

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Pruebas bioquímicas para el tamizaje y diagnóstico oportuno de mucopolisacaridosis de población en riesgo

Biochemical tests for screening and timely diagnosis of Mucopolysaccharidosis for population at risk

Walkyrie Aguilar (†)^a | Guadalupe Jibaja^b | Lourdes Pazmiño^c

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^b iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^c iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 31/08/2021

Aceptación: 15/12/2021

PALABRAS CLAVE

Mucopolisacaridosis, MPS, glicosaminoglicanos, GAG, tamizaje, diagnóstico.

ARTICLE HISTORY

Received: 13/08/2021

Accepted: 21/12/2021

KEY WORDS

Mucopolysaccharidosis, MPS, glycosaminoglycans, GAG, screening, diagnosis.

RESUMEN

Las mucopolisacaridosis son enfermedades raras, de baja prevalencia y de depósito lisosomal. Se producen por la acumulación de diferentes tipos de glucosaminoglicanos debido al defecto genético que produce la ausencia de la enzima respectiva para su degradación. En el presente trabajo se proponen pruebas bioquímicas para el tamizaje y diagnóstico oportuno de mucopolisacaridosis para población ecuatoriana en riesgo. Se utilizó el método espectrofotométrico con azul de dimetil metileno para determinar las concentraciones de diferentes glucosaminoglicanos en muestras de orina de pacientes diagnosticados con mucopolisacaridosis y pacientes sanos. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa para clasificar el tipo de mucopolisacaridosis. Se obtuvo la concentración de glucosaminoglicanos en muestras de orina, con una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con diagnóstico de mucopolisacaridosis y pacientes aparentemente sanos. Sin embargo, la técnica de electroforesis no permitió clasificar los diversos tipos de mucopolisacaridosis. Las concentraciones de glucosaminoglicanos de pacientes con mucopolisacaridosis son más elevadas que las de pacientes aparentemente sanos por lo que la técnica es válida para la determinación de glucosaminoglicanos por el método espectrofotométrico de azul de dimetil metileno, y sirve para realizar el tamizaje y diagnóstico de mucopolisacaridosis. La clasificación del tipo de mucopolisacaridosis por electroforesis en agarosa, no brindó resultados concluyentes.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis are rare, low prevalence diseases and are of lysosomal deposit. They are produced by the accumulation of different types of glycosaminoglycans due to the genetic defect that produces the absence of the respective enzymes for their degradation. We propose biochemical tests for the screening and timely diagnosis of mucopolysaccharidosis for the Ecuadorian population at risk. Spectrophotometry with dimethyl methylene blue reagent was used to determine concentrations of glycosaminoglycans in urine samples, from patients with mucopolysaccharidosis diagnosis and healthy patients. Agarose gel electrophoresis was used to classify the type of mucopolysaccharidosis. In the present investigation we determined the concentration of glycosaminoglycans in urine samples, with a statistically significant difference between healthy patients and patients with a diagnosis of MPS. However, the electrophoresis technique did not allow classifying the various types of mucopolysaccharidosis. The concentrations of glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidosis are higher than those of healthy patients, therefore the technique is valid for the determination of glycosaminoglycans. Spectrophotometry with dimethyl methylene blue is suitable for the screening and diagnosis of mucopolysaccharidosis. The methodology used for the correct classification of the type of mucopolysaccharidosis, by electrophoresis in agarose, did not give conclusive results.

INTRODUCCIÓN

Las MPS, enfermedades de depósito lisosomal, son errores innatos del metabolismo (EIM) debido a los GAG que se acumulan por el déficit de por lo menos una de las 11 enzimas que degradan a estos polisacáridos sulfurados. Los GAG son polímeros lineales formados por unidades repetidas como son los disacáridos, de carácter ácido.

Generan la matriz extracelular, formando moléculas de mayor complejidad como los proteoglicanos (Lin *et al.*, 2019; Stapleton *et al.*, 2018; Kobayashi, 2019; Kubaski *et al.*, 2020a, Wilson *et al.*, 2018). Estos compuestos son degradados por enzimas específicas que, en caso de presentarse en menor concentración, producen una acumu-

lación a nivel de los lisosomas, y cuya concentración en exceso es excretada por la orina. Las MPS son enfermedades genéticas (González Andrade *et al.*, 2017) que se transmiten como enfermedades autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X, como el síndrome de Hunter. La acumulación sistemática de GAG, como del heparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato, y/o queratán sulfato se asocia con síndromes clínicos específicos (Poswar *et al.*, 2019). Las formas más sencillas se caracterizan por anomalías de los huesos y enanismo, deterioro progresivo cardiopulmonar y muerte en el período de la infancia o adulto joven. Las formas más progresivas pueden desarrollar retardo mental y se presentan con un retardo en el desarrollo, facies específicas y anomalías de los huesos (Kubaski *et al.*, 2020b). Por otro lado, las funciones auditivas, visuales y cardiovasculares, como la movilidad articular pueden estar comprometidas (Kobayashi, 2019). El retardo mental es característico de la MPS tipos I, II y III. El manejo de soporte y paliativo para las complicaciones respiratorias y cardiovasculares, como auditivas e hidrocefalia, pueden mejorar notablemente la calidad de vida de estos pacientes y sus familias.

Las MPS aparecen, en la mayoría de los casos, durante la infancia sin síntomas clínicos evidentes al momento del nacimiento. Los pacientes con MPS demuestran un rango amplio de síntomas multistémicos con un curso crónico y progresivo, debilitando al sistema óseo y cardiopulmonar, cornea, piel, hígado, cerebro y meninges (Gomes Bicalho *et al.*, 2011).

Los tratamientos han demostrado que son más efectivos cuando más temprano se realice el diagnóstico. Existen varias alternativas terapéuticas para tratar las MPS, como el reemplazo enzimático, trasplante de médula ósea, trasplante de sangre de cordón umbilical, terapia y edición génica (Kubaski *et al.*, 2020a). Los GAG se determinan por varios métodos (Lin *et al.*, 2019; Colón *et al.*, 2017; Kubaski *et al.*, 2020b).

Los pacientes de la población ecuatoriana diagnosticados con MPS lo han sido en laboratorios de fuera del país, como es el caso de pacientes de la Fundación Fepel Dasha. En los laboratorios de diagnóstico del Ecuador no se han comprobado estas pruebas, por tanto, se limita el acceso al diagnóstico a todos aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades genéticas MPS. El laboratorio de Docencia de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador (UCE), cuenta con los equipos y los profesionales (bioquímicos clínicos) para realizar y validar las pruebas para diagnosticar las MPS.

El objetivo es proponer pruebas bioquímicas para el diagnóstico oportuno de MPS desde el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Químicas, UCE.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos utilizados fueron: equipo de espectrofotometría Fisher Scientific SP-2100UVPC y equipo de electroforesis horizontal biostep gelco GH200 series; además de los reactivos 1,9-Dimethyl-Methylene Blue Zinc Chloride Double Salt Dye Content grado p.a. pureza > 80% (1 g); etanol grado p.a. pureza 96% (1 L); ácido fórmico (100 mL); formiato de sodio (250 g); condroitín sulfato (500 mg), dermatán sulfato (25 mg); heparán sulfato proteoglicano (1 mg); gel de agarosa (100 g); tampón TAE (10X) (1 L) (Tris base, 48,4 g; ácido acético glacial, 11,4 mL; 0,5 M EDTA pH 8; 20 mL); tampón de carga (40% Sacarosa, 4 g; 3% glicerol, 3 mL; 0,025% azul bromofenol, 25 mg); agua destilada; azul de Coomassie (0,25g); metanol grado p.a. pureza 96% (90 mL) y ácido acético glacial (10 mL).

MÉTODOS

Se realizó la validación de las pruebas de bioquímicas de GAG en espectrofotometría con el reactivo DBM. El método utilizado se basó en una patente (Sampedro *et al.*, 2015).

Se desarrolló la validación de las pruebas de tamizaje y diagnóstico de laboratorio clínico al determinar la concentración de GAG en muestras de pacientes que presentan los diferentes tipos de MPS, y que pertenecen a la fundación Fepel Dasha y con pacientes aparentemente sanos, estudiantes de la UCE (grupo control) que se atendieron en el laboratorio clínico de la Facultad Ciencias Químicas, UCE. Otros colaboradores fueron, el laboratorio docente de Análisis Clínico y Fundación Fepel Dasha y sus pacientes con diagnóstico de MPS. Para el grupo de estudio, el criterio de inclusión fue el diagnóstico previo de MPS (realizado en laboratorios extranjeros ya que en nuestro país no se realiza esta prueba) mientras que para el grupo control el criterio de inclusión fue ser estudiantes aparentemente de la UCE que acudieron al servicio de laboratorio clínico.

El objetivo de la presente investigación no fue diagnosticar a los pacientes, sino utilizar las muestras de los pacientes diagnosticados con algún tipo de MPS (se utilizó muestreo no probabilístico por conveniencia, pacientes de la Fundación Fepel Dasha diagnosticados con un tipo de MPS, muestra disponible en el periodo de tiempo de la investigación).

No fue necesario realizar un emparejamiento y cegamiento de los pacientes que intervinieron en la investigación ya que ésta no fue un estudio epidemiológico.

Se aplicó consentimiento informado, documento firmado por el paciente o su representante. El representante

del paciente firmó la declaración de confidencialidad conociendo que toda información de los pacientes será manejada con absoluta confidencialidad por parte de los investigadores, y que los datos de filiación serán utilizados exclusivamente para garantizar la veracidad de los mismos.

Determinación de concentración de GAG en orina, por el método espectrofotométrico con DMB

Con ayuda del analizador Fisher Scientific SP-2100UVPC, localizado en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, se prepararon soluciones acuosas de concentraciones de GAG de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de condroitin sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato de la casa comercial Sigma Aldrich, midiendo su absorbancia con la disolución de azul de dimetilmetileno (DMB), de 0,35 mmol/L disuelto en etanol y en tampón formiato de sodio. Posterior a ello, se procedió a leer la absorbancia del complejo DMB-GAG de cada estándar y las muestras de orina de pacientes con MPS de diferentes tipos, a condiciones óptimas de pH 4, longitud de onda 528 nm, tiempo de reacción 5 minutos, y temperatura ambiente en un rango de 20-25°C. El reactivo DMB es capaz de unirse específicamente a los GAG sulfatados debido a la carga negativa de éstos. Se calcula por medio de la ley de Beer la concentración de GAG comparando con la concentración de los estándares (Aranzadi *et al.*, 2002; Cueva, 2019).

Procedimiento con prueba de azul de dimetilmetileno (DMB) por electroforesis en gel de agarosa.

Para la clasificación del tipo de MPS, se preparó el gel de agarosa. Pesar 0,4 g de agarosa, cantidad necesaria para obtener la concentración deseada 0,8% en función del volumen de gel aproximadamente de 10 x 10 cm ajustando a 50 mL con el buffer para la electroforesis. Se calentó la mezcla en un horno de microondas por un minuto, hasta observar que toda la agarosa se ha fundido. Se procedió a enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50°C. Mientras la solución de agarosa se enfría, se prepara el molde en el que se va a elaborar el gel, sellando los bordes, colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada. Se vierte cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y se deja que solidifique durante al menos 30 min. Una vez que el gel se solidificó, se procedió a retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis. Luego, se pinchó cuidadosamente con el peine para que queden libres los pocillos para lo cual se depositaron las muestras (la solución del gel de agarosa presentó un pH cercano a 8,3 sin necesidad de ajustarla).

Preparación del buffer de corrida para la electroforesis

Para la solución TAE 10X, se pesó Tris base, 48,4 g; se usó ácido acético glacial, 11,4 mL; 0,5 M EDTA pH 8, 20 mL y

se ajustó a 1 L con agua bidestilada. Se tomó una alícuota de 50 mL del buffer para la electroforesis y se llevó a 1 L con agua bidestilada hasta tener un TAE 0,5X. Esta solución se añadió luego en la cámara de electroforesis hasta que cubra el gel unos 3-5 mm. El EDTA se preparó previamente, añadiendo al agua bidestilada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad de 18,61 g de EDTA y se disolvió en 70 mL de agua destilada para obtener una concentración final de 0,5 M. Se ajustó el pH con NaOH hasta obtener una solución pH 8. Se ajustó el volumen a 100 mL. El TAE se diluyó con agua destilada antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso de 0,5X. Se procedió a verificar con un potenciómetro el pH de la solución amortiguadora, la misma que tuvo un pH cercano a 8,3 sin necesidad de ajustarla. En la electroforesis, el amortiguador ejerce dos funciones: por un lado, lleva la carga eléctrica y, por otro, determina la carga neta de las moléculas que se separan.

Preparación de las muestras y estándares.

Se precipitó 50 μL de las muestras de orina y con los diferentes estándares con 1000 μL de DMB por 5 min a 20-25°C, y se procedió a centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante. Con el precipitado que quedó, se mezcló 100 μL con un buffer de carga (6X); 0,025% azul de bromofenol, 25 mg; 40% sacarosa, 4 g; o 3% glicerol, 3 mL y ajustar a 10 mL con agua destilada. El volumen total estuvo determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente de 10 μL . (Antes de cargar la muestra de orina, previamente agitar. Se almacenaron los buffers bajo refrigeración para evitar el crecimiento de hongos entre 2 y 8°C.)

Carga de las muestras y estándares en el gel de electroforesis

Se cargaron en los pocillos las muestras que se prepararon. Al momento de sumergir las muestras en la cámara de electroforesis, se aseguró que los pocillos del gel estaban totalmente cubiertos por el buffer. Se procedió a conectar los cables a la fuente de alimentación, uno positivo y otro negativo (frecuentemente representados por colores rojo y negro, respectivamente), y se aplicó un voltaje de 80 V con un valor de corriente aproximado 40 mA durante 1 h 30 minutos. Se tuvo en cuenta que los GAG migraron hacia el cátodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables. Se realizó la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó a los límites de la parte inferior a un 25% aproximadamente 40 a 60 minutos de la longitud total del gel. En ese momento se detuvo la electroforesis. Finalizada la electroforesis se procedió al desmontaje del equipo, se desconectaron los electrodos de la fuente de poder ya apagada y se removió el sistema que contiene el gel de agarosa. Se enjuagaron con agua destilada todos los componentes de electrofo-

resis al terminar la corrida. Se procedió a reutilizar el buffer de electroforesis hasta 6 veces.

Tinción del gel y visualización

Terminada la electroforesis, se realizó la tinción, y para ello se sacó el gel de su molde cuidadosamente; se sumergió luego en una disolución azul de Coomasie; 0,25 g en 90 mL de metanol (96%): H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial y con suave movimiento rotatorio, durante 5 minutos. Se realizó la coloración del gel por más de dos horas, debido a que el colorante puede quedar retenido fuertemente en el gel generando un fondo oscuro por sobre tinción que impediría la visualización de los GAG. Se procedió a filtrar la solución de azul de Coomasie a través de un papel Whatman N.º 1 para eliminar los residuos extraños; antes de usar se dejó en reposo por una semana en un frasco oscuro. Culminado el tiempo de incubación, se depositó el colorante en el frasco original. Finalizada la tinción, se sumergió en una disolución preparada de decoloración lenta (10 mL de ácido acético 10% más 5 mL de metanol más 85 mL agua destilada), o en una disolución de decoloración rápida (10 mL de ácido acético 10% más 50 mL de metanol más 40 mL agua destilada), durante 24 a 48 horas. Se lavó el gel para quitar los residuos que dejó el colorante y no se fijó a las moléculas, luego se lavó con agua destilada para frenar la decoloración.

Se retiró el colorante con movimiento constante, y se cambió la solución por una nueva (esto de lo hace cuantas veces sea necesario según el desteñido). Se procedió a seguir desteñendo hasta que las bandas de los GAG se apreciaron claramente. El ácido acético puede ser utilizado en concentraciones de 5% o 10%. Los GAG se visualizaron como bandas y se compararon con los estándares.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se evidenció que la disolución de DMB, de la casa comercial de Sigma Aldrich, se debe preparar a una concentración de 0,35 mmol/L preferiblemente disuelto en etanol y en tampón formiato de sodio, para que la absorbancia aumente conforme se va formando el complejo DMB-GAG de cada estándar y muestra, teniendo una relación lineal en función de la Ley de Beer, y al límite de cuantificación de los estándares, lo que condujo a condiciones óptimas de pH 4, longitud de onda 528 nm, tiempo de reacción 5 minutos, y temperatura ambiente en un rango de 20-25°C; condiciones en las cuales es capaz de unirse específicamente a los GAG sulfatados debido a su carga negativa.

Estos valores fueron comparados y se obtuvieron resultados similares en relación con los indicados por el autor De La Cruz (De la Cruz Amorós *et al.*, 1999) (ver Tabla 1).

Los cálculos de los parámetros estadísticos para la determinación de concentración de GAG con los estándares (Tabla 2; Tabla 3) muestran las curvas de calibración, donde se midió la señal de respuesta por triplicado de cuatro soluciones con concentraciones espaciadas en forma independiente (n = 12) a lo largo del intervalo 10, 25, 50 y 100 µg/mL para cada GAG. Los resultados fueron expresados como valores medios y al aplicar la prueba de hipótesis con ANOVA de un solo factor, existe diferencias estadísticamente significativas, con un intervalo de confianza del 95% (p < 0,05) (dos colas y 3 grados de libertad), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, demostrando que sí se puede obtener la concentración de GAG en muestras de orina, de esta manera se puede comparar con el rango de referencia, se encuentran concentraciones superiores o inferiores al límite de cuantificación. De igual manera, los resultados de la figura 1 evidencian un comportamiento de una manera aproximadamente normal demostrada con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling y Ryan-Joiner, por el modelo de regresión de los mínimos cuadrados, aplicándose un ajuste lineal de dispersión obtenido en cada una de las curvas, y estableciéndose con los valores máximos y mínimos como se distancian respecto de la media con un intervalo de confianza del 95% (p < 0,05) en aquellas variables cuantitativas en las que se realizó dicho ajuste, que en función de un pH entre 3 y 6 se tiene un mejor comportamiento con una clara diferencia de los máximos de absorbancia en los que presentaban los complejos DMB-GAG. El autor De la Cruz obtuvo resultados de absorbancia máximas en muestras en pH entre 3 y 6. Para la precisión, los coeficientes de variación fueron de 0,61% para coindroitin sulfato, 0,59% para dermatán sulfato y 0,97% para heparán sulfato. Los límites de detección que se obtuvieron fueron de 0,11 µg/mL para coindroitin sulfato, 0,08 µg/mL para dermatán sulfato y 0,14 µg/mL para heparán sulfato, comparándose con las concentraciones de las muestras de orina que fueron mayores a los límites de detección, indicando que el método es válido. Se puede decir que el intervalo de concentración de las curvas de calibración fue de 10 y 100 µg/mL para cada GAG. 0,0142 A/µg/mL para coindroitin sulfato, 0,0090 A/µg/mL para dermatán sulfato y 0,0158 A/µg/mL para heparán sulfato, que corresponde a la pendiente de la recta de calibración, indicando que el método es sensible y se puede determinar GAG (ver Tabla 2 y Figuras 1, 2, 3 y 4).

En la actualidad los pacientes son diagnosticados en países extranjeros. Generalmente son atendidos cuando la enfermedad ya ha avanzado en su desarrollo, en la mayoría de los casos solo se aplican cuidados paliativos, comprometiendo la salud del paciente, el bienestar y la economía familiar, pese a que la Ley Orgánica de la Salud protege y garantiza su diagnóstico y tratamiento (González Andrade *et al.*, 2017) (ver Tabla 3 y Figuras 5 y 6).

Tabla 1. Programación del analizador Fisher Scientific SP-2100UVPC para determinar GAGs

| General | |
|--------------------------|-------------------------|
| Modo de medición | Absorbancia |
| Modo de reacción | UV-VIS |
| Modo de calibración | Regresión lineal |
| Blanco | Azul de dimetilmetileno |
| Longitud de onda | 528 nm |
| Temperatura | 20-25°C |
| Unidades | µg/mL |
| Análisis | |
| Volumen de muestra | 50 µL |
| Reactivo | Azul de dimetilmetileno |
| Volumen | 1000 µL |
| Tiempo de incubación | 5 minutos |
| Cálculos | |
| Dirección de la reacción | Incremento |
| Cálculo | Punto final |
| Calibración | |
| Intervalo de calibración | Cada corrida |
| Número de estándares | 4 |
| STD1: | 10 |
| STD2: | 25 |
| STD3: | 50 |
| STD4: | 100 |

UV-VIS: luz de visibilidad ultravioleta, nm: nanómetros, µg: microgramos, ml: mililitros uL: microlitros, STD: estándar.

Tabla 2. Valores medios de absorbancia reales de las soluciones estándar para el condroitin sulfato y prueba de precisión, límite de detección, linealidad, sensibilidad y correlación

| Solución de chondroitin sulfato (µg/mL) | Absorbancia |
|---|------------------|
| 10 | 0,411 |
| 25 | 0,421 |
| 50 | 0,445 |
| 100 | 0,544 |
| Promedio | 0,455 |
| sd | 0,003 |
| CV (%) | 0,61 |
| LD (µg/mL) | 0,11 |
| Linealidad (µg/mL) | 10 a 100 |
| Sensibilidad (A/µg/mL) | 0,0142 |
| Correlación | 0,9637 p < 0,018 |

µg: microgramos, mL: mililitros, SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación, LD: límite de detección.

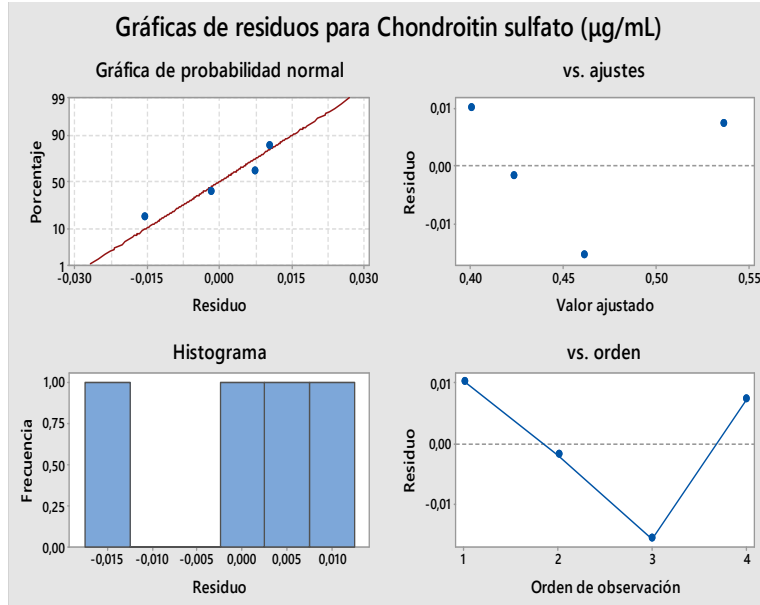


Figura 1. Línea ajustada chondroitin sulfato ($\mu\text{g/mL}$)

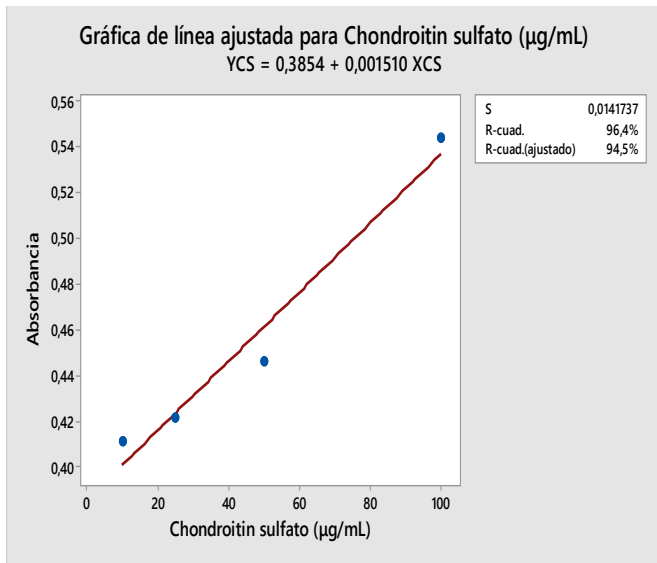


Figura 2. Residuos de chondroitin sulfato ($\mu\text{g/mL}$).

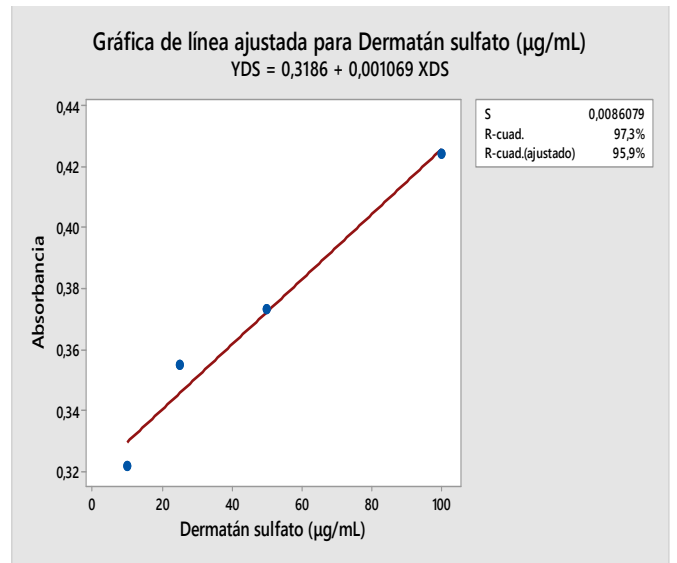


Figura 3. Línea ajustada para dermatán sulfato ($\mu\text{g/mL}$).

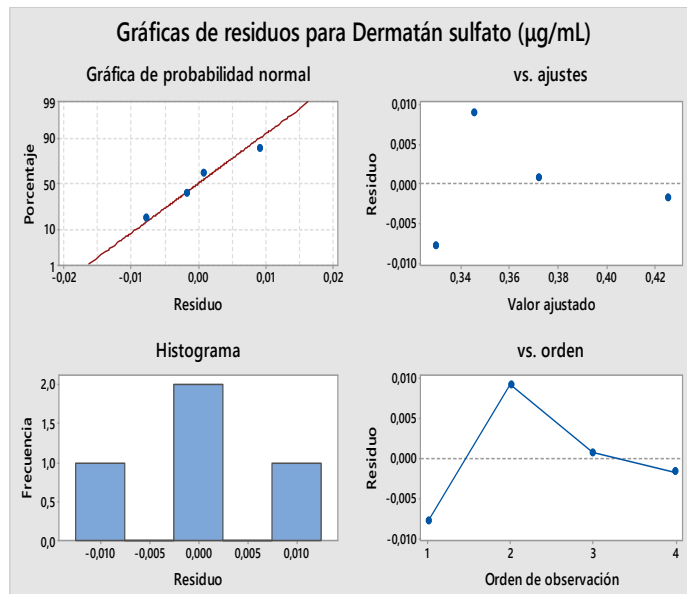


Figura 4. Línea de residuos para dermatán sulfato ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 3. Valores de absorbancia reales de las soluciones estándar para el heparán sulfato y prueba de precisión, límite de detección, linealidad, sensibilidad y correlación

| Solución de heparán sulfato (µg/mL) | Absorbancia |
|-------------------------------------|--------------------|
| 10 | 0,355 |
| 25 | 0,364 |
| 50 | 0,372 |
| 100 | 0,454 |
| Promedio | 0,386 |
| sd | 0,004 |
| cv (%) | 0,97 |
| LD (µg/mL) | 0,14 |
| Linealidad (µg/mL) | 10-100 |
| Sensibilidad (A/µg/mL) | 0,0158 |
| Correlación | 0,9198 $p < 0,041$ |

µg: microgramos, mL: mililitros, A: absorbancia. SD: desviación estándar, cv: coeficiente de variación, LD: límite de detección.

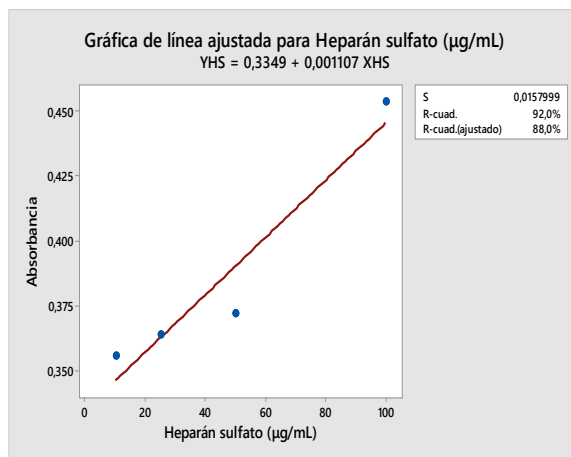


Figura 5. Línea ajustada para heparán sulfato (µg/mL)

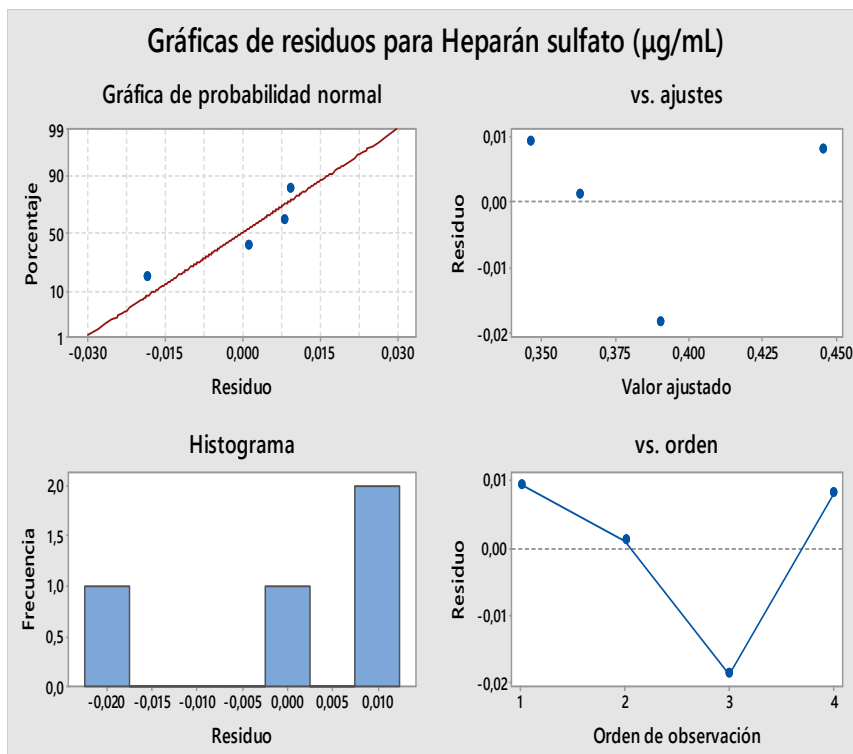


Figura 6. Línea de residuos para heparán sulfato (µg/mL)

Tabla 4. Frecuencia por grupos de edad/género para cada glucosaminoglicano con la prueba de DMB.

| Edad | Frecuencia (n)% | Frecuencia masculina (n)(%) | Frecuencia femenina (n)(%) |
|-------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|
| 18-19 | 97 (41) | 25 (28) | 72 (49) |
| 20-34 | 138 (59) | 63 (72) | 75 (51) |
| Total | 235 (100) | 88 (37) | 147 (63) |

| Edad | Concentración (µg/mL) | | | |
|-------|-----------------------|------------------|-----------------|------|
| | condroitin sulfato | dermatán sulfato | heparán sulfato | CV% |
| 18-19 | 6,53 ± 0,002 | 8,36 ± 0,002 | 7,55 ± 0,002 | 0,74 |
| 20-34 | 6,48 ± 0,002 | 8,29 ± 0,002 | 7,50 ± 0,002 | 0,59 |

cv: coeficiente de variación. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ANOVA: F = 7,22, p < 0,001.

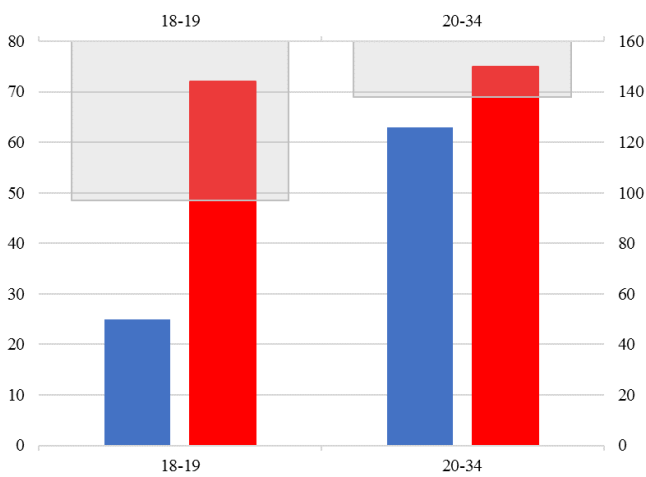


Figura 7. Frecuencia de la población estudiada por grupos de edad y género

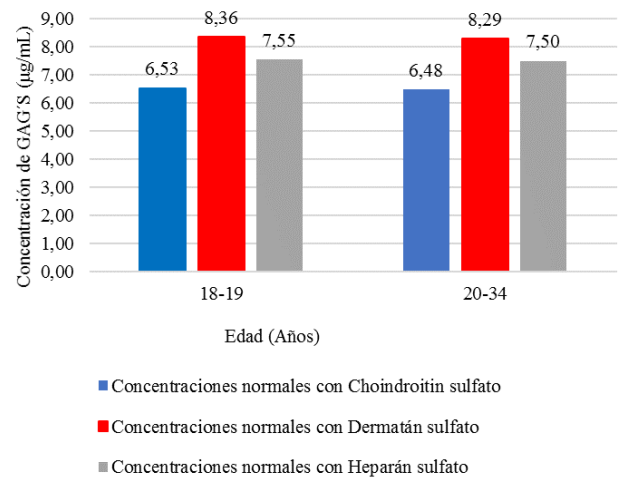


Figura 8. Valores de glucosaminoglicanos en muestras de orina con la prueba de azul de dimetilmetileno según la edad. Mann-Whitney: p < 0.017.

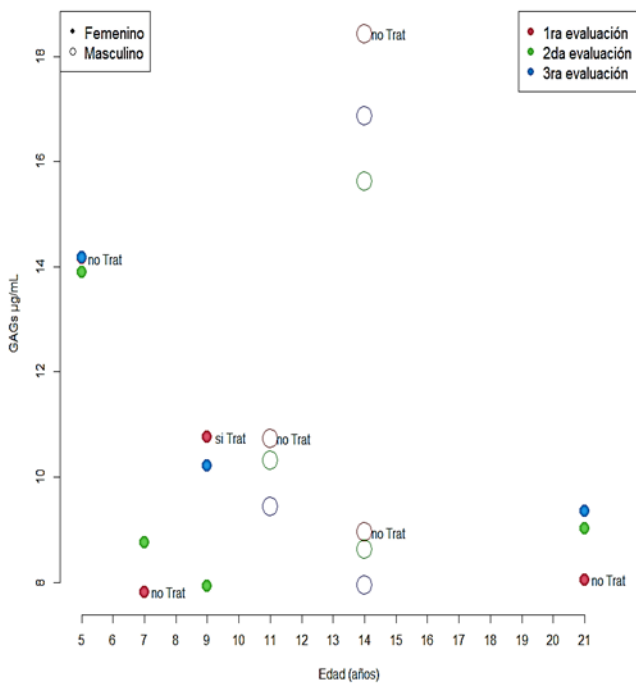


Figura 9. Correlaciones entre variables. Concentración de GAGs, edad, sexo, tratamiento. No existe correlación entre las variables, concentración de GAGs µg/mL- edad y sexo del paciente

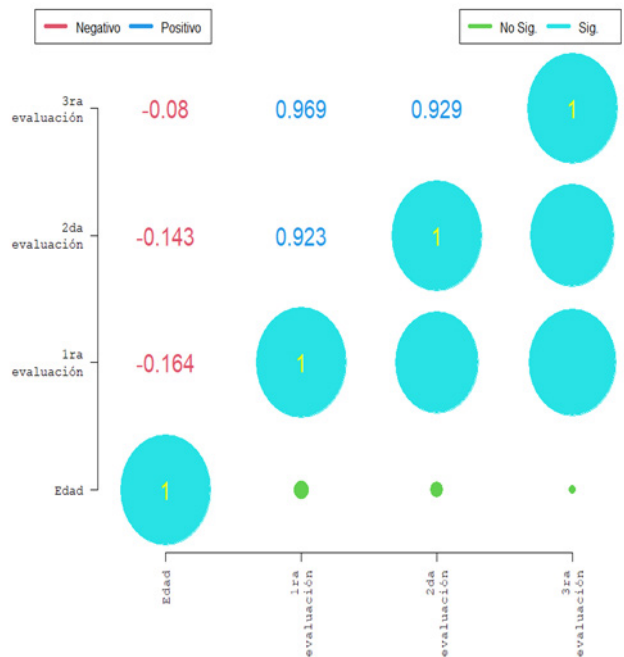


Figura 10. Correlación entre Pacientes (con edad)



Figura 11. Correlación entre pacientes (sin edad)



Figura 12. Correlación ACP con edad

De acuerdo, a los resultados obtenidos de los exámenes con muestras de estudiantes de la Universidad Central del Ecuador con la prueba de azul de dimetilmetileno (DMB) por el procedimiento de espectrofotometría para la determinación de concentración de GAG, (ver Tabla 4 y Figuras 7, 8, 9), en relación a pruebas bioquímicas convencionales del laboratorio clínico, se observa valores considerados normales, donde, se realizaron biometría hemática, glucosa, urea, ácido úrico, colesterol, triglicéridos y creatinina, no evidenciándose la presencia de enfermedades que pueden aumentar la excreción urinaria de GAG, cómo tampoco en otros factores fenotípicos como rasgos faciales toscos, por lo que, no fue necesario la aplicación de la electroforesis para el tipo de MPS, quedando así en procedimientos estandarizados para futuras determinaciones.

De acuerdo con el valor de R (Stapleton *et al.*, 2018) éste es significativo, lo que indica que no afecta la interpretación de variables significativas. De esta manera se comprueba la relación significativa entre los GAG y la edad (ver Figuras 10, 11, 12).

El R (Stapleton *et al.*, 2018) indica que el modelo tiene un buen ajuste y, al examinar la gráfica de línea ajustada y la gráfica de residuos, muestra relación entre GAG de pacientes con MPS y las edades de los pacientes.

Kubaski F. y su equipo de investigación realizaron la determinación de GAG en orina de pacientes con diferentes tipos de MPS y, de diferentes edades, encontrándose que los valores varían por la edad y el tipo de MPS (ver Figuras 13.1, 13.2, 14, 15).

Sabir E. y su equipo de investigación realizaron estudios de concentración de GAG por el método espectrofotométrico DMB en orina de pacientes con MPS, además realizaron investigaciones de estabilidad de las muestras a diferentes temperaturas, lo que fue tomado en cuenta para la presente investigación.

Se desarrollaron parámetros de linealidad, sensibilidad y correlación. En la determinación de la concentración de GAG en orina de pacientes aparentemente sanos que acudieron al laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCE, lo que demuestra que existe linealidad en los datos obtenidos por espectrofotometría con el reactivo DMB. Se cumple con una distribución homogénea, repetibilidad en los datos y que se realizó previamente el análisis de GAG con muestras de pacientes diagnosticados con MPS.

Para realizar el análisis de la concentración de GAG en muestras de orina de pacientes diagnosticados con MPS se varió el tiempo de reacción del reactivo con los GAG presentes en la orina, y se encontró la absorbancia incrementaba hasta el minuto 5 de la reacción indicando que ésta se ha completado.

CONCLUSIONES

Se concluye que sí se puede medir concentraciones de GAG en muestras de orina, en relación al rango de referencia.

Los valores de GAG de pacientes diagnosticados con MPS son significativamente mayores a los pacientes sanos. Los valores promedio de pacientes sanos comparados con estándares de dermatán son 8,38 mg/mL, condroitin 6,54 mg/mL, y con heparán 7,58 mg/mL. Los valores de pacientes con MPS IV (condroitin) fueron 9,64 mg/mL comparados con pacientes sanos que fueron de 6,54 mg/mL por lo que concluimos que los valores en los pacientes con MPS IV son significativamente más altos. La metodología utilizada para clasificar las diversas MPS del país fue por electroforesis horizontal con una temperatura de 25°C, de agarosa al 2,5%. No fue posible obtener la separación de los GAG para su correcta identificación. Los valores de pacientes con MPS II (dermatán y heparán) son 7,90 a 16,98 mg/mL comparados con pacientes sanos, que van de 7,58 a 8,38 mg/mL. Los pacientes con MPS III (heparán) son 8,58 a 8,81 mg/mL comparados con pacientes sanos que tienen un valor de 7,58 mg/mL. Los valores promedio de pacientes es de 8,38 mg/mL de dermatán en los pacientes sanos. El promedio de 6,54 mg/mL de condroitin en los pacientes sanos. El promedio de 7,58 mg/mL de heparán en los pacientes sanos. En las muestras de pacientes con MPS IV, se obtuvieron concentraciones ligeramente mayores de queratán y condroitin, 9,64 mg/mL comparados con sanos 9,54 mg/mL. Adicionalmente se obtuvo en MPS II, concentraciones mayores de dermatán y heparán, desde 7,90 y 16,98 mg/mL, comparados con sanos 7,58 y 8,38 mg/mL.

La metodología utilizada para clasificar los diferentes tipos de MPS por electroforesis horizontal a una temperatura de 25°C, con agarosa al 2,5%, no dio resultados analíticos concluyentes. No fue posible obtener la separación de los GAG para su correcta identificación. Se repitió este análisis con una estricta revisión del mismo, pero no se obtuvieron datos válidos.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno reportado por los autores.

AGRADECIMIENTOS Y PATROCINIO

Se expresa un fraterno agradecimiento a la Universidad Central del Ecuador, a la Dirección de Investigación, a la Unidad de Investigación Formativa, Facultad de Ciencias Químicas, Fundación Fepel Dasha. Los autores declaran que los recursos financieros para la elaboración de la presente investigación proceden del fondo de investigación semilla de la UCE.

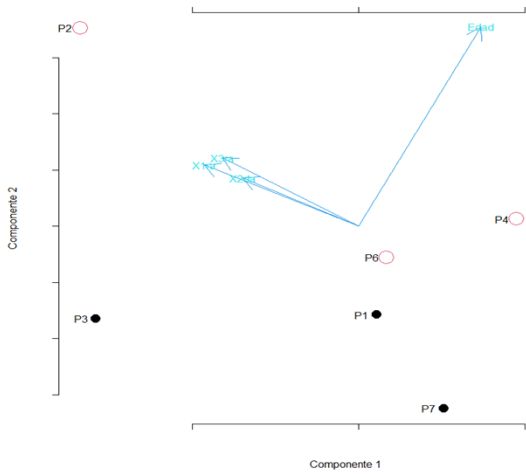


Figura 13.1. Correlación ACP sin edad

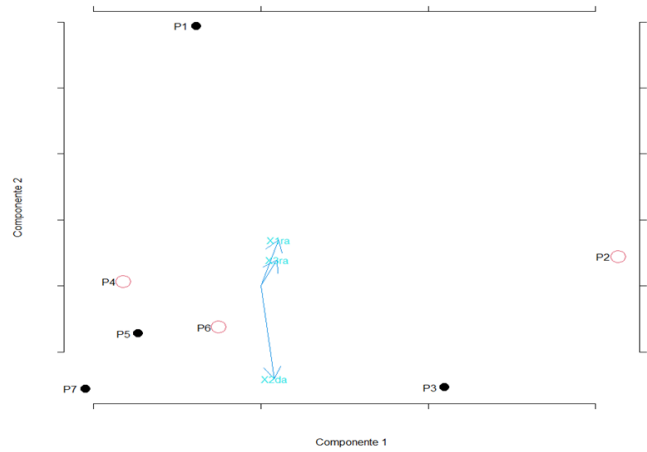


Figura 13.2. Correlación ACP sin edad

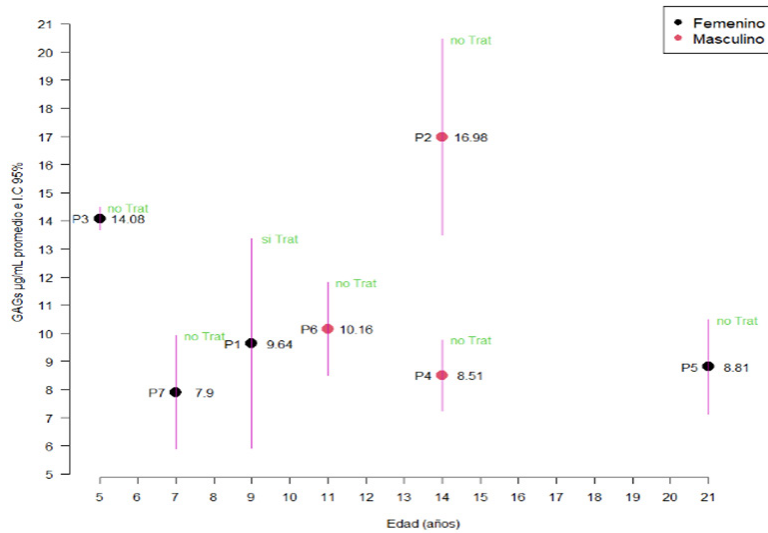


Figura 14. GAG's ug/ml. Promedio al IC 95% edad(años). El valor promedio de GAG's y su intervalo de confianza son utilizados para el cálculo de R cuadrado.

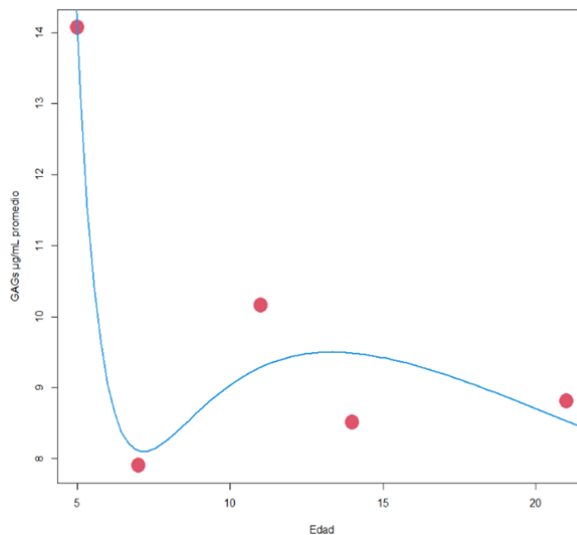


Figura 15. R2. De acuerdo con el valor de R2 éste es significativo, lo que indica que no afecta la interpretación de variables significativas. De esta manera se comprueba la relación significativa entre los GAG's y la edad. El R2 indica que el modelo tiene un buen ajuste y, al examinar la gráfica de línea ajustada y la gráfica de residuos, muestra relación entre GAG's de pacientes con MPS y las edades de los pacientes.

REFERENCIAS

1. Aranzadi E, Leiva E, Relaño E. Modificación de la técnica de determinación de mucopolisacáridos que utiliza azul de dimetilmetileno. *Rev Diagn Biol.* 2002; 51, 13-5.
2. Colón C, Álvarez JV, Castaño, C, Gutiérrez Solana LG, Márquez AM, O'Collaghan M, et al. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis: Results of the FIND project-A 2-year follow-up study. *Med (United States).* 2017; 96, 6887.
3. Cueva F. Análisis de pruebas bioquímicas de glucosaminoglicanos en orina de estudiantes que acuden al Laboratorio Clínico FCQ-UCE, junio-2019. *Univ Cent del Ecuador Fac Ciencias Químicas.* 2019; 4, 1-21.
4. De la Cruz Amorós V, Cortés Castell E, Moya M. Excreción urinaria de mucopolisacáridos en la edad pediátrica y en la adolescencia. *An Esp Pediatr.* 1999; 50, 361-6.
5. Centro de Genética Médica (CEGEMED), una prioridad en la atención de salud de los ecuatorianos que no puede posponerse. *Rev Fac Ciencias Médicas [Online]* 2017; 42, artículo 1. https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1509/1458
6. Kobayashi H. Recent trends in mucopolysaccharidosis research. *J. Hum Genet. [Online]* 2019, 64, artículo 2. <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0534-8>
7. Kubaski F, De Oliveira Poswar F, Michelin Tirelli K, Burin MG, Rojas Malaga D, Brusius Facchin AD, et al. Diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Diagnostics.* 2020; 10, 172.
8. Kubaski F, Sousa I, Amorim T, Pereira D, Trometer J, Souza A, et al. Neonatal screening for MPS disorders in Latin America: a survey of pilot initiatives. *Int J Neonatal Screen.* 2020; 6, 90.
9. Lin HY, Lee C, Lo YT, Tu RY, Chang YH, Chang CY, et al. An at-risk population screening program for mucopolysaccharidoses by measuring urinary glycosaminoglycans in Taiwan. *Diagnostics.* 2019; 9, 1-16.
10. Poswar F, Vairo F, Burin M, Michelin Tirelli K, Brusius Facchin A, Kubaski F, et al. Lysosomal diseases: overview on current diagnosis and treatment. *Genet Mol Biol.* 2019; 42, 165-77.
11. Sabir E, Lafhal K, Ezoubeiri A, Harkati I, Sbyea S, Ald amiz-Echevarr L, Andrade F, Ait Babram M, Mrabih Rabou F, Draiss G, Noureddine Rada N, Bouskraou M, Karim A, Fdil N. Usefulness of urinary glycosaminoglycans assay for a mucopolysaccharidosis-specific screening. *Pediatrics International* 2020; 62, 1077-1085.
12. Sampedro A, Álvarez González V, Colón Mejezas C, González MA, Lamas González O. Método para la separación de la fracción unida a glucosaminoglicanos y sus aplicaciones. 2 608 814, 2015.
13. Stapleton M, Arunkumar N, Kubaski F, Mason RW, Tadao, O.; Tomatsu, S. Clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab. [Online].* 2018, 125, artículo 1-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.003>
14. Wilson A, Lavery C, Stewart F, Thomas S, Cavell D, Brandon R, et al. Mucopolysaccharidosis and adulthood: genetics, inheritance, and reproductive options. *J Child Sci.* 2018; 8, 38-43.
15. Gomes Bicalho C, Morais Rezende M, Carrilho Moinhos Nogueira A, Melo Calvoso Paulon R, Xavier Acosta A. The importance of the otorhinolaryngologic evaluation in mucopolysaccharidosis patients. *Intl Arch. Otorhinolaryngol.* 2011; 15, 290-294