

## REPORTE DE CASO CLÍNICO

### **Diagnóstico prenatal enzimático de Enfermedades Lisosomales en Cuba.**

Caridad Menéndez Saíenz,<sup>1</sup> Sergio González García,<sup>1</sup> Marisol Peña Sánchez,<sup>1</sup> Luis Alberto Méndez Rosado,<sup>2</sup>  
Olga Quiñones,<sup>2</sup> Norma Diepa Padrón,<sup>2</sup> Ursulina Suárez Malledo,<sup>2</sup> Alina González-Quevedo Monteagudo<sup>1</sup>

1 Instituto de Neurología y Neurocirugía, La Habana

2 Centro Nacional de Genética Médica, La Habana

---

#### **Resumen**

En nuestro país se realiza diagnóstico prenatal de enfermedades lisosomales por técnicas enzimáticas en cultivos de amniocitos desde el año 1988. Este trabajo muestra 12 casos clínicos de diagnóstico prenatal a 11 parejas cada una portadora de diferentes enfermedades lisosomales, con hijos enfermos y/o fallecidos. A las madres se les realizó amniocentesis entre las 16-20 semanas de embarazo, procesándose simultáneamente un control de la misma edad gestacional. A los 18 días de cultivo de los amniocitos se cuantificó la actividad enzimática de  $\alpha$ -L-iduronidasa, en el caso de Mucopolisacaridosis (MPS) I, de arilsulfatasa B para la MPS VI, de  $\alpha$ -L-fucosidasa para fucosidosis, de  $\beta$ -galactosidasa para GM-1 gangliosidosis, de  $\beta$ -glucosidasa para Gaucher, de hexosaminidasa A para Tay-Sachs y esfingomielinasa para Niemann Pick. Estos 12 diagnósticos prenatales de enfermedades lisosomales fueron negativos. De hecho todos se llevaron a término y los niños llevan una vida normal y tienen buen estado de salud. Concluimos que estas técnicas resultaron útiles para definir la posible afectación del feto que se complementan con los resultados de los estudios moleculares.

#### **Abstract**

In our country the prenatal diagnosis of lysosomal diseases with enzymatic techniques has been conducted since 1988. This paper describes 12 clinical cases of prenatal diagnosis in 11 couples who were known carriers of lysosomal diseases, all with affected and/or deceased children. Mothers underwent amniocentesis between 16-20 weeks of pregnancy, and samples were simultaneously processed with a control of the same gestational age. Amniocytes were cultured during 18 days, after which the enzymatic activities of  $\alpha$ -L-iduronidase (for the MPS I case), arylsulphatase B (for MPS VI cases),  $\alpha$ -L-fucosidase (for fucosidosis cases),  $\beta$ -galactosidase (for GM-1 gangliosidosis cases),  $\beta$ -glucosidase (for Gaucher cases), hexosaminidase A (for the Tay-Sachs case) and sphingomyelinase (for the Niemann Pick case) were quantified. All 12 prenatal diagnoses were negative for the corresponding lysosomal disease and all pregnancies ended in a healthy newborn and in children with normal living. We concluded that prenatal enzymatic diagnosis was useful for defining the possible affection of the fetus and contributed to support genetic counseling for lysosomal diseases, although it does not rule out the need for molecular biology in doubtful cases.

---

#### **Introducción**

El diagnóstico preciso de los errores innatos del metabolismo (EIM) en edades tempranas de la vida es esencial para el éxito de los tratamientos (en los casos en que sean susceptibles de los mismos), y para realizar un buen cuidado médico y psicosocial de los pacientes y su familia. Además, es un requisito previo para un asesoramiento genético óptimo.<sup>1</sup>

Los EIM por diferentes mecanismos fisiopatológicos se expresan tempranamente desde el período prenatal y generalmente originan aborto espontáneo, muerte fetal intraútero o malformaciones congénitas.<sup>2</sup>

El advenimiento del diagnóstico prenatal ha modificado radicalmente el manejo de los embarazos y de los resultados perinatales. Muchas de las condiciones y afecciones moleculares, genéticas, funcionales y estructurales que afectan a la descendencia pueden ser detectadas ahora in útero, y en ocasiones, tratadas antes del nacimiento. Por esta razón algunas parejas buscan asesoramiento desde antes de la gestación, sobre todo cuando existe la posibilidad de que sean portadoras de alguna enfermedad con patrón de transmisión autosómico recesivo.<sup>3</sup>

Es muy importante la prevención de estas enfermedades, a pesar de su baja incidencia (1/15,000), ya que conllevan pobre calidad de vida, incapacidad, gastos de salud elevados, y en algunos casos la muerte en etapas tempranas de la vida.<sup>5</sup>

Dentro de las enfermedades metabólicas se encuentran las lisosomales,<sup>6</sup> que son enfermedades autosómicas recesivas, excepto para las enfermedades de Hunter y de Fabry, ligadas al cromosoma X.<sup>7</sup> Se originan por acúmulo de sustancias cuya máxima expresión clínica es la anasarca fetoplacentaria observada en algunos casos como: la gangliosidosis tipo I, sialidosis tipo II, mucopolisidosis tipo II, MPS tipo VII y la enfermedad de Niemann Pick tipo A y C.<sup>6</sup>

En el pesquiasaje prenatal se emplea la ecografía como herramienta diagnóstica de algunas enfermedades lisosomales ya que existen evidencias donde se ha observado el aspecto aumentado e irregular de órganos (hígado, bazo) afectados por el depósito de metabolitos, así como las dismorfias (ej: retardo en el crecimiento del fémur).<sup>8</sup>

Otras técnicas más específicas para el diagnóstico de las enfermedades lisosomales son la determinación de la actividad de las enzimas afectadas en líquido amniótico, amniocitos<sup>9</sup> y vellosidades del corion.<sup>10,11</sup> En la actualidad se han desarrollado técnicas de inmunohistoquímica y de biología molecular que han contribuido también al diagnóstico de estas patologías.<sup>12,13</sup> En nuestro país se realiza diagnóstico prenatal de enfermedades lisosomales por técnicas enzimáticas en cultivos de amniocitos desde el año 1988. Este trabajo muestra casos clínicos de diagnóstico prenatal a parejas con antecedentes de tener hijos con enfermedades lisosomales.

### **Casos clínicos y métodos**

En el período comprendido entre 1994 y el 2007 se estudiaron 12 casos de diagnóstico prenatal provenientes de 11 familias (A-K) que habían tenido hijos en los que se confirmó por estudios clínicos del fenotipo y bioquímicos, que tenían diagnóstico de alguna enfermedad de almacenamiento lisosomal. Se realizó la determinación prenatal de la actividad enzimática para las siguientes enfermedades: MPS I (1 caso), MPS VI (2 casos), fucosidosis (2 casos), GM-1 (2 casos), Gaucher (3 casos), Tay Sachs (1 caso) y Niemann Pick (1 caso).

Todas las mujeres a las que se les realizó amniocentesis eran portadoras, excepto en un caso que era el hombre el portador de la enfermedad lisosomal. Para este nuevo embarazo las dos mujeres portadoras de GM-1, una portadora de Fucosidosis y una portadora de Gaucher cambiaron de pareja. A todas las familias se les brindó asesoramiento genético por parte de especialistas y estuvieron de acuerdo, previo consentimiento informado, en realizarse estudio prenatal ante un nuevo embarazo, para evitar el nacimiento de otro hijo afectado.

A las madres se les realizó amniocentesis entre las 16-20 semanas de embarazo, procesándose simultáneamente un control de la misma edad gestacional y sin antecedentes familiares de estas enfermedades. Los amniocitos fueron aislados y cultivados en el Centro Nacional de Genética Médica, según las técnicas descritas.<sup>1,14</sup>

Después de 18 días de cultivo a las muestras de amniocitos se les determinó la actividad enzimática para cada una de las enzimas. Se cuantificó la actividad de  $\alpha$ -L-iduronidasa para MPS I,<sup>15</sup> de aril-sulfatasa B para la MPS VI,<sup>16</sup> de  $\alpha$ -L-fucosidasa para el diagnóstico de Fucosidosis,<sup>17</sup> de  $\beta$ -galactosidasa para GM-1 gangliosidosis,<sup>18</sup> de  $\beta$ -glucosidasa para la enfermedad de Gaucher,<sup>1</sup> de hexosaminidasa A para Tay-Sachs<sup>1</sup> y por último de esfingomielinasa para Niemann Pick.<sup>1</sup>

La cuantificación de proteínas en amniocitos se realizó por el método descrito por Lowry, 1951<sup>19</sup> y la actividad específica de la enzima (AE) se expresó en: nmoles/h/mg de proteínas. Al valor de actividad específica del control se le asignó el 100% y se calculó el porcentaje de la actividad específica de la muestra del paciente con respecto a ésta, obteniendo la relación de AE paciente/control. Esta relación se conoce como actividad porcentual (AP) y se calculó según:  $AP = (AE \text{ paciente}/AE \text{ control}) \times 100$ . Se consideran cifras normales de actividad porcentual el 50% o más de actividad.<sup>20-23</sup>

Los resultados del estudio enzimático prenatal se entregaron al grupo interdisciplinario que se encarga de la Consulta de Asesoría Genética que atiende a la familia, donde se le da toda la información que necesitan los padres para adoptar conducta reproductiva.

### **Resultados**

En la tabla 1 se presenta la actividad específica y porcentual de las enzimas lisosomales estudiadas en cultivo de amniocitos de los 12 diagnósticos prenatales. Como se observa, el rango de valores de AP es muy amplio (22.7 %-137.5%). Como muchos autores plantean, los valores de actividad específica de los controles pueden solaparse con los de los individuos portadores (heterocigóticos) de la enfermedad y se aceptan como no afectados cuando la AP está por encima del 50%.<sup>20-23</sup> No obstante, cuando la AP está por debajo 50 %, se dificulta la toma de decisión.

La familia portadora de MPS I tuvo previamente una hija sana y otra enferma fallecida y se les sugirió el estudio prenatal en el nuevo embarazo, el cual reporta un valor de  $\alpha$ -L-iduronidasa de un 156.4%, lo cual descarta la presencia de un feto afectado. En estos momentos la niña tiene 5 años y es completamente sana.

En los casos MPS VI, las familias son portadores del gen mutado para la proteína arilsulfatasa B (MPS VI). La familia B tuvo una hija enferma y la familia C tuvo dos hijos: uno sano y otro enfermo, en ambas familias los niños enfermos están fallecidos. Para las familias B y C se encontraron valores de actividad porcentual de 80.5 % y de 73.5 %, lo cual indica una actividad de la arilsulfatasa B preservada, sugiriendo que los fetos eran sanos.

En el caso de las dos familias portadoras de fucosidosis, la primera (D) tuvo una hija enferma y fallecida. En su segundo embarazo no hubo cambio de pareja y dio un resultado de AP de un 22.7%, valor bajo con respecto al control de la misma edad gestacional, por lo que se realizó estudio molecular en el Centro de Genética Médica de Holguín. El análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reportó una doble banda de 540 bp y 370 bp, que corresponde a un heterocigótico para la mutación Q422X de la fucosidosis.

La familia decidió llevar el embarazo a término y tuvieron un hijo sano.<sup>24</sup> La pareja de la familia E se separó, quedando una hija enferma que actualmente tiene 21 años. Esta mujer se embarazó de otro hombre y se obtuvo una AP de un 100.9%, por lo cual se consideró que no estaba afectada la actividad de la enzima.

Las familias de GM-1 (F y G) con hijos afectados y ya fallecidos se disociaron y las mujeres portadoras se embarazaron de otros hombres. En ambos casos se consideró que los fetos eran sanos ya que el estudio del cultivo de amniocitos reportó una AP de 56.9 % y de 70.0% respectivamente.

Para el estudio de portadores de la enfermedad de Gaucher, se realizaron tres amniocentesis, pero dos de estas a la misma mujer. La madre de la familia H, con una hija enferma y en tratamiento, se embarazó en dos ocasiones con una nueva pareja sin antecedentes previos de la enfermedad. Los resultados de actividad porcentual de los dos embarazos fueron 59.5% y 51.2%, respectivamente. Se decidió continuar los embarazos en ambas ocasiones y los niños nacieron sin afectación. La familia I tenía una hija fallecida y el nuevo embarazo fue de la misma pareja. El estudio del cultivo de amniocitos de ésta dio una AP de un 137.5%, lo cual se concluyó como normal y el niño nació saludable.

En el diagnóstico prenatal de Tay-Sachs los padres tenían un hijo fallecido y se repitió el embarazo sin separación conyugal, obteniéndose una actividad porcentual para la hexosaminidasa A de un 58.8%, por lo que se decidió continuar el embarazo.

Por último, la familia con Niemann-Pick tuvo dos niños enfermos y fallecidos, se separaron y el padre embarazó a su nueva relación. A la madre se le realizó amniocentesis, aunque no tenía antecedentes previos de EIM y su actividad de esfingomielinasa leucocitaria fue normal. La actividad porcentual para esta enzima en el cultivo de amniocitos fue de un 100.5% al comparar con el control de igual edad gestacional, lo cual era indicativo de que el feto no se encontraba afectado.

Los diagnósticos prenatales de los posibles casos de enfermedades lisosomales fueron negativos. Al realizar el asesoramiento genético, las familias decidieron llevar el embarazo a término. De hecho en la actualidad todos los niños llevan una vida normal y cuentan con buen estado de salud. Sin embargo, en algunos casos se encontraron cifras próximas al 50% de actividad porcentual de la enzima que pudieran indicar la posibilidad de que estos fetos sean portadores de estas enfermedades.

Consideramos que sería necesario realizar estudios moleculares para confirmar la presencia o no de mutaciones para estas enfermedades, para que se tenga en cuenta en su etapa reproductiva. También estos estudios son fundamentales en caso de dudas, cuando el resultado de las pruebas enzimáticas en el diagnóstico prenatal da cifras inferiores al 50% de actividad, ya que están en juego decisiones cruciales tanto para el médico como para la pareja, como en el caso de la familia D.

## Discusión

El diagnóstico prenatal enzimático no es una técnica infalible, aunque si económica. La medición de la actividad específica de las enzimas en cultivo de amniocitos es comparativa contra un control conocido de igual edad gestacional y sin antecedentes familiares previos de la enfermedad. Estos niveles de actividad pueden solaparse con los valores de los heterocigóticos, dificultándose la confirmación de la enfermedad. Esta fuente de variabilidad se considera una desventaja importante para los métodos enzimáticos, lo que ha sido reportado por algunos autores.<sup>23,25</sup>

La posibilidad de utilizar otras técnicas más avanzadas como las de Biología Molecular para el diagnóstico prenatal de enfermedades lisosomales no desecha la utilidad de las determinaciones enzimáticas. En situaciones donde las únicas técnicas disponibles para el diagnóstico prenatal son las enzimáticas, los resultados nos ofrecen un grado de seguridad cuando la AP está por encima del 50%, lo cual en nuestra casuística sucedió en el 91.7% de los diagnósticos realizados. Esto dejaría la necesidad de acudir a las técnicas de Biología Molecular, más costosas y menos accesibles para un mínimo de casos.

Los estudios moleculares (PCR) de rutina no siempre confirman la posibilidad de ser enfermos o portadores de la enfermedad. En ocasiones la alteración enzimática puede ocurrir por eventos post traduccionales. En un estudio realizado en un paciente con diagnóstico de Fucosidosis se encontraron niveles de ARNm normales para la enzima  $\alpha$ -L- fucosidasa, a pesar de que su actividad enzimática era nula.<sup>26</sup>

Otra evidencia es el reporte de un niño con galactosialidosis que tenía niveles reducidos de actividad específica de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y  $\alpha$ -neuraminidasa y niveles normales del precursor de  $\beta$ -galactosidasa, debido a un defecto post-traducciona en el procesamiento enzimático.<sup>27</sup> Por esta razón concordamos con otros autores en que los estudios moleculares (PCR) y los enzimáticos deben complementarse mutuamente,<sup>28</sup> pues estos no reconocen todas las modificaciones que afectan la expresión o actividad de la enzima.

Como las enfermedades estudiadas son autosómicas recesivas, es suficiente que uno de los padres sea portador para que exista probabilidad (50%) de que el niño sea heterocigótico. Es por esto que aunque haya habido cambio de pareja y se desconozca la actividad enzimática del padre o madre, se indique el diagnóstico prenatal en el nuevo embarazo.

## Conclusiones

El diagnóstico prenatal enzimático de enfermedades lisosomales en cultivo de células de líquido amniótico mantiene su vigencia, a pesar del desarrollo de las técnicas de biología molecular cuya implementación es costosa. Esta metodología es el paso inicial en el diagnóstico prenatal, resulta útil para definir la posible afectación del feto y se complementan con los resultados de los estudios moleculares.

## Referencias

1. Galjaard H. Genetic Metabolic Disease. Early diagnoses and prenatal analysis Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. New York. Oxford 1980.
2. Cao A. Antenatal diagnosis of beta-thalassemia in Sardinia. En: Banzowski Z, Capron A. Eds. Genetics, Ethics and Human values: Human Genome Mapping, Genetic Screening and Therapy. Genova, CIOMS, 1991:72-9.
3. Casagrandi CD, Zaldivar T, Nodarse RA, et al. Algunos aspectos éticos del diagnóstico prenatal, la medicina y terapia fetales. Rev Cubana Obstet Ginecol 2005, 31(3); 0-0.
4. Hopwood JJ, Morris CP. The mucopolysaccharidoses: Diagnosis, molecular genetics and treatment. Mol Biol Med 1990; 7: 381-404.
5. Imarzuki M, Gushi K, et al. Long term effects of bone marrow transplantation for inborn errors of metabolism: a study of four patients with lysosomal storage diseases. Acta Paediatr Jpm 1994; 36(1): 30-6.
6. Alvarez FR. Enfermedades hereditarias metabólicas y embarazo. Rev Cubana Obstet Ginecol 2003; 29(2):0-0.
7. Lyon G, Adams RD, Kolodny EH. Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children. Mc Gran Hill. Health Professions Division, 1996.

8. Yuksel A, Kayserili H, Gungor F. Short femurs detected at 25 and 31 weeks of gestation diagnosed as Leroy I-cell disease in the postnatal period: a report of two cases. *Fetal Diagn Ther.* 2007; 22(3): 198-202.
9. Fratantoni JC, Neufeld EC, Uhlendorf BW, et al. Intrauterine diagnosis of the Hurler and Hunter syndromes. *N Engl J Med* 1969; 280: 686.
10. Kleijer WJ, Van Diggelen OP, Janse HC, et al. First trimester diagnosis of Hunter syndrome on chorionic villi. *Lancet* 1984; 2: 472.
11. Kleijer WJ, Janse HC, Vosterd RPL, et al. First trimester diagnosis of mucopolysaccharidosis III A (Sanfilippo A disease). *N Engl J Med* 1986; 314: 185.
12. Lin SP, Chang JH, de la Cadena MP, Chang TF, Lee-Chen GJ. Mutation identification and characterization of a Taiwanese patient with fucosidosis. *J Hum Genet.* 2007; 52 (6): 553-6.
13. Phupong V, Shotelersuk V. Prenatal exclusion of Pompe disease by electron microscopy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37(5): 1021-4.
14. Verma R, Babu A. *Human Chromosome. Principles and techniques.* 2da. Ed.1995; 74-75.
15. Stirling JL, Robinson D, Fensom AH, Benson PF, Baker JE, Button LR. Prenatal diagnosis of two Hurler fetuses using an improved assay for methylumbelliferyl-alpha-L-iduronidase. *Lancet* 1979; 7(2): 8132- 37.
16. Baum H, Dodgson KS, Spencer B. The assay of arylsulfatase A and B in human urine. *Clin Chim Acta;* 4: 453-455.
17. Robinson D, Thorpe R. Fluorescent assay of alpha-L-fucosidase. *Clin Chim Acta.* 1974; 55: 65-69.
18. Galjaard H, Hoogeveen A, Keyzer W, et al. Genetic Heterogeneity in GM1-gangliosidosis. *Nature* 1975; 257: 60-62.
19. Lowry OH. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-68
20. Gort L. Anàlisi molecular de la mucopolisacaridosi I, la mucopolisacaridosi II i la leucodistròfia metacromàtica en els pacients espanyols. Utilitat diagnòstica i correlació genotip-fenotip. Tesis Doctoral. Espanya. Barcelona. Instituto de Bioquímica Clínica, 2000.
21. Jolly RJ, Desnick JM. Opitz. Inborn errors of lysosomal catabolism - principles of heterozygote detection-. *American Journal of Medical Genetics* 1979; 4(3): 293-307.
22. Fukuda M, Tanaka A, Isshiki, G. Variation of lysosomal enzyme activity with gestational age in chorionic villi. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 862-866.
23. Pámpols T. Enfermedades lisosomales. Del cromosoma la gen. Libro conmemorativo del 25 aniversario del Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona; 1995: 332-358.
24. Llauradó R A, Willems P, Coucke SF, Tamayo VJ, Mar J. Diagnóstico molecular prenatal de fucosidosis. Presentación de un caso. *Revista Española de Pediatría.* 2000; 56(5): 434-36.
25. Menéndez C. Diagnóstico enzimático de las mucopolisacaridosis en Cuba. Tesis presentada en opción al título académico de máster en bioquímica clínica. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 2000.
26. Lin SP, Chang JH, de la Cadena MP, Chang TF, Lee-Chen GJ. Mutation identification and characterization of a Taiwanese patient with fucosidosis. *J. Hum Genet.* 2007; 52(6): 553-6.
27. Patel MS, Callahan JW, Zhang S, Chan AK, Unger S, et al. Early-Infantile Galactosialidosis: Prenatal Presentation and Postnatal Follow-Up *American Journal of Medical Genetics* 1999; 85:38-47.
28. Pentchev PG, Barranger JA. Sphingolipidoses: molecular manifestations and biochemical strategies. *Journal of Lipid Research* 1978; 19: 401-409.

## **Anexos**

Enfermedades	Familia	AE amniocitos estudio	AE amniocitos control	AP(%)
MPS I	A	6.1	3.9	156.4
MPSVI	B	56.7	71.4	80.5
	C	48.8	66.3	73.5
Fucosidosis	D	10.1	36.8	22.7
	E	22.2	21.7	100.9
GM-1	F	9.16	16.1	56.9
	G	2.4	3.4	70.0
Gaucher	H*	0.24	0.4	59.5
	I	0.55	0.4	137.5
	H*	1.72	3.36	51.2
Tay-Sachs	J	12.2	21.0	58.8
Niemann-Pick	K	106.8	106.3	100.5

**Tabla 1:** Actividad específica y porcentual de las enzimas lisosomales estudiadas en cultivo de amniocitos para los 12 diagnósticos prenatales.

AE: nmoles/h/mg de proteínas

H\*: dos embarazos diferentes de la misma mujer.