

REVISIÓN

El laboratorio en el diagnóstico de las enfermedades metabólicas hereditarias. Impacto de las nuevas tecnologías



Celia Pérez-Cerdá* y Belén Pérez

Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, CIBER de Enfermedades Raras, IdiPaz, Madrid, España

Recibido el 25 de noviembre de 2014; aceptado el 8 de enero de 2015

Disponible en Internet el 13 de febrero de 2015

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico de laboratorio;
Enfermedades metabólicas hereditarias;
Espectrometría de masas;
Análisis de mutaciones;
Secuenciación masiva

KEYWORDS

Laboratory diagnosis;
Inherited metabolic diseases;
Mass spectrometry;
Mutation analysis;
Next generation sequencing

Resumen Las enfermedades metabólicas hereditarias son enfermedades mendelianas que agrupan a un colectivo de más de 600 patologías clasificadas en función de la vía metabólica alterada y su patogénesis. La mayoría se diagnostican posnatalmente tras el reconocimiento por parte del clínico de una serie de síntomas sugestivos de enfermedad. Los laboratorios de genética bioquímica y molecular están implicados en el reconocimiento de estas enfermedades ya que el análisis de metabolitos, proteínas y genes son claves para su diagnóstico. En este artículo se revisa cómo (abordaje) se diagnostican estas enfermedades y las técnicas bioquímicas y genéticas de laboratorio comúnmente utilizadas. Es en el ámbito de la identificación de metabolitos (espectrometría de masas) y detección de mutaciones (secuenciación masiva) donde el impacto de las nuevas tecnologías en estos últimos años ha sido espectacular, lo que ha facilitado el diagnóstico rápido y con pruebas poco invasivas y facilitará en el futuro el cribado poblacional.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

The impact of new technologies in the laboratory diagnosis of inherited metabolic diseases

Abstract Inherited metabolic diseases are a group of more than 600 diseases classified according to the altered metabolic pathway and their pathogenesis. Most are diagnosed postnatally after recognition by a number of clinical symptoms suggestive of disease. Laboratories of biochemical and molecular genetics are involved in the recognition of these diseases as the analysis of metabolites, proteins and genes are key for diagnosis. This article reviews how (approach) these diseases are diagnosed and the biochemical and genetic laboratory techniques commonly used.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: celia.perez@uam.es (C. Pérez-Cerdá).

It is in the area of identification of metabolites (mass spectrometry) and mutation detection (massive sequencing) where the impact of new technology in recent years has been spectacular, which facilitated rapid diagnosis with minimally invasive tests and will facilitate future population screening.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMH) son enfermedades mendelianas (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html), que agrupan a un colectivo de más de 600 patologías diferentes clasificadas en función de la vía metabólica alterada y su patogénesis. La mayor parte cumplen el criterio de enfermedad rara según la definición de la Unión Europea: *enfermedades raras, minoritarias, huérfanas o enfermedades poco frecuentes, incluidas las de origen genético, son aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica que tienen una prevalencia menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes*. Aunque individualmente son poco frecuentes, colectivamente son numerosas, contribuyendo de una forma muy significativa al número total de enfermos en la sociedad.

Las EMH se definen como trastornos genéticamente determinados en la síntesis y/o función de moléculas proteicas. Gran parte de estas proteínas son enzimas cuyo defecto da lugar a un bloqueo en la vía metabólica implicada y la consiguiente acumulación en fluidos corporales del sustrato de la reacción y otros metabolitos derivados. Este aumento no fisiológico de estos compuestos, en muchos casos tóxicos, así como la disminución del producto de la reacción, están implicados en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad¹.

La mayoría se heredan de forma autosómica recesiva, alrededor del 20% tienen herencia autosómica dominante, el 10% una herencia ligada al cromosoma X y una parte importante de las denominadas enfermedades mitocondriales tienen una herencia materna ya que afectan al ADN mitocondrial.

Recientemente, la Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism ha elaborado una clasificación de los EMH, agrupando las enfermedades en 15 grandes grupos, según afecten a moléculas sencillas del metabolismo intermedio o energético o a moléculas complejas localizadas en diferentes organelas celulares (tabla 1)².

Abordaje del diagnóstico de las EMH

La mayoría de las EMH se diagnostican *posnatalmente* tras el reconocimiento por parte del clínico de una serie de síntomas específicos y sugestivos de enfermedad metabólica. El comienzo puede ser a cualquier edad, aunque una gran parte de los pacientes presentan la enfermedad antes del año de vida. Suele comprometer a más de un sistema simultáneamente siendo el sistema nervioso central

el más comúnmente afectado. El diagnóstico exacto de la proteína/gen afectado, permite el acceso a opciones preventivas para la familia que deben darse a conocer a través del asesoramiento genético. Previo consentimiento informado al paciente o a los padres o tutores del paciente u otros miembros de la familia, se buscarían posibles miembros afectados todavía asintomáticos, sobre todo si pueden beneficiarse de un tratamiento precoz, se podría hacer el diagnóstico de *portadores* de la enfermedad entre familiares, y se aportaría información sobre el tipo de herencia, riesgo de recurrencia, pronóstico del curso clínico de la enfermedad (si se conoce) y opciones reproductivas (diagnóstico *prenatal* y preimplantacional). Existe una pequeña parte de las EMH (10%) y algunas endocrinopatías que pueden detectarse *presintómicamente* en los programas de cribado neonatal. El objetivo es identificar pacientes de pocos días de vida mediante pruebas analíticas poco costosas para intervenir precozmente y evitar, en lo posible, los efectos de la enfermedad.

Es en el ámbito de la identificación de metabolitos y detección de mutaciones donde el impacto de las nuevas tecnologías en estos últimos años ha sido espectacular, lo que ha facilitado el diagnóstico rápido y cada vez menos invasivo.

El laboratorio en el diagnóstico de las EMH

La mayoría de las EMH se diagnostican posnatalmente a partir de una sospecha diagnóstica realizada por el médico que reconoce una serie de síntomas y signos compatibles. Es conveniente un cribado clínico revisando los *algoritmos diagnósticos* de EMH en niños y adultos antes de iniciar investigaciones bioquímicas complicadas³. Es importante saber qué *tipo de muestra* es necesaria según la sospecha: sangre entera con anticoagulante, plasma o suero, orina de una micción o de 24 horas y líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuándo debe tomarse, de forma urgente ante el cuadro agudo y antes de iniciar tratamientos que interfieran y cómo debe conservarse (tabla 2). La sospecha clínica inicial de un EMH exige la realización de una serie de *estudios básicos* que pueden hacerse en el hospital (tabla 2). Con estos resultados se establece una estrategia diagnóstica en coordinación con el laboratorio de genética bioquímica, que realizará otros análisis más específicos (tabla 2), a ser posible en las mismas muestras en las que se realizaron las pruebas básicas.

Estudio de las vías metabólicas (metabolitos). La cuantificación de metabolitos en fluidos fisiológicos e identificación de un perfil metabólico concreto es, en muchos

Tabla 1 Clasificación de las EMHS según la SSIEM y enumeración de las más frecuentes o conocidas en cada grupo

Grupo de enfermedad	Enfermedad	GEN	OMIMGEN	
1.-Enfermedades del metabolismo de aminoácidos y péptidos (incluye aminoacidopatías, los defectos del ciclo de la urea, defectos en el transporte y las acidurias orgánicas)	Fenilcetonuria	PAH	261600	
	Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce	BCKDHA, BCKDHB	248600	
	Tirosinemia tipo 1	FAH	276700	
	Homocistinuria	CBS	236200	
	Def. ornitina transcarbamilasa	OTC	311250	
	Citrulinemia	ASS	215700	
	Hiperglicinemia no cetósica	GLDC	238300	
	Cistinuria	SLC3A1, SLC7A9	220100	
	Aciduria glutárica	GCDH	231670	
	Aciduria isovalérica	IVD	243500	
	Aciduria metilmalónica	MUT	251000	
2.-Enfermedades del metabolismo de carbohidratos	Aciduria propiónica	PCCA, PCCB	232000	
	Galactosemia clásica	GALT	230400	
	Acidosis láctica congénita por def. de piruvato carboxilasa			
	Def. fructosa 1,6 difosfatasa	PC	266150	
	Glucogenosis tipo Ia (Von Gierke)	FBP1	229700	
	Glucogenosis tipo V (McArdle)	G6PC PYGM	232200 232600	
	3.-Enfermedades del metabolismo de ácidos grasos y cuerpos cetónicos	Def. de carnitina palmitoiltransferasa 2	CPT2	255110
Def. acilCoA deshidrogenasa de cadena media		ACADM	201450	
Def. acilCoA deshidrogenasa de cadena muy larga		ACADVL	201475	
Def. de proteína trifuncional mitocondrial		HADHA, HADHB	143450	
Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica		HMGCS2	600234	
Def. de beta-cetotilasa		ACAT1	100678	
4.-Enfermedades del metabolismo energético	Def. del complejo piruvato deshidrogenasa E1 α	PDHA1	312170	
	Síndrome de Kearns-Sayre	DelecionesADNmt	530000	
	Síndrome de Melas	MutacionesADNmt	540000	
	Aciduria metilmalónica con encefalomiopatía	SUCLA2	612073	
	Síndrome de Leigh	SDHA, SURF1 y otros	256000	
	Def. de complejo I de cadena respiratoria con respuesta a riboflavina			
	Aciduria etilmalónica con encefalopatía	ACAD9	611126	
	Def. del transportador de creatina cerebral	ETFHE1 SLC6A8	602473 300352	
	5.-Enfermedades del metabolismo de purina, pirimidinas y otros nucleótidos	Enfermedad de Lesch-Nyhan	HPRT	308000
		Def. de adenilosuccinatoliasa	ADSL	103050
Xantínuria		XDH	278300	
Aciduria orótica		UMPS	258900	
Def. de dihidropirimidina deshidrogenasa		DPYD	274270	
6.-Enfermedades del metabolismo de esteroides	Def. de timidina fosforilasa (MNGIE)	TYMP	131222	
	Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	DHCR7	270400	
	Xantomatosis cerebrotendinosa	CYP27A1	213700	
7.- Enfermedades del metabolismo de la porfiria y grupo hemo	Porfiria aguda intermitente	HMBS	176000	
	Porfiria cutánea parda	UROD	176100	
	Protoporfiria eritropoyética	FECH	177000	
8.-Enfermedades del metabolismo de lípidos y lipoproteínas	Hipertrigliceridemia familiar	APOA5, LIPI	238600	
	Enfermedad de Tangier	ABCA	205400	
	Síndrome de Sjogren-Larsson	ALDH3A2	270200	
	9.-Defectos congénitos de glicosilación y otras enfermedades que afectan a la modificación proteica	Def. de fosfomanomutasa	PMM2	601785
Def. de fosfomanoisomerasa		MPI	602579	
Exostosis múltiple tipo I/II		EXT1/2	133701	
Cutis laxa por déficit de ATPasa V		ATP6V0A2	611716	

Tabla 1 (continuación)

Grupo de enfermedad	Enfermedad	GEN	OMIMGEN	
10.-Enfermedades lisosomales	Enfermedad de Sanfilippo A	SGSH	252099	
	Enfermedad de Morquio A	GALNS	253000	
	α -Manosidosis	MAN2B1	248500	
	Enfermedad de Gaucher	GBA	230800	
	Enfermedad de Fabry	GLA	301500	
	Enfermedad de Krabe	GALC	245200	
	Enfermedad de Niemann-Pick A o B	SMPD1	257200	
	Cistinosis	CTNS	219800	
	Enfermedad de Wolman	LIPA	278000	
	Enfermedad de Pompe	GAA	232300	
11.-Enfermedades peroxisomales	Adrenoleucodistrofia ligada al X	ABCD1	300100	
	Síndrome de Zellweger	PEX1 y otros	214100	
	Condrodisplasia rizomélicapunctata tipo 1	PEX7	215100	
	Enfermedad de Refsum	PHYH	266500	
12.-Enfermedades del metabolismo de neurotransmisores	Def. de tirosina hidroxilasa	TH	191290	
	Def. de succínico semialdehído deshidrogenasa	ALDH5A1	271980	
13.-Enfermedades del metabolismo de vitaminas y cofactores	Malabsorción hereditaria de folato	SLC46A1	229050	
	Def. de metilentetrahidrofolato reductasa	MTHFR	236250	
	Aciduriametilmalónica con homocistinuria		MMACHC	277400
			MMADHC	277410
			SLC19A2	249270
	Anemia megaloblástica con respuesta a tiamina			
	Def. de biotinidasa	BTD	253260	
	Epilepsia dependiente de piridoxina	ALDH7A1	266100	
	Def. del cofactor molibdeno A	MOCS1	603707	
	Def. de GTP ciclohidrolasa	GCH1	233910	
14.-Enfermedades del metabolismo de elementos traza y metales	Enfermedad de Menkes	ATP7A	309400	
	Enfermedad de Wilson	ATP7B	277900	
	Hemocromatosis hereditaria tipo 1	HFE	235200	
15.-Enfermedades del metabolismo de xenobióticos	Trimetilaminuria	FMO3	602079	

casos, diagnóstico de una EMH y en otros permite orientar una sospecha. Se utilizan diversas técnicas analíticas, fundamentalmente cromatografía y espectrometría de masas, cada una de ellas es específica para un grupo de metabolitos. Para valorar los resultados, es importante tener bien establecidos los intervalos control según edad y conocer edad, alimentación y medicación en el momento de la toma de la muestra al paciente. *La cromatografía de intercambio iónico* (CIO) es el método de elección para la separación y cuantificación de aminoácidos⁴. Está basado en la separación de los aminoácidos en función de su carga eléctrica en una columna de intercambio catiónico, elución de los mismos secuencialmente utilizando tampones de litio a diferentes pH y detección por colorimetría tiñendo con ninhidrina. Es una técnica muy reproducible y sensible. Todas las aminoacidopatías pueden diagnosticarse midiendo aminoácidos en fluidos biológicos (fig. 1A). El análisis de aminoácidos también se realiza para monitorización del tratamiento de numerosas EMH y se utiliza como marcador del estatus nutricional y de la funcionalidad de órganos como hígado, riñón, intestino etc... *La cromatografía líquida de alta resolución* (high performance liquid chromatography [HPLC]) es un método muy versátil, también basado en

la separación de metabolitos según sus propiedades físico-químicas. Se hace pasar las moléculas a través de una columna cromatográfica (fase estacionaria) bombeadas por un líquido o solvente (fase móvil) aplicando presión alta. El metabolito se identifica según su tiempo de retención y se detecta y cuantifica con distintos detectores. La detección electroquímica se utiliza en el análisis de neurotransmisores en LCR⁵, para el diagnóstico de, p.ej., las distonías con respuesta a dopa por defectos de tirosina hidroxilasa (síndrome de Segawa) o GTP ciclohidrolasa, que cursan con disminución de ácido homovanílico y/o ácido hidroxindolacético. Con el detector de fluorescencia se mide la homocisteína⁶ y las pterinas⁷, estos últimos metabolitos alterados en las hiperfenilalaninemias por defectos en la síntesis y regeneración del cofactor BH4 de la fenilalanina hidroxilasa. Para la cuantificación de purinas y pirimidinas se utiliza el detector diodearray (UV/visible)⁸ (fig. 1B).

La cromatografía de gases (gas chromatography [GC]) es la técnica de excelencia utilizada desde hace décadas para el análisis de ácidos orgánicos, moléculas en general volátiles de bajo peso molecular. En este caso, previamente al análisis en el cromatógrafo, las moléculas se derivatizan (habitualmente se forman trimetilsilil-derivados), y la

Tabla 2 Tipo de muestra, estudios bioquímicos básicos y específicos (metabolitos) y técnica utilizada en el diagnóstico de EMH grupo

Tipo de muestra	Estudios básicos	Estudios específicos	Técnica	Enfermedades
Sangre entera (EDTA o heparina) Conservar a t ^a ambiente Plasma Conservar a -20 ^a Suero Conservar -20 °C Eritrocitos Conservar a -20 °C	Hemograma	Aminoácidos	CIO	Amioacidopatías
	Gases y electrolitos			
	Anión Gap			
	Glucosa			
	Calcio, fosfato, magnesio			
	Transaminasas, CK			
	Coagulación			
	Colesterol			
	Triglicéridos, Ác. úrico			
	Lactato/piruvato			
	Cuerpos cetónicos			
		Ácidos grasos de cadena muy larga	GC/SIM/MS	Enfermedades peroxisomales
		Ácidos fitánico y pristánico	GC/SIM/MS	Enfermedades peroxisomales
		Esteroles	GC/SIM/MS	Defectos biosíntesis colesterol
		Plasmalógenos eritrocitarios	GC/FID	Enfermedades peroxisomales
	Carnitina y acilcarnitinas	ESI-MS/MS	Defectos β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos. Acidurias orgánicas	
	Ác. pipecólico	HPLC/ESI-MS/MS	Enfermedades peroxisomales y epilepsia dependiente de piridoxina	
	Coenzima Q	HPLC/APCI-MS/MS	Defectos biosíntesis de CoQ y enfermedades mitocondriales	
	Homocisteína	HPLC	Homocistinurias y defectos metabolismo folato	
	Catecolaminas	HPLC	Defectos metabolismo aminas biógenas	
	Piridoxal-P	HPLC	Epilepsia dependiente de piridoxina y de piridoxal-P	
	Tiamina y ésteres en sangre entera	HPLC	Defectos metabolismo tiamina	
	Galactosa	Espectrofotométrico	Galactosemias	
	Galactosa-1-P eritrocitaria	Espectrofotométrico	Galactosemias	
	Isoformas de transferrina (% CDT)	IEF y HPLC	Defectos N-glicosilación proteínas	
	Isoformas de ApoC3	IEF	Defectos O-glicosilación proteínas	
Orina				Aminoacidopatías
Aleatoria o fracción de 24 h	Olor y color especial	Aminoácidos	CIO	
Conservar a -20 °C	Glucosa			
	cuerpos reductores (clinitest)			
	Cuerpo cetónicos (comburtest)			
	Sulfitos (sulfitest)			
	pH			
	Urea			
	Ácido úrico			
	creatinina			

Tabla 2 (continuación)

Tipo de muestra	Estudios básicos	Estudios específicos	Técnica	Enfermedades
LCR Conservar -20 °C	Glucosa Lactato/piruvato	Ác. orgánicos	GC/MS	Acidurias orgánicas
		Succinilacetona	GC/MS	Tirosinemia tipo 1
		Galactitol y galactonato	GC/MS	Galactosemias
		Ác biliares	ESI-MS/MS	Defectos metabolismo ácidos biliares. Enfermedades peroxisomales
		Trimetilamina	ESI-MS/MS	Timetilaminuria
		Guanidinoacetato y creatina	ESI-MS/MS	Defectos metabolismo creatina
		D,L 2-OHglutarato	HPLC/ESI-MS/MS	Aciduria 2-OHglutáricas
		Ácido alfa-aminoadípico semialdehído	HPLC/ESI-MS/MS	Epilepsia dependiente de piridoxina
		Oligosacáridos	ESI-MS/MS	Oligosacaridurias
		Ác orótico y orotidina	HPLC	Defectos ciclo de la urea
		Purinas y pirimidinas	HPLC	Defectos metabolismo purinas y pirimidinas
		Pterinas	HPLC	Defectos metabolismo BH4
		Glicerol-P	GC-SIM-MS	Defecto fructosa 1,6 difosfatasa
		Glucosaminoglicanos	Espectrofotométrico	Mucopolisacaridosis
Aminoácidos	IEC	Aminoacidopatías		
		Piridoxal-P	HPLC	Epilepsia dependiente de piridoxina y de piridoxal-P
		Neurotransmisores	HPLC	Defectos de la neurotransmisión cerebral
		Pterinas	HPLC	Defectos metabolismo BH4 y de la neurotransmisión cerebral

elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte a través de la columna cromatográfica. Históricamente, el detector utilizado era un detector de ionización de llama (flame ionization detector), pero actualmente se utiliza el espectrómetro de masas. *La espectrometría de masas* (mass spectrometry [MS]) es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados. Así, el metabolito al entrar en el espectrómetro se ioniza y se fragmenta según sus características electroquímicas. El conjunto de fragmentos es único y por tanto identificativo de cada metabolito. La cuantificación se realiza por medio de calibradores con estándares internos. Con esta metodología (GC/MS) se identifican y cuantifican los ácidos orgánicos y otros compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular (aminoácidos, ácidos grasos, ácidos biliares...), biomarcadores de numerosísimas enfermedades que afectan al metabolismo intermediario, entre ellas las acidurias orgánicas (fig 1 C)⁹. Para incrementar la sensibilidad de detección se utiliza la monitorización selectiva de iones (selective ion monitoring), procedimiento utilizado, por ejemplo, en la cuantificación de los ácidos grasos de cadena muy larga para el diagnóstico de enfermedades peroxisomales¹⁰ (tabla 2).

Aunque la espectrometría de masas aplicada al diagnóstico de EMH se empezó a desarrollar en los años sesenta del siglo XX, ha sido a partir de la década de los 90 cuando hubo un avance extraordinario en el desarrollo de nuevas aplicaciones para el análisis de compuestos polares no volátiles de menor o mayor tamaño de forma rápida, utilizando poca cantidad de muestra e incluso en muestra de sangre y orina en papel, con apenas manipulación previa¹¹. La combinación del sistema de ionización de electrospray (electrospray ionization [ESI]) con la espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) es la utilizada para la medida de la concentración de acilcarnitinas (fig. 1D) y otros metabolitos. La separación de isómeros de acilcarnitinas o de ácidos orgánicos requiere una separación previa por cromatografía líquida (HPLC-ESI/MS/MS)¹². Otro sistema de ionización utilizado es la ionización química a presión atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization [APCI]) que en combinación con la cromatografía líquida (HPLC/APCI/MS/MS) se utiliza para medir el coenzima Q10¹³. Para el análisis de moléculas más grandes como péptidos, proteínas o glicoproteínas se han desarrollado otras técnicas como, por ejemplo, la que utiliza el sistema de ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization [MALDI]) junto con el analizador de tiempo de vuelo (time of flight [TOF]): MALDI/TOF/MS/MS, en el diagnóstico de

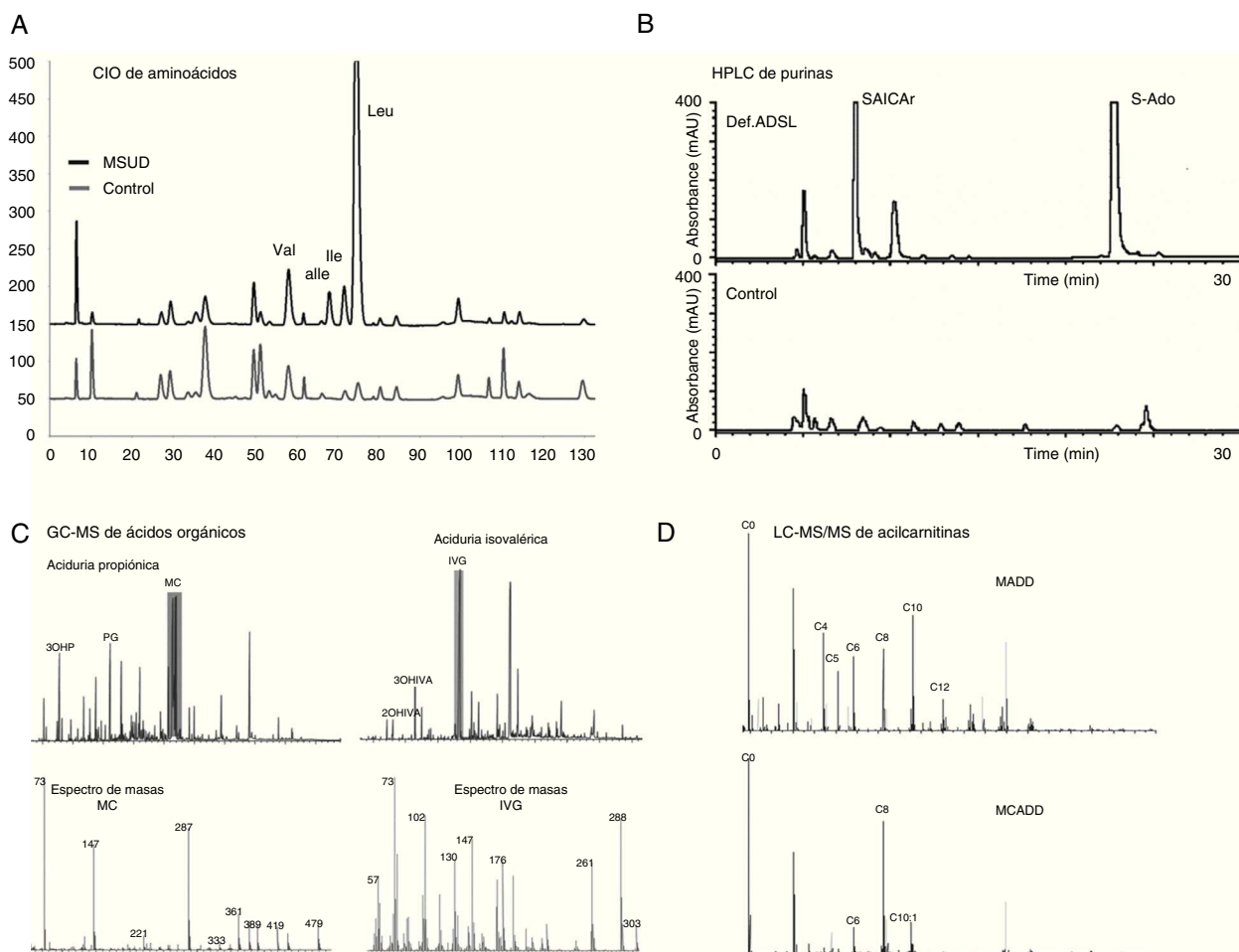


Figura 1 Ejemplos de cromatogramas diagnósticos de diferentes EMH. A) Cromatograma de aminoácidos en plasma por CIO de un paciente de jarabe de arce (MSUD), se observa el aumento de los aminoácidos marcadores de la enfermedad valina (Val), aloisoleucina (alle), isoleucina (Ile) y leucina (Leu). B) Cromatograma de purinas en líquido cefaloraquídeo (LCR) por HPLC de un paciente con deficiencia en adenilossuccinato liasa (ADSL), se observa el aumento de los metabolitos diagnósticos succinilaminoimidazol carboxamida ribósido (SAICAr) y succiniladenosina (S-ado). C) Cromatogramas y espectros de masas de ácidos orgánicos en orina por GC-MS de una aciduria propiónica, se observan los biomarcadores ácidos 3-hidroxipropiónico (3 OHP) y metilcítrico (MC) y la propionilglicina (PG) y el espectro de masas del MC; y de una aciduria isovalérica, se observan los metabolitos marcadores ácidos 2-hidroxiisovalérico (2 OHIVA) y 3-hidroxiisovalérico (3 OHIVA) e isovalerilglicina (IVG) y el espectro de masas de la IVG. D) Espectros de masas de acilcarnitinas en plasma por ESI-MS/MS de una deficiencia múltiple de acilCoA deshidrogenasa (MADD), se observa el perfil con aumentos de butirilcarnitina (C4), isovalerilcarnitina (C5), hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8), hexanoilcarnitina (C6), decanoilcarnitina (C10) y dodecanoilcarnitina (C12); y de una deficiencia de acilCoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD), con aumentos de C6, C8 y decenoilcarnitina (C10:1).

hemoglobinopatías¹⁴, defectos congénitos de glicosilación¹⁵ y diferentes enfermedades de depósito lisosomal¹⁶.

Los procedimientos diagnósticos basados en la determinación de metabolitos pueden dar resultados falsos negativos si la muestra no se ha tomado en el momento adecuado (descompensación metabólica), por ello es muy importante conocer cuándo y cómo se ha tomado y conservado la muestra, medicación, dieta, incluyendo suplementos alimenticios y vitaminas que se han administrado al paciente. Los resultados deben ser valorados en laboratorios expertos familiarizados en el estudio y diagnóstico de EMH.

Estudio del producto génico (enzimas y proteínas). El análisis de la proteína afectada a nivel de su función o de su expresión es, en muchos casos, importante bien como confirmación del resultado del análisis de metabolitos o

genético o bien cuando no existen metabolitos biomarcadores de la enfermedad. Para el estudio de la función proteica se necesitan células (linfocitos, fibroblastos de piel cultivados a partir de una biopsia de piel, eritrocitos, linfoblastos) o tejidos (biopsia hepática, muscular etc.). La actividad enzimática suele medirse incubando con el sustrato del enzima para medir disminución de sustrato o aparición de producto por técnicas espectrofotométricas o radiactivas. Así se confirma la actividad propionilCoA carboxilasa deficiente en pacientes con aciduria propiónica, utilizando $^{14}\text{CO}_3\text{H}$, uno de los sustratos de la carboxilación del metilmalonilCoA¹⁷. Las células cultivadas, fundamentalmente fibroblastos de piel y linfoblastos, permiten realizar ensayos *in vitro* (incorporación de aminoácidos, oxidación de sustratos), para determinar la función de una vía metabólica completa,

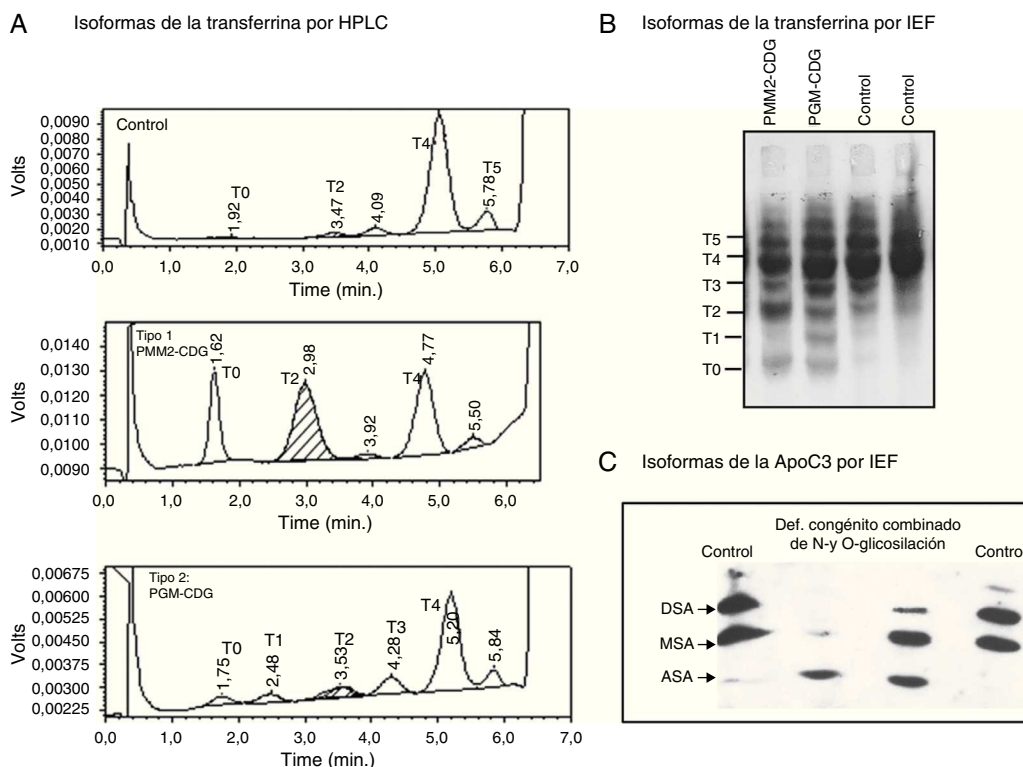


Figura 2 Análisis de las isoformas de la N-glicoproteína transferrina y de la O-glicoproteína lipoproteína apoC3 en suero para la detección de defectos congénitos de glicosilación. A) Perfil de las isoformas de la transferrina separadas y cuantificadas por HPLC-Variant. La isoforma mayoritaria en suero control es la tetrasialilada (T4); se observa un perfil alterado tipo 1, en un paciente con PMM2-CDG, con aumentos de las isoformas hipoglicosiladas: asialilada (T0) y disialilada (T2) y de tipo 2 en un paciente con PGM-CDG, en donde se observan aumentos de las isoformas: asialilada (T0), monosialilada (T1), disialilada (T2) y trisialilada (T3). En ambos casos se observa la disminución de la isoforma mayoritaria T4. B) Análisis por isoelectroenfoque de la transferrina, en este caso las isoformas se separan por su punto isoelectrico en gradiente de pH. Se observan las bandas patológicas en los pacientes con PMM2-CDG (T0 y T2) y PGM-CDG (T0, T1, T2 y T3, respectivamente). C) Análisis por isoelectroenfoque de la apoC3, las isoformas también se separan en función de su punto isoelectrico en un gradiente de pH. Los carriles centrales corresponden a dos pacientes con un defecto combinado en la N- y O-glicosilación de proteínas. En un caso se observa aumento de la isoforma asialilada (ASA) y desaparición de las bandas correspondientes a las formas disialilada (DSA) y monosialilada (MSA) y en el otro aumento de la isoforma MSA y fuerte disminución de la DSA de la apoC3.

como por ejemplo la oxidación de ^{14}C -propionato para el análisis de funcionalidad de la vía del propionato en el diagnóstico de las acidurias metilmalónicas¹⁸, de la ^{14}C -leucina en el diagnóstico de la enfermedad jarabe de arce y del ^{14}C -piruvato, para los defectos del complejo piruvato deshidrogenasa y en general, de la función energética mitocondrial. En las enfermedades causadas por un defecto en la glicosilación de proteínas, el análisis en suero de las isoformas de la transferrina, proteína N-glicosilada transportadora de hierro, y de la lipoproteína O-glicosilada ApoC3 se utiliza para orientar junto con la sintomatología clínica el análisis genético. Su concentración en sangre puede ser normal, sin embargo están deficientemente glicosiladas, lo que se traduce en un cambio del perfil de sus isoformas (fig. 2)¹⁹.

Estudio genético (genes). La confirmación genética de las EMH se lleva a cabo en los laboratorios especializados de genética molecular mediante el análisis de mutaciones del gen correspondiente.

El defecto primario en una EMH es una alteración en la secuencia nucleotídica del ADN que determina la secuencia de aminoácidos de una proteína. La secuencia de

nucleótidos del ADN mediante un proceso llamado transcripción genera una cadena de ARN, que se procesa (splicing) para dar lugar al ARN mensajero (ARNm), que se traduce (proceso de traducción) en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Finalmente, la proteína es sometida a una serie de modificaciones postraduccionales (fosforilación, glicosilación, etc.) para ser plenamente funcional.

Básicamente, el diagnóstico genético consiste en buscar mutaciones potencialmente patogénicas del gen afectado en material genético (ADN o ARN) del paciente. La muestra a analizar puede ser sangre con anticoagulante (EDTA), sangre seca impregnada en papel de filtro, tejidos como biopsia de hígado o muscular, fibroblastos de piel cultivados, biopsia corial o amniocitos para los estudios prenatales, etc. . . Las mutaciones pueden afectar a secuencias reguladoras alterando su expresión, secuencias exónicas, alterando la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica, o a regiones intrónicas, que en general afectan al procesamiento (splicing) del ARNm. En la secuencia nucleotídica puede haber mutaciones puntuales que afectan a un solo nucleótido, deleciones o inserciones que afectan a

Tabla 3 Tipo de mutaciones y nomenclatura

Efecto en la proteína	Cambio nucleotídico
De cambio de sentido (missense)	
p.Gly631Arg	c.1891G>C
Sin sentido (nonsense)	
p.Arg313Ter	c.937C>T
Inserción/duplicación	
p.Leu308Phefs*35	c.923dupT
Delección	
p.His140Leufs*44	c.419delA
Mutación en el procesamiento de ARNm (splicing)	
p.Val681_Thr706del26	c.2041-2A>G (IVS22-2A>G); delección exon 23
p.Thr62_Ser100del39	c.231+1G>C (IVS3+1G>C); delección exon 3-4
p.Val429Phefs*6	c.1285-1416A>G; inserción 84 pb
Gran delección	
p.Val681_Thr706del26	c.2041-2824_c.2118+987del3889; incluye delección exon23

Ejemplos de mutaciones descritas en el gen PCCA (NM_000282.3), que causan aciduria propiónica.

uno o unos pocos nucleótidos y grandes reordenamientos genómicos, es decir delecciones, duplicaciones o inversiones que pueden afectar a uno o más genes. Según su efecto en la proteína, las mutaciones se clasifican como de cambio de sentido (missense) cuando cambia un aminoácido por otro, de cambio sin sentido (nonsense) cuando un aminoácido cambia por un codón de parada de la traducción. En el caso de pequeñas delecciones o inserciones de nucleótidos, estas pueden ser en fase de lectura si la delección es de tres o múltiplo de tres nucleótidos, eliminándose o insertándose aminoácidos o bien puede producir un cambio en la fase de lectura (frameshift), dando lugar a un codón de parada prematuro (tabla 3). Las mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm se denominan mutaciones de splicing, y son causadas por mutaciones puntuales, delecciones o inserciones bien en la secuencia conservada donadora y aceptora de splicing, localizadas en la unión exón-intrón o bien en secuencias exónicas o intrónicas menos conservadas que están implicadas en la regulación del proceso de splicing. El efecto es la generación de transcritos aberrantes portadores de delecciones de secuencias exónicas completas o parciales o inserciones de secuencias intrónicas (pseudogen), transcritos que si son traducidos, dan lugar, en general a proteínas truncadas debido a cambios en la fase de lectura (tabla 3). En la base de datos Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org; HGMD) están tabuladas las mutaciones descritas en los genes humanos de las EMH²⁰.

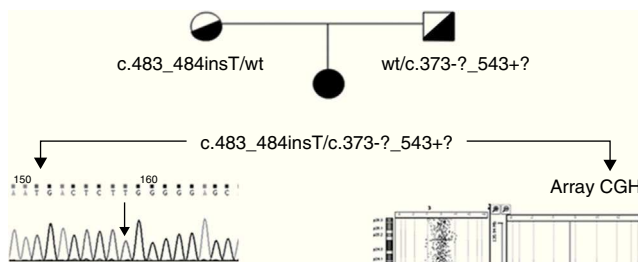
El conocimiento de las mutaciones en los afectos de una determinada EMH es de gran utilidad para la búsqueda de una posible correlación genotipo/fenotipo clínico y bioquímico, para establecer la condición de portador de la enfermedad de otros miembros de la familia, para ofrecer un diagnóstico prenatal rápido y fiable y consejo genético; por último, en términos epidemiológicos, para obtener información sobre frecuencia de alelos mutados y su distribución geográfica y poblacional. Además, en los últimos años, el conocimiento de la naturaleza de la mutación y su efecto está permitiendo el desarrollo de tratamientos personalizados basados en el genotipo del paciente^{21,22}.

Técnicas convencionales de diagnóstico genético

El desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en 1986 por Kary Mullis²³, supuso un hito en el diagnóstico de enfermedades genéticas, ya que mediante esta técnica se amplifica hasta 10⁹ veces una región de copia única del genoma partiendo de ADN genómico (ADNg), obteniéndose así grandes cantidades de la secuencia a analizar. Para el análisis de mutaciones de un gen, básicamente, a partir del ADNg se amplifican en la reacción en cadena de la polimerasa por separado los exones del gen seleccionado junto con sus secuencias intrónicas flanqueantes, que incluyen las secuenciasceptoras y donadoras de splicing o se amplifica el ADN complementario (ADNc), obtenido por retrotranscripción con la enzima transcriptasa en reverso utilizando como sustrato el ARNm. Tras la purificación de los fragmentos obtenidos, se someten a las reacciones de secuenciación mediante el método enzimático de terminación de cadena de ADN por incorporación de dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs), método de *secuenciación de Sanger*²⁴, posterior separación en aparatos de electroforesis capilar y detección fluorimétrica (fig. 3A). El análisis partiendo de ARNm es más rápido, ya que de este modo se analizan todos los exones codificantes a la vez en uno o dos fragmentos. Además analizando el ADNc se detectan con mayor facilidad los errores en el procesamiento del ARNm.

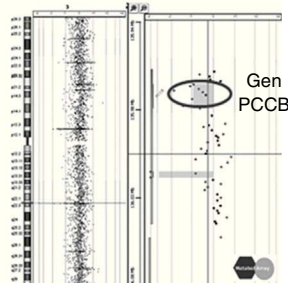
Existen otras técnicas para el análisis de reordenamientos genómicos, que detectan grandes delecciones, inserciones, duplicaciones y disomías uniparentales. La *técnica de multiplex-ligation dependent probe amplification*, se basa en la hibridación con sondas específicas para los exones del gen que se va a analizar, regiones que posteriormente se ligan, amplifican, se separan por electroforesis capilar y detectan por fluorescencia. Las delecciones se identifican por disminución o ausencia del pico correspondiente al exón o grupo de exones deleccionados. Es una técnica complementaria a la secuenciación estándar ya que hay genes en los que se producen delecciones con frecuencia

A Detección de una mutación puntual con secuenciación estándar de sanger.



B Detección de una gran deleción con un array CGH

Gran deleción en heterocigosis
g.135976819-135989453 (hg19)
de 12634 pb



C Detección de una disomía uniparental con un array de SNPs

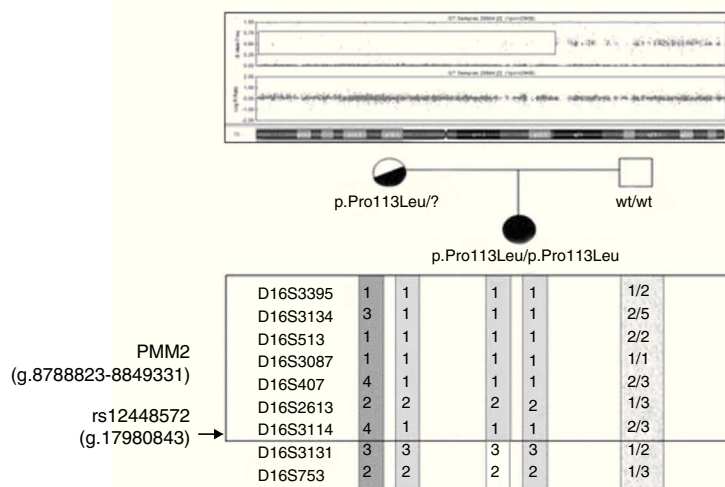


Figura 3 A) Secuenciación convencional Sanger del exón 5 del gen PCCB de una muestra de ADN de un paciente con acidemia propiónica. Se observa la inserción de una T entre las posiciones 483 y 484 del cDNA en homocigosis que dará lugar a un cambio en la fase de lectura y a la aparición de un codón de terminación prematura. Esta mutación se encuentra en el alelo materno. B) El análisis de la segregación mendeliana evidenció la posible presencia de una deleción que fue detectada en el alelo paterno mediante hibridación genómica comparada (aCGH metaboloarray®). Se observa una deleción de 12,6 Mb, se indican las coordenadas genómicas, en el cromosoma 3 que incluye parte del gen PCCB. C) Detección de una isodisomía uniparental segmental materna de la región del cromosoma 16 donde se localiza el gen PMM2, en un paciente con un defecto congénito de glicosilación. En el array de SNP se observa la pérdida de heterocigosis que se confirma mediante el estudio de microsatélites, lo que resulta en la homocigosidad para la mutación patológica p.Pro113Leu en el caso del índice, siendo el padre no portador de la misma.

(genes OTC, GLDC, PCCA etc...) ²⁵. Las técnicas basadas en arrays son muy versátiles y permiten el análisis de todo el genoma y en varias muestras a la vez. En el caso del array de hibridación genómica comparada (array-CGH), se identifican pérdidas o ganancia de material genético en la muestra de ADN del paciente cuando se compara con una muestra de ADN referencia. Básicamente, se marcan con diferentes fluoróforos el genoma del paciente y del control, se hibrida con el array de oligos de las regiones seleccionadas y se compara la fluorescencia unida a la región seleccionada lo que permite detectar deleciones (pérdida) o duplicaciones (ganancia), (fig. 3B). En los arrays de SNP (polimorfismos de

solo nucleótido), se analizan hasta 10^6 SNP del genoma; se utilizan en estudios de ligamiento, mapeo de homocigosidad y detección de disomías uniparentales, alteración genética producida cuando se heredan dos cromosomas o segmentos de un cromosoma del mismo progenitor, lo que da lugar a que aparezca una mutación recesiva en homocigosidad cuando uno de los progenitores no es portador de la misma (fig. 3C) ²⁶.

Por último, existen otras técnicas de rastreo de mutaciones, hoy ya prácticamente en desuso. Las técnicas basadas en el distinto comportamiento electroforético de fragmentos de ADN según su secuencia en geles desnaturizantes o *electroforesis en gel con gradiente desnaturizante*

(Denaturing gradient gel electrophoresis) o en geles no desnaturizantes (*single-stranded conformational polymorphism*), permiten detectar el fragmento de ADN que contiene la mutación. Otro método de rastreo más actual es el *high resolution melting*, basado en las diferentes temperatura de melting (temperatura a la cual se separan las dos cadenas de ADN), de un fragmento de ADN que contiene una mutación con respecto al fragmento control. Con cualquiera de estas técnicas, se requiere posteriormente la secuenciación estándar (Sanger) del fragmento seleccionado para precisar la mutación específica.

Para un correcto asesoramiento genético en todos los casos es imprescindible el análisis de la segregación mendeliana en muestras de los padres, para confirmar la presencia de las mutaciones en alelos diferentes en el caso de enfermedades de herencia autosómica recesiva, para detectar posibles deleciones o disomías uniparentales en los casos en los que se haya detectado la mutación en homocigosis y para poder identificar mutaciones *de novo* en enfermedades autosómicas dominantes o ligadas al cromosoma X.

Cribado neonatal de los EMH por tándem masas (MS/MS)

El cribado neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas es una actividad esencial dentro de la salud pública y tiene como objetivo la detección presintomática de estas enfermedades mediante pruebas que puedan aplicarse a toda la población de recién nacidos, de manera que la intervención médica a tiempo reduzca la morbilidad, mortalidad y las posibles discapacidades asociadas a dichas enfermedades. Ya hace 50 años se inició el cribado masivo en recién nacidos de la fenilcetonuria o deficiencia del enzima fenilalanina hidroxilasa, que si no es diagnosticada y tratada precozmente, produce retraso mental grave y otras secuelas neurológicas. El método utilizado estaba basado en un sistema de inhibición bacteriana utilizando sangre seca impregnada en papel de filtro que se toma del talón de los recién nacidos²⁷. A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes técnicas analíticas para el cribado de diferentes EMH, cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, fluorometría, colorimetría, radioinmunoensayo etc. Actualmente, la combinación del sistema de ionización ESI con la espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) es la técnica utilizada para la medida de la concentración de aminoácidos y acilcarnitinas en los programas de cribado neonatal ampliados de todo el mundo²⁸. De manera que se detectan un importante número de EMH que afectan al metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos y de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos. Los aminoácidos y las acilcarnitinas se extraen de la muestra en papel y se analizan bien derivatizándose mediante butilación (formación de butil-ésteres) que favorece la ionización o bien sin derivatizar. La mayoría de los aminoácidos tienen la característica de perder un fragmento neutro de 102 Da al chocar con las moléculas del gas en el interior del espectrómetro, generándose un perfil de fragmentos reproducible (NL102). Los aminoácidos básicos solo se pueden analizar mediante el método de «medida de múltiples iones» (multiple reaction monitoring), basado en la selección del fragmento característico de cada uno

de ellos. También las acilcarnitinas tienen la característica común de perder un fragmento de masas de 85 Da de carga positiva cuando se someten a los choques moleculares dentro del espectrómetro (PS85), obteniéndose un espectro de masas que cubre las acilcarnitinas desde 2 (C2) hasta 20 átomos de carbono (C20). La mayoría de los programas de cribado actuales utilizan la combinación de ensayo de NL102 para aminoácidos, de multiple reaction monitoring para aminoácidos básicos y PS85 para la carnitina y acilcarnitinas de forma secuencial.

En la actualidad, no existe aún un consenso sobre el número de patologías que deben cribarse. La comisión Europea elaboró un informe publicado en 2012, en el que se pone de manifiesto las diferencias existentes entre países e incluso entre regiones del mismo país^{29,30}. En el año 2006, el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud bajo la coordinación del Ministerio de Sanidad y Asuntos Sociales, elaboró un informe analizando la situación de las actividades del cribado neonatal en las diferentes CC.AA. españolas. En las conclusiones se recomienda una revisión interna de los programas de cribado que garantice el acceso a las mismas detecciones independientemente del lugar de nacimiento del recién nacido (equidad), e insta a la creación de un grupo de trabajo de expertos que definan los criterios a utilizar para incorporar nuevas patologías a cribar y cuáles han de ser estas patologías. Con este motivo, se elaboró un documento en el que se reformulan estos criterios y se hace una valoración de las patologías en base a su importancia en la literatura científica, proponiéndose un panel de 24 enfermedades endocrinas y metabólicas recomendables para cribar (tabla 4)³¹. El 23 de julio de 2013 se aprobó en el Pleno del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud la relación de enfermedades que formarán parte del programa de cribado neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas del Sistema Nacional de Salud: hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria, fibrosis quística, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD), deficiencia de 3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHADD), acidemia glutárica tipo I (GA-I) y anemia falciforme.

Diagnóstico genético de los EMH por secuenciación masiva

La tecnología de la secuenciación masiva del ADN con los equipos de secuenciación de nueva generación (next generation sequencing) permite la secuenciación del genoma completo o del exoma celular (suma de los exones o regiones codificantes más regiones intrónicas adyacentes) de forma cada vez más rápida y eficaz y está suponiendo un avance sin precedentes en la elucidación de las bases moleculares de miles de enfermedades genéticas, entre ellas las EMH. En el mercado existen diferentes instrumentos para la secuenciación masiva, pero para todos se utiliza un esquema de trabajo similar. Se requiere la fragmentación del ADN y amplificación clonal masiva de los fragmentos generados seguida de bien pirosecuenciación (plataforma Roche 454/FLX), bien secuenciación por síntesis (plataforma Illumina) o bien secuenciación en una reacción de ligación (plataforma SOLID)³². Tras la generación de librerías clonales, se alinean las miles de secuencias

Tabla 4 Patologías recomendables para introducir en los programas de cribado neonatal y metabolito marcador

Aminoacidopatía	Metabolito marcador
Hiperfenilalaninemia/fenilcetonuria	Aumento de fenilalanina (Phe) y cociente Phe/Tyr
Defectos en la metabolismo de BH4	Aumento de fenilalanina (Phe) y cociente Phe/Tyr
Enfermedad de la orina con olor a Jarabe de arce	Aumento de leucina + isoleucina (Leu + Ile) y valina (Val)
Tirosinemia tipo 1	Aumento de succinilacetona (SA) y tirosina (Tyr)
Homocistinurias	Aumento de metionina (Met) y homocisteína (Hcys)
<i>Defectos en la β-oxidación de ácidos grasos</i>	
Def. de acilCoA deshidrogenasa de cadena media	Aumento de octanoilcarnitina (C8), hexanoilcarnitina (C6), decanoilcarnitina (C10), decenoilcarnitina (C10:1) y cociente C8/C10
Def. primaria de carnitina	Disminución de carnitina libre (C0)
Def. 3-hidroxiacilCoA deshidrogenasa de cadena larga	Aumento de 3-OH palmitoilcarnitina (C16OH), 3-OH palmitoleilcarnitina (C16:1-OH), 3-OH oleilcarnitina (C18:1-OH), 3-OH estearoilcarnitina (C18-OH) y cociente C16-OH/C16
Def. acilCoA deshidrogenasa de cadena muy larga	Aumento de miristoleilcarnitina (C14:1), miristoilcarnitina (C14), miristodienoilcarnitina (C14:2) y cociente C14:1/C16
Def carnitina palmitoil transferasa 1	Aumento de C0; disminución de palmitoilcarnitina (C16) y estearilcarnitina (C18) y aumento del cociente C0/(C16 + C18)
Def. carnitina palmitoil transferasa 2	Aumento de C16, C18, oleilcarnitina (C18:1) y linoleilcarnitina (C18:2)
Def carnitina/acilcarnitina translocasa	Aumento de C16, C18, C18:1 y C18:2
<i>Acidemias orgánicas</i>	
Aciduria glutárica	Aumento de glutarilcarnitina (C5-DC) y del cociente C5-DC/C16
Aciduria isovalérica	Aumento de isovalerilcarnitina (C5)
Acidurias metilmalónicas (MUT, CblA, CblB, CblC, CblD)	Aumento de propionil-carnitina (C3) y cocientes C3/C2 (acetilcarnitina) y C3/C16
Acidemia propiónica	Aumento de C3 y cocientes C3/C2 y C3/C16
Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica	Aumento 3-hidroxi-isovalerilcarnitina (C5OH) y 3-metilglutarilcarnitina (C6DC)
Def. beta cetotilasa	Aumento de 2-metil-3-hidroxi-butirilcarnitina o 3-hidroxi-isovalerilcarnitina (C5OH) y tiglilcarnitina (C5:1)
<i>Otras enfermedades endocrino-metabólicas</i>	
Hipotiroidismo congénito	Aumento de tirotrópina (TSH) y disminución de tiroxina (T4)
Hemoglobinopatías	Alteración en la movilidad electroforética de hemoglobina S y (Hb A, F, A2, S, C, E y D)
Fibrosis quística	Aumento de la tripsina inmunorreactiva (IRT); análisis de mutaciones en el gen <i>CFTR</i>
Galactosemia	Aumento de galactosa-1-fosfato; disminución de actividad Galactosa-1-P uridiltransferasa (GALT)
Deficiencia biotinidasa	Disminución de actividad biotinidasa

generadas con la secuencia del genoma humano de referencia. La gran cantidad de variantes detectadas se filtran por una serie de programas informáticos hasta determinar cuáles podrían ser las variantes causantes de enfermedad. Básicamente, se analiza su presencia o no en bases de datos de polimorfismos (dbSNP, db 1000 genomas, EVS, db del laboratorio) y de mutaciones ya descritas [HMGD]), se analiza su efecto funcional sobre la proteína, siendo buenas candidatas las variantes de cambio de sentido, pequeñas duplicaciones o inserciones que afectan a la fase de lectura (generan frameshifts o codones de parada de la traducción) o que afectan a las regiones conservadas del procesamiento del ARNm. Las variantes de cambio aminoacídico (missense) se evalúan mediante análisis estructural en programas bioinformáticos (SIFT, polyphen2 etc.), que predicen su efecto patogénico sobre la proteína

(fig. 4). En todos los casos, las mutaciones se confirman analizando la segregación mendeliana en ADN de los padres mediante la secuenciación de Sanger. La secuenciación masiva del exoma se está utilizando en la práctica clínica, en algunos casos mediante la estrategia de paneles para grupos de EMH clínicamente definidos pero con gran heterogeneidad genética, como por ejemplo las enfermedades mitocondriales³³ o los defectos congénitos de glicosilación³⁴.

Elaboración de informes de laboratorio

El ESHG Quality Committee ha publicado muy recientemente unas recomendaciones para la elaboración de informes en un intento de armonizar su presentación en Europa y países vecinos³⁵. El informe es un documento médico emitido desde el laboratorio al clínico que envía las muestras en

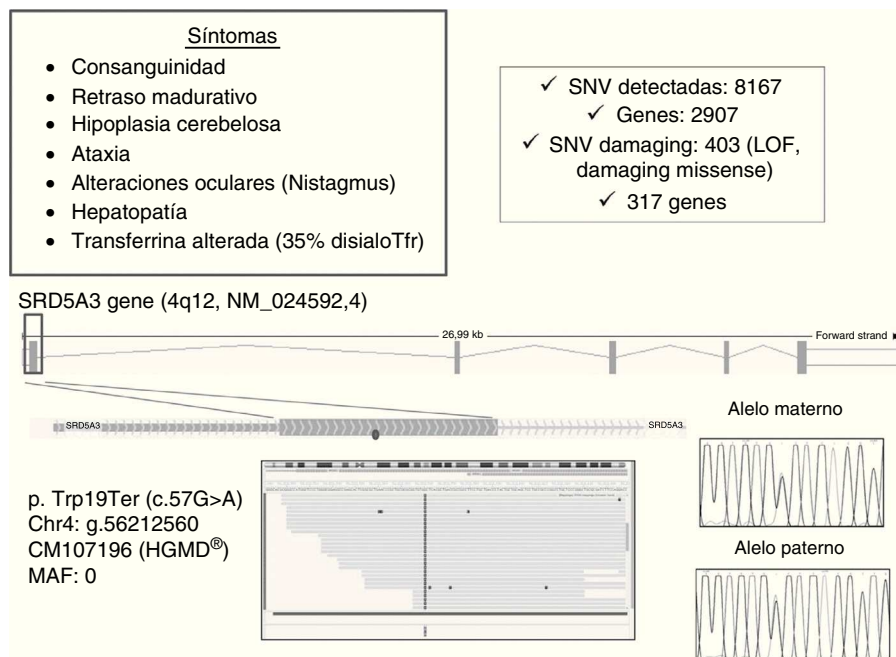


Figura 4 Estudio genético en un caso con sospecha clínica y bioquímica de un defecto congénito de glicosilación. Se analizó el ADN del paciente utilizando el panel de genes TrusightOne, para el análisis del exoma de 4800 genes del OMIM relacionados con enfermedad. Tras la captura y secuenciación de los fragmentos en un Myseq, se alinearon las secuencias y se detectaron 403 variaciones de un solo nucleótido (SNV-single nucleotide variation) patogénicas, de las cuales una (c.57G > A) se encontraba en la región codificante del gen SRD5A3 en homocigosis. Este cambio tiene un efecto presumiblemente severo, ya que da lugar a un codón de parada prematuro (p.Trp19Ter). La presencia de la mutación en homocigosis se confirmó en muestras de los padres por secuenciación Sanger.

las que se refieren los resultados interpretados de las pruebas bioquímicas y genéticas realizadas al paciente. Debe ser claro, conciso, preciso e interpretativo, con el objetivo último de proporcionar respuestas útiles para el diagnóstico del paciente.

Conclusión

La implementación de los dos avances tecnológicos más interesantes de los últimos años, la espectrometría de masas para el análisis de metabolitos y proteínas, y la secuenciación masiva en el análisis del ADN, han tenido y van a seguir teniendo un gran impacto sobre el modo de diagnosticar las EMH. Tanto para el cribado de población asintomática (neonatal) como para el de la sintomática, la espectrometría de masas tiene un gran potencial en el desarrollo de métodos muy sensibles para la identificación y cuantificación de metabolitos (metaboloma)³⁶ o proteínas (proteoma)³⁷ en muestras humanas no invasivas³⁸. Por otro lado, los métodos para la secuenciación masiva del genoma y del exoma son cada vez más económicos y rápidos en la obtención de resultados y parece inevitable en un futuro no muy lejano su aplicación en el diagnóstico prenatal³⁹ o en el cribado de población asintomática. Aunque en este caso, todavía quedan numerosas cuestiones prácticas y éticas que resolver, especialmente las que se derivan de la necesidad de la aceptación por parte del paciente o de sus padres de un consentimiento informado complejo, y del manejo de numerosos datos genéticos, algunos de ellos de significado incierto⁴⁰. La identificación de portadores de enfermedades

graves y la detección en un recién nacido de mutaciones relacionadas con enfermedad o riesgo de enfermedad de comienzo en la edad adulta requerirán un buen asesoramiento genético⁴¹.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todo el personal científico, técnico y administrativo del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid, su excelente trabajo durante estos años, muy especialmente a su directora, la Profesora Magdalena Ugarte. También agradecen a Rosa Navarrete la composición de las figuras de este trabajo.

Bibliografía

1. Scriver CR. *Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'inborn errors of metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008.* *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:580–98.
2. Zschocke J. *SSIEM Classification of inborn errors of metabolism.* En: *Enad Blau, Marinus Duran K, Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, editores. Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases.* Heidelberg: Springer;2014.

3. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:261–74.
4. Mayne PD, Roche G, Deverell D. Amino acids: analytical aspects. *J Inher Metab Dis*. 2001;24:305–8.
5. Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Fernandez Y, Fernandez-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;142:153–8.
6. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem*. 1997;43:690–2.
7. Fukushima T, Nixon JC. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem*. 1980;102:176–88.
8. Castro M, Carrillo R, Garcia F, Sanz P, Ferrer I, Ruiz-Sala P, et al. Thirteen years experience with selective screening for disorders in purine and pyrimidine metabolism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014;33:233–40.
9. Sweetman L. Organic acid analysis. En: Hommes FA, editor. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics*. Nueva York: Wiley-Liss; 1991. p. 143–76.
10. Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev*. 2003;25:481–7.
11. Roschinger W, Olgemoller B, Fingerhut R, Liebl B, Roscher AA. Advances in analytical mass spectrometry to improve screening for inherited metabolic diseases. *Eur J Pediatr*. 2003;162 Suppl 1:S67–76.
12. Ferrer I, Ruiz-Sala P, Vicente Y, Merinero B, Perez-Cerda C, Ugarte M. Separation and identification of plasma short-chain acylcarnitine isomers by HPLC/MS/MS for the differential diagnosis of fatty acid oxidation defects and organic acidemias. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;860:121–6.
13. Barshop BA, Gangoiti JA. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion*. 2007;7 Suppl.:S89–93.
14. Kiernan UA, Black JA, Williams P, Nelson RW. High-throughput analysis of hemoglobin from neonates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem*. 2002;48:947–9.
15. Sturiale L, Barone R, Palmigiano A, Ndosimao CN, Briones P, Adamowicz M, et al. Multiplexed glycoproteomic analysis of glycosylation disorders by sequential yolk immunoglobulins immunoseparation and MALDI-TOF MS. *Proteomics*. 2008;8:3822–32.
16. Faid V, Michalski JC, Morelle W. A mass spectrometric strategy for profiling glycoproteinoses, Pompe disease, and sialic acid storage diseases. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2:528–42.
17. Perez-Cerda C, Merinero B, Rodriguez-Pombo P, Perez B, Desviat LR, Muro S, et al. Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidemia patients. *Eur J Hum Genet*. 2000;8:187–94.
18. Merinero B, Perez B, Palmigiano A, Rincon A, Desviat LR, Martinez MA, et al. Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to mut, cblA or cblB complementation group. *J Inher Metab Dis*. 2008;31:55–66.
19. Perez-Cerda C, Quelhas D, Vega AI, 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.
20. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The human gene mutation database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014;133:1–9.
21. Vega AI, Perez-Cerda C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Perez 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.
22. Jorge-Finnigan A, Brasil S, Underhaug J, Ruiz-Sala P, Merinero B, Banerjee R, et al. Pharmacological chaperones as a potential therapeutic option in methylmalonic aciduria cblB type. *Hum Mol Genet*. 2013;22:3680–9.
23. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263–73.
24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463–7.
25. Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Perez B, Perez-Cerda C, Navarrete R, Vijzelaar R, et al. High frequency of large genomic deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia. *Mol Genet Metab*. 2009;96:171–6.
26. Perez B, Nevado J, Lapunzina P, Gallego L, Perez-Cerda C, Merinero B, et al. Segmental uniparental disomy leading to homozygosity for a pathogenic mutation in three recessive metabolic diseases. *Mol Genet Metab*. 2012;105:270–1.
27. Guthrie R, Whitney M. Phenylketonuria detection in the newborn infant as a routine hospital procedure. Publication 419. Washington, DC: U.S. Department of Health, Education, and Welfare (HHS); 1964.
28. Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res*. 1995;38:324–31.
29. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, Rupp K, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization Part 1. From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis*. 2012;35:603–11.
30. Burgard P, Rupp K, Lindner M, Haegi G, Rigter T, Weinreich SS, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization Part 2. From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *J Inher Metab Dis*. 2012;35:613–25.
31. Marín J, Aldamiz L, Castiñeiras D, Dalmau Serra J, Fernández Sánchez A, González Lamuño D, et al. Programas de cribado neonatal en España: actualización y propuestas de futuro. Documento de consenso. Real Patronato sobre discapacidad, Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España. Madrid: Editorial Polibea; 2010.
32. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387–402.
33. Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion*. 2013;13:379–87.
34. Timal S, Hoischen A, Lehle L, Adamowicz M, Huijben K, Sykut-Cegielska J., et al. Gene identification in the congenital disorders of glycosylation type I by whole-exome sequencing. *Hum Mol Genet*. 2012;21:4151–61.
35. Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet*. 2014;22:160–70.
36. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS One*. 2011;6:e16957.
37. Nanjappa V, Thomas JK, Marimuthu A, Muthusamy B, Radhakrishnan A, Sharma R, et al. Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D959–65.
38. Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;855:42–50.

39. Filges I, Friedman JM. Exome sequencing for gene discovery in lethal fetal disorders - harnessing the value of extreme phenotypes. *Prenat Diagn.* 2014.
40. Ormond KE, Wheeler MT, Hudgins L, Klein TE, Butte AJ, Altman RB, et al. Challenges in the clinical application of whole-genome sequencing. *Lancet.* 2010;375:1749–51.
41. Hodgson JM, Metcalfe SA, Aitken M, Donath SM, Gaff CL, Winship IM, et al. Improving family communication after a new genetic diagnosis: a randomised controlled trial of a genetic counselling intervention. *BMC Med Genet.* 2014; 15:33.