NaBH_3CN 1M en THF. La solución del derivatizante utilizada es de concentración 200 mmol/L y se prepara por dilución de 5 mg de APTS en $48\ \mu\text{L}$ de ácido acético al 15%. La mezcla de reacción se incuba durante

toda la noche a 37 °C. Tras la derivatización las muestras se diluyen en agua bidestilada 1:40 antes de ser inyectadas en el analizador.

- *Instrumentación*

El análisis mediante electroforesis capilar se realizó en un sistema P/ACE™ System 2200 de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA), equipado con detector de fluorescencia y con un módulo de laser de argón de longitud de onda de emisión de 488 nm de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA, USA). Este analizador dispone del software 32 Karat 8.0 para el control del instrumento y para el análisis de los electroferogramas.

El capilar utilizado es específico para la separación de carbohidratos, y forma parte del kit, N-CHO Coated Capillary (capilar de poliacrilamida recubierto). La longitud total es de 60,2 cm con una ventana a 50 cm que se acopla al detector de fluorescencia y con un diámetro interno de 50 µm. El capilar se mantiene a 20°C durante la separación. Previo a su primer uso se acondiciona con un lavado a una presión de 20 psi de agua bidestilada durante 10 minutos y un acondicionamiento con el tampón de carrera de 2 minutos. Previamente a cada inyección el capilar se lava con agua bidestilada y tampón de carrera a una presión de 20 psi durante 30 y 60 segundos, respectivamente. La inyección de la muestra en el capilar se realiza hidrodinámicamente a una presión de 0,5 psi durante 3 segundos. Se aplica un voltaje de separación constante de 30 kV durante 20 minutos, en polaridad reversa, generándose una corriente electroforética de -14 µA. Las muestras se almacenan refrigeradas en el instrumento a 10 °C hasta el momento de su análisis.

- *Interpretación de resultados*

El análisis de resultados es cualitativo, por comparación del perfil electroforético del paciente frente al perfil normal para su edad y a perfiles de orinas procedentes de pacientes con oligosacaridosis ya diagnosticadas. La aparición de oligosacáridos con un grado de polimerización superior a cuatro se considera patológica, ya que este hecho no se observa en muestras control, a excepción de pacientes en el periodo de lactancia. El grado de polimerización de cada oligosacárido se determina mediante el

electroferograma del dextrano parcialmente digerido. En la figura 16 se muestran perfiles de oligosacáridos en orina obtenidos mediante este procedimiento.

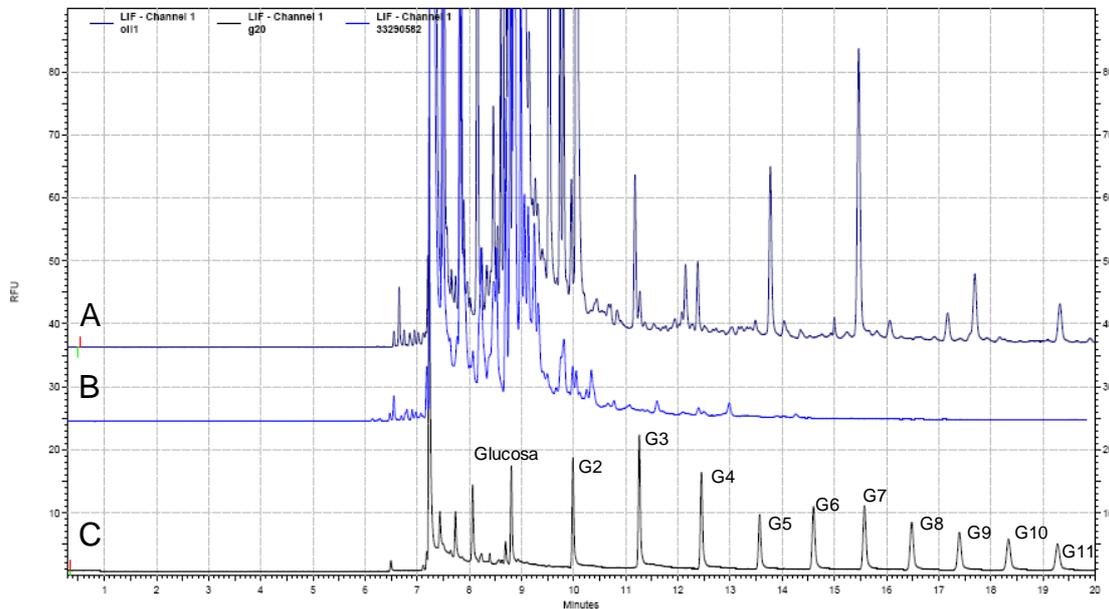


Figura 16. Perfiles de oligosacáridos en orina obtenidos mediante CE-LIF. **A:** gangliosidosis GM1; **B:** control; **C:** marcador del grado de polimerización (dextrano parcialmente digerido).

Control de calidad

- Control interno

Como control interno de la calidad se utilizan muestras de orina procedentes de pacientes con diagnóstico de oligosacaridosis (ver más adelante). Se realizan alícuotas de 30 μL que se conservan a -20°C o inferior, y se utilizan en cada serie analítica como control interno. La serie se acepta siempre que en el perfil del control se observen las alteraciones detectadas en series anteriores.

MÉTODOS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS OLIGOSACARIDOSIS

Análisis del perfil de excreción de aminoácidos mediante cromatografía de intercambio iónico

La aspartilglucosaminuria es una oligosacaridosis caracterizada por la excreción de aspartilglucosamina, compuesto glicado no reductor y por lo tanto no susceptible de ser detectado mediante derivatización con APTS. Por este motivo, ante una sospecha de aspartilglucosaminuria, se realiza un análisis de aminoácidos en orina, ya que la aspartilglucosamina sí se detecta mediante este procedimiento.

El análisis de aminoácidos se realiza por un proceso de cromatografía de intercambio iónico. La resina tenía una carga negativa y los aminoácidos se introducen en la columna a un pH ácido, lo que asegura que todos estén cargados positivamente. Las condiciones analíticas se varían progresivamente incrementando el pH, la temperatura y la carga iónica de los tampones. Estos cambios provocan que se alcance sucesivamente el punto isoeléctrico para cada uno de los aminoácidos, punto en el cual la atracción iónica de la resina se pierde y el aminoácido eluye de la columna. Una vez separados los aminoácidos reaccionan con ninhidrina (derivatizante) a temperatura elevada, dando lugar a compuestos coloreados, que se detectan por espectrometría a diferentes longitudes de onda (570 nm para los alfa- y beta-aminoácidos y 440 nm para los iminoácidos) (Moyano 1998). La aspartilglucosamina también reaccionará con la ninhidrina por el residuo de Asp.

- *Muestras*

Para el análisis cuantitativo de aminoácidos en orina, se recoge una micción en un bote estéril, preferiblemente la primera de la mañana. Si la muestra no se procesa al día se almacena a -20°C o inferior hasta el momento del análisis.

- *Reactivos*

<i>Reactivo</i>	<i>Datos del producto</i>	<i>Aplicación</i>
Citrato de litio 0.2 mol/L pH 2.8	Biochrom 80-2038-15	Fase móvil
Citrato de litio 0.3 mol/L pH 3	Biochrom 80-2038-16	Fase móvil
Citrato de litio 0.5 mol/L pH 3.15	Biochrom 80-2099-83	Fase móvil
Citrato de litio 0.9 mol/L pH 3.5	Biochrom 80-2097-18	Fase móvil
Citrato de litio 1.65 mol/L pH 3.55	Biochrom 80-2037-69	Fase móvil
Hidróxido de litio 0.3 mol/L	Biochrom 80-2038-20	Fase móvil
Ninhidrina	Merck 1.06762.1000	Reactivo derivatizante
Acetato sódico trihidratado	Sigma 32318	Componente de la solución derivatizante
Acetato potásico	Sigma 32309	Componente de la solución derivatizante
Citrato tripotásico monohidratado	Panreac 131655.1210	Componente de la solución derivatizante
Ácido acético	Merck 1.00063.2500	Componente de la solución derivatizante
Etilenglicol	Panreac 121316.0716	Componente de la solución derivatizante
Hidridantina dihidrato	Sigma 53940	Componente de la solución derivatizante
Ácido clorhídrico	Merck 100317	Componente de la solución derivatizante
Ácido sulfosalicílico	Sigma 33619	Componente de la solución desproteinizante

- *Preparación de las soluciones de trabajo*

Para la preparación de la solución de ninhidrina, se prepara previamente un tampón acetato de 272 g de acetato sódico trihidratado, 589 g de acetato potásico y 8 g de citrato tripotásico monohidratado. Se añaden 200 mL de ácido acético y se enrasa a un volumen final de 2 litros con agua bidestilada. La solución final de ninhidrina se prepara a partir de 675 mL de este tampón, 1575 mL de etilenglicol, 22,5 g de ninhidrina y 1,8 g de hidridantina dihidrato. Se agita bajo una corriente de nitrógeno y cuando la solución está totalmente homogénea se añaden 90 mL de ácido clorhídrico.

La solución desproteinizante de las muestras de orina consiste en una solución 197 mmol/L de ácido sulfosalicílico, que se prepara pesando de 3 g de éste ácido, enrasando a un volumen de 10 mL.

- *Procedimiento*

La muestra se prepara mezclando 500 μ L de orina + 50 μ L de la solución desproteinizante. Se agita bien y se centrifuga a 1500 x g durante 10 minutos a 5°C. Se ajusta el pH de la muestra a 2 añadiendo 100 μ L de hidróxido de litio 0,3 mol/L por cada 200 μ L de sobrenadante de orina. Una vez ajustado el pH las muestras ya están preparadas para ser introducidas en el cromatógrafo.

- *Instrumentación*

Las muestras se procesan en el analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Pharmacia Biotech, Biochrom Ltd., UK) equipado con una columna High Resolution Lithium Column por cromatografía de intercambio iónico. Mediante un gradiente ascendente de pH, que se consigue variando los tampones de la fase móvil, se van eluyendo los aminoácidos a medida que alcanzan su punto isoelectrico.

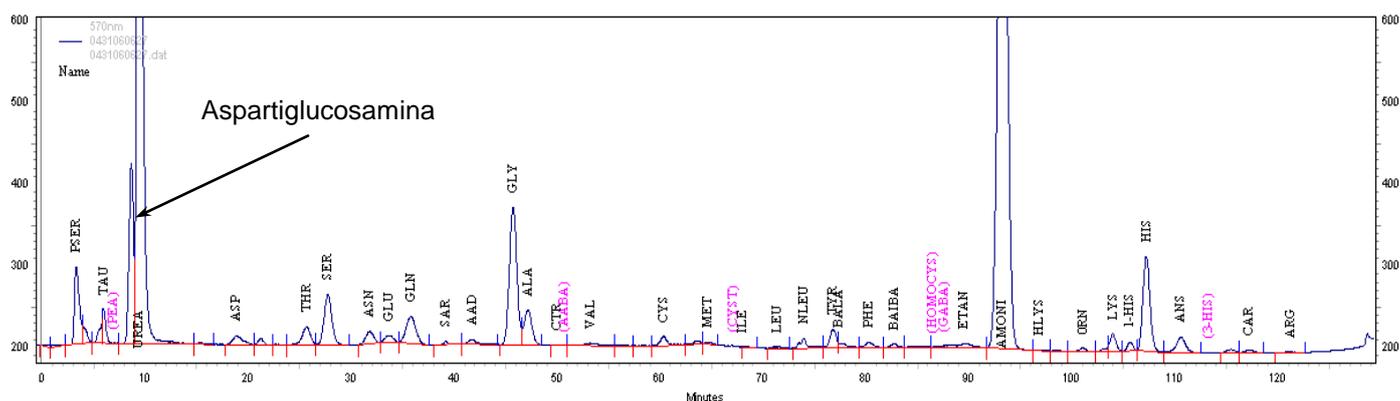


Figura 17. Perfil de excreción de aminoácidos característico de aspartilglucosaminuria obtenido por cromatografía de intercambio iónico.

- *Interpretación de resultados*

La aspartilglucosamina eluye a los 9 minutos, inmediatamente antes que la urea, con la que se puede solapar si las condiciones de separación no son óptimas. En los sujetos

control la excreción de aspartilglucosamina es indetectable. En la figura 17 se muestra el perfil de aminoácidos en orina de un paciente afecto de aspartilglucosaminuria.

Análisis de la excreción de GAGs

La determinación de la excreción de glucosaminoglicanos (GAGs) es un análisis básico junto a la excreción de oligosacáridos en el diagnóstico diferencial de las enfermedades de acúmulo. Los GAGs son unos compuestos que están presentes en diferentes tejidos (hueso, cartílago, córnea, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos...) y fluidos biológicos (líquido sinovial) con funciones estructurales y de protección, respectivamente. En las mucopolisacaridosis se produce un aumento de la excreción de estos compuestos como consecuencia de la deficiencia de algún enzima lisosomal necesario en su metabolización. La excreción de GAGs se determina mediante un procedimiento espectrométrico adaptado a un autoanalizador, según un procedimiento previamente descrito por nuestro grupo (Colomé 1999). El procedimiento se basa en la determinación espectrofotométrica de los GAGs conjugados con el reactivo 1,9-azul de dimetilmetileno (DMB).

- Muestras

Para la cuantificación de GAGs se recoge orina de una micción en un bote estéril, preferiblemente la primera de la mañana. Si la muestra se procesa al día se almacena a -20°C o inferior hasta el momento del análisis.

- Reactivos

<i>Reactivo</i>	<i>Datos del producto</i>	<i>Aplicación</i>
Acetato de sodio	Merck, ref. 6268	Componente solución DMB
Ácido acético	Merck 1.00063.2500	Componente solución DMB
DMB	Serva 20335	Reactivo de conjugación
Condroitin sulfato C	Sigma C-4384	Estándar externo

- *Preparación de los calibradores*

Se prepara una solución inicial pesando 1 mg de condroitin sulfato y diluyéndolo en 1 mL de agua bidestilada. A partir de esta solución se prepara la curva de calibración a 4 puntos:

- Blanco (0 µg/mL).
- Estándar de 25 µg/mL: Añadir 50 µL de la solución madre a 1950 µL de agua destilada.
- Estándar de 50 µg/mL: Añadir 100 µL de la solución madre a 1900 µL de agua destilada.
- Estándar de 100 µg/mL: Añadir 200 µL de la solución madre a 1800 µL de agua destilada

- *Preparación de las soluciones de trabajo*

Se prepara un tampón de acetato sódico 50 mmol/L pesando 4 g de acetato de sodio, diluyéndolo a continuación en agua bidestilada. Se ajusta el pH a 5,6 con ácido acético 50 mmol/L y se enrasa a 1 litro. Por otro lado, se disuelven 61 mg de DMB en 5 mL de etanol. Esta dilución se lleva a un volumen de 500 mL con el tampón acetato preparado anteriormente.

- *Instrumentación*

Las muestras se procesan directamente sin tratamiento previo en el analizador ABX Pentra 400 (Horiba). Tras una incubación de 6 minutos de 5 µL de muestra, 80 µL de agua bidestilada y 300 µL de la solución de NBD, se realiza una lectura de absorbancia a 530 nm.

- *Características metrológicas del procedimiento*

Durante la validación de este procedimiento en nuestro laboratorio se establecieron las siguientes características metrológicas:

Intervalo de medida: 0 -100 µg/mL

CV interserie: 13 %

- *Interpretación de resultados*

Los resultados se calculan mediante calibración externa y se expresan en relación a la creatinina, como mg de GAGs/mmol de creatinina. Las excreciones obtenidas se comparan en relación a los intervalos de referencia establecidos en nuestro laboratorio, y que varían en función de la edad del paciente (Colomé 1999):

<i>Edad</i>	<i>n</i>	<i>GAGs (mg/mmol de creatinina)</i>
0 – 6 meses	24	7,1 – 18,0
7 – 11 meses	12	3,3 – 7,3
1 – 2 años	22	1,9 – 6,7
3 – 6 años	22	1,7 – 5,4
7 – 10 años	24	1,0 – 4,3
11 – 15 años	18	0,5 – 3,1
16 – 18 años	10	0,1 – 2,1

Tabla 6. Valores de referencia de la excreción de GAGs en función de la edad (*n*: número de individuos control utilizados en cada grupo).

- *Control de calidad*

Control interno

Como control interno de la calidad se utiliza el Control Special Assay in urine (SKLM), ref. SAU-01. Este control se valoró durante 10 series y se calculó su valor medio con su intervalo de confianza $\pm 2SD$. La serie se acepta siempre que el valor obtenido esté dentro de este intervalo de control.

Evaluación externa de la calidad

La determinación de GAGs en orina está incluida en el programa de evaluación externa de la calidad “Special Assays in Urine” organizado por la “European Research Network Inherited Disorders of Metabolism” (ERNDIM), con 8 determinaciones anuales.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Validación de procedimientos cuantitativos/semicuantitativos: Perfil de glicosilación y determinación de GABA.

En el proceso de validación de los procedimientos cuantitativos desarrollados en el transcurso de esta tesis se calcularon los siguientes parámetros:

Coeficiente de variación interserie del tiempo de migración

Se determinó el tiempo de migración de una solución de estándar en 10 días diferentes para ver si éste se mantenía constante. Se expresó como porcentaje de variación dividiendo la desviación estándar por el tiempo de migración medio, multiplicado por 100.

Coeficiente de variación intraserie

Se analizaron 2 muestras fisiológicas con concentraciones diferentes 10 veces en la misma serie. El coeficiente para cada concentración se calculó en forma de porcentaje, dividiendo la desviación estándar de los resultados por la media aritmética. $CV_{intra} = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$.

Coeficiente de variación interserie

Se analizaron 2 muestras fisiológicas con concentraciones diferentes durante 20 series diferentes. El coeficiente se calculó en forma de porcentaje, dividiendo la desviación estándar de los resultados por la media aritmética. $CV_{inter} = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$.

Linealidad

Se calculó diluyendo progresivamente el patrón de calibración concentrado y calculando el coeficiente de regresión de las rectas obtenidas. Se consideró una buena linealidad si $r^2 > 0.99$.

Límite de cuantificación - Límite inferior del intervalo analítico

Se determinó como aquella concentración mínima con resultados reproducibles (imprecisión inferior al 15%). Se analizaron diluciones progresivas hasta alcanzar este valor de imprecisión.

Límite de detección

Se define como la menor concentración que genera una respuesta superior a tres veces la señal del blanco. Se partió de la concentración correspondiente al límite inferior del intervalo analítico y se fueron haciendo diluciones progresivas hasta alcanzar aquella concentración mínima que superaba la señal del blanco $\times 3$.

Comparación de métodos

Se realizó una comparación utilizando la regresión de Passing-Bablok, siempre que existiera otro método cuantitativo para la determinación de las magnitudes estudiadas. Se realizó una comparación de más de 20 resultados obtenidos por ambos procedimientos, con valores que cubrieran todo el intervalo analítico.

Análisis de la inexactitud

Se participa en programas de control de la calidad externos siempre que estén disponibles, con el fin de determinar la exactitud de los resultados obtenidos.

Valores de referencia

Para los diferentes procedimientos, los valores de referencia se calcularon como la media $\pm 2SD$, siempre que los valores tuvieran una distribución gaussiana; o como la mediana más los percentiles 2,5-97,5 cuando la distribución no fue normal. Se establecieron diferentes intervalos en función de la edad, siempre que hubiera una relación de los resultados con la edad estadísticamente significativa y diferencias estadísticamente significativas entre las medias y/o las desviaciones estándar de los diferentes grupos establecidos.

Análisis de muestras patológicas

Mediante el análisis de muestra patológicas se validan los intervalos de referencia obtenidos y se comprueba la ausencia de falsos negativos.

Validación de procedimientos cualitativos: Perfil de oligosacáridos en orina

En el proceso de validación de los procedimientos cualitativos descritos se calcularon los siguientes parámetros

Coeficiente de variación interserie del tiempo de migración

Se determinó el tiempo de migración de una solución de estándar en 10 días diferentes para ver si éste se mantenía constante. Se expresó como porcentaje de variación dividiendo la desviación estándar por el tiempo medio de migración, multiplicado por 100.

Estudio de repetitibilidad

Mediante el análisis diario del material de control se determinó si el procedimiento cualitativo tenía suficiente precisión, es decir, si el perfil se mantenía en las diversas series.

Perfiles de referencia

Se establecieron perfiles cualitativos de referencia a partir del análisis de un número mínimo de 20 muestras de sujetos control de diferentes edades. Se estudió si el perfil dependía de la edad, pudiéndose establecer diferentes perfiles en función de esta variable

Estudio de muestras patológicas

Se consideró que el método tenía suficiente eficiencia diagnóstica siempre que el análisis de muestras patológicas generara perfiles claramente alterados en comparación con los perfiles de referencia.

Análisis estadístico de datos

Para los diferentes estudios estadísticos se han aplicado las siguientes pruebas:

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov en el estudio de la distribución de datos.
- Regresión de Passing-Bablok y diagrama de Bland-Altman en el estudio de comparación de métodos.
- Prueba de Pearson en el estudio de la correlación entre variables paramétricas.
- Prueba de T de Student en la comparación de medias de variables paramétricas.
- Prueba de T de Student pareada en la comparación de medias de variables paramétricas pareadas.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los detalles de cada una de estas pruebas figuran en cada uno de los artículos publicados. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS (versiones 17.0 y 19.0), con excepción de los cálculos en la comparación de métodos en los que se utilizó el programa MedCalc.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estandarización y evaluación de la determinación de sialotransferrina por CE con detección ultravioleta para el estudio de defectos congénitos de la glicosilación. Aplicación de la determinación de sialotransferrina por CE en el diagnóstico de casos con fenotipos leves
2. Estandarización de la determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser: evaluación del procedimiento y establecimiento de valores referencia. Aplicación de la determinación de GABA en LCR como biomarcador para el estudio de pacientes pediátricos con enfermedades neurológicas
3. Estandarización y evaluación de un nuevo procedimiento para la determinación de oligosacáridos en orina por CE y detección de fluorescencia inducida por láser en el cribado de oligosacaridosis y enfermedades relacionadas

1. Estandarización y evaluación de la determinación de sialotransferrina por CE con detección ultravioleta para el estudio de defectos congénitos de la glicosilación. Aplicación de la determinación de sialotransferrina por CE en el diagnóstico de casos con fenotipos leves

Mild Clinical and Biochemical Phenotype in Two Patients with PMM2-CDG (Congenital Disorder of Glycosylation Ia)

Mercedes Casado, M Mar O'Callaghan, Raquel Montero, Celia Pérez-Cerda, Belén Pérez, Paz Briones, Esther Quintana, Jordi Muchart, Asunción Aracil, Mercedes Pineda, Rafael Artuch

Cerebellum 2012; 11: 557–563

En el trabajo anterior a esta tesis realizado por nuestro grupo (Quintana, Montero y colaboradores 2009) se realizó la validación de este procedimiento para el diagnóstico de los CDG. Se establecieron intervalos de referencia de cada isoforma específicos de procedimiento y se mostraron las ventajas de los métodos semicuantitativos frente al IEF.

Una vez validado el procedimiento de CE se instauró en nuestro laboratorio como método de cribado para los CDG, permitiendo ampliar significativamente el número de pacientes estudiados y detectar casos con alteraciones bioquímicas muy sutiles.

El objetivo de este trabajo ha sido la descripción de dos pacientes con CDG-Ia que presentaban un fenotipo leve, tanto clínico como bioquímico, que podrían haber generado resultados falsos negativos con los métodos de cribado convencionales.

pdf cerebellum hoja 1

pdf cerebellum hoja 2

pdf cerebellum hoja 3

pdf cerebellum hoja 4

pdf cerebellum hoja 5

pdf cerebellum hoja 6

pdf cerebellum hoja 7

Síntesis de resultados

- La paciente 1 mostró a los 9 meses de edad un retraso psicomotor del desarrollo correspondiente a un niño de 4 meses, presentaba problemas en la manipulación de objetos y temblor intencional. En el examen físico se manifestó una hipotonía con reflejos normales y lipodistrofia en nalgas. La bioquímica general no mostró ninguna alteración significativa, incluyendo hemograma, factores de coagulación, proteínas séricas, hormonas tiroideas y el resto de magnitudes.
- La paciente 2 mostró a los 8 meses un retraso psicomotor detectado en el contexto de un sarampión, además de hipotonía, estrabismo bilateral convergente, temblor y lipodistrofia en nalgas. En una exploración posterior, a la edad de 16 meses, se evidenció hipoplasia cerebelar por resonancia magnética. Los parámetros de bioquímica general tampoco mostraron ninguna alteración significativa.
- La paciente 1 se identificó claramente mediante CE como un CDG tipo 1, mientras que por IEF la alteración del perfil fue muy sutil y apenas distinguible del control. En la paciente 2, se obtuvo un perfil tipo 1 claramente alterado en el primer análisis mediante IEF. Al cabo de unos meses se volvió a realizar el estudio para confirmar este hallazgo y se obtuvo un perfil normal también por IEF. Ante estos resultados se pensó que la alteración inicial podría ser secundaria al cuadro vírico agudo. Una tercera muestra de control volvió a mostrar un perfil claramente alterado, tanto por IEF como por CE, técnica entonces recién implantada. A partir de estos resultados se reprocesaron las dos primeras muestras por CE, confirmándose el patrón tipo 1 en la muestra inicial y detectándose una ligera alteración que había pasado desapercibida por IEF en la segunda muestra.
- En el estudio de la actividad enzimática de la fosfomanomutasa (PMM2) se obtuvo una actividad en el límite inferior del intervalo de referencia para la primera paciente y una actividad claramente disminuida en la segunda. También se realizó el estudio molecular del gen PMM2, donde se encontraron mutaciones previamente descritas en heterocigosis.

2. Estandarización de la determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser: evaluación del procedimiento y establecimiento de valores referencia. Aplicación de la determinación de GABA en LCR como biomarcador para el estudio de pacientes pediátricos con enfermedades neurológicas.

Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

Mercedes Casado, Marta Molero, Cristina Sierra, Angels García-Cazorla, Aida Ormazabal, Rafael Artuch

Electrophoresis 2013; 00: 1–7

Debido a la escasez de métodos descritos para determinar GABA en LCR mediante CE-LIF, la falta de validación técnica en la mayoría de ellos y a la disparidad de resultados obtenidos, ha sido necesario estandarizar un nuevo procedimiento para cuantificar GABA en LCR, tomando como punto de partida los métodos previamente descritos.

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un nuevo procedimiento de medida para GABA en LCR. Una vez desarrollado el procedimiento, se realizó la validación del mismo, así como el establecimiento de valores de referencia. Debido a las peculiaridades en la estabilidad de este neurotransmisor, se hizo un estudio de las diferentes variables premetrológicas que podían afectar al resultado. Por último, también se analizó el efecto de diversos fármacos antiepilépticos sobre la concentración de GABA en LCR.

pdf electrophoresis hoja 1

pdf electrophoresis hoja 2

pdf electrophoresis hoja 3

pdf electrophoresis hoja 4

pdf electrophoresis hoja 5

pdf electrophoresis hoja 6

pdf electrophoresis hoja 7

pdf electrophoresis hoja material suplementario 1

pdf electrophoresis hoja material suplementario 2

Síntesis de resultados

- En el proceso de optimización de la reacción de derivatización se determinaron aquellos valores de concentración de NBD-F, de pH de la mezcla de reacción, de temperatura y de tiempo de incubación que dieron lugar a una mayor formación de GABA derivatizado.
- En la optimización de la resolución electroforética se realizaron separaciones en modo CZE. Se optimizó la separación mediante la utilización de diferentes concentraciones de borato en el tampón de carrera, pH y voltajes. No se consiguió la separación total entre glutamina y GABA debido a la elevada concentración de este aminoácido en LCR (ratio Gln/GABA = 5000/1)
- Se utilizó un modo MECK de separación añadiendo SDS al tampón de carrera y se volvieron a optimizar concentración de borato, de SDS, pH del tampón. Por último se añadió β -ciclodextrina a diversas concentraciones para mejorar la resolución. La resolución fue máxima aplicando un voltaje de 20 kV y con un tampón de carrera de composición 200 mmol/L de borato de sodio, 10 mmol/L de SDS, 8.5 mmol/L de β -ciclodextrina y ajustado a pH 10.
- En el método descrito se consiguió una gran estabilidad de los tiempos de migración, obteniéndose una desviación interdiaria únicamente del 1,1%. La linealidad obtenida fue de 2,5 nmol/L a 1 μ mol/L ($r^2 = 0.999$), y la imprecisión intra e interdiaria calculada a partir de análisis de muestras con valores fisiológicos de GABA fue de 6 y 8%, respectivamente. El límite de detección conseguido a partir de análisis de estándares diluidos fue de 1 nmol/L. Se realizó una comparación con muestras analizadas por CE-LIF y cromatografía de intercambio iónico obteniéndose una buena correlación. La comparación entre ambos métodos se realizó a concentraciones altas, ya que la cromatografía de intercambio iónico no tiene la sensibilidad requerida para analizar GABA a las concentraciones fisiológicas de LCR.
- Se estudiaron las mejores condiciones de recogida, manipulación y almacenamiento de la muestra de LCR con el fin de evitar la hidrólisis del GABA conjugado. Se detectaron aumentos estadísticamente significativos entre las muestras mantenidas en frío respecto a aquellas mantenidas a temperatura ambiente, o que habían sufrido más de 3 ciclos de congelación/descongelación.

La muestra se debe recoger y mantener en frío durante todo el proceso, ya que a temperatura ambiente aumenta la hidrólisis y la concentración de GABA libre se ve falsamente aumentada.

- En el establecimiento de valores de referencia se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la concentración de GABA y la edad, por lo que se estratificaron los intervalos de referencia en dos grupos de edad. Estos intervalos de referencia fueron establecidos en un elevado número de pacientes en comparación con la mayoría de los valores de referencia previamente descritos por otros autores, y fueron notablemente más bajos que éstos. Presumiblemente, puede ser debido al aumento de hidrólisis que se da siempre que la muestra no se manipule adecuadamente.
- La concentración de GABA en LCR de pacientes neuropediátricos en tratamiento con antiepilépticos que actúan sobre el metabolismo del GABA, como valproato y gabapentina, fue estadísticamente superior que en aquellos pacientes en tratamiento con antiepilépticos que actúan en otras vías.

3. Estandarización y evaluación de un nuevo procedimiento para la determinación de oligosacáridos en orina por CE y detección de fluorescencia inducida por láser en el cribado de oligosacaridosis y enfermedades relacionadas.

A capillary electrophoresis procedure for the screening of oligosaccharidoses and related diseases

Mercedes Casado, Laura Altimira, Raquel Montero, Esperanza Castejon, Andres Nascimento, Belen Perez-Dueñas, Aida Ormazabal, Rafael Artuch

Anal Bioanal Chem, aceptado en Abril 2014

El cribado de estas enfermedades en nuestro centro se ha realizado tradicionalmente mediante cromatografía en capa fina. Este hecho ha provocado que el número de pacientes a analizar fuera muy limitado. Además este método era extremadamente laborioso y transcurría durante 3 días de trabajo. Por esta razón, se desarrolló y evaluó un nuevo procedimiento basado en CE-LIF. Tras la evaluación mostrada en el presente trabajo, el nuevo procedimiento se instauró en nuestro centro. Este hecho permitió aumentar significativamente el número de pacientes a estudiar.

El objetivo de este trabajo ha sido estandarizar un nuevo procedimiento para el cribado de las oligosacaridosis y otras enfermedades relacionadas, para lo que recopilamos orinas de sujetos control y de pacientes con diversas enfermedades, y se establecieron perfiles característicos de excreción de oligosacáridos.

Síntesis de resultados

- En el análisis de muestras de orina de sujetos control se establecieron dos perfiles de referencia en función de la edad: un perfil para menores de un año con excreción baja de diversos oligosacáridos presentes en la leche materna o en la fórmula artificial; y un perfil para edades superiores que tan solo presentaba excreción del tetrasacárido derivado de la degradación fisiológica del glucógeno.
- Se estudio la relación entre la excreción del glucotetrasacárido con la edad en sujetos control, obteniéndose una correlación negativa estadísticamente significativa ($r = -0.645$; $p = 0.0007$; $n = 24$).
- Todas las orinas procedentes de pacientes que contenían oligosacáridos con extremo reductor libre generaron un perfil claramente alterado cuando se compararon con controles de la misma edad.
- Las alteraciones obtenidas en los perfiles patológicos fueron mucho más evidentes que las obtenidas mediante cromatografía en capa fina.
- La respuesta y resolución de los oligosacáridos urinarios obtenidas por CE-LIF fueron adecuadas para el cribado de oligosacaridosis.
- Aquellas orinas procedentes de pacientes con aspartilglucosaminuria y enfermedad de Schindler, caracterizadas por la excreción de oligosacáridos no reductores, mostraron perfiles sin alteraciones. Esto es debido a que la reacción de derivatización previa al análisis únicamente tiene lugar sobre oligosacáridos reductores.

DISCUSIÓN CONJUNTA

DISCUSIÓN CONJUNTA

La electroforesis capilar tiene lugar en un capilar de pequeño diámetro, lo que le confiere una serie de ventajas respecto a otros métodos de separación. Entre sus ventajas podemos destacar una alta resolución, corto tiempo de separación, bajo coste de análisis, pequeño volumen de muestra requerido y bajo consumo de reactivos. Acoplado la electroforesis capilar a un sistema de detección altamente sensible como el detector de fluorescencia inducida por láser, se consigue además disminuir sustancialmente el límite de detección de los procedimientos. Estas características hacen esta metodología idónea para el análisis de metabolitos de difícil cuantificación, como por ejemplo el GABA por su baja concentración, cuya medida actualmente queda restringida únicamente a métodos MS/MS, no disponibles en la mayoría de laboratorios clínicos debido a su alto coste inicial. También permite el desarrollo de procedimientos que sustituyan los métodos convencionales, que para algunos metabolitos de difícil separación son largos y tediosos, hecho que dificulta ampliar el número de pacientes susceptibles de cribado. En esta tesis hemos desarrollado y validado tres procedimientos de medida basados en CE. En dos de los procedimientos el fin era la eliminación de procedimientos de cribado laboriosos, usados tradicionalmente en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades metabólicas. En ambos casos, el cambio de procedimiento ha permitido aumentar el número de pacientes a estudiar, pudiendo incluir pacientes con una clínica quizás no tan sugestiva de la enfermedad, con la idea de desvelar fenotipos no descritos. Otro punto importante es el aumento de la sensibilidad de estos procedimientos respecto a los convencionales, característica que permite detectar pacientes con ligeras alteraciones bioquímicas que pasarían desapercibidos por los métodos convencionales. En el transcurso de esta tesis esta situación se ha dado en dos ocasiones, en una paciente afecta de CDG-1a descrita en resultados y en un paciente con mucopolisidosis 3, que fue diagnosticado mediante CE, tras realizarse una cromatografía en capa fina que fue negativa.

Respecto al estudio de neurotransmisores en LCR, suele estar restringido al estudio de metabolitos de serotonina y dopamina. Generalmente no se estudia la vía GABAérgica,

debido a la escasez de métodos descritos para determinar GABA en LCR, la falta de validación técnica en la mayoría de ellos y a la disparidad de resultados reportados. Con el fin de realizar un estudio de LCR donde también se estudie esta vía, se realizó la estandarización de la determinación de GABA en LCR mediante cromatografía electrocinética micelar y detección de fluorescencia inducida por láser. Una vez desarrollado el procedimiento, se realizó la validación del mismo, así como el establecimiento de valores de referencia estratificados por edad. Debido a las peculiaridades en la estabilidad de este neurotransmisor, se estudiaron las diferentes variables premetrológicas que pueden afectar al resultado. Por último, también se estudió el efecto que tienen diversos fármacos antiepilépticos sobre la concentración de GABA en LCR.

1. Estandarización y evaluación de la determinación de sialotransferrina por CE con detección ultravioleta para el estudio de defectos congénitos de la glicosilación. Aplicación de la determinación de sialotransferrina por CE en el diagnóstico de casos con fenotipos leves

En este estudio se realizó en primera instancia una validación del procedimiento de CE para el cribado de los defectos congénitos de glicosilación frente al método clásico del IEF. Como parte de la validación se llevó a cabo un estudio de intercambiabilidad de los resultados obtenidos en el perfil de glicosilación de la transferrina por HPLC y CE, y se evaluó la utilidad diagnóstica de ambos procedimientos frente al IEF (Quintana, Montero y colaboradores 2009). Para ello se procesaron muestras pertenecientes a sujetos control y muestras con diferentes perfiles de glicosilación alterados. Existían estudios previos comparativos entre estos dos métodos, pero no para el cribado de estas enfermedades, sino para la detección de perfiles de glicosilación alterados debido a un consumo crónico de alcohol (Helander 2005), donde únicamente se estudió el porcentaje de la forma disialilada de la transferrina y la población utilizada fue diferente. En nuestro caso, hemos observado que existía una fuerte correlación lineal entre los resultados de ambos métodos y que únicamente no eran transferibles los resultados de disialotransferrina, aun presentando una clara

correlación entre ellos. Esta discordancia entre esta isoforma y las demás puede ser debida a los valores de las muestras utilizadas en el estudio de intercambiabilidad. En un estudio de este tipo, se deben incluir muestras con valores de la magnitud a estudiar que comprendan todo el intervalo analítico con una distribución homogénea. En nuestro caso, debido a la baja incidencia de este grupo de patologías, no pudimos cumplir esta premisa. Tan solo pudimos obtener 18 muestras patológicas, y dentro de éstas, únicamente 12 tenían valores de disialotransferrina superiores al 2%. Esta falta de homogeneidad en la distribución de valores se mantiene en el resto de las isoformas, pero es en la disialotransferrina donde es más marcada. Por lo tanto, sería necesario ampliar el estudio a medida que se fueran obteniendo más pacientes con el fin de tener una distribución homogénea de datos con la que obtendríamos una estadística más robusta. Aún con estas limitaciones, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente, donde también encontraron unos valores de disialotransferrina ligeramente superiores por HPLC respecto a los de CE (Helander 2005).

Según los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la importancia de la cuantificación de esta isoforma en concreto para la detección de los defectos de glicosilación, es recomendable que cada laboratorio calcule unos intervalos de referencia específicos de método para poder interpretar correctamente los resultados. Los valores de referencia obtenidos fueron similares a los descritos previamente (Helander 2004, Carchon 2004). En estos estudios previos también se había descrito que estos valores eran independientes de la edad y del sexo.

El IEF continúa siendo la técnica de uso común en la mayoría de laboratorios que se dedican a enfermedades metabólicas. Es altamente específica, ya que el uso de anticuerpo frente a transferrina prácticamente impide la aparición de falsos positivos. Como contra partida, es una técnica manual, que consume mucho tiempo y que solo permite realizar series analíticas con número muy limitado de muestras. Este último punto hace la técnica inviable en aquellos centros con un número importante de pacientes a estudiar. En los últimos años se está ampliando el cribado de este tipo de enfermedades, debido a la aparición de nuevas presentaciones clínicas, por lo que el número de análisis ha aumentado considerablemente. Además de todo esto, el IEF tiene como desventaja la interpretación subjetiva de sus resultados. Con el fin de

aumentar su objetividad, se propuso la lectura densiométrica de las bandas, pero se vio que no era reproducible debido a que las bandas no se tiñen homogéneamente y de forma débil o a que el ruido de fondo es demasiado elevado. En la mayoría de casos, la inspección visual es suficiente para determinar si un perfil está alterado o es normal, pero en aquellos perfiles donde la alteración es muy sutil es donde se pueden dar resultados falsos negativos. Un método semicuantitativo puede paliar estos problemas: por un lado existe la posibilidad de aumentar el número de muestras a analizar sin consumir más tiempo del personal, permitiendo así un cribado más amplio. Por otro lado, al poder cuantificar de una manera reproducible el porcentaje de cada isoforma, se facilita considerablemente la interpretación de los resultados. Dentro de la serie de pacientes que fue utilizada en este estudio, todos han sido fácilmente identificados como patológicos, incluso aquellos tipo 1 discretamente alterados que por IEF se consideraron dudosos, ya que al cuantificar se obtuvieron valores de disialotransferrina por encima del límite superior de referencia. Si hacemos una comparación de costes entre el IEF y el nuevo procedimiento, es obvio que el equipamiento para la CE tiene un precio más elevado que para el IEF, pero el anticuerpo anti transferrina humana utilizado en el IEF también tiene un coste superior que los reactivos de los otros dos métodos. Por otro lado, si se tiene en cuenta el tiempo de personal consumido, en el IEF el tiempo utilizado por muestra es varias veces superior que en los métodos semicuantitativos. Así que, una vez asumida la inversión inicial en el equipamiento, el método de CE resulta más económico que el IEF.

Respecto a la identificación de nuevos casos, es interesante destacar que clínicamente los pacientes estudiados presentaron un cuadro leve-moderado con un rasgo clínico prácticamente no descrito en pacientes CDG, que es el temblor (Grünewald 2009). Este hecho hizo que la sospecha inicial no fuera en esta dirección. Respecto al análisis de sialotransferrina, ambas pacientes mostraron un perfil levemente alterado, que incluso llegó a ser valorado como normal en la paciente 2 cuando utilizamos el IEF. Fue interesante también el estudio evolutivo de esta paciente, que mostró un perfil alterado inicialmente, que se normalizó por IEF en una segunda muestra y que volvió a estar alterado en una tercera. Este hecho podría estar relacionado con la persistencia

de actividad enzimática residual, que permitiría una cierta corrección temporal del perfil de sialotransferrina después de algún episodio agudo. En cualquier caso, esta normalización del perfil de glicosilación no se acompañó de mejoría clínica. Por otro lado, ya había sido descrito que en presencia de infecciones se puede alterar el perfil de glicosilación debido a un incremento de la actividad neuraminidasa (Quintana 2007). Es importante tener en cuenta este hecho con el fin de evitar falsos positivos o, como en el caso de la paciente 2, falsos negativos, al asumir que la alteración era posiblemente de origen secundario.

Las mutaciones observadas en ambos casos en el gen *PMM2* se pueden considerar leves (Westphal 2001). Por tanto, es para este tipo de pacientes, que mantienen una cierta actividad residual, para los que es importante disponer de un método de análisis de sialotransferrina con mayor sensibilidad que el IEF, ya que de lo contrario podrían pasar desapercibidos en el cribado convencional de los síndromes CDG.

2. Estandarización de la determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser: evaluación del procedimiento y establecimiento de valores referencia. Aplicación de la determinación de GABA en LCR como biomarcador para el estudio de pacientes pediátricos con enfermedades neurológicas

En este trabajo se desarrollo un nuevo procedimiento de medida para la cuantificación de GABA en LCR. Para poder llevar a cabo una cuantificación con una imprecisión aceptable, es necesaria una metodología altamente sensible, ya que en LCR este neurotransmisor está presente a muy bajas concentraciones. Un método de CE acoplado a un detector de alta sensibilidad como el LIF, con límites de detección reportados del orden de nano a picomolar, sería idóneo para este análisis. Debido a que el GABA no presenta fluorescencia nativa es necesario llevar a cabo una derivatización previa a la detección por LIF. Existen una gran variedad de derivatizantes que reaccionan con las aminas produciendo compuestos fluorogénicos. En la elección del derivatizante lo primero a tener en cuenta es el tipo de láser del que se dispone. En nuestro caso se trata de un láser de Argón, con una longitud de onda de emisión de

488 nm. Por tanto, se debe utilizar un derivatizante que produzca compuestos que presenten un máximo de absorbancia cercano a esta longitud de onda. Uno de los más utilizados con esta característica es el FITC (fluoresceína-5-isotiocianato), debido a que produce unos compuestos derivatizados que son estables. Esta fue nuestra primera opción (datos no mostrados, previos a la publicación). Los inconvenientes que encontramos fue el largo tiempo de incubación requerido en el proceso de derivatización y la generación de varios productos de hidrólisis que aparecían en el electroferograma del blanco a diferentes tiempos de retención, siendo muy probable que alguno interfiriera con la señal del GABA. Nuestra segunda opción fue el NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol), derivatizante que reacciona con aminas y que requiere un corto tiempo de incubación, produciendo pocos compuestos de hidrólisis y con una longitud de onda de absorción de sus derivatizados de 488 nm.

Una vez elegido el derivatizante se intentaron adaptar trabajos publicados sobre análisis de GABA mediante CE-LIF y NBD-F. En un primer momento, si se revisa la bibliografía sobre el análisis mediante CE-LIF de este neurotransmisor, se puede observar que en la gran mayoría de trabajos publicados, la cuantificación se lleva cabo en líquido proveniente de microdiálisis, principalmente en ratas (Chen 2001, Sauvinet 2003, Ehlen 2005, Kaul 2011). Para la obtención de esta muestra se implanta una cánula directamente en la región cerebral de interés. En esta matriz, la concentración de GABA acostumbra a estar muy elevada, del orden de micromolar, especialmente si se estudian áreas GABAérgicas. En nuestra matriz de estudio, la concentración de esta molécula es muy inferior, del orden de nanomolar. Fue principalmente por este motivo por lo que no fue posible la adaptación sin modificaciones de un método ya descrito. Se partió del método descrito por Zhang y Zhang en 2001, en el que determinaban GABA en microdializados de hipotálamo de ratas. Al intentar adaptar este procedimiento para el análisis de LCR nos encontramos con una elevada concentración de glutamina en LCR, con un valor medio de 500 $\mu\text{mol/L}$, que enmascaraba totalmente la señal del GABA, con una concentración unas 5000 veces menor, mientras que en microdializado de hipotálamo las concentraciones de ambos compuestos eran similares. Se aumentó la concentración del tampón de separación con el fin de disminuir el EOF y así mejorar la resolución entre estas dos moléculas. También se testaron diferentes valores de pH del tampón, y aunque se logró mejorar

la resolución entre los dos compuestos al analizar soluciones estándar con GABA y glutamina, aún no se observaba una resolución óptima al analizar LCR. Por esta razón modificamos el modo de separación, de CE en zona libre (CZE) a cromatografía electrocinética micelar (MECK). Mediante este tipo de separación se consigue modificar sustancialmente los tiempos de retención, ya que los diferentes compuestos (neutros y cargados) interaccionan más o menos con las micelas en función de su naturaleza química. Se le añadió SDS al tampón de separación a diferentes concentraciones y se estudió su efecto sobre la resolución de muestras de LCR. También se añadió β -ciclodextrina al tampón a diferentes concentraciones. El uso de estos dos compuestos a unas concentraciones determinadas en un tampón de separación de concentración alta de borato y pH 10, permitió la separación del pico de GABA del resto de aminas del electroferograma, aplicando un voltaje de separación de 30 kV. Una vez optimizada la resolución se reevaluaron y optimizaron las variables que intervienen en la derivatización: temperatura, tiempo y pH de reacción y concentración del derivatizante; con el fin de conseguir la mayor respuesta posible. Ya establecidas las mejores condiciones de derivatización y separación se realizó la validación del procedimiento, obteniéndose unos resultados satisfactorios tanto en imprecisión como en límite de detección. Estas características metrológicas hacen válido el procedimiento para el diagnóstico de posibles deficiencias de GABA.

Durante la elaboración de los valores de referencia nos encontramos con una gran dispersión de datos. Los datos obtenidos de LCR de punción lumbar de urgencias, que habían permanecido cierto tiempo a temperatura ambiente durante su procesamiento en el laboratorio de urgencias, eran visiblemente superiores a aquellos obtenidos tras punción lumbar según el protocolo de recogida de LCR para el estudio de neurotransmisores, que mantiene las muestras siempre en frío. Este hecho, junto con la gran disparidad existente entre los valores de referencia publicados (Bergquist 1994, Deng 2008), nos hizo pensar que las condiciones premetrológicas podían ser cruciales para una correcta cuantificación. Para confirmar esta hipótesis realizamos un estudio de estabilidad en el que estudiamos como variaba la concentración de GABA en un mismo LCR tras diferentes condiciones de recogida, ciclos de congelación-descongelación y tiempo a temperatura ambiente. Se vio que el factor que hacía aumentar la concentración de GABA es el tiempo a temperatura ambiente, por lo que

es recomendable recoger el LCR tras la punción en hielo, llevarlo al laboratorio en frío y congelarlo a -80°C hasta el momento del análisis. En la manipulación durante el análisis sería óptimo descongelarlo e introducirlo inmediatamente en un baño de hielo mientras dure la manipulación. Hay muy poca bibliografía sobre este tema, los trabajos sobre análisis de GABA en diferentes matrices no mencionan esta cuestión, por lo que se sobreentiende que no tienen en cuenta este factor. Únicamente encontramos trabajos muy antiguos como el realizado por Grossman en 1980 en el que hablan de la hidrólisis que tiene lugar a temperatura ambiente del GABA conjugado provocando una falsa elevación de GABA libre, a partir de péptidos como la homocarnosina, formado por histidina y GABA.

Teniendo en cuenta estos factores volvimos a realizar los valores de referencia, utilizando únicamente LCR que hubieran estado recogidos en las condiciones óptimas y manteniéndolos en frío durante todo el procesamiento de la muestra. Los valores de referencia obtenidos fueron sustancialmente inferiores a los que se encuentran generalmente en la bibliografía. Hay muy pocos estudios donde se establezcan valores de referencia. En el trabajo de Eckstein del 2008 se hace una comparativa de los valores obtenidos en diferentes trabajos mediante diversas técnicas. En esta comparativa todos los valores de referencia son entre 3 y 10 veces superiores a los nuestros, excepto los realizados por Goldsmith en 1987, que sí habla específicamente de evitar la hidrólisis de los conjugados de GABA. Estos son similares a los realizados por Kok en 1993 que también advierte de la posibilidad de obtener resultados falsamente elevados si no se trabaja en las condiciones premetrológicas adecuadas. Los valores de referencia obtenidos fueron estratificados por edad, ya que se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa entre la edad y los valores de GABA. En los dos últimos trabajos nombrados, realizados en población pediátrica, también estratifican los valores de referencia por edades, aunque los intervalos de edad son diferentes a los nuestros. En nuestro caso disponemos de un número mucho más elevado de muestras de LCR de referencia, por lo que es de esperar que sean altamente fiables.

Diversos antiepilépticos tienen su mecanismo de acción sobre el metabolismo del GABA. Debido al alto número de pacientes bajo algún tratamiento anticonvulsivo a los que se les realiza punción lumbar, decidimos estudiar si el efecto sobre el metabolismo

del GABA se vería reflejado en su concentración en LCR. Los resultados obtenidos mostraron claramente un aumento estadísticamente significativo de la concentración de GABA en aquellos pacientes en tratamiento con valproato o vigabatrina, que modulan el metabolismo del GABA, frente a los pacientes en tratamiento con anticonvulsivos con mecanismos que no afectan al GABA. Estos datos sugieren que en aquellos casos de difícil control en los que no hay una buena respuesta al tratamiento, se podría monitorizar el efecto de estos antiepilépticos monitorizando la concentración de GABA en LCR.

En el transcurso de este trabajo fueron diagnosticados en nuestro centro dos hermanos afectos de deficiencia de SSADH, segundo enzima implicado en la metabolización del GABA. Estos pacientes excretan grandes cantidades del ácido 4-hidroxibutírico, debido a que el sustrato del enzima deficiente se transforma no enzimáticamente en este compuesto cuando se acumula. En estos pacientes esta descrito un aumento moderado de GABA en LCR (Pearl 2003), no muy importante debido a la vía de escape no enzimática anteriormente comentada. A uno de ellos se le realizó una punción lumbar con la finalidad de realizar un estudio de neurotransmisores, en la que se pudo determinar GABA obteniéndose un valor aumentado tal como se describe en la bibliografía. Hasta el momento no se han detectado más casos de alteraciones en el metabolismo del GABA, pero es de esperar que en los próximos años, debido al alto número de estudios de LCR que se llevan a cabo en nuestro centro, se detecten alteraciones primarias o secundarias de este neurotransmisor.

3. Estandarización y evaluación de un nuevo procedimiento para la determinación de oligosacáridos en orina por CE y detección de fluorescencia inducida por láser en el cribado de oligosacaridosis y enfermedades relacionadas

En este trabajo se desarrolló un procedimiento basado en CE-LIF para determinar la excreción de oligosacáridos en orina, con la finalidad de poder sustituir el método clásico de cribado de la oligosacaridosis, la cromatografía en capa fina, por un método más rápido, menos laborioso y con una interpretación de resultados más objetiva. La electroforesis capilar se viene utilizando desde hace algunos años en estudios

glicómicos. Existe una gran variedad de oligosacáridos presentes en las glicoproteínas, con estructuras muy similares y en el caso de isómeros, con el mismo peso molecular. Es por esta razón, que la electroforesis capilar, con su alto poder resolutivo, capaz de separar moléculas muy parecidas estructuralmente, es idónea para la separación y el análisis de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas. Para poder detectar los oligosacáridos mediante LIF es necesaria una derivatización previa con un agente fluorogénico. El primer derivatizante ampliamente utilizado en los estudios glicómicos es el ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS). Mediante este reactivo se analizan los oligosacáridos derivados de diversas glicoproteínas, como inmunoglobulinas, ovoalbúmina, fetuína, etc. El ANTS, mediante una aminación reductiva con el extremo no reductor del oligosacárido, produce derivatizados que emiten fluorescencia bajo una longitud de onda de excitación de 370 nm. Esta longitud de onda de excitación es cercana a la longitud de onda del láser de He-Cd ($\lambda=325$ nm), láser de un elevado coste. Por esta razón, actualmente el reactivo más utilizado para derivatizar oligosacáridos es el 1-aminopireno-3,6,8-trisulfonato (APTS), ya que produce unos derivatizados con una longitud de onda de excitación de 455 nm, cercana a los 488 nm de longitud de onda del láser de Argón, láser mucho más accesible y acoplado a la mayoría de aparatos de CE-LIF. Chen en 1995 fue el primero en utilizar este derivatizante en el estudio de glicanos derivados de glicoproteínas. A partir de aquí existen un elevado número de trabajos que utilizan este derivatizante para estudios glicómicos. Nuestro trabajo consistió en adaptar estos procedimientos, establecidos para el estudio de glicoproteínas, para la detección de oligosacáridos en orina, ya que hasta el momento no hay descrito ningún procedimiento basado en CE-LIF para el estudio de oligosacáridos en esta matriz. Los oligosacáridos en condiciones normales están a una concentración muy baja en la orina, por lo que fue necesario concentrar la muestra con el fin de obtener una mayor repuesta. El volumen de orina del que partimos para realizar el análisis fue variable en función de la concentración de creatinina, para obtener unos resultados que fueran comparables entre muestras e independientes de lo concentrada que estuviera la orina. También se optimizaron las cantidades de derivatizante y de ácido acético utilizadas en la reacción, así como el tiempo y la temperatura de incubación. Al final se eligieron unas condiciones de reacción suaves, con la finalidad de evitar la pérdida de residuos de ácido siálico, ya

que está descrito que el enlace entre este monómero y el resto de la cadena glucídica es termolábil y se degrada fácilmente a temperaturas superiores a los 60°C (Chen 1995).

Una vez optimizadas todas las variables de derivatización se procedió al estudio de oligosacáridos mediante CE-LIF en muestras de sujetos control y de pacientes afectados de oligosacaridosis u otras enfermedades caracterizadas también por la excreción aumentada de oligosacáridos en orina. Junto con las muestras se analizó también un marcador de tamaño formado por glucosacáridos lineales con diferentes grados de polimerización, desde glucosa hasta Glc₁₅, con el que se obtenían los tiempos de migración aproximados en función del grado de polimerización del oligosacárido. Mediante el estudio de sujetos control se establecieron dos tipos de perfiles de referencia, basados principalmente en la dieta de los sujetos. En los sujetos de edad inferior a un año, en los que su dieta estaba basada totalmente o en gran proporción en leche materna o de fórmula artificial, se obtuvo un perfil con la presencia de abundantes oligosacáridos en baja proporción, con movilidades según el marcador de tamaño entre tri- y pentasacáridos. La leche materna presenta un elevado número de oligosacáridos complejos, con una concentración total de 10 a 20 g/L (Rudloff en 2012). Estos oligosacáridos presentan una alta proporción de fucosa y se postula que están relacionados con un buen establecimiento de la flora intestinal en los lactantes. Actualmente la mayoría de leches de fórmula intentan imitar la composición de la leche materna añadiendo diversos tipos de oligosacáridos. La presencia de estos oligosacáridos de la dieta ha sido demostrada tanto en orina como en heces de los lactantes (De Leoz 2013). En sujetos control de mayor edad, con una dieta libre de leche materna o de fórmula, estos oligosacáridos no estaban presentes, y únicamente presentaban un oligosacárido con un tiempo de retención en la posición de tetrasacárido. Este oligosacárido presenta una excreción que decrece con la edad, obteniéndose una correlación negativa estadísticamente significativa. La excreción fisiológica de este tetrasacárido ya ha sido reportada en otros estudios, y corresponde al oligosacárido 6- α -D-glucopiranosil-maltotriosa (Glc4), producto de la degradación intravascular del glucógeno (Sluiter 2012). Una vez establecidos estos perfiles en la población control, se pone de manifiesto que en la interpretación de resultados habrá

que tener en cuenta estas variaciones en la excreción de oligosacáridos en función de la edad del paciente.

Todas las muestras de orina procedentes de pacientes que contenían oligosacáridos con extremo reductor libre generaron un perfil claramente alterado cuando se compararon con controles de la misma edad. En el caso de la fucosidosis, causada por una actividad deficiente del enzima α -L-fucosidasa, se acumulan en tejidos y orina glucoconjugados fucosilados por una incompleta degradación de N- y O-glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos. El producto que se acumula en mayor cantidad es el glicopéptido Fuc-GlcNAc-Asn, correspondiente al punto de unión entre la cadena glucídica y la proteína (Michalski 1999). Este glicopéptido, al carecer de extremo reductor, no será susceptible de reaccionar con el APTS y por lo tanto, no será detectado mediante este procedimiento. Estos pacientes acumulan en menor medida otros oligosacáridos reductores que sí podrán reaccionar con el APTS. En la fig 2a del material suplementario en la sección de resultados se muestra el perfil claramente alterado obtenido para un paciente con fucosidosis comparado con un perfil de un sujeto control de la misma edad, en el cual se observa un pico anormal con una movilidad electroforética correspondiente a hexa-heptasacárido en el marcador de tamaño. Este pico correspondería al hexasacárido Fuc-Gal-GlcNAc-Man₂-GlcNAc, cuya excreción ha sido descrita en afectos de fucosidosis mediante métodos de MS (Ramsay 2005, Xia 2013).

En los pacientes afectos de α -manosidosis, causada por defectos en el enzima α -manosidasa, se acumulan oligosacáridos ramificados con un alto contenido en manosa (Man_n-GlcNAc, $n \geq 2$) (Michalski 1999). El perfil obtenido mediante nuestro procedimiento, mostrado en la fig 2b del material suplementario en la sección de resultados, fue similar a los perfiles descritos previamente mediante MS (Klein 1998, Xia 2013). Es un perfil claramente alterado con una gran excreción del trisacárido Man₂-GlcNAc y excreción de otros oligosacáridos de estructuras Man₃₋₅-GlcNAc, con una señal decreciente a medida que aumenta el grado de polimerización.

Las gangliosidosis son debidas a defectos en enzimas que intervienen en la degradación de los gangliósidos, y en algunos tipos también en la degradación de otras moléculas glicosiladas. La gangliosidosis GM1 está causada por una actividad deficiente del enzima β -galactosidasa, enzima que libera residuos de galactosa en la degradación

del gangliósido GM1 y también en la degradación de otros glicolípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos. Debido a la deficiencia de este enzima, estos pacientes presentan una excreción elevada de oligosacáridos galactosilados (Sandhoff 2013). En la fig 1a en la sección de resultados se muestra un perfil correspondiente a un paciente GM1, con una excreción muy elevada de varios oligosacáridos anómalos, con grados de polimerización de 3 a 11. El perfil es similar a los descritos por procedimientos de MS, donde se detectan varios oligosacáridos anómalos con una excreción predominante del octasacárido Gal₂-GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc (Xia 2013).

En la enfermedad de Sandhoff existe una deficiencia de la subunidad β de las hexosaminidasas A y B. La hexosaminidasa A sólo está involucrada en la degradación del gangliósido GM2, pero la B participa tanto en la degradación del GM2 como en la liberación de GlcNAc durante la degradación de las glicoproteínas. Es el defecto de este enzima el que provocará un aumento de la excreción de oligosacáridos (Sandhoff 2013). En el perfil urinario obtenido por CE-LIF (fig 1b en la sección de resultados) se detectan claramente 8 oligosacáridos anómalos con grados de polimerización de tetra- a hexasacáridos. En los procedimientos basados en MS tan sólo se describen tres oligosacáridos (un tetra-, un penta- y un hexasacárido) (Ramsay 2005, Bruggink, 2012, Xia 2013). Esta discrepancia entre los perfiles se deba probablemente a la capacidad de la CE de separar isómeros con el mismo peso molecular que son indistinguibles por procedimientos de MS.

Las glucogenosis son enfermedades causadas por defectos en la degradación del glucógeno. En varios tipos de glucogenosis se ha descrito el aumento de la excreción del oligosacárido 6-α-D-glucopiranosil-maltotriosa (Glc4) (Sluiter 2012). En la glucogenosis tipo 2 o enfermedad de Pompe se correlaciona la excreción de este tetrasacárido con la progresión de la enfermedad y con la respuesta terapéutica a la terapia de sustitución enzimática (Young 2009). En la figura 3 del material suplementario se muestran los perfiles obtenidos en el análisis de muestras de enfermedad de Pompe (fig 3a) y de glucogenosis tipo 3 (fig 3b). En ambos perfiles se observa una clara elevación del Glc4, muy superior a la excreción fisiológica de los controles. También se detectan otras cantidades menores de otros oligosacáridos con mayor grado de polimerización, correspondientes a diversos polímeros de glucosa derivados de la acumulación de glucógeno.

Debido a la bajísima incidencia de este tipo de enfermedades no ha sido posible analizar muestras del resto de defectos que cursan con oligosacariduria, pero es lógico pensar que todas aquellas enfermedades que excreten oligosacáridos reductores serán fácilmente detectadas mediante este procedimiento. Aquellas que únicamente excreten glicocompuestos no reductores, como es el caso de la aspartilglucosaminuria, no podrán ser detectadas. En este caso, debido a que el compuesto que se acumula tiene un residuo aminoacídico, es posible detectarlo mediante un análisis convencional de aminoácidos en orina mediante cromatografía de intercambio iónico. De igual modo, en la enfermedad de Schindler, donde el acúmulo principal son glicopéptidos no reductores que contienen la estructura GalNAc-O-Ser/Thr (Michalski 1999), también se obtiene un perfil indistinguible de los controles.

Para el resto de enfermedades que presentan excreción de oligosacáridos reductores, se obtuvieron perfiles claramente alterados, con presencia de picos anormales no presentes en las orinas control. La interpretación de los perfiles fue mucho más clara y objetiva que en el caso de análisis mediante cromatografía en capa fina, además de tratarse de un procedimiento mucho más rápido y que permite ampliar el cribado a un número mayor de pacientes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La semicuantificación de las isoformas de la sialotransferrina mediante CE ofrece varias ventajas frente al método convencional de análisis de IEF, como son una mayor reproducibilidad y un análisis objetivo de los resultados mediante el uso de valores de referencia.
- 2) El análisis de sialotransferrina mediante CE ha permitido detectar nuevos pacientes con fenotipos leves que tuvieron perfiles por IEF normales o dudosos. De este hecho se desprende que la aplicación de esta técnica disminuirá el número de falsos negativos en el cribado de las CDG, identificando pacientes con nuevos fenotipos que hasta ahora podrían haber pasado desapercibidos.
- 3) La determinación de GABA en LCR por MECK y detección de fluorescencia inducida por láser es una buena herramienta para la cuantificación de este neurotransmisor.
- 4) Existe una correlación significativa entre la concentración de GABA en LCR y la edad, lo cual hace necesario el estudio de un elevado número de sujetos control en el establecimiento de los valores de referencia.
- 5) Para un análisis correcto de GABA en LCR es recomendable recoger la muestra en hielo inmediatamente tras la punción lumbar, llevarlo al laboratorio en frío y congelarlo a -80°C hasta el momento del análisis. Durante la manipulación del análisis sería óptimo mantener la muestra en frío. Estas consideraciones son necesarias debido a la alta tasa de hidrólisis que se da a temperatura ambiente produciendo valores falsamente elevados.
- 6) Aquellos fármacos antiepilépticos que intervienen en el metabolismo del GABA producen un aumento de la concentración de este neurotransmisor en LCR. En aquellos pacientes de difícil control en los que no hay una buena respuesta al tratamiento se podría monitorizar el efecto de estos antiepilépticos determinando la concentración de GABA en LCR.

- 7) El estudio de los oligosacáridos en orina mediante CE-LIF ofrece varias ventajas frente al método clásico de cribado de las oligosacaridosis, la cromatografía en capa fina, entre las que cabe destacar un menor tiempo de análisis y una mejor interpretación de los resultados.
- 8) El análisis de oligosacáridos mediante CE presenta una mayor sensibilidad que permitirá detectar nuevos pacientes con fenotipos leves que podrían presentar resultados falsos negativos con la cromatografía en capa fina.
- 9) La CE es una tecnología de una gran versatilidad que complementa otras técnicas de separación más establecidas en el estudio de errores congénitos del metabolismo. Ha permitido sustituir técnicas convencionales en el estudio de estos trastornos, caracterizadas por ser muy laboriosas, por técnicas más sensibles y semi-automatizadas, que permiten el análisis de un número mayor de pacientes. Es previsible que con estos nuevos procedimientos, se consiga ampliar y mejorar el diagnóstico de las enfermedades metabólicas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- Akaboshi S, Hogema BM, Novelletto A, Malaspina P, Salomons GS, Maropoulos GD, Jakobs C, Grompe M, Gibson KM. Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. *Hum Mutat* 2003;22:442-450
- Andria G, Parenti GC. Oligosaccharidoses and related disorders. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2nd edition. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag 2003:399-410
- Aoyama C, Santa T, Tsunoda M, Fukushima T, Kitada C, Imai K. A fully automated amino acid analyzer using NBD-F as a fluorescent derivatization reagent. *Biomed Chromatogr* 2004;18:630-636.

B

- Baena B, Cifuentes A, Barbas C. Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005;26:2622-2636
- Bergquist J, Gilman S, Ewing A and Ekman R. Analysis of Human Cerebrospinal Fluid by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal Chem* 1994;66:3512-3518
- Britz-McKibbin P. Expanded newborn screening of inborn errors of metabolism by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry (CE-ESI-MS). *Methods Mol Biol* 2013;919:43-56
- Bruggink C, Poorthuis BJ, Deelder AM, Wuhrer M. Analysis of urinary oligosaccharides in lysosomal storage disorders by capillary high-performance anion-exchange chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:1671-1683

C

- Carchon HA, Chevigné R, Falmagne JB, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clin Chem* 2004;50:101-111
- Chalcraft KR, Britz-McKibbin P. Newborn screening of inborn errors of metabolism by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: a second-tier method with improved specificity and sensitivity. *Anal Chem* 2009;81:307-314
- Chang PL, Chiu TC, Chang HT. Stacking, derivatization, and separation by capillary electrophoresis of amino acids from cerebrospinal fluids. *Electrophoresis* 2006;27:1922-1931
- Chen FT, Evangelista RA. Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Anal Biochem* 1995;230:273-280
- Chen FT, Evangelista RA. Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19:2639-2644
- Chen Z, Wu J, Baker GB, Parent M, Dovichi NJ. Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J Chromatogr A* 2001;914:293-298
- Colomé C, Quintana M, Puig RM, Moreno J, Vilaseca MA, Artuch R. Determinación de glucosaminoglicanos en orina por un procedimiento espectrométrico. Valores de referencia para una población pediátrica. *Quím Clín* 1999;18:278-281

D

- De Leoz ML, Wu S, Strum JS, Niñonuevo MR, Gaerlan SC, Mirmiran M, German JB, Mills DA, Lebrilla CB, Underwood MA. A quantitative and comprehensive method to analyze human milk oligosaccharide structures in the urine and feces of infants. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:4089-4105
- Deng YH, Wang H, Zhang HS. Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Sep Sci* 2008;31:3088-3097

- Dhossche D, Applegate H, Abraham A, Maertens P, Bland L, Bencsath A, Martinez J. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Med Sci Monit* 2002;8:PR1-PR6

E

- Eckstein JA, Ammerman GM, Reveles JM, Ackermann BL. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *J Neurosci Methods* 2008;171:190-196
- Ehlen JC, Albers HE, Breyer ED. MEKC-LIF of gamma-amino butyric acid in microdialysate: systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis. *J Neurosci Methods* 2005;147:36-47
- Eklund EA, Freeze HH. The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. *NeuroRx* 2006;3:254-63

F

- Freeze H. Genetic Disorders of Glycan Degradation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009
- Freeze HH, Aebi M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, 2005;15(5):490-8

G

- Galindo CA, Sitges M. Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings: comparison with omega-agatoxin IVA. *Neurochem Res* 2004;29:659-669
- Goldsmith RF, Earl JW, Cunningham AM. Determination of γ -aminobutyric acid and other amino acids in cerebrospinal fluid of pediatric patients by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1987;33:1736-1740
- Grossman MH, Hare TA, Manyam NV, Glaeser BS, Wood JH. Stability of GABA levels in CSF under various conditions of storage. *Brain Res* 1980;182:99-106

- Grünewald S. The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:827-834
- Guttman A, Chen FT, Evangelista RA. Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996;17:412-417.
- Guttman A. Multistructure sequencing of N-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis and enzyme matrix digestion. *Electrophoresis* 1997;18:1136-1141

H

- Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-1890
- Helander A, Bergström J, Freeze H. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin. *Clin Chem* 2004;50:954-958
- Helander A, Wienders JPM, te Stroet R, Bergström JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2005;51:1528-1531
- Hernández LF, Segovia G, Mora F. Effects of activation of NMDA and AMPA glutamate receptors on the extracellular concentrations of dopamine, acetylcholine, and GABA in striatum of the awake rat: a microdialysis study. *Neurochem Res* 2003;28:1819-1827
- Hjertén S. Free zone electrophoresis. *Chromatogr Rev* 1967;9:122–219
- Humbel R, Collart M. Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases. I. Rapid detection by thin-layer chromatography. *Clin Chim Acta* 1975;60:143-145

J

- Jaeken J, Matthijs G, Carchon H, Van Schaftingen E. Defects of N-glycan synthesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:1601-22

- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E. Familiar psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr Res* 1980;14:179
- Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *J Inherit Metab Dis* 2011;34:853-858
- Jorgenson J, Luckacs K. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981;53:1298-1302

K

- Kaul S, Faiman MD, Lunte CE. Determination of GABA, glutamate and carbamathione in brain microdialysis samples by capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Electrophoresis* 2011;32:284-291
- Klein A, Lebreton A, Lemoine J, Périni JM, Roussel P, Michalski JC. Identification of urinary oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 1998;44:2422-2428
- Klein AD, Futerman AH. Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013;11 Suppl 1:59-63
- Klinker CC, Bowser MT. 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2007;79:8747-8754
- Kodama T, Lai YY, Siegel JM. Changes in inhibitory amino acid release linked to pontine-induced atonia: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci*. 2003;23:1548-1554
- Kok RM, Howells DW, van den Heuvel CC, Guérand WS, Thompson GN, Jakobs C. Stable isotope dilution analysis of GABA in CSF using simple solvent extraction and electron-capture negative-ion mass fragmentography. *J Inherit Metab Dis* 1993;16:508-512

L

- Leroy JG. Oligosaccharidoses, disorders allied to the oligosaccharides. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR, eds. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 5th Ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone 2007:2413-2448

- Li YM, Qu Y, Vandenbussche E, Arckens L, Vandesande F. Analysis of extracellular gamma-aminobutyric acid, glutamate and aspartate in cat visual cortex by in vivo microdialysis and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods* 2001;105:211-215
- Lorenzo MP, Navarrete A, Balderas C, Garcia A. Optimization and validation of a CE-LIF method for amino acid determination in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Jan 25;73:116-124

M

- Mechref Y, Muzikar J, Novotny MV. Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: a case for multimethodological approach. *Electrophoresis* 2005;26:2034-2046
- Michalski JC, Klein A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: α - and β -mannosidosis, fucosidosis and α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1455:69-84
- Mikkers F, Everaerts F, Verheggen P. High-performance zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 1979;169:11-20
- Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Lambruschini N. Plasma amino acids in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:684-689

N

- Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th Ed. New York, New York: McGraw-Hill; 2001:3421-3452
- Nouadje G, Rubie H, Chatelut E, Canal P, Nertz M, Puig P, Couderc F. Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1995;717:293-298

O

- O'Brien KB, Esguerra M, Klug CT, Miller RF, Bowser MT. A high-throughput on-line microdialysis-capillary assay for D-serine. *Electrophoresis* 2003;24:1227-1235
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for

the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods* 2005;142:153-158

- Ortolano S, Viéitez I, Navarro C, Spuch C. Treatment of Lysosomal Storage Diseases: Recent Patents and Future Strategies. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2014 Jan 14. [Epub ahead of print]

P

- Pearl PL, Novotny EJ, Acosta MT, Jakobs C, Gibson KM. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults. *Ann Neurol* 2003;54:S73-S80
- Pérez-Cerdá C, Quelhas D, Vega A I, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem* 2008; 54:93-100
- Prieto JA, Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Sanjurjo P. Análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Química Clínica* 2007;26:66-72

Q

- Quintana E, Gala S, García-Cazorla A, Montero R, Muñoz-Almagro C et al. Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:267
- Quintana E, Sturiale L, Montero R, Andrade F, Fernandez C et al. Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:S273-S278
- Quintana E, Montero R, Casado M, Navarro-Sastre A, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R. Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Chromatogr B* 2009;877:2513-2518

R

- Rada P, Tucci S, Teneud L, Paez X, Perez J, Alba G, García Y, Sacchettoni S, del Corral J, Hernandez L. Monitoring gamma-aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;735:1-10.

- Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012. *Electrophoresis* 2013;34:86-98
- Ramsay SL, Meikle PJ, Hopwood JJ, Clements PR. Profiling oligosaccharidurias by electrospray tandem mass spectrometry: quantifying reducing oligosaccharides. *Anal Biochem* 2005;345:30-46
- Rudloff S, Pohlentza G, Borscha C, Lentze MJ, Kunz C. Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br J Nutr* 2012;107:957-963
- Ruhaak LR, Hennig R, Huhn C, Borowiak M, Dolhain RJ, Deelder AM, et al. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res* 2010;9:6655-6664

S

- Samakashvili S, Ibáñez C, Simó C, Gil-Bea FJ, Winblad B, Cedazo-Mínguez A, Cifuentes A. Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. *Electrophoresis* 2011;32:2757-2764
- Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J Neurosci* 2013;33:10195-10208
- Sauvinet V, Parrot S, Benturquia N, Bravo-Moratón E, Renaud B, Denoroy L. In vivo simultaneous monitoring of gamma-aminobutyric acid, glutamate, and L-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Analytical developments and in vitro/in vivo validations. *Electrophoresis* 2003;24:3187-3196
- Shi X, Liang P, Song D, Yang W, Gao X. Quantification of γ -aminobutyric acid in the heads of houseflies (*Musca domestica*) and diamondback moths (*Plutella xylostella* (L.)), using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Sep Sci* 2012;35:548-555
- Sluiter W, van den Bosch JC, Goudriaan DA, van Gelder CM, de Vries JM, Huijmans JG, Reuser AJ, van der Ploeg AT, Ruijter GJ. Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for a characteristic glycogen-derived tetrasaccharide in Pompe disease and other glycogen storage diseases. *Clin Chem* 2012;58:1139-1147

- Song P, Mabrouk OS, Hershey ND, Kennedy RT. In vivo neurochemical monitoring using benzoyl chloride derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2012;84:412-419
- Song Y, Shenwu M, Dhossche DM, Liu YM. A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of gamma-aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;814:295-302
- Sowell J, Wood T. Towards a selected reaction monitoring mass spectrometry fingerprint approach for the screening of oligosaccharidoses. *Anal Chim Acta* 2011;686:102-106
- Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M et al. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* 2005;15:1268-1276

T

- Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc* 1937;33:524-531
- Tůma P, Samcová E, Stulík K. Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection--an efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders. *Anal Chim Acta* 2011;685:84-90

V

- Van Eijk HG, Van Noort WL, Dubelaar ML, Van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1983;132:167-171
- Vega AI, Pérez-Cerdá C, Abia D, Gámez A, Briones P, Artuch R, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B. Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:929-939
- Vega AI, Pérez-Cerdá C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Pérez B. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Hum Mutat* 2009;30:795-803

- Virtanen R. Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection. *Acta Polytechnica Scand* 1974;123:1-67

W

- Westphal V, Peterson S, Patterson M, Tournay A, Blumenthal A et al. Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genet Med* 2001;3:393-398

X

- Xia B, Asif G, Arthur L, Pervaiz MA, Li X, Liu R, et al. Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Clin Chem* 2013;59:1357-1368

Y

- Young SP, Zhang H, Corzo D, Thurberg BL, Bali D, Kishnani PS, Millington DS. Long-term monitoring of patients with infantile-onset Pompe disease on enzyme replacement therapy using a urinary glucose tetrasaccharide biomarker. *Genet Med* 2009;11:536-541

Z

- Zhang D, Zhang J, Ma W, Chen D, Han H, Shu H, Liu G. Analysis of trace amino acid neurotransmitters in hypothalamus of rats after exhausting exercise using microdialysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:277-282
- Zhang H, Le Potier I, Smadja C, Zhang J, Taverna M. Fluorescent detection of peptides and amino acids for capillary electrophoresis via on-line derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:1387-1394
- Zhang JB, Li MJ, Li Z, Yan XJ, Yuan JQ, Dong WX, Zhang Y, Chu QC, Ye JN. Study on urinary profile of inborn errors of metabolism by 18-crown-6 modified capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;929:102-106
- Zhang L, Chen H, Hu S, Cheng J, Li Z, Shao M. Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence-charge coupled device. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;707:59-67

- Zhou L, Wang S, Tian K, Dong Y, Hu Z. Simultaneous determination of catecholamines and amino acids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Sep Sci* 2007;30:110-117
- Zhu X, Shaw PN, Pritchard J, Newbury J, Hunt EJ, Barrett DA. Amino acid analysis by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection: application to nanolitre-volume biological samples from *Arabidopsis thaliana* and *Myzus persicae*. *Electrophoresis* 2005;26:911-919

ANEXO

OTRAS PUBLICACIONES

- Quintana E, Montero R, Casado M, Navarro-Sastre A, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R. Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Chromatogr B* 2009;877:2513-2518
- Tondo M, Moreno J, Casado M, Brandi N, Sierra C, Vilaseca MA, Ormazabal A, Artuch R. Selenium Concentration in Cerebrospinal Fluid Samples from a Paediatric Population. *Neurochem Res* 2010;35:1290-1293
- Ortez C, Villar C, Fons C, Duarte ST, Pérez A, García-Villoria J, Ribes A, Ormazabal A, Casado M, Campistol J, Vilaseca MA, García-Cazorla A. Undetectable levels of CSF amyloid- β peptide in a patient with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Alzheimers Dis* 2011;27:253-257
- Sanchez-Masian DF, Artuch R, Mascort J, Jakobs C, Salomons G, Zamora A, Casado M, Fernandez M, Recio A, Lujan A. L-2-hydroxyglutaric aciduria in two female Yorkshire terriers. *J Am Anim Hosp Assoc* 2012;48:366-3671
- Calpena E, Casado M, Martínez-Rubio D, Nascimento A, Colomer J, Gargallo E, García-Cazorla A, Palau F, Artuch R, Espinós C. 5-Oxoprolinuria in Heterozygous Patients for 5-Oxoprolinase (OPLAH) Missense Changes. *JIMD Rep* 2013;7:123-128
- Molero-Luis M, Serrano M, Ormazabal A, Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pons R, Artuch R; Neurotransmitter Working Group: Amartino H, Arrabal L, Campistol J, Casado M, Castro de Castro P, Cormand B, Dinopoulos A, Domingo R, Durarte ST, Fernández-Álvarez E, Desviat LR, Hegde A, López-Laso E, Montero R, Ortez C, Pérez B, Pineda M, Sierra C, Szlago M, Schenone AB, Ruiz Á, Sequeira S, Tondo M, Yapici Z, Iniesta R. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol* 2013;55:559-566
- Molero-Luis M, Fernández-Ureña S, Jordán I, Serrano M, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Artuch R; Neopterin working group: Pérez-Dueñas B, Campistol J, O'callagan M, Pineda M, Sierra C, Casado M, Muñoz-Almagro C, Monsonís M, Velasco J, Valls A, Cambra FJ. Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropediatric patients: establishment of a new cut off-value for the identification of inflammatory-immune mediated processes. *PLoS One* 2013;8:e83237

Investigaciones futuras derivadas de la tesis

Por los resultados que se están obteniendo con la aplicación de los métodos descritos en esta tesis, se están desarrollando dos nuevas líneas de trabajo que probablemente derivarán en nuevos resultados científicos.

Una de ellas está relacionada con la determinación del GABA en LCR. Datos preliminares obtenidos recientemente por nuestro grupo demuestran que la concentración de GABA se ve afectada en diferentes ECM, como es el caso de las enfermedades mitocondriales y en ciertas aminoacidopatías. En estos casos, y por diferentes mecanismos, el valor de GABA en LCR se encuentra disminuido. Dado el papel inhibitor de este neurotransmisor, es previsible que este hecho explique la presencia de epilepsia en estos ECM. Con el análisis de más pacientes, podremos no solo confirmar este defecto central de GABA, sino también aplicar nuevas aproximaciones terapéuticas. En otro ámbito más común, la relación del GABA con los diferentes tratamientos antiepilépticos merece una investigación aparte, dada la elevada frecuencia de la epilepsia dentro del ámbito de la neuropediatría.

La segunda línea de interés es la de la determinación de oligosacáridos en orina para el cribado de oligosacaridosis. Ya hemos detectado un paciente que había mostrado un resultado negativo con otras pruebas, por lo que pensamos que la aplicación de este cribado en series largas de pacientes neuropediátricos nos va a permitir identificar nuevos fenotipos. Por otro lado, con la creciente aplicación de pruebas de secuenciación masiva para el diagnóstico de los ECM, se detectan gran cantidad de cambios genéticos de significado incierto. La posibilidad de disponer de una prueba de cribado tan sensible y practicable nos va a permitir identificar nuevas variantes fenotípicas, pero también descartar los resultados genéticos inciertos como causantes de enfermedad.