

Excreción urinaria de mucopolisacáridos en la edad pediátrica y en la adolescencia

V. de la Cruz Amorós, E. Cortés Castell, M. Moya

Resumen. Fundamento: El déficit de enzimas lisosomales conduce a un acúmulo de materiales no degradados en dicha organela, produciendo alteraciones estructurales y funcionales. Las mucopolisacaridosis son un grupo de enfermedades derivadas de estas alteraciones, y están originadas por el depósito intracelular de glicosaminoglicanos (GAG) (mucopolisacáridos). Aunque presentan una baja incidencia, sus manifestaciones clínicas, su pobre calidad de vida y el pronóstico infausto de la mayoría de los cuadros clínicos, hacen necesario un diagnóstico precoz, que permita una actuación terapéutica inmediata. El diagnóstico definitivo está basado en la cuantificación de la actividad enzimática implicada, pero es necesario disponer de métodos analíticos sencillos y fáciles de aplicar ante una sospecha clínica.

Métodos: El estudio se ha efectuado en una muestra de población de 632 niños y adolescentes (1 mes - 18 años), con parámetros clínicos de normalidad. En todos los casos se recogió una muestra parcial de orina en la que se cuantificaron niveles de glicosaminoglicanos y creatinina, expresados como índice GAG/creatinina (mg/mmol), y en un grupo reducido de dicha población (n=27), se obtuvo además, una muestra de 24 horas. El método de cuantificación utilizado para los glicosaminoglicanos fue la reacción colorimétrica con el 1,9 azul dimetilmetileno (DMB). Se establecieron las condiciones óptimas de pH, longitud de onda y tiempo de reacción. Las modificaciones realizadas sobre estos factores, condujeron a la optimización del método de cuantificación, quedando definidos de la siguiente manera: pH 4,0; longitud de onda 528 nm; tiempo de reacción 5 minutos. Los porcentajes de error y coeficientes de variación obtenidos en el intra e interensayo, fueron inferiores al 5%.

Resultados: La validez de la muestra parcial fue establecida, obteniéndose correlación lineal entre los valores en orina de 24 horas y muestra parcial con un coeficiente de correlación de $r = 0,89$ ($p < 0,0001$).

Los resultados conseguidos permitieron establecer unos valores de normalidad en las edades estudiadas, que oscilan entre un índice de GAG/creatinina de 8,70 mg/mmol en el grupo de edad de 1-2 años, a 1,34 mg/mmol en el grupo de 17-18 años, con una distribución para los grupos intermedios de edad que se ajusta a una función logarítmica, existiendo una clara discriminación con los valores obtenidos en orinas de pacientes con sospecha clínica de mucopolisacaridosis.

Conclusión: Se presentan modificaciones al método espectrofotométrico de cuantificación de glicosaminoglicanos que utiliza como colorante el DMB. Se confirma su sencillez metodológica, su fácil aplicación, así como su sensibilidad, requisitos imprescindibles para ser utilizado en una amplia muestra de población. De esta forma se

han obtenido unos valores de referencia en población sana, observándose que dichos valores de excreción son una función dependiente de la edad.

An Esp Pediatr 1999;50:361-366.

Palabras clave: Mucopolisacaridosis; Glicosaminoglicanos (GAG), 1,9 azul dimetilmetileno (DMB); Análisis cuantitativo; Valores de normalidad.

URINARY EXCRETION OF MUCOPOLYSACCHARIDES IN PEDIATRIC AND ADOLESCENT PATIENTS

Abstract. Objective: Lysosomal enzyme deficiency results in an accumulation of undegraded material producing structural and functional disorders. Mucopolysaccharidosis is a group of disorders caused by an increase in glycosaminoglycans (GAG) (mucopolysaccharides). Mucopolysaccharidosis, while showing a low incidence, has some clinical manifestations that warrant early diagnosis in order to establish immediate therapeutical action. Although definitive diagnosis is based on quantification of the involved enzymatic activity, it is necessary to have easy to use analytical methods available when there is clinical suspicion of the disease.

Patients and methods: This study was made on a population of 632 clinically normal adolescents and children (one month to 18 years of age). In all cases a partial sample of urine to quantify glycosaminoglycans and creatinine expressed as the index GAG/creatinine (mg/mmol) was collected. In a reduced group of 27 people a 24-hour urine sample was collected. Determination of glycosaminoglycan levels was performed with a colorimetric reaction with 1,9-dimethylmethylene blue (DMB). Optimal condition of pH, wavelength and reaction time were established. The values found to be optimal for quantification were defined as pH 4.0, wavelength 528 nm and a reaction time of five minutes. Intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 5%.

Results: Validity of the partial urine sample was established by obtaining a linear correlation between the 24 hour urine sample and the partial urine sample with a correlation coefficient of $r = 0.89$ ($p < 0.0001$). The results obtained have allowed the establishment of normal values ranging from an index GAG/creatinine of 8.70 mg/mmol in the group aged 1 to 2 years to 1.34 mg/mmol in the group 17 to 18 years of age, with a distribution of intermediate ages adjusted to a logarithmic function. There was a clear difference in the values obtained in urine of patients with clinical suspicion of mucopolysaccharidosis.

Conclusions: Modifications in the spectrophotometric method using DMB as a colorant for quantification of glycosaminoglycans are presented. The feasibility, easy application and sensibility of this method, condition required for its widespread use, are confirmed. Normal reference values from a healthy population have been obtained and shown to be age dependent.

Key words: Mucopolysaccharidosis. Glycoaminoglycans (GAG). 1,9 dimethylmethylene blue (DMB). Urinary screening test. Quantitative analysis. Normal values. Early diagnosis.

Departamento de Pediatría. Universidad Miguel Hernández
Correspondencia: Dra. Victoria de la Cruz Amorós. Servicio de Pediatría.
Hospital Universitario de San Juan. Carretera de Valencia, s/n.
03550 San Juan (Alicante).
Recibido: Julio 1998
Aceptado: Enero 1999

Introducción

Los mucopolisacáridos son polímeros lineales formados por unidades repetidas de disacáridos, con un marcado carácter ácido^(1,2). Son constituyentes fundamentales de la matriz extracelular⁽³⁻⁵⁾, formando parte de macromoléculas mucho más complejas denominadas proteoglicanos⁽⁶⁻⁸⁾.

En su degradación intervienen una serie de enzimas, cuya deficiencia provoca la acumulación lisosomal de diversos productos parcialmente degradados de los glicosaminoglicanos⁽⁹⁾, siendo excretados en cantidades aumentadas en orina^(10,11). Estos trastornos metabólicos, son hereditarios y clínicamente progresivos, no existiendo consenso general sobre su incidencia, pero una estimación aproximada los sitúa en 1:30.000 nacimientos^(12,13).

El trasplante de médula ósea, representa la única alternativa terapéutica eficaz, siempre y cuando se cumplan los criterios de selección establecidos: edad del paciente igual o inferior a los 2 años de edad⁽¹⁴⁾ y escaso deterioro neurológico, lo que implica realizar una correcta valoración del daño cerebral en el momento del trasplante^(15,16).

La necesidad de un diagnóstico precoz en este tipo de enfermedades, ha conducido al desarrollo de diversos métodos cualitativos, como el test de Berry basado en la reacción metacromática de la orina impregnada en papel con azul de toluidina⁽¹⁷⁾, semicuantitativos, como el test de la turbidez con cloruro de cetilpiridinium (CPC) o bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB)⁽¹⁸⁾ o puramente cuantitativos, como los que utilizan el azul alcian 8GX o el 1,9 azul dimetilmileno (DMB)⁽¹⁹⁻²¹⁾, siendo evidentes las ventajas reportadas por estos últimos. La confirmación diagnóstica definitiva radicará en la cuantificación de la actividad metabólica de la enzima implicada^(22,23).

Todos estos hechos hacen necesario disponer de un método analítico de escasa complejidad, que pueda ser utilizado en todos los casos en los que se establezca una sospecha clínica de mucopolisacaridosis.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue adecuar y demostrar la fiabilidad, sencillez y fácil manejo de un método cuantitativo espectrofotométrico⁽²¹⁾ basado en la utilización del 1,9 azul dimetilmileno (DMB), para el estudio de la excreción urinaria de glicosaminoglicanos (GAG), y al mismo tiempo obtener unos valores normales de excreción en la edad pediátrica y en la adolescencia, que puedan servir de referencia, ante la necesidad de realizar un diagnóstico o seguimiento en un niño con sospecha clínica.

Material y métodos

Sujetos de estudio.- El trabajo se realizó en una muestra de población de 632 niños y adolescentes con edades cronológicas comprendidas entre 1 mes y 18 años, que acudieron a Consultas Externas del Hospital Universitario de San Juan por patología no relevante. A todos ellos se les realizó un estudio auxológico (peso, talla, índice de masa corporal), con el fin de definir el estado nutricional de dicha población. Se recogió una muestra parcial de orina, de cada uno de ellos, conservándose a -80°C has-

ta su procesamiento analítico. A un grupo reducido de esta población (n=27) se les recogió orina de 24 horas, y posteriormente a las 48 horas una muestra parcial al igual que al resto de los individuos.

Métodos analíticos.- El método utilizado se basa en la reacción metacromática que presenta el colorante DMB, tras su unión a los grupos sulfato de los glicosaminoglicanos, permitiendo a partir de la medida de la absorbancia⁽²⁴⁾, cuantificar la excreción urinaria de los mismos, utilizándose un espectrofotómetro Beckman DU-70.

Con el fin de optimizar el rendimiento del método se realizaron diversas modificaciones sobre algunos de los parámetros descritos previamente⁽²¹⁾ y que intervienen directamente en él: pH de reacción, tiempo óptimo de lectura (tiempo de reacción) y longitud de onda a la cual medir la absorbancia.

Preparación del reactivo.- La disolución madre contenía 0,35 mmol/l de DMB (Serva Feinbiochemica, Heidelberg), en tampón formiato sódico (0,2 mM); a pH comprendido entre 3,0 y 6,0. Para facilitar la disolución, el DMB se disolvió previamente en 10 ml de etanol (96%). Para el análisis de las muestras, e inmediatamente antes de ser utilizada, se realizó una dilución 1:10 con el mismo tampón.

Glicosaminoglicanos estándar.- Para las disoluciones de referencia, se emplearon como estándares: condroitín sulfato C (cartílago de tiburón), condroitín sulfato A (cartílago costal porcino), dermatán sulfato (piel porcina), heparán sulfato (riñón bovino) y keratán sulfato (córnea bovina), todos ellos de Sigma Chemical. Se prepararon unas curvas de concentración con cada uno de los estándares, oscilando el intervalo entre 0 y 200 µg/ml, utilizando para la disolución del liofilizado agua bidestilada.

Cuantificación de glicosaminoglicanos.- Una vez establecidas las condiciones óptimas de pH (4,0), longitud de onda (528 nm) y tiempo de reacción (5 minutos), el análisis se llevó a cabo empleando 50 µl de orina o disolución de estándar, a los cuales se les añadió 1 ml de disolución colorante (1:10). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente controlada en un rango de 20-25°C.

Cuantificación de creatinina.- La cuantificación de creatinina urinaria, permitió expresar los resultados obtenidos en la cuantificación de glicosaminoglicanos, como índice de excreción GAG/creatinina (mg/mmol), evitando de esta forma recoger orina de 24 horas para su determinación. Para ello, se utilizó el autoanalizador de creatinina Beckman.

La distribución de la muestra de población se estableció mediante intervalos de tiempo anuales, entre los distintos grupos de edad, con el fin de que los resultados fueran lo más pormenorizados posible.

El estudio estadístico se realizó utilizando el programa SPSS V 6.1. La relación entre variables cualitativas, se efectuó por medio de tablas de contingencia, analizándolas por medio del Test de la χ^2 de Pearson (nivel de significación de $p < 0,05$). La comparación de los valores medios de las distintas variables cuantitativas, se realizó mediante la aplicación de pruebas no para-

Tabla I Distribución de la población global estudiada por grupos de edad y sexo

Grupos de edad (años)	Frecuencia n (%)	Frecuencia varones (n)	Frecuencia mujeres (n)	Edad (años) Media \pm DE (Mediana)
0-1	47 (7,4%)	30	17	0,5 \pm 0,3 (0,3)
1-2	30 (4,7%)	16	14	1,6 \pm 0,3 (1,7)
2-3	32 (5,1%)	24	8	2,6 \pm 0,3 (2,6)
3-4	36 (5,7%)	19	17	3,6 \pm 0,3 (3,6)
4-5	36 (5,7%)	18	18	4,6 \pm 0,3 (4,6)
5-6	35 (5,5%)	17	18	5,6 \pm 0,3 (5,6)
6-7	37 (5,9%)	25	12	6,6 \pm 0,3 (6,6)
7-8	35 (5,5%)	23	12	7,6 \pm 0,3 (7,6)
8-9	34 (5,4%)	26	8	8,7 \pm 0,3 (8,8)
9-10	41 (6,5%)	25	16	9,6 \pm 0,3 (9,6)
10-11	35 (5,5%)	15	20	10,6 \pm 0,3 (10,6)
11-12	36 (5,7%)	13	23	11,6 \pm 0,3 (11,8)
12-13	31 (4,9%)	17	14	12,5 \pm 0,3 (12,5)
13-14	36 (5,7%)	21	15	13,7 \pm 0,3 (13,7)
14-15	35 (5,5%)	22	13	14,6 \pm 0,3 (14,6)
15-16	32 (5,1%)	13	19	15,5 \pm 0,3 (15,5)
16-17	32 (5,1%)	20	12	16,7 \pm 0,3 (16,7)
17-18	32 (5,1%)	16	16	17,7 \pm 0,3 (17,7)
TOTAL	632 (100%)	360	272	

métricas (U de Mann-Whitney), con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis de regresión se llevó a cabo utilizando el método de los mínimos cuadrados, aplicando un ajuste lineal, logarítmico o exponencial, según el modelo de dispersión obtenido en cada una de las curvas, lo que permitió establecer el 95% de los valores máximos y mínimos, en aquellas variables cuantitativas en las que se realizó dicho ajuste.

Resultados

La comparación estadística del número de casos entre los grupos de edad, mostró una distribución homogénea para una χ^2 de Pearson de 7,57 ($p = ns$) (Tabla I). La distribución por sexos en la muestra de población fue de 360 para el género masculino (56,96%) y 272 para el femenino (43,04%). El análisis estadístico aplicado (χ^2 de Pearson), demostró un predominio numérico de los varones en el conjunto de la población ($\chi^2=12,25$; $p < 0,0001$).

El índice de masa corporal (índice de Quetelet) permitió evaluar el estado nutricional de la población; en este sentido, la distribución de los resultados obtenidos, en función de los percentiles de normalidad por grupos de edad y sexo, muestran que dicha población cumple con los criterios de normalidad establecidos⁽²⁵⁾.

Las modificaciones llevadas a cabo sobre los factores implicados directamente sobre la optimización del método de cuantificación, consistieron en preparar una serie de reactivos color a distintos pH (3,0-6,0), realizándose posteriormente los espec-

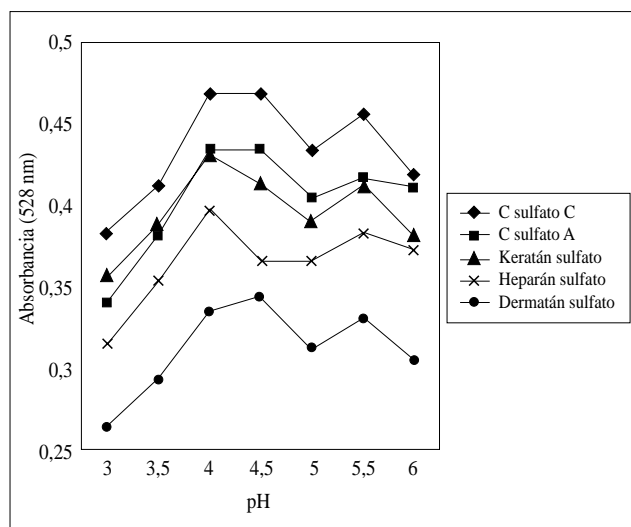


Figura 1. Variación de la absorbancia a 528 nm del complejo GAG-DMB con el pH.

tros de absorción del producto de reacción del colorante con los distintos GAG estándar, comprobándose que exhibían el mejor comportamiento a pH 4,0 (Fig. 1), para todos ellos.

Este ensayo permitió establecer las longitudes de onda (λ) óptimas, observándose una clara diferencia entre los máximos de absorbancia para el DMB, y los que presentaban los complejos glicosaminoglicanos-colorante. No existiendo diferencias en los espectros de absorción entre los complejos formados con los distintos glicosaminoglicanos, tanto cualitativa, como cuantitativamente.

Si bien, aunque a simple vista y de forma inmediata se observa la reacción hipsocromática, al poner en contacto la solución colorante con los estándares o el fluido biológico a analizar, en este caso la orina, se quiso determinar con exactitud el período de tiempo en el que se completa la reacción y la existencia o no de degradación del producto formado, durante el tiempo de lectura. Para ello se realizó una cinética de absorbancia durante 30 minutos con los distintos glicosaminoglicanos y a distintas concentraciones, con lecturas de la misma cada minuto (Fig. 2). Se observó que el incremento de la absorbancia era significativo hasta el minuto 5 de la cinética, reflejando que la reacción se ha completado, y no existiendo degradación del complejo al permanecer constante durante el tiempo restante de la cinética. Hay que destacar el comportamiento exhibido por el keratán sulfato, ya que de acuerdo con la cinética obtenida, su reacción es más lenta y se habría completado a los 15-20 minutos, siendo quizás este momento el idóneo para su lectura.

La elección del condroitín sulfato C como estándar de referencia, se realizó por una parte, porque es el glicosaminoglicano, junto al condroitín sulfato A, excretado en mayor cantidad en sujetos no afectados de mucopolisacaridosis, y por otra parte por el comportamiento mostrado en el intra e interensayo, presentando un porcentaje de error y un coeficiente de variación in-

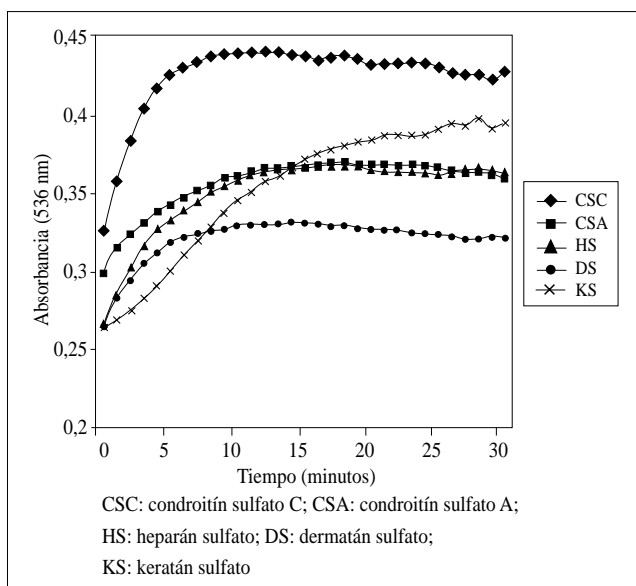


Figura 2. Cinética de absorción de la formación del complejo glicosaminoglicano-colorante.

feriores al 5%, en ambos casos.

Aunque la cuantificación de una sustancia excretada en orina es siempre más exacta y fiable si se lleva a cabo en una alícuota del volumen total urinario de 24 horas, la dificultad que conlleva este procedimiento, sobre todo en el período de la lactancia, impide, en ocasiones, su aplicación. Por este motivo, se quiso comprobar la correlación existente entre los valores obtenidos en orina de 24 horas de un sujeto frente a los obtenidos en muestra parcial del mismo sujeto, recogida con 48 horas de diferencia, expresando los resultados como índice de excreción (Fig. 3). El análisis estadístico aplicado, mostró una buena correlación lineal ($r = 0,8919$) entre ambas determinaciones, con un elevado grado de significación estadística ($p < 0,0001$), por lo que el resto del estudio se efectuó utilizando una muestra parcial.

Una vez establecidas las condiciones idóneas, se procedió a cuantificar la excreción urinaria de mucopolisacáridos en la población objeto del estudio.

La representación gráfica de los resultados obtenidos en la cuantificación urinaria, permitió comprobar que el índice de excreción es una función dependiente de la edad, existiendo marcadas diferencias entre los valores obtenidos en etapas precoces de la infancia y los obtenidos en la época de la adolescencia, observándose, sobre todo una amplia variabilidad en los dos primeros años de la vida. En la figura 4, se puede observar el ajuste correspondiente a los valores medios calculados a partir de los resultados obtenidos, así como el ajuste correspondiente al 95% de los valores máximos y mínimos. Dicho ajuste, se consigue mediante una transformación logarítmica, pudiendo de esta manera, y mediante la aplicación de la fórmula:

$$\text{Índice GAG/creatinina (mg/mmol)} = 11,02 - 3,35 \times \ln$$

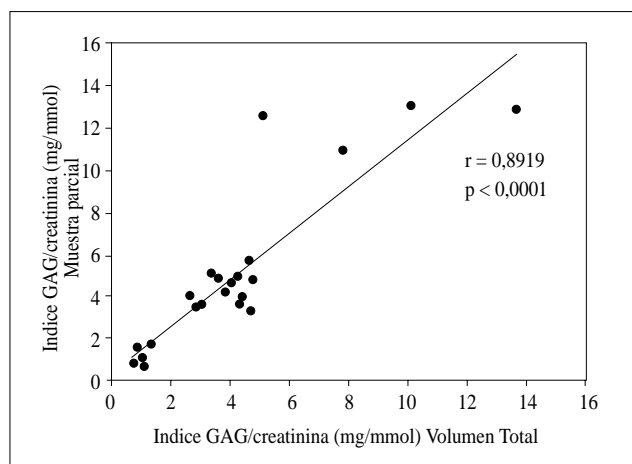


Figura 3. Correlación índice GAG/creatinina cuantificado en orina de 24 horas vs muestra parcial.

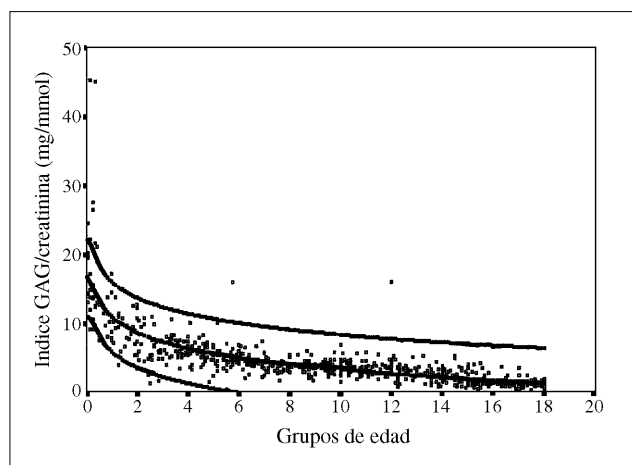


Figura 4. Ajuste de los valores de normalidad del índice GAG/creatinina en la edad pediátrica y en la adolescencia.

(edad en años), obtener unos valores medios de normalidad, para cada grupo de edad. No se ha efectuado distinción entre los valores de normalidad por sexos, aunque la distribución no ha sido homogénea, debido a que estos valores son idénticos, excepto en los grupos de edad de 12 a 16 años, en los que existen diferencias significativas ($p < 0,02-0,0004$), con valores del índice inferiores aproximadamente a una unidad (0,9-1,3) en el grupo femenino.

En la tabla II, se refleja, en valores absolutos, el intervalo de normalidad para cada uno de estos grupos, excepto para el correspondiente al primero (0-1 año), cuyo logaritmo del grupo de edad asignado ($n^\circ \text{ grupo}=1$) es 0.

La sensibilidad del método se puso de relieve, al tener la oportunidad de cuantificar la excreción urinaria de glicosaminoglicanos en 3 casos diagnosticados clínicamente de mucopolisacaridosis y en otros tres con sospecha clínica, de los cua-

Tabla II Intervalo de normalidad del índice GAG/creatinina (mg/mmol) en la muestra de población estudiada

Grupos de edad (años)	Límite inferior (95%) (mg/mmol)	Valores medios (mg/mmol)	Límite superior (95%) (mg/mmol)
1-2	3,64	8,70	13,75
2-3	2,29	7,34	12,39
3-4	1,32	6,38	11,43
4-5	0,57	5,63	10,68
5-6	0	5,02	10,06
6-7	0	4,50	9,54
7-8	0	4,05	9,10
8-9	0	3,66	8,70
9-10	0	3,31	8,34
10-11	0	2,99	8,02
11-12	0	2,70	7,73
12-13	0	2,43	7,46
13-14	0	2,18	7,21
14-15	0	1,95	6,98
15-16	0	1,73	6,76
16-17	0	1,53	6,56
17-18	0	1,34	6,37

les en uno de ellos pudo confirmarse, posteriormente, la existencia de un síndrome de Hunter. Los resultados obtenidos en los 6 casos estudiados, muestran unos valores de excreción que exceden en gran medida al rango de normalidad para su grupo de edad (Fig. 5).

Discusión

El colorante básico 1,9 azul dimetilmetileno (DMB), fue utilizado en un principio, para detectar mediante métodos histoquímicos, la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados en cultivos tisulares de cartílago. Posteriormente, se utilizó como test de "screening" urinario, mediante un análisis colorimétrico, para el diagnóstico de las mucopolisacaridosis⁽¹⁹⁻²¹⁾. Desde entonces se han desarrollado diversas modificaciones^(20,21) principalmente encaminadas a utilizar muestras parciales de orina y con estos métodos se ha cuantificado la excreción urinaria de glicosaminoglicanos, tanto en la población normal, como en los pacientes afectados de mucopolisacaridosis.

La metodología utilizada en el presente trabajo introduce una serie de modificaciones con respecto al método original desarrollado por Whitley⁽²¹⁾: a) con respecto al pH del medio y dada su influencia sobre los espectros de absorción del complejo DMB-glicosaminoglicanos^(24,26), se obtuvo la mayor absorbancia a pH 4,0, discretamente superior al utilizado por otros autores^(21,27-29), con un rango entre pH 3,0 a 3,5; b) las longitudes de onda en las que se producía la máxima absorbancia de los complejos (528, 530, 534 y 536 nm), concuerdan perfectamente con el espectro obtenido por Templeton⁽²⁶⁾ y por otros inves-

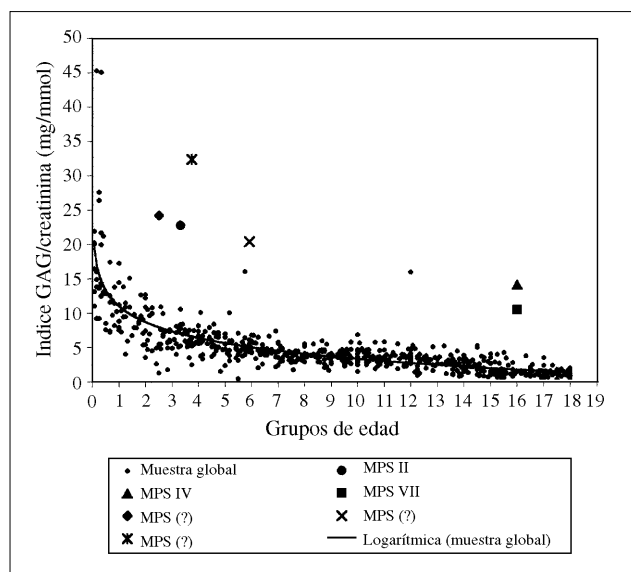


Figura 5. Excreción urinaria en niños con diagnóstico de mucopolisacaridosis frente a los valores de normalidad.

tigadores^(21,27,29); c) las cinéticas de absorbancia mostraron la conveniencia de iniciar la lectura a los 5 minutos de haberse realizado la mezcla, tiempo en el que parece haberse completado la formación de los complejos, salvo en el caso del keratán sulfato en donde claramente se observa un pequeño retraso en el tiempo, situando su momento óptimo de lectura alrededor de los 15-20 minutos. Estos resultados difieren con la mayoría de los trabajos publicados^(19,21,27,29), en los que la lectura se realizó a los pocos segundos (10 ± 5 s.) de haberse efectuado la mezcla; d) las curvas de concentración de los distintos estándares mostraron una proporción lineal hasta $100 \mu\text{g/ml}$ para todos ellos, y en las 4 longitudes de onda a las que se llevó a cabo la lectura, siendo, por tanto, este rango, el utilizado para la cuantificación de las muestras. Dicho rango concuerda con el establecido por Whitley ($10-150 \mu\text{g/ml}$)⁽²¹⁾, aunque difiere del estimado por otros autores^(20,27,29), si bien es cierto que existen importantes diferencias metodológicas con estos últimos trabajos reseñados.

Una vez definidas las condiciones óptimas del método de cuantificación, se procedió a cuantificar la excreción urinaria de glicosaminoglicanos en la población objeto de estudio. El tamaño de la muestra analizada, es el más amplio de los utilizados hasta ahora, al menos en los trabajos revisados^(21,27-29). En todos ellos se constata un hecho, y es que el índice de excreción es una función dependiente de la edad, observándose una amplia variación en edades precoces, sobre todo durante el primer año de vida. Este hecho, que ha podido ser corroborado en el presente trabajo, se debe por una parte, a la existencia durante la edad pediátrica, de determinadas etapas en las que existe un mayor potencial madurativo y una aceleración de la velocidad de crecimiento, traduciéndose a nivel metabólico, en procesos incrementados de síntesis y degradación de los sustratos implicados, originando una excreción urinaria aumentada de sus

metabolitos, y por otra, a los cambios existentes en la excreción urinaria de creatinina durante este período de la vida⁽²⁸⁾.

El hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en la muestra de población estudiada, en función del sexo, hizo aconsejable enfocar el análisis de los resultados, teniendo en cuenta este hecho. La comparación de los resultados obtenidos del índice GAG/creatinina, puso de relieve la existencia de diferencias significativas en el período de edad comprendido entre los 12 y 16 años, con un discreto mayor índice en el caso de los varones. Estos resultados no han podido ser contrastados con los obtenidos por otros autores, porque en los trabajos revisados en los que se expresan valores de normalidad, no se ha realizado esta diferenciación por sexo. Al margen de este hallazgo, se puede utilizar una gráfica común, como la mostrada en la figura 4, que engloba ambas poblaciones, para establecer la normalidad o no de un resultado, puesto que las diferencias en valores absolutos son mínimas.

En resumen, la experiencia obtenida en este trabajo, mediante la aplicación de un método espectrofotométrico que utiliza como colorante el 1,9 azul dimetilmetileno (DMB) para la cuantificación urinaria de glicosaminoglicanos, permite confirmar la sencillez de su metodología, su fácil aplicación y, sobre todo la sensibilidad del mismo, requisitos imprescindibles para poder ser aplicado a grandes masas de población, con el objetivo de poder establecer unos rangos de normalidad en la población sana, y, por tanto, poder realizar un diagnóstico precoz de mucopolisacaridosis, fundamentalmente a partir del primer año de edad.

Bibliografía

- 1 Rodén L. Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteoglycans. En: Lennarz WJ, (ed). The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. New York: Plenum Press, 1980: 267-371.
- 2 Arilla E. Oligosacáridos y polisacáridos. Glicoproteínas: Cartílago. En: Herrera E, (ed). Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. Vol I, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1991: 391-425.
- 3 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, (eds). La adherencia célula-célula y la matriz extracelular. En: Biología Molecular de la Célula. Barcelona: Omega, 1986: 721-766.
- 4 Fransson LA. Structure and function of cell-associated proteoglycans. *Trends Biochem Sci* 1987; **12**:406-411.
- 5 Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, (eds). Reparación: crecimiento celular, regeneración y curación de heridas. En: Patología Humana. México: McGraw-Hill-Interamericana; 1995: 49-62.
- 6 Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Ann Rev Biochem* 1991; **60**:443-475.
- 7 LeBaron RG, Höök A, Esko JD, Gay S, Höök M. Binding of heparan sulfate to type V collagen. *J Biol Chem* 1989; **264**:7950-7956.
- 8 Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989; **264**:13369-13372.
- 9 Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. En: Scriver Ch, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol II. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 2465-2494.
- 10 Wappner RS, Brandt IK. Inborn Errors of Metabolism. En: Oski FA, DeAngelis CD, Feigin RD, Warshaw JB, (eds). Principles and Practice of Pediatrics. Philadelphia: Lippincott, 1990: 77-161.
- 11 Swaiman KF. Lysosomal Diseases. Swaiman KF, (ed). Pediatric Neurology. Principles and Practice. Vol II. Missouri: C.V. Mosby Company, 1989: 1017-1066.
- 12 Chabás A. Enfermedades por acúmulo lisosomal. XVII Congreso Nacional de Genética Humana; 1991 Mayo 1-4. Palma de Mallorca. Programa Oficial: 33-43.
- 13 Linstedt U, Maier Ch, Joehnk H, Stephani U. Threatening spinal cord compression during anesthesia in a child with Mucopolysaccharidosis VI. *Anesthesiology* 1994; **80**:227-229.
- 14 Bone-marrow transplantation for neurovisceral storage disorders (editorial). *Lancet* 1986; **4**:788-789.
- 15 Cowan MJ. Bone marrow transplantation for the treatment of genetic diseases. *Clin Biochem* 1991; **24**:375-381.
- 16 McKinnis EJR, Sulzbacher S, Rutledge JC, Sanders J, Scott R. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *J Pediatr* 1996; **129**:145-148.
- 17 de Jong JGN, Hasselman JJF, van Landeghem AAJ, Vader HL, Wevers RA. The spot test is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem* 1991; **37**:572-575.
- 18 Kodama Ch, Kodama T, Yosizawa Z. Methods for analysis of urinary glycosaminoglycans. *J Chromatogr* 1988; **429**:293-313.
- 19 Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; **883**:173-177.
- 20 Panin G, Naia S, Dall'Amico R et al. Simple spectrophotometric quantification of urinary excretion of glycosaminoglycan sulfates. *Clin Chem* 1986; **32**:2073-2076.
- 21 Whitley Ch, Ridnour M, Draper K, Dutton Ch, Neglia J. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. *Clin Chem* 1989; **35**:374-379.
- 22 Pàmols MT. Conceptos generales sobre las enfermedades metabólicas hereditarias y su diagnóstico, tratamiento y prevención. En: Del Cromosoma al Gen. Libro Conmemorativo del 25 aniversario del Instituto de Bioquímica Clínica. Barcelona: Octubre, 1995: 175-230.
- 23 Rattenbury JM, Worthy E, Allen J. Screening tests for glycosaminoglycans in urine: experience from regional interlaboratory surveys. *J Clin Pathol* 1988; **41**:936-939.
- 24 Pineda M, Cárdenas J, eds. Espectroscopia Ultravioleta-Visible de Compuestos Biológicos. Córdoba; Publicaciones del Monte de Piedra y Caja de Ahorros, 1988.
- 25 Hernández M, Castellet J, Narvaiza JL et al. Curvas y Tablas de Crecimiento. Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo. Fundación Faustino Orbeagozo Eizaguirre; Bilbao, 1988: 5-31.
- 26 Templeton DM. The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans. *Connec Tissue Res* 1988; **17**:23-32.
- 27 Whitley Ch, Draper K, Dutton Ch, Brown P, Severson S, France L. Diagnostic test for Mucopolysaccharidosis. II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix. *Clin Chem* 1989; **35**:2074-2081.
- 28 Phuc Thuy L, Nyhan WL. A new quantitative assay for glycosami-