



Revisión

Utilidad de la espectrometría de masas para el análisis de metabolitos en líquido cefalorraquídeo de pacientes con errores congénitos del metabolismo

Mass spectrometry utility for the analysis of cerebrospinal fluid metabolites from patients with inborn errors of metabolism

Maria Antònia Caro-Miró¹, Blai Morales-Romero^{1,2}, Judit García-Villoria¹⁻³

¹Sección de Errores Congénitos del Metabolismo. IBC-Clínic. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. Barcelona. ²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Barcelona

Recibido: 14/09/2022
Aceptado: 17/12/2022

Correspondencia: Maria Antònia Caro Miró. Sección de Errores Congénitos del Metabolismo. IBC-Clínic. C/ Mejía Lequerica, s/n. Edificio Helios III. 08028 Barcelona. e-mail: macaro@clinic.cat

Palabras clave:

Enfermedades genéticas congénitas.
Agentes neurotransmisores. Aminas biógenas. Líquido cefalorraquídeo. Espectrometría de masas.

RESUMEN

Los errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores son enfermedades poco prevalentes que cursan con síntomas en el sistema nervioso central y, en algunos casos, afectan también a nivel periférico. En general, estos pacientes tienen que pasar por largos procesos hasta conocer su diagnóstico definitivo. El análisis de los metabolitos en el líquido cefalorraquídeo por espectrometría de masas en tándem presenta una buena sensibilidad y especificidad, agiliza el diagnóstico bioquímico y optimiza el uso de la muestra. En los últimos años, se tiende al estudio de paneles de metabolitos para facilitar el diagnóstico.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00150

Caro-Miró MA, Morales-Romero B, García-Villoria J. Utilidad de la espectrometría de masas para el análisis de metabolitos en líquido cefalorraquídeo de pacientes con errores congénitos del metabolismo. Rev Med Lab 2022;3(3):101-110

Keywords:

Genetic diseases inborn. Neurotransmitter agents. Biogenic amines. Cerebrospinal fluid. Mass spectrometry.

ABSTRACT

Inborn errors of neurotransmitter metabolism are rare diseases with central nervous system symptoms and, in some cases, peripheral involvement. In general, these patients must go through long processes before a definitive diagnosis is made. The analysis of cerebrospinal fluid metabolites by mass spectrometry has good sensitivity and specificity, speeds up biochemical diagnosis and optimises the use of the sample. In recent years, the trend has been towards the study of metabolites panels to facilitate the diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo xx, cuando se estableció la definición de *error congénito del metabolismo*, atribuida al médico inglés Archibald Edward Garrod, que se basó en estudios realizados con pacientes afectados de alcaptonuria, albinismo, cistinuria y pentosuria (1), hasta la actualidad, se han producido múltiples avances en el área de conocimiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. La implementación de la tecnología de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en los programas de cribado neonatal realizados a partir de sangre seca del talón de los recién nacidos, con su alta sensibilidad y especificidad, constituye un gran hito que ha permitido mejorar el rendimiento diagnóstico de un elevado número de enfermedades metabólicas hereditarias (2). Sin embargo, los pacientes que padecen otras patologías que no presentan marcadores bioquímicos periféricos continúan experimentando una larga odisea diagnóstica (3).

En la actualidad, el estudio de metabolitos que se realiza para diagnosticar estas entidades puede llevarse a cabo mediante dos estrategias. Por un lado, encontramos la metodología dirigida (la más extendida en los laboratorios clínicos), centrada en el estudio de un panel de metabolitos relacionados con la sospecha clínica. Por otro lado, la metodología no dirigida está basada en el estudio de un número muy elevado de metabolitos, incluyendo los que no están relacionados con la sospecha clínica inicial (4). Sin embargo, actualmente esta tecnología solo está disponible en centros muy especializados. Es importante recalcar que estos avances han ido de la mano de la creación de multitud de bases de datos, entre las que destaca la Human Metabolome Database (5).

Un número importante de enfermedades metabólicas hereditarias cursan con afectación del sistema nervioso central, que interfiere en el proceso de neurodesarrollo y predispone a la neurodegeneración (6). No obstante, los defectos primarios del metabolismo y del transporte de los neurotransmisores son un grupo de enfermedades neurometabólicas muy poco frecuentes (7,8) que pueden afectar tanto a pacientes pediá-

tricos como a adultos (7). Por ello, ante la sospecha de la mayoría de estas patologías se requiere el análisis de determinados metabolitos en líquido cefalorraquídeo (LCR) (9). En los últimos años se ha constituido un grupo de trabajo a nivel internacional para el estudio de estas enfermedades (International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders) cuyo objetivo principal es la creación de un registro global de pacientes (8).

En esta revisión se pretende describir el estado del arte del estudio de los principales metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores, ya sean defectos enzimáticos primarios o de sus cofactores, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

En los últimos años, la espectrometría de masas en tándem ha ido sustituyendo a las técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a detección electroquímica o fluorescente para la cuantificación de metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo de los neurotransmisores (10). Básicamente esto se debe a la mayor sensibilidad y especificidad de los detectores de espectrometría de masas en comparación con los detectores electroquímicos o fluorescentes. Por otro lado, también se ha puesto de manifiesto la necesidad de optimizar el uso de la muestra de LCR con el objetivo de poder analizar paneles de metabolitos de forma más rápida y con un menor volumen (3).

ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DE LAS AMINAS BIÓGENAS

Los neurotransmisores monoaminérgicos son moléculas derivadas de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) implicadas en procesos de señalización (11). En esta revisión nos centraremos en los defectos primarios del metabolismo de las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) y de la serotonina. Estos pueden clasificarse en defectos enzimáticos primarios y deficiencias de la tetrahidro-

biopterina (BH₄), que actúa como cofactor enzimático de la tirosina hidroxilasa (TH), de la triptófano hidroxilasa (TPH) y de la fenilalanina hidroxilasa (PAH), entre otras enzimas.

En la tabla I se muestran las alteraciones de metabolitos en los errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas, su tipo de herencia y su número

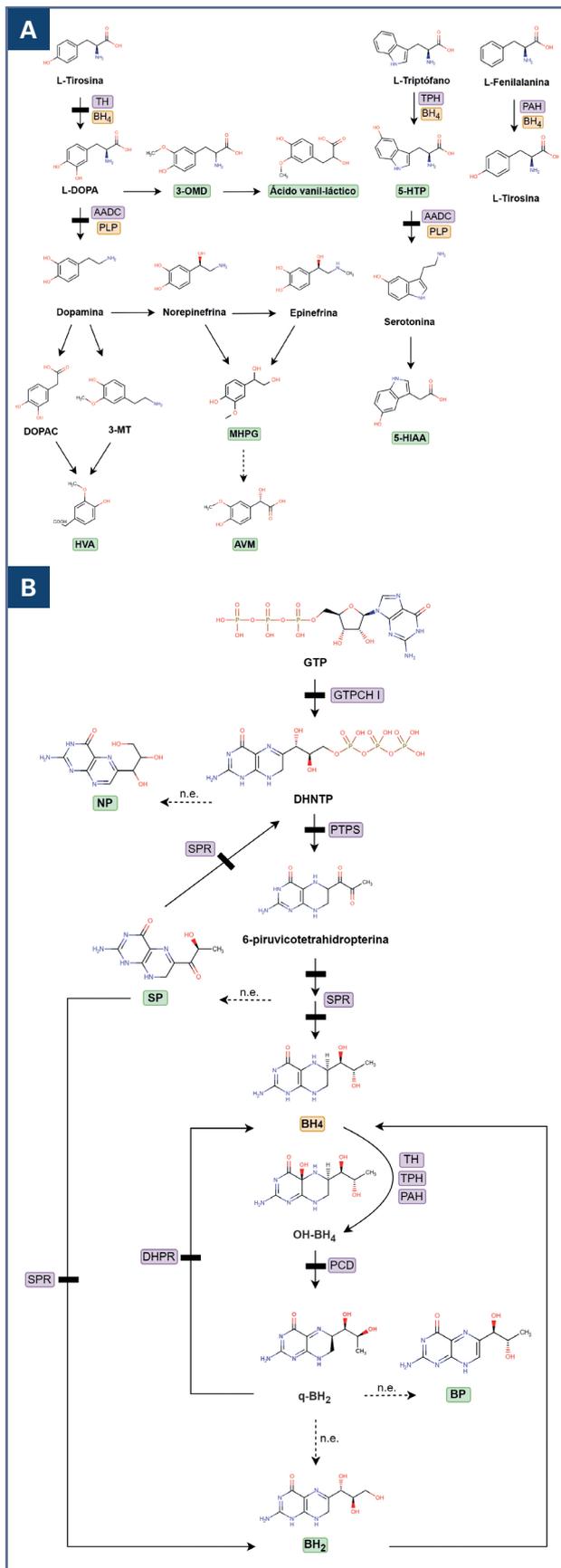
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Por otro lado, en la figura 1 se representan las principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas.

En primer lugar, destacaremos la deficiencia de la TH y la deficiencia de la carboxilasa de los aminoácidos aromáticos (AADC).

Tabla I.
Alteraciones de metabolitos en LCR y orina de los errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas, GABA, folato y vitamina B₆, tipo de herencia y número OMIM de las entidades

	Patología	Número OMIM	Tipo de herencia	Metabolitos alterados en LCR	Metabolitos alterados en orina
Errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas	Deficiencia de TH	605407	AR	↓ HVA, MHPG	
	Deficiencia de AADC	608643	AR	↓↓ HVA, 5-HIAA ↑↑ 3-OMD, 5-HTP	↑ Ácido vanil-láctico, 3-OMD
	Deficiencia de GTPCH I	233910	AR	↓ HVA, 5-HIAA	↓ BP, NP
	Deficiencia de PTPS	261640	AR	↓ HVA, 5-HIAA, BP ↑ NP	↓ BP ↑ NP
	Deficiencia de PCD	264070	AR	No se observan alteraciones	↓ BP
	Deficiencia de DHPR	261630	AR	↓ HVA, 5-HIAA, 5-MTHF ↑ BP	↓ BP
	Deficiencia de GTPCH I	128230	AD, AR	↓ HVA, 5-HIAA, NP, BP y BH ₄	
	Deficiencia de SPR	612716	AD, AR	↓ HVA, 5-HIAA, BH ₄ ↑ SP, BP, BH ₂	↑ SP
Errores congénitos del metabolismo del GABA	Deficiencia de GABA-T	613163	AR	↑ GABA, β-alanina	
	Deficiencia de SSADH	271980	AR	↑ GABA, GHB, homocarnosina, carnosina	↑↑ GHB
Errores congénitos del metabolismo del folato	Deficiencia de folato cerebral	613068	AR	↓ 5-MTHF	
	Malabsorción hereditaria de folato	229050	AR	↓ 5-MTHF	
Errores congénitos del metabolismo de la vitamina B ₆	Deficiencia de PNPO	610090	AR	↓ HVA, 5-HIAA ↑ 3-OMD, 5-HTP, glicina, treonina, histidina, taurina ↓ β-alanina, PLP	↑ Ácido vanil-láctico, 3-OMD
	Deficiencia de antitriptina o α-AASA deshidrogenasa	266100	AR	↑ P6C, α-AASA, ácido piperidínico, 3-OMD ↓ PLP, HVA, 5-HIAA, glicina, treonina	

↑: valores aumentados en comparación los valores de referencia de edad; ↓: valores disminuidos en comparación los valores de referencia de edad; AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; LCR: líquido cefalorraquídeo; TH: tirosina hidroxilasa; HVA: ácido homovanílico; MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; AADC: carboxilasa de los aminoácidos aromáticos; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; 3-OMD: 3-O-metildopa; GTPCH I: guanosina-5'-trifosfato ciclohidrolasa I; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano; BP: biopterina; NP: neopterina; PTPS: 6-piruvicetetrahydropterina sintasa; PCD: pterina-4α-carbaminolamina deshidratasa; DHPR: dihidropterina reductasa; 5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato; BH₄: tetrahydrobiopterina; SPR: sepiapterina reductasa; SP: sepiapterina; BH₂: 7,8-dihydrobiopterina; GABA: ácido γ-aminobutírico; GABA-T: GABA transaminasa; SSADH: succinato semialdehído deshidrogenasa; GHB: γ-hidroxibutírico; PNPO: piridox(am)ina-5'-fosfato oxidasa; PLP: piridoxal-5'-fosfato; α-AASA: α-aminoadípico semialdehído; P6C: piperidina-6-carboxilato.



Estas patologías se incluyen en los defectos enzimáticos primarios del metabolismo de las aminas biógenas y para su diagnóstico es imprescindible el análisis de determinados metabolitos en LCR. La TH es la enzima limitante de la síntesis de las catecolaminas, por lo que su deficiencia provoca una disminución en LCR de la concentración de ácido homovanílico (HVA), metabolito producido a partir de la dopamina y 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) (9,12). Por otro lado, la AADC es la enzima que cataliza el último paso de la vía de síntesis de la dopamina y serotonina. Su deficiencia genera una disminución de las concentraciones de HVA y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) acompañada de un incremento en las concentraciones de 3-O-metildopa (3-OMD) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en LCR (9). Por último, también se observa un incremento en la concentración de ácido vanil-láctico en orina detectado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (13), cuya cuantificación es de utilidad para el diagnóstico.

Por otro lado, las patologías relacionadas con la deficiencia de BH₄ se clasifican en dos grupos: las que cursan con hiperfenilalaninemia y las que no cursan con hiperfenilalaninemia.

Las deficiencias de BH₄ que cursan con hiperfenilalaninemia pueden detectarse en los programas de cribado neonatal mediante una elevación de fenilalanina o una alteración del ratio fenilalanina/tirosina en sangre seca obtenida del talón de los recién nacidos y analizada mediante MS/MS. Posteriormente, ante una detección positiva en el programa de cribado, de-

Figura 1 – (A y B). Principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas. Las enzimas se representan de color lila; los cofactores, de color amarillo y los metabolitos que pueden estar alterados, de color verde. Las reacciones no enzimáticas se muestran con flechas discontinuas con la indicación "n.e." Las flechas discontinuas sin "n.e." indican que no se presentan las reacciones enzimáticas intermedias. Los defectos enzimáticos mencionados en la revisión se representan mediante barras sólidas sobre las flechas. TH: tirosina hidroxilasa; BH₄: tetrahydrobiopterina; L-DOPA: levodopa; 3-OMD: 3-O-metildopa; AADC: carboxilasa de los aminoácidos aromáticos; PLP: piridoxal-5'-fosfato; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 3-MT: 3-metoxitiramina; HVA: ácido homovanílico; MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; AVM: ácido vanilmandélico; TPH: triptófano hidroxilasa; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; PAH: fenilalanina hidroxilasa; GTP: guanosina-5'-trifosfato; GTPCH I: guanosina-5'-trifosfato ciclohidrolasa I; DHNTS: 7,8-dihidroneopterina trifosfato; PTPS: 6-piruvicotetrahydropterina sintasa; SPR: sepiapterina reductasa; OH-BH₄: hidroxitetrahydrobiopterina; PCD: pterina-4 α -carbaminoalamina dehidratasa; DHPR: dihydropterina reductasa; q-BH₂: quininoide dihydrobiopterina; BH₂: 7,8-dihydrobiopterina; BP: biopterina; NP: neopterina; SP: sepiapterina. Las fórmulas se han obtenido de la Human Metabolome Database y de ChemsSpider. La imagen se ha elaborado con la aplicación draw.io.

ben realizarse otras pruebas complementarias para su confirmación bioquímica, como la determinación de los niveles de fenilalanina en plasma, la cuantificación de las pterinas en orina o incluso la determinación de determinados metabolitos en LCR (15). Podemos diferenciar dos subgrupos: la deficiencia de enzimas que participan en la síntesis de la BH_4 y el déficit de enzimas implicadas en su regeneración. La guanosina-5'-trifosfato ciclohidrolasa I (GTPCH I) es la enzima limitante de la vía de síntesis de la BH_4 . Su deficiencia heredada de forma autosómica recesiva (AR) provoca una disminución de las concentraciones de HVA y 5-HIAA en LCR, además de una disminución de biopterina (BP) y neopterinina (NP) en orina. La enzima 6-piruvicotetrahydropterina sintasa (PTPS) elimina el grupo trifosfato de la 7,8-dihidroneopterinina trifosfato (DHN-TP), y mediante una reacción de óxido-reducción, genera la molécula 6-piruvicotetrahydropterina, que posteriormente será convertida en BH_4 por la acción de la sepiapterina reductasa (SPR). La deficiencia enzimática de la PTPS es el desorden más frecuente del metabolismo de las pterinas (16). En LCR se observa una baja concentración de HVA y 5-HIAA, además de una disminución en los metabolitos de la vía de las pterinas, excepto la NP, que se encuentra elevada. En orina, también se demuestra la reducción de los metabolitos de la vía de las pterinas acompañada de un aumento en la concentración de NP (17). En la regeneración de la BH_4 participan la pterina-4 α -carbaminolamina dehidratasa (PCD) y la dihydropterina reductasa (DHPR). La primera cataliza la conversión de la pterina-4 α -carbaminolamina en quininoide dihydrobiopterina (q- BH_2) y la segunda genera la molécula de BH_4 a partir de la q- BH_2 (16). En la deficiencia enzimática de la PCD, en general, no se observan alteraciones del perfil de los neurotransmisores en el LCR e incluso algunos pacientes pueden ser asintomáticos (16,18). El déficit de la DHPR constituye la segunda deficiencia más prevalente de las enzimas implicadas en el metabolismo de las pterinas (19). La disminución de la actividad de esta enzima provoca un descenso en la concentración de HVA, 5-HIAA y 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) acompañada de un aumento de BP en LCR (17,18).

Las deficiencias de BH_4 que no cursan con hiperfenilalaninemia engloban la distonía sensible a levodopa (L-DOPA) o deficiencia de GTPCH I con herencia autosómica dominante (AD) y la deficiencia de SPR, heredada generalmente de forma AR, aunque existe un paciente descrito en la bibliografía con herencia AD (20). Los pacientes afectados de distonía sensible a L-DOPA o deficiencia de GTPCH I con herencia AD muestran una disminución de las concentraciones de HVA, 5-HIAA, NP, BP y BH_4 en LCR (7,12), ya que presentan una alteración en la vía de síntesis de la BH_4 . Por otro lado, la deficiencia de SPR, enzima implicada en el último paso en la síntesis de la BH_4 , provoca una disminución de las concentraciones de HVA, 5-HIAA y BH_4 acompañada de un incremento en las concentra-

ciones de sepiapterina (SP), BP y 7,8-dihydrobiopterina (BH_2) en LCR, además de un incremento de SP en orina (11,12).

Principales técnicas para el análisis de metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo de las aminas biógenas

En el artículo de Mena *et al.* (21) se describen las condiciones cromatográficas para el análisis de las aminas biógenas en LCR mediante HPLC de fase reversa acoplada a un detector electroquímico (ED). En la publicación de Ormazábal *et al.* (22) se exponen los valores de referencia de HVA, 5-HIAA, 3-OMD, 5-HTP y MHPG en LCR analizados mediante HPLC acoplado a ED en una población pediátrica control, además de en pacientes con déficit de TH y de GTPCH I. En los últimos años, debido a su mayor sensibilidad y especificidad de detección y cuantificación, muchos laboratorios han implementado la tecnología de espectrometría de masas en tándem para el estudio de los neurotransmisores. Sin embargo, debido a la elevada polaridad que presentan gran parte de estos metabolitos, su capacidad de retención en las columnas de los sistemas de HPLC de fase reversa es baja. Por ello, su análisis es complicado y su sensibilidad de detección puede verse disminuida. Así, en algunos casos, puede ser necesario realizar procesos previos de derivatización (23) o utilizar sistemas de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) (24) que permitan alargar los tiempos de retención y, consecuentemente, aumentar su sensibilidad de detección. No obstante, modificando las condiciones cromatográficas y la composición de la fase móvil también puede optimizarse la retención de estos metabolitos en columnas C18 de fase reversa (25-27). En el artículo de Wassenberger *et al.* (14) se describen los valores de distintos metabolitos en LCR, además de en suero y en orina, en pacientes con deficiencia de TH y deficiencia de AADC antes y durante el tratamiento.

El primer método descrito para llevar a cabo el análisis de las pterinas en LCR requería de una etapa de oxidación previa de las formas reducidas de la BP en la que su análisis tenía que realizarse por separado (28). Unos años más tarde se publicó otro método que permitía el análisis simultáneo de las formas oxidadas y reducidas de la BP (29). Sin embargo, se ha cuestionado la especificidad de este último (10). En el artículo de Ormazábal *et al.* (22) se exponen los valores de referencia de la NP y de la BP en LCR analizados mediante HPLC de fase reversa acoplada a un detector de fluorescencia (FD) en una población pediátrica control, además de en pacientes con déficit de TH y de GTPCH I. En la publicación de Arning *et al.* (30) se describe un método para la determinación de la BH_4 , BH_2 , NP y SP en LCR mediante LC-MS/MS con dilución isotópica.

ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA)

En este apartado van a describirse las principales patologías relacionadas con los defectos del catabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA) en las que el análisis de determinados metabolitos en LCR es de utilidad. En esta revisión no van a tratarse los defectos de receptores y de transportadores del GABA, ya que su diagnóstico es predominantemente genético (12).

En la tabla I se muestran las alteraciones de metabolitos en los errores congénitos del metabolismo del GABA, su tipo de herencia y su número OMIM. Por otro lado, en la figura 2 se representan las principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo del GABA.

La deficiencia de la GABA transaminasa (GABA-T) produce una alteración en la vía de degradación del GABA, lo que genera su acumulación en LCR, además de un aumento en la concentración de β -alanina (31,32). En el artículo de Jaeken *et al.* (33) se describen dos casos clínicos en los que se demuestra la utilidad de los marcadores citados en LCR ante la sospecha diagnóstica de esta patología.

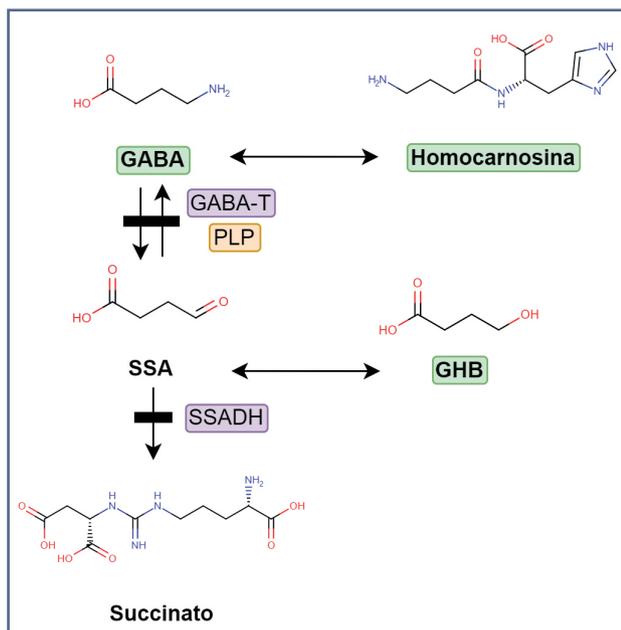


Figura 2 – Principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo del GABA. Las enzimas se representan de color lila; los cofactores, de color amarillo y los metabolitos que pueden estar alterados, de color verde. Los defectos enzimáticos mencionados en la revisión se representan mediante barras sólidas sobre las flechas. GABA: ácido γ -aminobutírico; GABA-T: GABA transaminasa; PLP: piridoxal-5'-fosfato; SSA: succinato semialdehído; GHB: ácido γ -hidroxibutírico; SSADH: succinato semialdehído deshidrogenasa. Las fórmulas se han obtenido de la Human Metabolome Database y de Chemspider. La imagen se ha elaborado con la aplicación draw.io.

La deficiencia de la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADHD) también cursa con una alteración en el metabolismo del GABA (34). Los pacientes que padecen este déficit enzimático presentan una acumulación de GABA en LCR, además de ácido γ -hidroxibutírico (GHB), un potente depresor del sistema nervioso central que también puede detectarse en orina, homocarnosina y carnosina (dipéptido formado por β -alanina y L-histidina) (31). En general, ante la sospecha de esta patología, se realiza un perfil de ácidos orgánicos en orina como prueba de cribado. Sin embargo, el análisis del LCR también puede ser de utilidad (34).

Principales técnicas para el análisis de metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo del GABA

Se han descrito varios métodos para el análisis del GABA: HPLC acoplada a FD (HPLC-FD) (35), HPLC-ED (36) o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), entre otras. No obstante, la mayoría requiere de largos protocolos de preparación y derivatización de la muestra antes de su análisis (37). En el artículo de Arning *et al.* (37) se describe un método para la cuantificación del GABA total y libre presente en LCR a través de LC-MS/MS con dilución isotópica y sin derivatización previa. La cuantificación del GABA total y libre se realiza por separado, tanto la preparación de la muestra como su análisis posterior. Además, para poder llevar a cabo la cuantificación del GABA libre se requiere la realización de una hidrólisis ácida previa que permita liberar el GABA unido a proteínas.

El estudio de la homocarnosina en LCR también es de utilidad ante una sospecha diagnóstica de un error congénito del metabolismo del GABA. Existen varias publicaciones en las que se describen diversas metodologías para su análisis: HPLC-FD (38) o HPLC de intercambio iónico acoplada a un detector ultravioleta (UV) (39), entre otras. En el artículo de Jansen *et al.* (40) se describe una metodología para el análisis de la homocarnosina mediante LC-MS/MS. Esta técnica presenta ciertas ventajas respecto a las anteriores, entre las que destacan: reducción del tiempo de la carrera cromatográfica de las muestras e introducción de un estándar interno para su posterior cuantificación.

ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DEL FOLATO

En esta revisión, nos centraremos en el análisis de la deficiencia de folato cerebral y en la malabsorción hereditaria de folato por su afectación al sistema nervioso central y por la importancia del análisis de metabolitos presentes en LCR ante una sospecha diagnóstica.

En la tabla I se muestran las alteraciones de metabolitos en los errores congénitos del metabolismo del folato, su tipo de herencia y su número OMIM.

La deficiencia de folato cerebral se define como un síndrome que cursa con afectación del sistema nervioso central en el que se demuestra una disminución en la concentración de 5-MTHF en LCR, con concentraciones normales en sangre periférica (12,41). La deficiencia del receptor de folato de alta afinidad, encargado de mediar el transporte de la molécula hacia el sistema nervioso central, constituye la forma congénita primaria.

Por otro lado, la malabsorción hereditaria de folato se produce ante una deficiencia del transportador de folato acoplado a protones, localizado en el intestino. Los pacientes afectados de esta patología muestran unos niveles disminuidos de folato tanto en LCR como en sangre periférica (12).

Principales técnicas para el análisis de metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo del folato

En la determinación del 5-MTHF en LCR, ante una sospecha diagnóstica de una deficiencia cerebral de folato también se han descrito diversas metodologías, entre las que destacan: HPLC-ED, HPLC-FD (42) y LC-MS/MS con dilución isotópica (43). En la publicación de Ormazábal *et al.* (44) se exponen los valores de referencia de 5-MTHF en LCR analizados mediante HPLC de fase reversa acoplada a FD. Por otro lado, en el artículo de Akiyama *et al.* (45) se propone el uso de la determinación del folato total presente en LCR como prueba de cribado ante la sospecha de una deficiencia cerebral de folato. Se sugiere la realización de esta prueba de cribado debido al difícil acceso a la cuantificación de 5-MTHF en LCR en gran parte de los centros hospitalarios.

ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA B₆

El piridoxal-5'-fosfato (PLP) es el metabolito biológicamente activo de la vitamina B₆. Se genera mediante reacciones de fosforilación y oxidación a partir de otros vitámeros precursores (piridoxina-5'-fosfato y piridoxamina-5'-fosfato). El PLP actúa como cofactor en múltiples reacciones enzimáticas esenciales en el sistema nervioso central como: el metabolismo de la dopamina, serotonina, glutamato, GABA, glicina y D-serina (46).

En la tabla I se muestran las alteraciones de metabolitos en los errores congénitos del metabolismo de vitamina B₆, su tipo de herencia y su número OMIM. Por otro lado, en la figura 3 se representan las principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo de la vitamina B₆.

En este apartado nos centraremos en el déficit de la enzima piridox(am)ina-5'-fosfato oxidasa (PNPO) y en el déficit de antiquitina o α -aminoadípico semialdehído (α -AASA) deshidrogenasa. Ambas patologías cursan con convulsiones dependientes de determinados me-

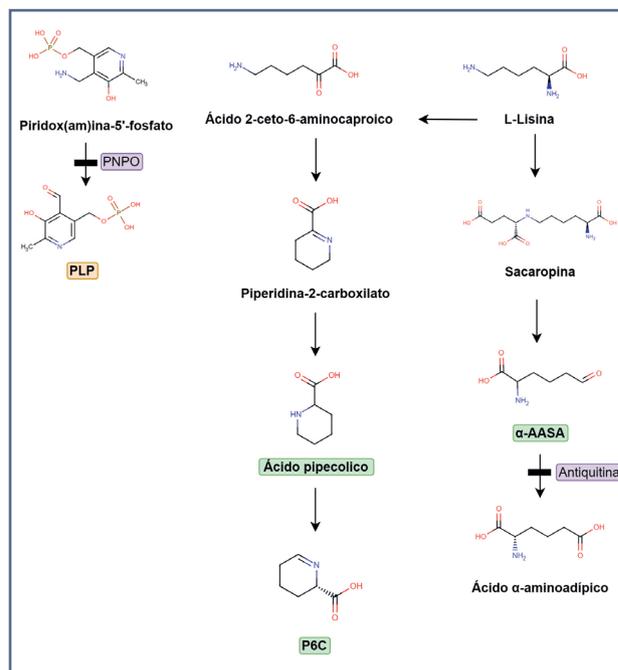


Figura 3 – Principales rutas metabólicas implicadas en los errores congénitos del metabolismo de la vitamina B₆. Las enzimas se representan de color lila; los cofactores, de color amarillo y los metabolitos que pueden estar alterados, de color verde. Los defectos enzimáticos mencionados en la revisión se representan mediante barras sólidas sobre las flechas. PNPO: piridox(am)ina-5'-fosfato oxidasa; PLP: piridoxal-5'-fosfato; P6C: piperidina-6-carboxilato; α -AASA: α -aminoadípico semialdehído. Las fórmulas se han obtenido de la Human Metabolome Database y de Chemspider. La imagen se ha elaborado con la aplicación draw.io.

tabolitos de la vitamina B₆. En el primer caso, los pacientes responden a la terapia con PLP y en el segundo, al tratamiento con piridoxina (12,47).

La PNPO es la enzima encargada de catalizar el paso de piridox(am)ina-5'-fosfato a PLP (48). Por ello, las convulsiones de los pacientes que presentan este déficit enzimático responden a la terapia con PLP. En el artículo de Mills *et al.* (49) se describen algunos casos de pacientes con este déficit en los que se observa una alteración de determinados metabolitos de las vías metabólicas en las que el PLP actúa como cofactor. Así, se demuestran disminuciones de HVA y 5-HIAA acompañadas de un aumento en las concentraciones de 3-OMD y 5-HTP en LCR. Además, se observa un incremento en la concentración de ácido vanil-láctico en orina, que también es de utilidad para el diagnóstico de la patología (13). Estas alteraciones se producen como consecuencia de una menor actividad enzimática de la AADC dependiente del cofactor. Por otro lado, se observa un aumento en las concentraciones de glicina y de treonina en LCR, igualmente explicado por una reducción de las actividades de determinadas enzimas implicadas en las vías de metabolización

de la glicina y de la treonina que requieren el PLP como cofactor. Las concentraciones de taurina e histidina en LCR también están aumentadas respecto a los valores de los pacientes control y las concentraciones de β -alanina y PLP se encuentran disminuidas (48,50). La antiquitina o α -AASA deshidrogenasa es una enzima implicada en el metabolismo cerebral de la lisina (51) y su déficit constituye la causa más común de epilepsia dependiente de piridoxina. Su deficiencia genera una elevación de piperidina-6-carboxilato (P6C), α -AASA y ácido pipercolico (52). La P6C produce una reacción de condensación con el PLP que genera su inactivación (51). Así, se observa una disminución de PLP en LCR que, a su vez, provoca un descenso en la concentración de HVA, 5-HIAA, glicina y treonina, acompañado de un incremento en las concentraciones de 3-OMD (50). Los cambios en las concentraciones de estos metabolitos también explican una disminución de la actividad de las enzimas dependientes de PLP como cofactor.

Principales técnicas para el análisis de metabolitos presentes en LCR de pacientes con errores congénitos del metabolismo de la vitamina B₆

En la publicación de Bates *et al.* (53) se describe un protocolo para el análisis del PLP en plasma mediante HPLC de fase reversa acoplada a FD. En el artículo de Ormazábal *et al.* (54) se exponen los valores de referencia del cofactor enzimático PLP en LCR de pacientes pediátricos con deficiencia de PNPO analizados mediante HPLC de fase reversa acoplada a FD. En la publicación de Van der Ham *et al.* (55) se refieren los valores de referencia de los vitámeros de la vitamina B₆ (piridoxal, piridoxina, piridoxamina y sus formas fosforiladas) en LCR mediante una metodología de LC-MS/MS con ionización positiva por electrospray y dilución isotópica validada por el mismo grupo, en la que, además, se lleva a cabo una precipitación de las proteínas de la muestra con ácido tricloroacético. Unos años más tarde el mismo laboratorio proporcionó los valores de referencia en plasma y LCR de los vitámeros de la vitamina B₆ (piridoxal, piridoxina, piridoxamina y sus formas fosforiladas) en pacientes pediátricos con discapacidad intelectual, asociada o no a epilepsia, cuantificados mediante cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) (46).

REQUERIMIENTOS PREANALÍTICOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE LCR

Para el análisis de los metabolitos presentes en LCR de pacientes con sospecha de errores congénitos del metabolismo con expresión en el sistema nervioso central, en general, se recogen tres tubos numerados según el orden de extracción, que deben protegerse de

la luz. El primer tubo se utiliza para el análisis del HVA y del 5-HIAA. En el segundo tubo se determinan los niveles de PLP y de 5-MTHF. Por último, el tercer tubo, que contiene 1,4-ditiotreitol (DTT) como agente reductor y ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) como quelante de metales, se utiliza para llevar a cabo el análisis de las pterinas (18,56). Las muestras deben centrifugarse justo después de su extracción y debe separarse el sobrenadante en otro tubo estéril para evitar la oxidación de determinados metabolitos por la presencia de eritrocitos (18). Estas muestras deben conservarse en hielo seco o -80 °C hasta su análisis. Este procedimiento es de gran relevancia en el análisis de GABA libre y de determinados metabolitos de la vía de las pterinas por su alta termolabilidad (17,18,57).

TENDENCIA ACTUAL. ANÁLISIS DE PANELES DE METABOLITOS PRESENTES EN LCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DE LOS NEUROTRANSMISORES

En dos publicaciones del año 2020, Galla *et al.* (25) y Klinke *et al.* (3), se propone el análisis simultáneo de 30 y de 38 metabolitos, respectivamente, en LCR ante una sospecha de un error congénito del metabolismo que curse con síntomas neurológicos. El artículo de Galla *et al.* se centra en el análisis de los metabolitos que se encuentran alterados en los defectos del metabolismo de la tirosina y del triptófano, ya sea por defectos enzimáticos primarios o por déficit de sus cofactores. Además, también se cuantifican las pterinas, el cortisol y la histamina tanto en suero como en LCR. El método, validado por la Agencia Europea del Medicamento, se basa en el análisis del panel de metabolitos en un mismo ensayo de 20 minutos mediante LC-MS/MS en una columna C18 de fase reversa con dilución isotópica. Tanto en la muestra de suero como en la muestra de LCR se lleva a cabo un proceso de precipitación de las proteínas presentes en la muestra de forma previa a su análisis. Por otro lado, en la publicación de Klinke *et al.* se llevan a cabo dos ensayos distintos, ambos analizados mediante LC-MS/MS con una columna C18 de fase reversa con dilución isotópica. El primer ensayo incluye los metabolitos relacionados con los errores congénitos del metabolismo de la tirosina y del triptófano, ya sea por defectos enzimáticos primarios o por déficit de sus cofactores, de la vitamina B₆, del folato o del resto de las pterinas. Por otra parte, el segundo ensayo se centra en el análisis de las purinas y de las pirimidinas, además del guanidinoacetato.

Por último, es importante mencionar la publicación de Yan *et al.* (58), en la que se analiza un panel de 13 metabolitos relacionados con la inflamación. El ensayo se lleva a cabo en LCR mediante LC-MS/MS en una columna C18 con dilución isotópica y permite cuantificar metabolitos que forman parte de la vía de las pterinas, triptófano-quinurenina y óxido nítrico.

CONCLUSIONES

En este artículo de revisión se demuestra la utilidad del estudio de metabolitos en LCR mediante espectrometría de masas en tándem para el diagnóstico de las enfermedades hereditarias del metabolismo de los neurotransmisores. Además, se pone de manifiesto la tendencia al análisis simultáneo de múltiples metabolitos con el objetivo de reducir el tiempo para obtener un diagnóstico, optimizar el uso de la muestra de LCR y disminuir los tiempos de respuesta del laboratorio para el análisis de los metabolitos y de la emisión del correspondiente informe. Finalmente, cabe destacar la importancia de llevar a cabo estudios moleculares después de haber realizado el diagnóstico bioquímico para poder ofrecer consejo genético al paciente y su familia, y en el caso de que sea posible, orientar respecto al pronóstico o al tratamiento de la patología.

AGRADECIMIENTOS

Beca de rotación nacional 2021 concedida por la Asociación Española del Laboratorio Clínico.

BIBLIOGRAFÍA

- Prasad C, Galbraith PA. Sir Archibald Garrod and alkaptonuria-'Story of metabolic genetics'. *Clin Genet* 2005;68(3):199-203.
- Mussap M, Zaffanello M, Fanos V. Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. *Ann Transl Med* 2018;6(17):338.
- Klinke G, Richter S, Monostori P, Schmidt-Mader B, García-Cazorla A, Artuch R, et al. Targeted cerebrospinal fluid analysis for inborn errors of metabolism on an LC-MS/MS analysis platform. *J Inherit Metab Dis* 2020;43(4):712-25.
- Coene KLM, Kluijtmans LAJ, van der Heeft E, Engelke UFH, de Boer S, Hoegen B, et al. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J Inherit Metab Dis* 2018;41(3):337-53.
- Wishart DS, Guo AC, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res* 2022;50(D1):D622-31.
- Saudubray JM, García-Cazorla A. An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2018;20(4):301-25.
- Pearl PL, Capp PK, Novotny EJ, Gibson KM. Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults. *Clin Biochem* 2005;38(12):1051-8.
- Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, López-Laso E, et al. The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders. *Mol Genet Metab Reports* 2016;9:61-6.
- Szymańska K, Kuśmierska K, Demkow U. Inherited disorders of brain neurotransmitters: Pathogenesis and diagnostic approach. *Adv Exp Med Biol* 2015;837:1-8.
- Guibal P, Lo A, Maitre P, Moussa F. Pterin determination in cerebrospinal fluid: State of the art. *Pteridines* 2017;28(2):83-9.
- Brennenstuhl H, Jung-Klawitter S, Assmann B, Opladen T. Inherited Disorders of Neurotransmitters: Classification and Practical Approaches for Diagnosis and Treatment. *Neuropediatrics* 2019;50(1):2-14.
- Couce ML, Aldámiz-Echevarría L, García-Jiménez MC, González-Lamuño D. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias; 2022.
- Ruiz A, García-Villoria J, Ormazábal A, Zschocke J, Fiol M, Navarro-Sastre A, et al. A new fatal case of pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase (PNPO) deficiency. *Mol Genet Metab* 2008;93(2):216-8.
- Wassenberg T, Geurtz BPH, Monnens L, Wevers RA, Willemsen MA, Verbeek MM. Blood, urine and cerebrospinal fluid analysis in TH and AADC deficiency and the effect of treatment. *Mol Genet Metab Reports* 2021;27:100762.
- Opladen T, López-Laso E, Cortès-Saladelafont E, Pearson TS, Sivri HS, Yıldız Y, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Orphanet J Rare Dis* 2020;15(1):126.
- Longo N. Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(3):333-42.
- Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales SJR, Clayton PT. The monoamine neurotransmitter disorders: An expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurol* 2011;10(8):721-33.
- Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders - Clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol* 2015;11(10):567-84.
- Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis* 2012;35(6):963-73.
- Steinberg D, Blau N, Goriunov D, Bitsch J, Zuker M, Humel S, et al. Heterozygous mutation in 5'-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 2004;5:187-90.
- Mena MA, Aguado EG, de Yébenes JG. Monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. HPLC/ED method. *Acta Neurol Scand* 1984;69(4):218-25.
- Ormazábal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Álvarez 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(1):153-8.
- Cox JM, Butler JP, Lutzke BS, Jones BA, Buckholz JE, Biondolillo R, et al. A validated LC-MS/MS method for neurotransmitter metabolite analysis in human cerebrospinal fluid using benzoyl chloride derivatization. *Bioanalysis* 2015;7(19):2461-75.
- Tufi S, Lamoree M, de Boer J, Leonards P. Simultaneous analysis of multiple neurotransmitters by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2015;1395:79-87.
- Galla Z, Rajda C, Rácz G, Grecsó N, Baráth Á, Vécsei L, et al. Simultaneous determination of 30 neurologically and metabolically important molecules: A sensitive and selective way to measure tyrosine and tryptophan pathway metabolites and other biomarkers in human serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr A* 2021;1635:461775.
- Marcos J, Renau N, Valverde O, Aznar-Lain G, Gracia-Rubio I, González-Sepúlveda M, et al. Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2016;1434:91-101.
- Fuertig R, Ceci A, Camus SM, Bezard E, Luippold AH, Hengerer B. LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain. *Bioanalysis* 2016;8(18):1903-17.
- Fukushima T, Nixon JC. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem* 1980;102(1):176-88.
- Hyland K. Estimation of tetrahydro, dihydro and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1985;343(1):35-41.

30. Arning E, Bottiglieri T. LC-MS/MS Analysis of Cerebrospinal Fluid Metabolites in the Pterin Biosynthetic Pathway. *JIMD Rep* 2016;29:1-9.
31. Parviz M, Vogel K, Gibson K, Pearl P. Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies. *J Pediatr Epilepsy* 2014;3(4):217-27.
32. Kennedy AD, Pappan KL, Donti T, Delgado MR, Shinawi M, Pearson TS, et al. 2-Pyrrolidinone and succinimide as clinical screening biomarkers for gaba-transaminase deficiency: Anti-seizure medications impact accurate diagnosis. *Front Neurosci* 2019;13:394.
33. Jaeken J, Casaer P, de Cock P, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Gamma-aminobutyric acid-transaminase deficiency: a newly recognized inborn error of neurotransmitter metabolism. *Neuropediatrics* 1984;15(3):165-9.
34. Pearl PL, Shukla L, Theodore WH, Jakobs C, Gibson KM. Epilepsy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism. *Brain Dev* 2011;33(9):796-805.
35. Goldsmith RF, Earl JW, Cunningham AM. Determination of gamma-aminobutyric acid and other amino acids in cerebrospinal fluid of pediatric patients by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1987;33(10):1736-40.
36. Naini AB, Vontzalidou E, Côté LJ. Isocratic HPLC Assay with Electrochemical Detection of Free gamma-aminobutyric Acid in Cerebrospinal Fluid. *Clin Chem* 1993;39(2):247-50.
37. Arning E, Bottiglieri T. Quantification of γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:109-18.
38. Dunnett M, Harris RC. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1997;688(1):47-55.
39. Yokoyama Y, Horikoshi S, Takahashi T, Sato H. Low-capacity cation-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing urinary basic metabolites using a reversed-phase column coated with hexadecylsulfonate. *J Chromatogr A* 2000;886(1-2):297-302.
40. Jansen EEW, Gibson KM, Shigematsu Y, Jakobs C, Verhoeven NM. A novel, quantitative assay for homocarnosine in cerebrospinal fluid using stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2006;830(2):196-200.
41. Ramaekers VT, Paediatric D. Cerebral folate deficiency. *Neurology* 2004;46(12):843-51.
42. Chládek J, Šišpera L, Martínková J. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;744(2):307-13.
43. Arning E, Bottiglieri T. Quantitation of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:175-82.
44. Ormazábal A, García-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, González V, Fernández-Álvarez E, Pineda M, et al. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: Reference values for a paediatric population. *Clin Chim Acta* 2006;371(1-2):159-62.
45. Akiyama T, Tada H, Shiokawa T, Kobayashi K, Yoshinaga H. Total folate and 5-methyltetrahydrofolate in the cerebrospinal fluid of children: correlation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(12):2009-14.
46. Albersen M, Bosma M, Jans JJM, Hofstede FC, van Hasselt PM, de Sain-van der Velden MGM, et al. Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120972.
47. Wilson MP, Plecko B, Mills PB, Clayton PT. Disorders affecting vitamin B6 metabolism. *J Inher Metab Dis* 2019;42(4):629-46.
48. Clayton PT. B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J Inher Metab Dis* 2006;29(2-3):317-26.
49. Mills PB, Surtees RAH, Champion MP, Beesley CE, Dalton N, Scamber PJ, et al. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)line 5'-phosphate oxidase. *Hum Mol Genet* 2005;14(8):1077-86.
50. Rahman S, Footitt EJ, Varadkar S, Clayton PT. Inborn errors of metabolism causing epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 2013;55(1):23-36.
51. Mills PB, Struys E, Jakobs C, Plecko B, Baxter P, Baumgartner M, et al. Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med* 2006;12(3):307-9.
52. Sharma S, Prasad AN. Inborn errors of metabolism and epilepsy: Current understanding, diagnosis, and treatment approaches. *Int J Mol Sci* 2017;18(7):1384.
53. Bates CJ, Pentieva KD, Matthews N, Macdonald A. A simple, sensitive and reproducible assay for pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma. *Clin Chim Acta* 1999;280(1-2):101-11.
54. Ormazábal A, Oppenheim M, Serrano M, García-Cazorla A, Campistol J, Ribes A, et al. Pyridoxal 5'-phosphate values in cerebrospinal fluid: Reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Mol Genet Metab* 2008;94(2):173-7.
55. Van der Ham M, Albersen M, de Koning TJ, Visser G, Middendorp A, Bosma M, et al. Quantification of vitamin B6 vitamers in human cerebrospinal fluid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2012;712:108-14.
56. Hyland K, Surtees RAH, Heales SJR, Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr Res* 1993;34(1):10-4.
57. Assmann B, Surtees R, Hoffmann GF. Approach to the diagnosis of neurotransmitter diseases exemplified by the differential diagnosis of childhood-onset dystonia. *Ann Neurol* 2003;54(Suppl.6):S18-24.
58. Yan J, Han V, Heng B, Guillemin G, Bandodkar S, Dale R. Development of a translational inflammation panel for the quantification of cerebrospinal fluid Pterin, Tryptophan-Kynurenine and Nitric oxide pathway metabolites. *eBioMedicine* 2022;77:103917.