



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

Utilidad de la prueba del 2,4 DPHN en el diagnóstico de las enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos

MSc. Iovana Fuentes Cortés¹
MSc. Jazminia Anayl Moreno Arango²
Dra. Laritza Martínez Rey³
Téc. Sup. Daviana Suárez Perdigón⁴

¹ Centro Nacional de Genética Médica/Genética Bioquímica, La Habana, Cuba, ifuentes@cngen.sld.cu

² Centro Nacional de Genética Médica/Genética Bioquímica, La Habana, Cuba, jamar@cngen.sld.cu

³ Centro Nacional de Genética Médica/Genética Bioquímica, La Habana, Cuba, laritzam@infomed.sld.cu

⁴ Centro Nacional de Genética Médica/ Genética Bioquímica, La Habana, Cuba, dsuarez@cngen.sld.cu

Resumen: Introducción: Las enfermedades metabólicas hereditarias (EHM) del metabolismo de los aminoácidos se producen debido a un déficit en alguna de las enzimas o cofactores que intervienen en el proceso de degradación de los diferentes aminoácidos. Las pruebas químicas cualitativas como la del 2,4 Dinitrofenilhidracina (DPHN), resultan necesarias para el diagnóstico de las EHM del metabolismo de los aminoácidos aparejado al gran avance tecnológico que ha devenido en la búsqueda de los parámetros bioquímicos característicos de esta entidad. Objetivo: Describir la utilidad de la prueba del 2,4 DPNH, en el diagnóstico de las enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos, en una muestra de pacientes evaluados en el laboratorio de Genética Bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), en el período comprendido entre enero de 2016 hasta Diciembre del 2021. Materiales y métodos: Se realizó un estudio descriptivo transversal. De un universo de 2958 pacientes estudiados en el laboratorio de Pruebas metabólicas en orina (PMO) del departamento de Genética Bioquímica del CNGM, con motivo de indicación de sospecha de una enfermedad metabólica hereditaria del metabolismo de los aminoácidos, en el periodo de Enero del 2016 a Diciembre del 2021. Se utilizaron dos métodos: la prueba cualitativa turbidimétrica del 2,4DNPH y la determinación de ácidos orgánicos en orina por Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Resultados: Se identificaron tras el estudio, 11 casos positivos de padecer una EHM. Conclusiones: La prueba química cualitativa del 2,4DNPH resultó ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos, diagnosticada en nuestro laboratorio.

Palabras clave: enfermedades metabólicas hereditarias, metabolismo

I.INTRODUCCIÓN

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMH), son enfermedades monogénicas, de herencia autosómica recesiva en su mayoría. La alteración en un gen produce un defecto enzimático, que conduce a las alteraciones bioquímicas características de cada enfermedad metabólica y son responsables de los fenotipos desadaptativos propios de cada patología.^{1,2} Las aminoacidopatías se producen debido a un déficit en alguna de las enzimas o cofactores que intervienen en el proceso de degradación de los diferentes aminoácidos. Dentro de las 39 aminoacidopatías reportadas en la actualidad, las más relevantes de acuerdo a su incidencia son, la fenilcetonuria, la homocistinuria, tirosinemia y la hiperglicemia no cetósica³. Sus manifestaciones clínicas se asemejan con cuadros infecciosos y de intoxicación. Su presentación más severa se ha evidenciado en los recién nacidos. La mayoría de las aminoacidopatías son tratables a partir de esquemas nutricionales a excepción de la hiperglicemia no cetósica.^{4,5} Por la gran heterogeneidad y dificultad diagnóstica, característica de este grupo de enfermedades, en los últimos años se ha observado un gran avance en las estrategias y procedimientos analíticos así como en los diagnósticos desarrollados para el estudio de las mismas, razón por la cual los laboratorios han sido dotados de una mayor capacidad diagnóstica con la inserción de nuevas técnicas que llevan aparejado un equipamiento analítico altamente costoso.⁶ Entre las técnicas cuentan la Cromatografía gaseosa acoplada a Espectrometría de masas (CG/EM), la Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectrometría de Masas en Tándem, entre otras.⁷ A pesar de estos avances tecnológicos, no se le debe de restar importancia a un grupo de pruebas convencionales que siguen siendo necesarias para este diagnóstico, entre las que se encuentran las pruebas químicas cualitativas (PQC).⁸ Pruebas rápidas, de fácil acceso y presuntivas en el establecimiento de exámenes más especializados; se realizan en muestras de orina de la primera micción de la mañana (mejor expresión de los metabolitos de interés analítico) y se basan en la detección cualitativa de grupos funcionales.¹⁵ Teniendo en cuenta el momento de aparición de las EHM (período neonatal o en la primera infancia), el diagnóstico temprano puede ser sugerido por pruebas de tamisaje neonatal. En nuestro país, solo se pesquisan enfermedades como la Fenilcetonuria, Déficit de Biotinidasa, Galactosemia, Hipotiroidismo congénito y Fibrosis quística, razón por la cual la sospecha inicial del resto de las enfermedades de este heterogéneo grupo está dada por las manifestaciones clínicas y posteriormente los hallazgos del laboratorio mediante el análisis de los marcadores bioquímicos, los cuales permitirán orientar el diagnóstico.^{10, 11,12}

Los alfacetoácidos, del grupo de los cetoácidos, son compuestos excretados por vía urinaria y permiten el diagnóstico de un grupo de enfermedades comprendidas entre los EHM. La prueba del 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DPHN) o reactivo de Brady, tiene como finalidad la detección de estos metabolitos en orina.¹⁰ Enfermedades como la Fenilcetonuria, la enfermedad de orina de jarabe de arce (MSDU), la Tirosinemia, algunos tipos de acidurias, entre otras pertenecientes a los EHM de los aminoácidos, pueden resultar positivos ante esta prueba.¹¹ El perfil de los alfacetoácidos en orina, generalmente se obtienen por CG/EM, antes precedida de la realización de las pruebas cualitativas, constituyendo ambas, una de las herramientas más importantes en el laboratorio de genética bioquímica.^{12,13} El objetivo de este artículo es describir la utilidad de las PQC a través de la prueba del 2,4 DPNH, para el diagnóstico de las enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos, en una muestra de pacientes evaluados en el laboratorio de Genética Bioquímica, en el período comprendido entre enero de 2016 hasta diciembre del 2021.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo transversal de un universo de 2958 pacientes estudiados en el laboratorio de Pruebas metabólicas en orina (PMO) del departamento de Genética Bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica, con motivo de indicación de sospecha de una enfermedad metabólica hereditaria del metabolismo de los aminoácidos, en el periodo de Enero del 2016 a Diciembre del 2021. La metodología de trabajo estuvo concebida según el algoritmo clínico bioquímico establecido en el Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM, en dos etapas: la realización de las pruebas químicas cualitativas entre las que se encuentra la del tipo turbidimétrica 2,4DNPH, donde la muestra de orina de primera micción de la mañana previamente centrifugada a 500RPM por 3min, se extrae el sobrenadante y se trabajan con 500µL de la misma. Se añaden 500 µL de reactivo y se homogeniza. Tras 10min de reacción se observa el resultado. Siendo positivo tras la aparición de una turbidez o precipitado de color amarillo o blanco-amarillo. Si la muestra resultara positiva, se pasa a la segunda etapa: la determinación de ácidos orgánicos en orina, donde se añadió la cantidad de orina equivalente a 0,25 mg de creatinina y se trató con 60 U de ureasa durante 30 min a temperatura ambiente. La muestra se alcalinizó con hidróxido de sodio (8 N) hasta pH 14 y se oximó con cloruro de hidroxilamina (40%). Posteriormente se acidificó con ácido clorhídrico (6 N) hasta pH 1 y se saturó con 1 g de cloruro de sodio. Luego se realizaron dos extracciones líquido/líquido con 6 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se recuperó y secó en sulfato de sodio anhidro y se evaporó a 50 °C en atmósfera de nitrógeno. Una vez secas las muestras, se derivatizó con 2, 2,2-trifluoro-N-metil-N-rifluoroacetamida durante 20 min a 60 °C y se inyectó 1 µL en el CG/EM con una relación de *split* 1/10.

III. RESULTADOS

De un total de 2958 muestras de orina analizadas en el laboratorio de Pruebas Metabólicas en el período del 2016-2021, 14 de las 41 que previamente resultaron positivas al estudio del 2,4DNPH, siguieron el algoritmo establecido por el laboratorio, representando el 34,14% de los casos estudiados (Tabla 1). Criterios como, la presentación de volúmenes insuficientes de algunas muestras recepcionadas en el laboratorio de Pruebas Metabólicas para la continuación de estudios y a la no entrada, por segunda ocasión, de la misma para cumplimentar la segunda y última etapa en el diagnóstico, constituyeron limitantes en el estudio. Cabe destacar que en trabajos revisados en la literatura, como en los laboratorios del INTA en Chile, el laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo de Costa Rica, establecen algoritmos clínicos bioquímicos similares a los desarrollados por nuestro departamento, y por consiguiente una buena respuesta en cuanto a la correlación de los estudios.^{14,15}

Tabla 1: Muestras estudiadas para 2,4 DNPH en el laboratorio de pruebas metabólicas y con resultado positivo al estudio de ácidos orgánicos en orina en el periodo 2016-2021.

Año	Total de muestras estudiadas en el laboratorio de pruebas metabólicas	Total de muestras positivas al 2,4 DNPH	Total de muestras positivas al 2,4 DNPH que se les realizó la Determinación de Ácidos Orgánicos en orina	Total de muestras positivas a la determinación de Ácidos orgánicos precedida de la prueba de 2,4DNPH
2016	470	3	-	-
2017	720	6	3	1
2018	816	13	5	5
2019	430	2	-	-
2020	268	5	3	3
2021	254	12	4	2
TOTAL	2958	41(1,4%)	14(34, 14%)	11(78, 57%)

La aplicación de la CG/EM, tras la positividad de la prueba del 2,4DNPH, permitió identificar 11 pacientes con trastornos diferentes, representando el 78,57% de los casos analizados, tras la aplicación del algoritmo bioquímico establecido, comparable con otros autores que diagnostican este grupo de enfermedades por CG/EM. ¹⁶(Fig. 1) En la tabla 2 se observan los diagnósticos que se obtuvieron tras el estudio de la determinación de ácidos orgánicos en orina, tras haber tenido una prueba de 2,4DNPH positiva. Cabe destacar que en estudios consultados suman casos como Fenilcetonuria u otras aminoacidopatías en pacientes cuyos perfiles cromatográficos sugieren acidurias orgánicas. ^{14,16} Estas enfermedades, antes mencionadas son analizadas mediante marcadores bioquímico establecidos en nuestro laboratorio y de conjunto con el programa de pesquisa neonatal, no se ha diagnosticado ningún paciente por la tecnología de CG/EM como fuera del programa.

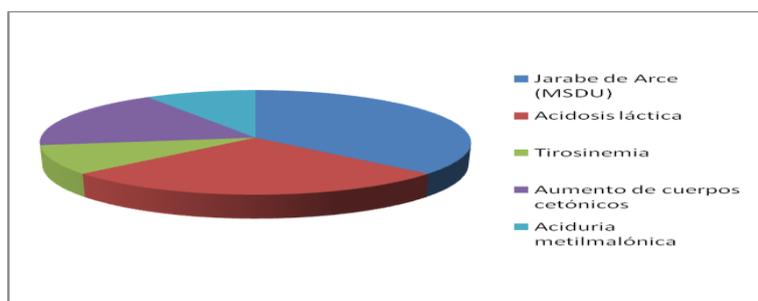


Figura 1: Diagnósticos obtenidos tras el estudio de ácidos orgánicos en orina, con prueba de 2,4DNPH positiva en el periodo 2016-2021.

Tabla 2. Diagnósticos resultantes al estudio de ácidos orgánicos en orina, con prueba de 2,4DNPH positiva en el periodo 2016-2021.

Año	Total de muestras positivas a la determinación de Ácidos orgánicos precedida de la prueba de 2,4DNPH	Diagnósticos obtenidos tras el estudio de ácidos orgánicos
2017	1	MSDU (1 caso)
2018	5	Acidosis láctica (1 caso) Aumento de cuerpos cetónicos (2 casos) Derivados de la tirosina (tirosinemia) (1 caso) MSDU (1 caso)
2020	3	MSDU (1 caso) Acidosis láctica (2 casos)
2021	2	MSDU (paciente estudiado en dos ocasiones) (1 caso) Aciduria metilmalónica (1 caso)
TOTAL	11	

La negatividad obtenida en 3 de las 14 muestras estudiadas, estuvieron dadas porque las mismas no fueron extraídas del paciente en el momento de la descompensación metabólica o fase aguda, lo cual trajo consigo variaciones en las concentraciones de los metabolitos o marcadores bioquímicos y por consiguiente la obtención de resultados no significativos o falsos negativos para este tipo de análisis bioquímico.¹⁷

IV.CONCLUSIONES

La prueba química cualitativa del 2,4DNPH resultó ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos, diagnosticada en nuestro laboratorio. Esta prueba, caracterizada por su sencillez y fácil ejecución, permitió orientar el diagnóstico presuntivo de este grupo de enfermedades en función de la confirmación por técnicas mucho más especializada como la Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masas

REFERENCIAS

1. Ayman W, Hattab E. Inborn Errors of Metabolism. Clin. Perinatol. 2015 [31 de Mayo del 2022].(42) 412-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.010>.
2. Cabello J.F., Giugliani R. Errores Innatos del Metabolismo. Rev. Med. Clínica Las Condes. 2015 [15 de enero del 2022]. (4) 483-486. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.06.022>

3. Hoffman GF Selective screening for inborn errors of metabolism--past, present and future. *Eur J Pediatr*. 1994. [15 de enero del 2022].153: S2-8
4. Sanjurjo P., Baldellou A., Adalmiz-Echevarría K. Los errores congénitos del metabolismo como enfermedades raras con un planteamiento global específico. *Anales Sis San Navarra*. 2008 [31 de Mayo 2022]. (31) 63-98.
5. González-Lamuño D., Couce ML., Bueno MA., Aldámiz-Echevarría L. Cuando las enfermedades raras se convierten en algo urgente: los errores innatos del metabolismo en atención primaria. *Aten Primaria*. 2009 [31 de Mayo 2022] 41(4): 221–226. doi: [10.1016/j.aprim.2008.07.013](https://doi.org/10.1016/j.aprim.2008.07.013).
6. Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin Chem* . 2002[25 de marzo del 2022]48: 708-17.
7. Camayd I, Nuevas L., Álvarez A. Diagnóstico bioquímico de acidurias orgánicas en Cuba: periodo 2008-2013. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2015. [25 de febrero del 2022]. 49(2) . 209-214 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53541089004>
8. Mesa R. y colab. Pruebas bioquímicas para la detección de metabolitos producidos en los errores innatos del metabolismo. *IATREIA* . 2014 [25 de febrero del 2022] 27(4): 417-427.
9. Ganchala C. Propuesta de implementación de Pruebas Bioquímicas para Tamizaje de Errores Innatos del Metabolismo en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador 2017 – 2018. Trabajo de investigación presentado como requisito previo a la obtención del título de Bioquímica Clínica. Quito, 2018. [25 de marzo del 2022]
10. Cabrera N., Toledo A.M. Los estudios de pesquisa activa en Cuba. *Rev Cubana Salud Pública*. 2008 [31 de Mayo del 2022], 34 (1) [ISSN 1561-3127](https://doi.org/10.1016/j.rsc.2008.07.013)
11. Bermudez A.J., Valdés P. Técnicas de Tamisaje de Errores Congénitos del Metabolismo. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Salud de Colombia. 1988 [25 de marzo del 2022] 1(12) ISBN-958-13-0025-2
12. Gonzales-Lamuño D. y colab. El cribado metabólico del recién nacido como modelo asistencial de la medicina de precisión. Perspectiva desde la asociación española para el estudio de los Errores Innatos del Metabolismo. *Rev. Esp. Salud Pública*. 2021 [25 de marzo del 2022] 95, 1-17
13. Martínez S. Análogos de cetoácidos en pacientes con enfermedad renal crónica. 2021[31 de Mayo del 2022] 41(3) 227-366 DOI: [10.1016/j.nefro.2020.05.011](https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.05.011)
14. - Raimann E. Diagnóstico de errores innatos del metabolismo. *Rev Chil Pediatr*. 2008[25 de marzo del 2022] 79 (1): 92-95
15. Alvear, C., Barboza, M., Moneriz, C. Errores innatos del metabolismo: experiencia de trece años de estudio en Cartagena de Indias, Colombia. *Rev. Cien. Biom*. 2021[25 de marzo del 2022] 10(2), 98-108. <https://doi.org/10.32997/rcb-2021-3370>