

LA SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES LISOSOMALES

M.D. del Castillo Bilbao y C. Pascual Marquí.

Dpto. de Diagnóstico Bioquímico y Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba.

RESUMEN En el diagnóstico bioquímico de las enfermedades hereditarias lisosomales se emplean muestras de leucocitos y con menor frecuencia cultivos de fibroblastos. Con el objetivo de encontrar métodos no invasivos para realizar el diagnóstico de estas patologías, se valoró la posible utilización de la saliva de los sujetos como material biológico con este fin. La presencia de actividad enzimática -manosidasa, -fucosidasa, -galactosidasa, arilsulfatasa total y β -N-acetilhexosaminidasa total y la confirmación del diagnóstico de enfermedad de Tay-Sachs y Síndrome de Maroteix-Lamy, así como la detección de los heterocigotos respectivos demostraron el valor potencial de la saliva como material biológico.

ABSTRACT. For the biochemical diagnosis of lysosomal diseases leukocytes and less frequently fibroblast cultures are employed. In order to find non-invasive methods for diagnosis of these diseases, saliva was evaluated as possible biological material. The presence of -mannosidase, -fucosidase, -galactosidase, total arylsulfatase and total β -N-acetyl-hexosaminidase enzymatic activities and the confirmation of the diagnosis of Tay-Sachs disease and Maroteix-Lamy Syndrome and also, for the detection of heterozygous respectively saliva showed the potential value as biological material.

INTRODUCCION

Las enfermedades lisosomales se deben a la alteración de una u otra enzima lisosomal como consecuencia de alguna mutación del gen que codifica la síntesis de estas proteínas ó en el mecanismo de procesamiento según el caso. Estas enzimas se encargan de la degradación de un conjunto de macromoléculas fundamentales como esfingolípidos y mucopolisacáridos, de ahí que el criterio más generalizado para su clasificación sea la evaluación de la especie molecular que se acumula en los tejidos y como consecuencia de ello pueden encontrarse niveles elevados de excrección en orina¹.

El diagnóstico de estas patologías permite establecer el tratamiento más adecuado al paciente, conocer la presencia del gen en nuestra población y brindar el consejo genético a los padres o realizar el diagnóstico prenatal específico con fines preventivos.

Habitualmente, para el diagnóstico de las enfermedades lisosomales se emplean muestras de leucocitos y con menor frecuencia cultivos de fibroblastos. Para la obtención adecuada de leucocitos se necesitan aproximadamente 10 mL de sangre; los pacientes necesitados de tales diagnósticos en la mayoría de los casos no sobrepasan los dos años de edad por lo que la recolección de este volumen de muestra con frecuencia se hace difícil. Recientemente, se estudió la posibilidad de realizar dicho diagnóstico en suero cuya obtención resulta más fácil y económica.

Con el objetivo de utilizar métodos no invasivos para el diagnóstico de estas patologías se trata de valorar la saliva como posible material biológico para este fin. Los resultados demostraron la factibilidad de esta muestra para el diagnóstico de un grupo de estas enfermedades.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y Preparación de Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre total, suero y saliva de pacientes remitidos a consulta con sospechas clínicas de enfermedades lisosomales, así como de los padres respectivos. El estudio bioquímico comprende un análisis comparativo de los resultados encontrados para los pacientes estudiados, los padres respectivos y sujetos normales (controles).

Las determinaciones de la actividad específica de aquellas enzimas que se sospechaba de su deficiencia se realizaron en leucocitos, suero y saliva.

La obtención de leucocitos se realizó según el procedimiento descrito por Galjaard¹. La concentración de proteínas de la muestra de leucocitos, obtenida a partir de 10 mL de sangre total se determinó por el método de Lowry².

El suero se obtuvo por centrifugación de 3 mL de sangre total a 2 000 r/min durante 10 ó 20 min. EL sobrenadante se recolectó y se conservó inmediatamente en refrigeración (4 a 8°C) hasta el momento de la determinación.

La saliva se obtuvo de la cavidad bucal mediante colocación de una torunda de algodón debajo de la lengua, luego de 1 ó 2 min se recolectó el volumen obtenido en un tubo Eppendorf y se conservó de 0 a 10°C. Mediante este método, se obtuvo 1 mL de muestra aproximadamente lo que resultó suficiente para el estudio posterior. Una porción de la muestra (500 L) se centrifugó a 2 000 r/min durante 30 s en una centrifuga JANETZKI TH 12 y el sobrenadante se utilizó para el análisis enzimático.

Las determinaciones se hacen paralelamente en las tres muestras empleando la misma metodología general con ligeras modificaciones que serán especificadas a continuación.

Determinación de la Actividad Enzimática

La actividad enzimática se determinó empleando el método fluorimétrico, cuyo principio se basa en la utilización de metilumbeliferil-derivados, no fluorescentes, específicos para cada enzima que al ser hidrolizados a nivel del enlace glicosídico liberan 4-metilumbeliferona que es un compuesto fluorescente.

Los procedimientos en esencia son los mismos que los reportados en la literatura¹ con ligeras modificaciones, consistentes en realizar una cinética en el tiempo para la reacción, en lugar de utilizar sólo el punto final de la determinación para obtener el valor de la actividad enzimática. La estabilidad del sustrato es controlada durante la reacción.

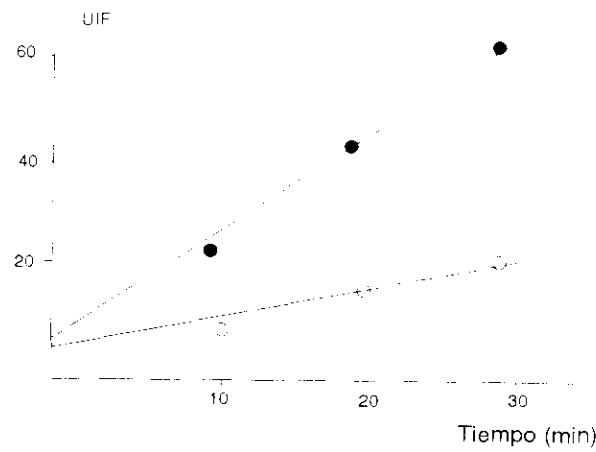
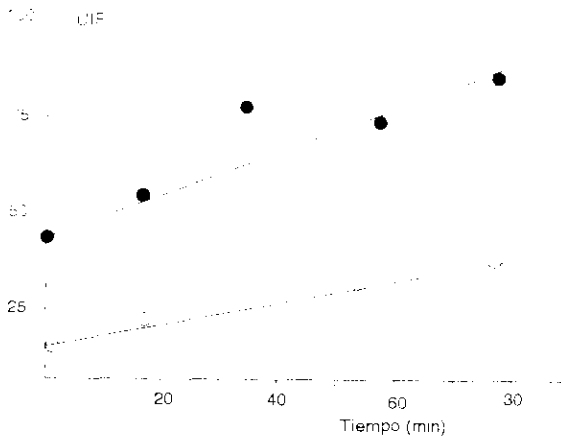
La determinación de la arilsulfatasa total en saliva por el método fluorimétrico se realizó modificando la concentración del sustrato a 25 mM. La actividad de la arilsulfatasa B en leucocitos se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Baum y col en 1959.

Los ensayos en saliva se realizaron contra blancos con el objetivo de corroborar la no existencia de componentes fluorescentes y descartar la aparición de un falso valor de actividad enzimática.

Para completar la evaluación de la saliva como material biológico para el diagnóstico de enfermedades lisosomales se estudiaron muestras de saliva de pacientes con deficiencia leucocitaria de las enzimas hexosaminidasa A y arilsulfatasa B.

El producto de la actividad enzimática fue determinado en un fluorímetro previamente calibrado. Una solución de sulfato de quinina equivalente en intensidad fluorescente a una solución de metilumbeliferona de concentración conocida fue utilizada para calibrar el fluorímetro Corning Eel 244.

Los resultados fueron expresados en $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ para el suero y la saliva, debido a que la concentración de proteínas séricas resulta muy heterogénea y en saliva resulta muy baja. Las actividades específicas leucocitarias se expresaron en $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas, excepto en la Tabla 1, donde aparecen expresados en $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ para facilitar la comparación entre los resultados.



RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de actividad específica de la hexosaminidasa total variaron cuando los ensayos se realizaron en presencia o ausencia de albúmina (Tabla I). La obtención de valores de actividad específica más elevados en presencia de albúmina pudo deberse a un efecto protector de esta proteína sobre la hexosaminidasa A y como consecuencia de esto, una menor inactivación de esta enzima en el tiempo.

TABLA I

Actividad específica de las enzimas lisosomales en saliva y leucocitos de sujetos normales

| Enzima | Actividad enzimática específica (nmol. h ⁻¹ .mL ⁻¹) | |
|----------------------|--|------------|
| | saliva | leucocitos |
| -manosidasa | 62,8 | 89,7 |
| -fucosidasa | 62,8 | 125,6 |
| -galactosidasa | 35,9 | 22,4 |
| β-galactosidasa | 58,5 | 257,2 |
| arilsulfatasa total | 15,0 | 42,6 |
| hexosaminidasa total | | |
| -con albúmina | 1 326,81 | 1 441,1 |
| -sin albúmina | 643,9 | 2 310,6 |

El comportamiento cinético de las enzimas en leucocitos y saliva fue similar (Figuras 1 y 2).

El diagnóstico definitivo en el caso de la paciente que presentaba características clínicas propias de la enfermedad de Tay-Sachs fue complejo, debido a que esta es una patología propia de poblaciones judías y la paciente estudiada era de la raza negra sin antecedentes judíos conocidos.

La hexosaminidasa A, enzima cuya deficiencia es la causa de la enfermedad de Tay-Sachs, es una proteína trimérica formada por dos cadenas β y una α. La producción de las cadenas β involucran un conjunto de modificaciones postranscripcionales del producto génico primario. Desde la remoción del péptido señal y la glicosilación en el retículo endoplasmático, con un oligosacárido rico en manosa, hasta la fosforilación de los residuos manosil terminal y la unión no covalente de las cadenas en el aparato de Golgi. Cualquier fallo en estos procesos, puede dar lugar a la heterogeneidad genética de esta enfermedad lisosomal³.

La aparición de una nueva mutación o variante de la enfermedad de Tay-Sachs no es un evento imposible, incluso en un paciente de la raza negra, debido a la extraordinaria heterogeneidad (4) y a la multitud de estructuras y funciones que se pueden afectar.

La reducida actividad específica de la hexosaminidasa A encontrada en leucocitos de la paciente (Tabla II) permitió establecer el diagnóstico inequívoco de una enfermedad de Tay-Sachs.

TABLA II

Actividad específica de las enzimas lisosomales leucocitarias de los pacientes

| Enfermedad | Enzima | Paciente | Control |
|------------------------|------------------------|----------|---------|
| Tay-Sachs | β-hexosaminidasa A | 112,5 | 1 238,9 |
| | β-hexosaminidasa total | 1 551,7 | 499,5 |
| Mucopolisacaridosis VI | arilsulfatasa B | 50,4 | 183,4 |
| | arilsulfatasa total | 2,5 | 4,4 |

Paralelamente, manteniendo exactamente las mismas condiciones experimentales, se hicieron las determinaciones en suero y saliva (Tablas III y IV).

TABLA III

Actividad específica de la β-N-acetilhexosaminidasa en suero

| Casos con respecto al | Actividad enzimática específica (nmol. h ⁻¹ .mL ⁻¹) | % control |
|-----------------------|--|-----------|
| Paciente | 0,0 | 0,0 |
| Madre | 160,1 | 39,0 |
| Control | 1 411,8 | 100,0 |

TABLA IV

Actividad específica de la β-N-acetilhexosaminidasa en saliva

| con respecto al control | Actividad enzimática específica (nmol. h ⁻¹ .mL ⁻¹) | % Casos |
|-------------------------|--|---------|
| Paciente | 22,9 | 5 |
| Madre | 411,8 | 80 |
| Control | 503,3 | 100 |

En el suero de la paciente no se detectó actividad alguna de la enzima hexosaminidasa A y para la madre se obtuvo un valor de actividad específica de un 39% con respecto al control. Este último resultado demostró el carácter heterocigótico de la madre para la enfermedad de Tay-Sachs, lo que confirmó los resultados obtenidos en leucocitos. El patrón de herencia para este tipo de patología es recesivo, por lo tanto los padres deben ser herocigotos obligados.

Los valores obtenidos en la saliva coincidieron con los encontrados en leucocitos y suero. El análisis de esta muestra permitió reafirmar el carácter heterocigoto de los padres.

El otro caso de estudio fue el del Síndrome de Maroteux-Lamy. Las arilsulfatasas constituyen un grupo de dos isoenzimas lisosomales, arilsulfatasa A y arilsulfatasa B y otra microsomal, arilsulfatasa C. La Mucopolisacaridosis tipo VI o Síndrome de Maroteux-Lamy se debe específicamente a la deficiencia de la arilsulfatasa B⁹.

La actividad específica de la arilsulfatasa total en la paciente se encontró disminuida, 57 % con respecto al control, como consecuencia de la deficiencia de la isoenzima B (Tabla I). Igual que para el caso de la deficiencia de hexosaminidasa A, se obtuvieron resultados en suero que confirmaron este diagnóstico y se demostró el carácter heterocigoto de la madre (Tabla V).

TABLA V

Actividad específica de la arilsulfatasa total en suero

| con respecto al Casos | Actividad enzimática específica (nmol. h ⁻¹ .mL ⁻¹) | % control |
|-----------------------|--|-----------|
| Paciente | 0,6 | 30,0 |
| Madre | 1,0 | 53,8 |
| Contro | 1,9 | 100,0 |

No se disponía de muestra de saliva de esta paciente, pero si de la madre, lo que permitió demostrar el carácter heterocigoto de la madre para esta patología (Tabla VI).

TABLA VI

Actividad específica de la arilsulfatasa total en saliva

| Casos con respecto al | Actividad enzimática específica (nmol. h ⁻¹ .mL ⁻¹) | % control |
|-----------------------|--|-----------|
| Madre | 1 | 33 |
| Control | 3 | 100 |

Entre los componentes de la saliva se pueden encontrar células epiteliales desprendidas de la mucosa bucal, leucocitos, linfocitos y bacterias; una gran diversidad de moléculas, enzimas de origen leucocitario y lisosomal⁶⁻¹⁰, mucina y sales minerales disociadas en iones (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, PO₄²⁻, Fe³⁺, etc)¹¹.

Con anterioridad¹², ya fue reportada la utilidad de este fluido como material biológico para la detección de sustancias fisiológicamente activas como la insulina. Se han determinado valores norma-

les de insulina humana en saliva mediante inmunoensayo enzimático fluorimétrico altamente sensible y se ha podido valorar la respuesta a la secreción de insulina mediante una carga de glucosa. Estos resultados indicaron la utilidad diagnóstica de la saliva para estos propósitos y demostró la posibilidad de utilización de métodos basados en los principios fluorimétrico de esta muestra.

De esta forma, queda demostrado el extraordinario valor de la saliva por ser una muestra que se obtiene fácilmente y que no requiere prácticamente ningún procesamiento previo para su empleo con fines diagnósticos.

CONCLUSIONES

Se demuestra el valor potencial de la saliva como material biológico de simple obtención para el diagnóstico de las enfermedades: Manosidosis, Fucosidosis, Fabry, GM1 Gangliosidosis, Mucopolisacaridosis, Sandhoff y Tay-Sachs y detección de heterocigotos.

La utilización de la saliva como material biológico posibilita la aplicación un método menos cruento para el diagnóstico de las enfermedades heredo metabólicas lisosomales.

BIBLIOGRAFIA

- Galjaard H. In: **Genetic Metabolic Diseases. Early diagnosis and prenatal analysis.** Elsevier/ North-Holland. Biomedical Press Amsterdam. New. York. OXFORD, 1980.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. **Biol. Chem.** 193, 265, 1951.
- Neufeld E.F., d'Azzo A. and Proia R.L. In: **Molecular Basis of lysosomal Storage Disorders.** Barranger J.A. and Brady R.O. Eds., 251-256. Academic Press, London. 1984.
- Specola N., Vanier M.T., Gutiérrez F., Mikol J., and Alcardi J. **Neurology** 40, 145, 1990.
- O'Brien J.F., Cantaz M. and Spranger, J. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 60, 1170, 1974.
- Den Tandt W.R. and Jacken, J. **Short communications,** 1979.
- Menguy R., Masters Y.F., Desbaillets L. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 134, 1020, 1970.
- Rinderknecht H., Geokas M.C. and Haverback B. J. **Clin. Chim. Acta.** 29, 481, 1970.
- Sakomoto W., Nishikaza O. and Sakakibara E. **J. Biochem.** 75, 675, 1974.
- Singer J.D., Cotlier E., van Krimmer R. **Lancet** 11, 1116, 1973.
- Spinetti M-Berti. **Manual de Bioquímica.** Editorial Científico-Médica. Barcelona-Madrid-Lisboa-Río de Janeiro, 1964.
- Ruan K., Ke D., Huang X., Ni D., Pan S., Yao R., Lin H., Xie Z. **Analytical Letters** 21, 381, 1988.