

Dra. Elisabet Fuguet Jordà
Departament de Química Analítica

Dr. Rafael Artuch Iriberrí
*Laboratori de Metabolopaties Hospital
Sant Joan de Déu*



Treball Final de Grau

Determination of hexosamines in urine by HPLC for diagnosis of mucopolysaccharidoses type III

Determinación de hexosamines en orina por HPLC para el diagnóstico de mucopolisacariosis tipo III

Nelson Zamora Campos

June 2014

Aquesta obra esta subjecta a la llicència de:
Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>

*Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el
bello y maravilloso mundo del saber.*

Albert Einstein

El presente trabajo ha sido posible gracias a diferentes personas que se han identificado con el proyecto. Por esto, quiero expresar mi agradecimiento a:

-A mi tutor del trabajo, Rafael Artuch, por asignarme este proyecto, por tus consejos y ayuda en el desarrollo del mismo durante todos estos meses.

-A mi tutora, Elisabet Fuguet, por aconsejarme y ayudarme a corregir y mejorar esta memoria.

-A todo el personal del Laboratorio de Metabopatías del Hospital Sant Joan de Déu, por vuestro buen recibimiento, consejos, ayuda y motivación durante todo este tiempo.

-A Samuel Núñez, por tus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

-A mi madre, Elizabeth, por tu cariño, esfuerzo y ejemplo. Muchas gracias por hacer posible mi formación durante todos estos años.

CONTENTS

1. SUMMARY	3
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCTION	7
3.1. Glycosaminoglycans/Mucopolysaccharides	7
3.2. Mucopolysaccharidosis	10
3.3. Diagnostic methods	11
4. OBJECTIVES	16
5. EXPERIMENTAL	17
5.1. Población de estudio	17
5.2. Materiales y métodos	17
5.2.1. Patrones, reactivos y disolventes	17
5.2.2. Preparación de patrones y muestras	18
5.2.3. Instrumentación y condiciones cromatográficas	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Validación del procedimiento	22
6.2. Establecimiento de los intervalos de referencia	23
6.2.1. Metodos estadísticos	23
6.2.2. Estudios de correlación de los parámetros estudiados	23
6.2.3. Discusión	26
6.3. Estudio de la capacidad de discriminación de los parámetros estudiados	28
6.3.1. Métodos estadísticos	28
6.3.2. Parámetros y test estadísticos	28
6.3.3. Discusión	32
7. CONCLUSIONS	33
8. REFERENCES AND NOTES	35
9. ACRONYMS	37

1. SUMMARY

In the present work a reported analytical method was optimized in order to improve the diagnostic of a rare disease: Mucopolysaccharidoses type III (MPS III). This process is based on the separation and quantification of hexosamines (glucosamine and galactosamine), released as products of glycosaminoglycans (GAGs) hydrolysis presents in urine, by HPLC and detected by fluorescence measures. The concentration of galactosamine and glucosamine in urine of 20 persons as control sample and 9 patients with MPS III was determined. The control group showed similar concentrations of both hexosamines in urine, whereas in the group of MPS III patients the concentration of glucosamine was significantly higher than galactosamine. According to the obtained data, it was demonstrated that the ratio of concentrations galactosamine/glucosamine is the most useful parameter to discern people affected by MPS III, being a normal ratio 0.91 ± 0.08 and 0.28 ± 0.03 the ratio to diagnose the disease. It was established a unique reference interval to control sample for every considered biochemical parameter. According to the procedure, GAGs were hydrolyzed with HCl and the released hexosamines were derivatized with anthranilic acid. Finally, different products were separated and quantified by reverse phase HPLC and with fluorescence detector.

Keywords: Mucopolysaccharidoses; Glycosaminoglycans; Hexosamines; HPLC; Glucosamine; Galactosamine.

2. RESUMEN

En el presente trabajo se pone a punto una técnica descrita en la bibliografía que permite afinar el diagnóstico de una enfermedad rara: Mucopolisacáridosis tipo III (MPS III). El procedimiento consiste en separar y cuantificar las hexosaminas (glucosamina y galactosamina) liberadas en el proceso de hidrólisis de los glicosaminoglicanos (GAGs) excretados en orina mediante un procedimiento de HPLC con detección de fluorescencia. Se determinaron las concentraciones de glucosamina y galactosamina en orina de 20 sujetos control y 9 pacientes diagnosticados con MPS III. El primer grupo mostró unas concentraciones similares de ambas hexosaminas en orina y el segundo presentó una concentración significativamente más alta de glucosamina en comparación con la galactosamina. A partir de estos datos se demostró que la relación de concentraciones de galactosamina/glucosamina es el parámetro más eficaz para discriminar entre individuos sanos y enfermos, obteniéndose una relación de 0.91 ± 0.08 para un control y 0.28 ± 0.03 para un paciente enfermo. Se estableció un único intervalo de referencia para la población control, para cada parámetro bioquímico analizado. En el procedimiento, los GAGs fueron hidrolizados con HCl y las hexosaminas liberadas se derivatizaron con ácido antranílico y fueron separadas y cuantificadas por HPLC de fase reversa y detector de fluorescencia.

Palabras clave: Mucopolisacáridosis; Glicosaminoglicanos; Hexosaminas; HPLC; Glucosamina; Galactosamina

3. INTRODUCTION

3.1 Glicosaminoglycans/Mucopolysaccharides:

Glicosaminoglycans (GAGs) or mucopolysaccharides are a group of polysaccharides which are obtained from the hydrolysis of proteoglycans, a type of glycoproteins that are found in extracellular matrix and in the plasmatic membrane of a wide range of mammalian cells. Proteoglycans are formed by several chains of GAGs covalently bonded to a proteic nucleus. These polysaccharides consist on a number of successive units of disaccharides [1]. As a result of the differences on the sulfation and/or acetylation degree or the inclusion of different monosaccharides, a range of different GAGs can exist:

a) Chondroitin sulfate (CS): Is the most common GAG and is formed by successive alternate units of glucuronic acid and *N*-Acetilgalactosamine chains. Depending on the position of the sulfate group in galactosamine, the following compounds are distinguished [2]:

-Chondroitin sulfate A (CSA): sulfate in 4-position (Fig.1)

-Chondroitin sulfate C (CSC); sulfate in 6-position (Fig.2)

b) Dermatan sulfate (DS) o Condroitin sulfate B (CSB): Is formed by chains containing successive alternate units of iduronic acid and *N*-Acetilgalactosamine. Also a certain amount of glucuronic acid (C-5 epimer of iduronic acid) is found in CSB due to the epimerization process (Fig.3)

c) Heparan sulfate (HS): Is formed by units of iduronic acid, glucosamine, glucuronic acid and *N*-Acetilglucosamine in different ammounts (Fig.4)

d) Heparan sulfate (HS): Is formed by chains which are composed of successive units of galactose and *N*-Acetilglucosamine (Fig.5)

The initial cleavage of GAGs linked to proteins leads to polysaccharides sulfated chains, and then, these chains are subsequently degraded by enzymes within lysosomes. The degradation is started by the non-reducing side of the molecule.

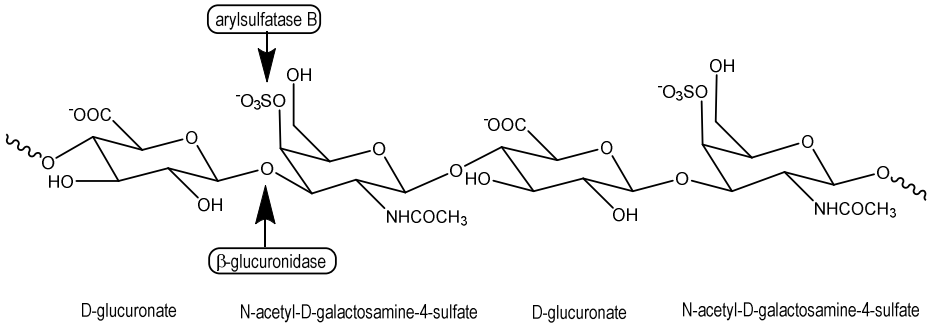


Figure 1. Structure of Chondroitin sulfate A with lysosomal enzymes. The cleavage sites are indicated by arrows

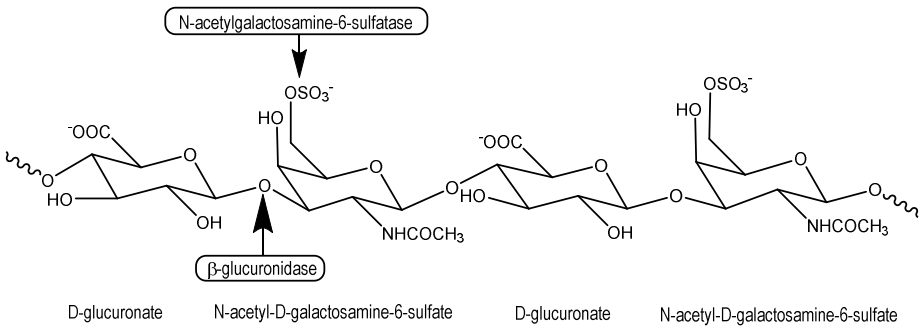


Figure 2. Structure of Chondroitin sulfate C with lysosomal enzymes. The cleavage sites are indicated by arrows

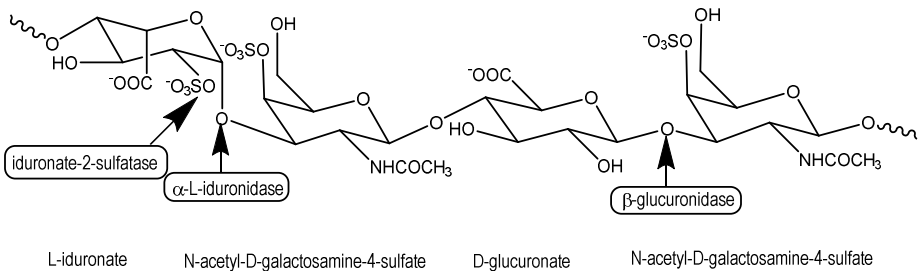


Figure 3. Structure of Dermatan sulfate with lysosomal enzymes. The cleavage sites are indicated by arrows

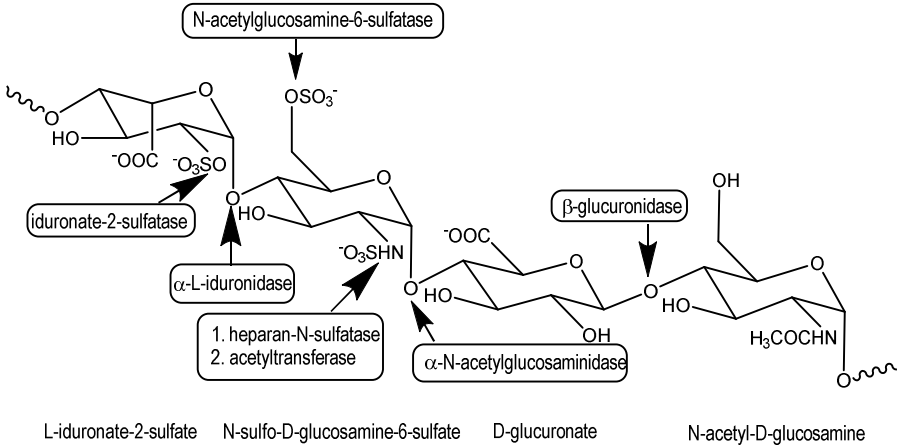


Figure 4. Structure of Heparan sulfate with lysosomal enzymes. The cleavage sites are indicated by arrows

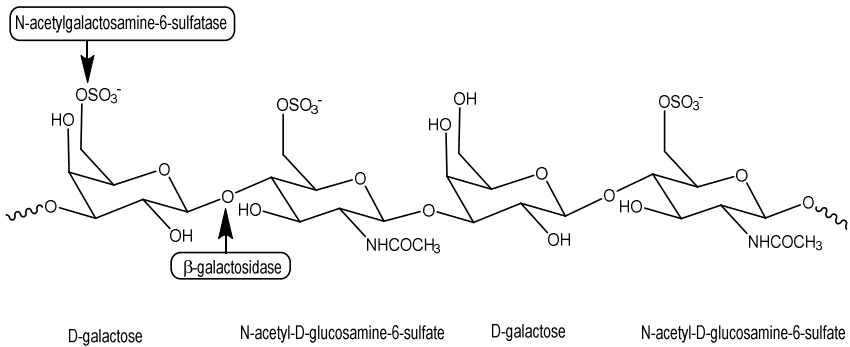


Figure 5. Structure of Keratan sulfate with lysosomal enzymes. The cleavage sites are indicated by arrows

3.2 Mucopolysaccharidoses

Mucopolysaccharidoses (MPS) is a group of metabolic hereditary diseases (classified as rare diseases) due to a lack of activity of some enzymes that process glycosaminoglycans (GAGs). As a result of that lack of activity, an accumulation of GAGs is found in lysosomes and biological fluids, and this is the cause of the group of metabolic deficiencies known as MPS. There are a number of common features among the MPS diseases: at the beginning there is an asymptomatic period which comprises the first months or years of life. Once the accumulation of GAGs triggers the disease, a progressive damage to the tissues is produced until it becomes irreversible (nervous system, cognitive tissue and liver are some of the critically affected tissues) and commonly dysmorphism (alterations in physical appearance called “Gargoylism”) is presented [3]. The main biomarker for these diseases is an atypically high concentration of GAGs which can be detected in urine as well as a decreased enzyme activity in blood samples (the second study is used as a complement to the preliminary urine test).

MPS could be definitely diagnosed by detecting the mutations of DNA in the group of candidate genes which are involved in such diseases. Therefore, MPS are classified depending on the lack of activity of the different enzymes that break down GAGs, and that lack of activity is due to mutations in genes responsible for coding and synthesis of these enzymes [4]. Depending on the type of enzyme involved, a particular type of GAG accumulates (table I)

Types	Eponym	Gen	Enzyme	Accumulated GAGs
I	Hurler	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase	DS, HS
I	Scheie	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase	DS, HS
I	Hurler-Scheie	<i>IDUA</i>	α -L-iduronidase	DS, HS
II	Hunter	<i>IDS</i>	Iduronate-2-sulfatase	DS, HS
IIIA	Sanfilippo A	<i>SGSH</i>	Heparan-N-sulfatase	HS
IIIB	Sanfilippo B	<i>NAGLU</i>	α -N-acetylglucosaminidase	HS
IIIC	Sanfilippo C	<i>HGSNAT</i>	Acetyltransferase	HS
IIID	Sanfilippo D	<i>GNS</i>	N-acetylglucosamina-6-sulfate	HS
IVA	Morquio A	<i>GALNS</i>	N-acetylgalactosamine-6-sulfate	KS, CSC
IVB	Morquio B	<i>GLBI</i>	β -D-galactosidase	KS
VI	Maroteaux-Lamy	<i>ARSB</i>	Arylsulfatase B	DS
VII	Sly	<i>GUSB</i>	β -D-glucuronidase	DS,HS,CSA

Table I: MPS types, eponymes, genes, enzyme involved and types of GAGs accumulated

3.3 Diagnostic methods

-General screening method

- **UV-Vis Spectrophotometry:**

As GAGs are present in urine, there is a high interest in the development of robust and quantitative methods, which could be performed in a short period of time and could be automated. Also analytical methods should be as cheap as possible. In the group where the present work has been performed, the method for detection and quantification of GAGs is UV-Vis spectrophotometry, based on a reaction between GAGs and a chromophore which lead to an UV-Vis absorbent complex. This method is widely used as an initial step for the study of such substances and diseases.

The chromophore is 1,3-dimethylene blue (DMB). This compound forms a complex GAG-DMB with an intense absorption at 530 nm [5]

One of the advantages of this method is the easy automatization of the technique. However, only the total amount of GAGs could be determined, instead of discriminating among them. In addition, in diseases MPS IV and VII false negative results could be obtained due to the huge variability in quantitative excretion of GAGs. For that reason, it is crucial to develop analytical methods which allow us to distinguish between different kinds of excreted GAGs.

-Methods for the discrimination between different GAGs:

Nowadays, two methods are widely used to separate and quantify different kinds of GAGs (GAGs tipification):

- **Electrophoresis in cellulose acetate gels:**

This is the most common procedure for the identification of GAGs. It is based on selective precipitation of GAGs in urine, then they are dissolved in water and red phenol and to finally to separate them by electrophoresis over cellulose acetate strips (saturated with a barium acetate buffer 0.1M) with a potential of 200 V for 5 minutes. Then the strip is submerged in a 1 M barium acetate buffer with a 15 % (v/v) of ethanol for 2 minutes. Another step of electrophoresis is performed at 200 V for 30 minutes and then the stripe is saturated with the 0.1 M barium acetate buffer with a 50 % (v/v) of ethanol for 2 minutes. Finally, the last electrophoresis step is performed at 200 V for 10 minutes and is colored with "alcian" blue for 15 minutes. It is washed with acetic acid 0.1 M. The strip is dried at room temperature, is scanned and evaluated by densitometry [1]

The problem that this process may present is that this is a manual method, hardly automatizable and critically depends on a quite subjective visual inspection and it is only semiquantitative.

- **High-performance liquid chromatography with turbo ion spray tandem mass spectrometry detection(HPLC-ESI-MS/MS)**

Recently there has been standardization processes for quantitative determination of GAGs through RP-HPLC-ESI-MS/MS, a really expensive technology. Moreover, a high cost must be afforded in order to prepare the sample so it can be analyzed. Mainstream, GAGs present in the sample (which can be obtained from blood or urine) must be hydrolyzed by enzyme digestion (enzymes chondroitinase B, heparitinase and querantase II) so disaccharides DS, HS and KS are produced respectively. Then this disaccharides are separated and quantified by HPLC-MS/MS [6]

- Method for analysis of hexosamines

- **Reverse-phase High-performance liquid chromatography with fluorescence detection**

The method consists on GAGs hydrolysis to deliver hexosamines: GlcN and GalN (Fig.6-10). Then to react hexosamines with a derivatization agent and to separate them by HPLC with fluorescence detection [7]. The GalN/GlcN ratio provides important information about the type of GAGs that is accumulated in different types of MPS (table II)

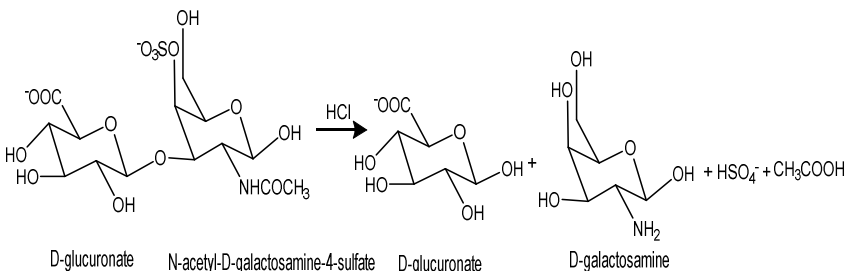


Figure 6. Hydrolytic cleavage of CSA disaccharide. GalN is the free hexosamine

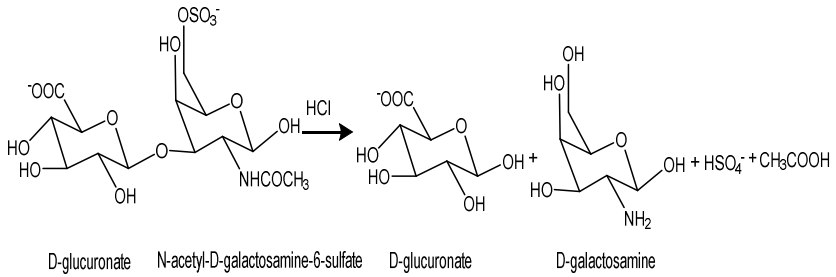


Figure 7. Hydrolytic cleavage of CSC disaccharide. GalN is the free hexosamine

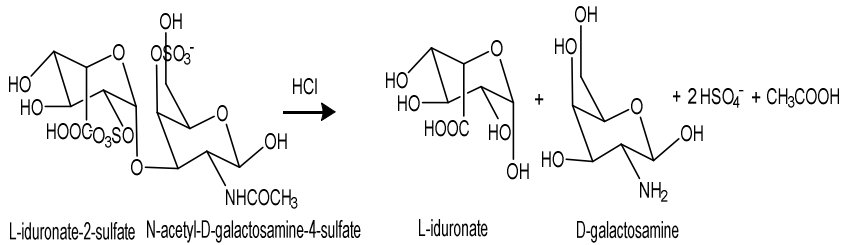


Figure 8. Hydrolytic cleavage of DS disaccharide. GalN is the free hexosamine

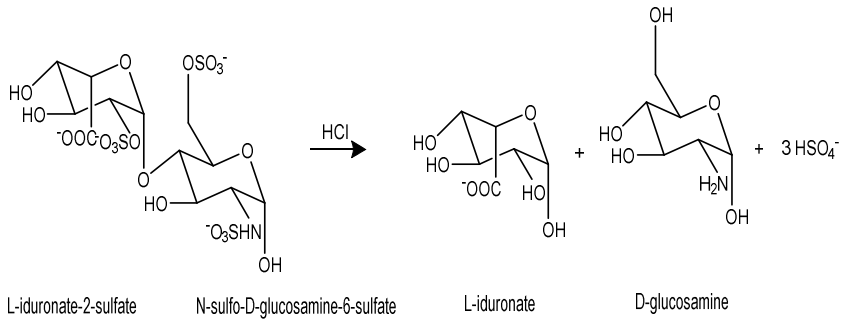


Figure 9. Hydrolytic cleavage of HS disaccharide. GlcN is the free hexosamine

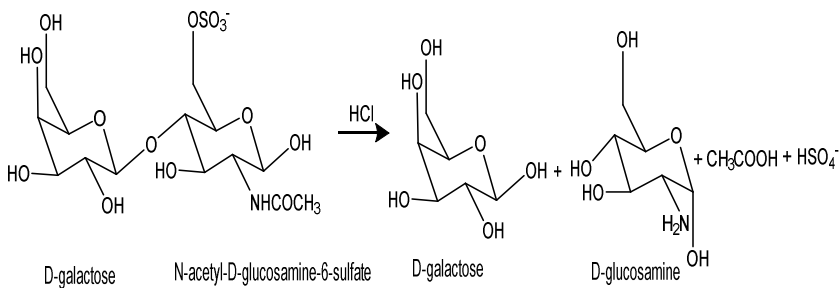


Figure 10. Hydrolytic cleavage of KS disaccharide. GlcN is the free hexosamine

GAG type	Hexosamine type	GalN/GlcN Ratio
CSA	GalN	increases
CSC	GalN	increases
DS	GalN	increases
HS	GlcN	decreases
KS	GlcN	decreases

Table II: Changes in values of GalN/GlcN ratio are detailed according to the type of GAGs that is accumulated in MPS

4.OBJECTIVES

The general objective in the present work is to optimize an HPLC technique, previously reported in the literature, to isolate and quantify hexosamines (glucosamine and galactosamine) released in the hydrolysis of GAGs presents in urine.

The following particular objectives are defined:

- To establish optimized conditions for the preparation and derivatization of a sample for a proper detection of galactosamine and glucosamine.
- To establish optimized chromatographic conditions for a proper isolation and detection of the compounds if interest.
- To validate the procedure, with variation coefficients, limit of detection and limit of quantitation
- To establish the ratio of concentrations galactosamine/glucosamine in a control sample and in a sample of patients diagnosed with MPS III.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Población de estudio

Para establecer los valores de referencia, se estudiaron 20 controles (edad, 2-16 años, media = 7.8 y desviación estándar=4.2) en muestras de orina de pacientes que acudieron al hospital para exploraciones pediátricas convencionales, y que no presentaban ninguna enfermedad crónica o trastorno neurológico conocido. Se estudiaron además muestras de orina de 9 pacientes con diagnóstico genético de diferentes MPS III (edad, 3-17, media = 9.9 y desviación estándar=4.6)

5.2. Materiales y métodos

5.2.1 Patrones, reactivos y disolventes

Patrones

-Hidrocloruro de D-(+)-glucosamina ($\geq 99\%$ p/p, CAS 66-84-2, Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA)

-Hidrocloruro de D-(+)-galactosamina ($\geq 99\%$ p/p, CAS 1772-03-8, Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA)

Reactivos utilizados:

Acetato de sodio ($\geq 99\%$ p/p, CAS 127-09-03, Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácido clorhídrico fumante (37% p/p, CAS 7647-01-0, Merck, Darmstadt, Alemania)

Ácidoantranílico ($\geq 99\%$ p/p, CAS 118-92-3, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Cianoborohidruro de sodio ($\geq 99\%$ p/p, CAS 25895-60-7, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Ácido bórico ($\geq 99\%$ p/p, CAS 10043-35-3, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Ácido acético glacial (100%, CAS 64-19-7, Merck, Darmstadt, Alemania)

Disolventes utilizados como eluyentes:

Etanol de grado HPLC (CAS 64-17-5, Merck, Darmstadt, Alemania)

Metanol de grado HPLC (CAS 67-56-1, Merck, Darmstadt, Alemania)

Agua Milli-Q (Merck, Millipore, Darmstadt, Alemania)

5.2.2. Preparación de los patrones y muestras**Patrones**

A partir de los patrones de hidrocloreuro de glucosamina e hidrocloreuro de galactosamina se preparan 2 patrones madre, uno de GlcN y otro de GalN de concentraciones 828 y 846mg/L, respectivamente. Seguidamente, se hacen las correspondientes diluciones en agua milli-Q y se obtienen 6 patrones de GlcN de concentraciones 4.1, 8.3, 24.8, 41.4, 66.2 y 82.8 mg/L, respectivamente y otros 6 patrones de galactosamina de concentraciones: 4.2, 8.5, 16.9, 25.4, 33.8 y 42.3 mg/L, respectivamente. Después se pipetea 100µL de cada patrón en tubos Ependorff y se desecan en un termobloque a 110°C (de esta manera, en cada Ependorff se deseca una determinada cantidad de patrón según su concentración)

Para la reacción de derivatización se prepara una solución de metanol-acetato-borato con las siguientes cantidades: 120 mg de acetato de sodio y 100 mg de ácido bórico disueltos en 5 ml de metanol. Para preparar el reactivo derivatizante se pesan 150mg de ácido antranílico (reactivo derivatizante) y 100 mg de cianoborohidruro de sodio en un tubo de vidrio y se disuelven en 5ml de solución de metanol-acetato-borato.

Cada patrón desecado se disuelve en un mismo volumen de reactivo: 150µL de reactivo derivatizante y 150µL de acetato de sodio 1% en cada uno de los Ependorff. La reacción se lleva a cabo durante 1h a 80°C en un termobloque. Seguidamente se dejan enfriar a temperatura ambiente y cada patrón se analiza por HPLC (volumen de inyección de 10µL).

Muestras

Se distinguen 3 etapas en la preparación de las muestras:

-Precipitación con etanol de todos los GAGs presentes en la orina

Se adiciona 500 µL de orina en un Ependorff y se centrifuga a 10000rpmx10min. A continuación, se pipetea 100µl de sobrenadante en otro Ependorff y se adicionan 250µL de etanol. Seguidamente se deja en el congelador a -30°C durante 2 h para favorecer la precipitación de todos los GAGs.

Después, el Ependorff se centrifuga a 10000rpmx10min, se decanta el sobrenadante y se conserva el pellet.

-Hidrólisis de los GAGs para obtener sus correspondientes hexosaminas

El pellet se trata con 250µL de HCl 4M y se lleva a cabo la hidrólisis a 110°C durante 1.5 horas en un termobloque. Seguidamente, el producto resultante se deseca en el mismo termobloque y a la misma temperatura.

-Derivatización de las hexosaminas

Se pipetea 150µL de solución derivatizante (descrita en la preparación de los patrones) y 150µL de acetato de sodio 1% en el Ependorff que contiene la muestra de orina hidrolizada y desecada. La reacción se lleva a cabo durante 1h a 80°C en un termobloque. Seguidamente la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y se analiza por HPLC (volumen de inyección de 10µL)

5.2.3. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Todas las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo con una columna Teknocrroma C18, de dimensiones 25x0,4cm y diámetro de partícula de 5µm, equipada con una precolumna con el mismo relleno.

El análisis cromatográfico se ha realizado en un HPLC con detección de fluorescencia (Perkin-Elmer, Series 200, USA). La detección de fluorescencia se llevó a cabo a las longitudes de onda de excitación y emisión de 300 y 425 nm, respectivamente. El volumen de inyección para patrones y muestras es de 10 µL. Las muestras se inyectaron con un inyector automático. El flujo de fase móvil fue de 1ml/min.

La composición de la fase acuosa (eluyente A) es un tampón de acetato de sodio de concentración 50mM y de pH 4.1. La composición de la fase orgánica (eluyente B) es 20% de eluyente A en metanol. El gradiente de elución empleado se muestra en la tabla III.

Tiempo (min)	A(%)	B(%)	Modo de elución
0-5	90	10	Isocrática
5-20	85	15	Gradiente lineal
20-25	85	15	Isocrática
25-30	0	100	Gradiente lineal
30-35	0	100	Isocrática
35-45	90	10	Gradiente lineal

Tabla III: Gradiente de elución empleado para todas las separaciones cromatográficas

Modificaciones respecto al procedimiento descrito en la bibliografía.

Las modificaciones respecto al procedimiento descrito en la bibliografía [7] fueron:

-La utilización de una columna Teknocroma C18 5 μ m (25x0.4cm) en contraste con la columna Gemini C18 3 μ m (15x0.46cm) de Phenomenex.

-El gradiente de elución empleado (tabla III) en contraste con el gradiente de 0-10 min 3% B isocrático, 10-35 min 3-10% de B con gradiente lineal, 35-45 min 10-100% de B con gradiente lineal, 45-50min de B isocrático y 50-55 min 3% de B isocrático.

-La desecación de patrones y muestras en contraste con la liofilización de los mismos

A continuación se muestran los cromatogramas de los patrones de GalN y de GlcN

que se registraron después de la establecer las condiciones cromatográficas (Fig.11-12).

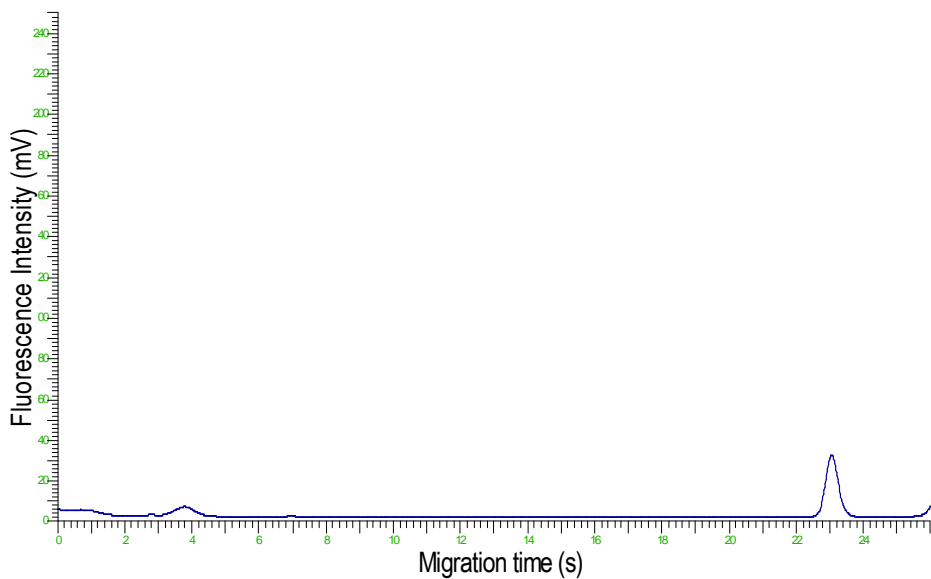


Figura 11. Cromatograma de un patrón de GalN de concentración 2.8 mg/L

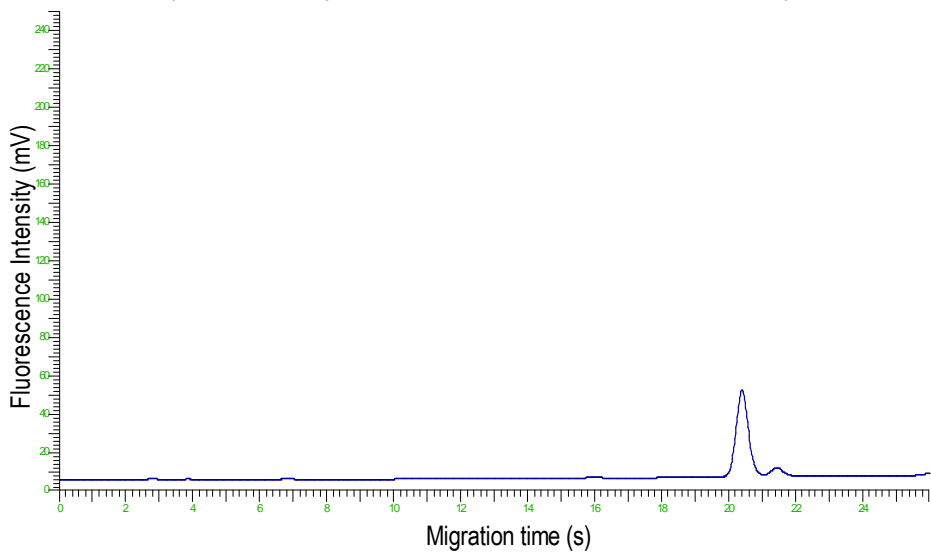


Figura 12. Cromatograma de un patrón de GlcN de concentración 2.8 mg/L

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación del procedimiento.

-Se calculó el coeficiente de variación intraserie, dividiendo la desviación estándar por la media de los valores obtenidos de ratio GalN/GlcN al analizar una misma muestra de orina de sujeto control 7 veces en un mismo día y el resultado se multiplicó por 100 (porcentaje).

- Se calculó el coeficiente de variación interserie, dividiendo la desviación estándar por la media de los valores obtenidos de la relación GalN/GlcN al analizar una misma muestra de orina de paciente con MPS III en 3 días diferentes y el resultado se multiplicó por 100 (porcentaje)

-El límite de detección se calculó como la concentración de de GlcN y GalN que proporciona una señal igual a la media de 3 blancos más tres veces la desviación estándar

-El límite de cuantificación se calculó como la concentración de GlcN y GalN que proporciona una señal igual a la media de 3 blancos más 10 veces la desviación estándar

Los coeficientes de variación fueron:

- Coeficiente de variación intraserie ($\sigma / \bar{x} \cdot 100$) para un valor de $\bar{x} = 1,02$ y una $\sigma = 0.05 \rightarrow 4.8\%$.
- Coeficiente de variación interserie ($\sigma / \bar{x} \cdot 100$) para un valor de $\bar{x} = 0.28$ y una $\sigma = 0.02 \rightarrow 7.14\%$.

Los límites de detección fueron:

- GlcN $\rightarrow 0.15$ mg/L
- GalN $\rightarrow 0.40$ mg/L

Los límites de cuantificación fueron:

- GlcN $\rightarrow 0.35$ mg/L
- GalN $\rightarrow 0.81$ mg/L

Como límite arbitrario de consenso en el laboratorio donde se realizó el procedimiento, se considera que los valores de coeficientes de variación interserie o intraserie inferiores al 15% resultan adecuados para el propósito del mismo (identificación de pacientes con enfermedades metabólicas).

Los tiempos de retención junto con los parámetros de la recta de calibrado de ambas hexosaminas se representan en la tabla IV:

Hexosamina	Tiempo de retención (min)	Ecuación	R ²
Glucosamina	20.5	$y=188431x-644367$	0.9975
Galactosamina	23.1	$y=219007x-837464$	0.9945

Tabla IV. Tiempo de retención y parámetros de las rectas de calibrado de las hexosaminas

6.2. Establecimiento de los intervalos de referencia

6.2.1. Métodos estadísticos

Para el cálculo de los intervalos de referencia en población control, se aplicó el estadístico de Pearson y el test t de Student para buscar si existe o no correlación entre la edad y los parámetros estudiados en orina. En ausencia de correlación se establecerá un único intervalo de referencia, mientras que si se observa una correlación positiva o negativa con la edad, se establecerán diferentes intervalos.

6.2.2. Estudios de la correlación de los parámetros estudiados

Como es de esperar, en los cromatogramas registrados de sujetos control (Fig. 13) y de paciente con MPS III (Fig. 14) se observaron diferencias significativas en las intensidades de picos de GlcN y GalN. Debido a esto, se escogieron 3 parámetros a estudiar: excreción de GlcN, excreción de GalN y la ratio GalN/GlcN. Todo esto con el objetivo de conocer cuál de estos parámetros es más útil para discriminar entre sujetos control y pacientes con MPS III.

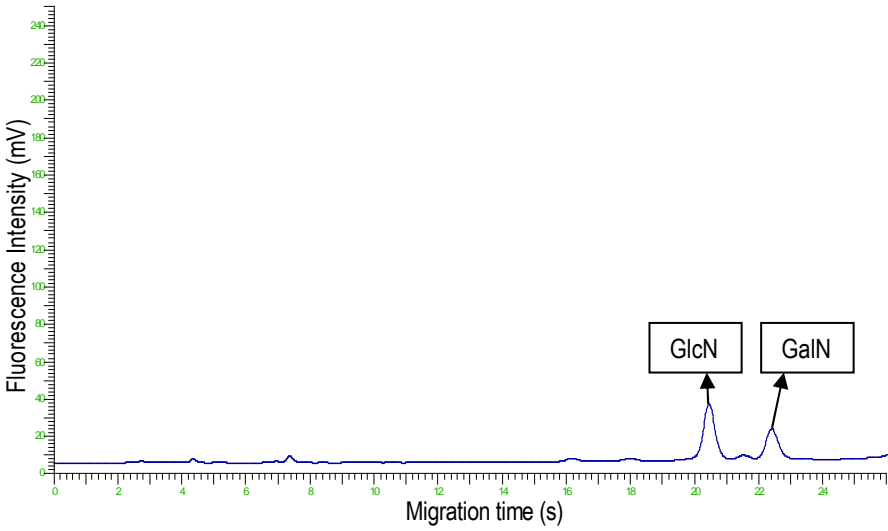


Figura 13. Cromatograma de un sujeto control de 12 años

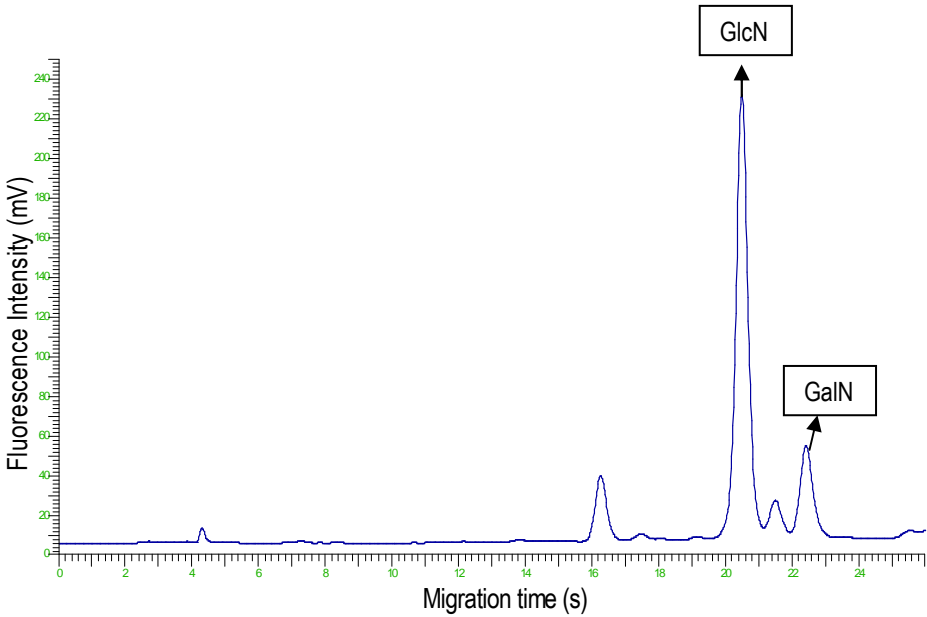


Figura 14. Cromatograma de un paciente con MPS III de 10 años

Correlación entre la edad y los diferentes parámetros estudiados

La excreción de metabolitos en orina generalmente varía según la edad, de modo que es necesario establecer los intervalos de referencia. Se estudió la correlación entre la edad del y los diferentes parámetros estudiados (excreción de GlcN y GalN y la relación GalN/GlcN) obtenidos en analizar muestras de orina de 20 sujetos control. Los resultados se muestran a continuación (Fig.15-17) en forma de representación gráfica (dispersión) y como cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y el estudio del mismo mediante un test t de Student (Tabla V).

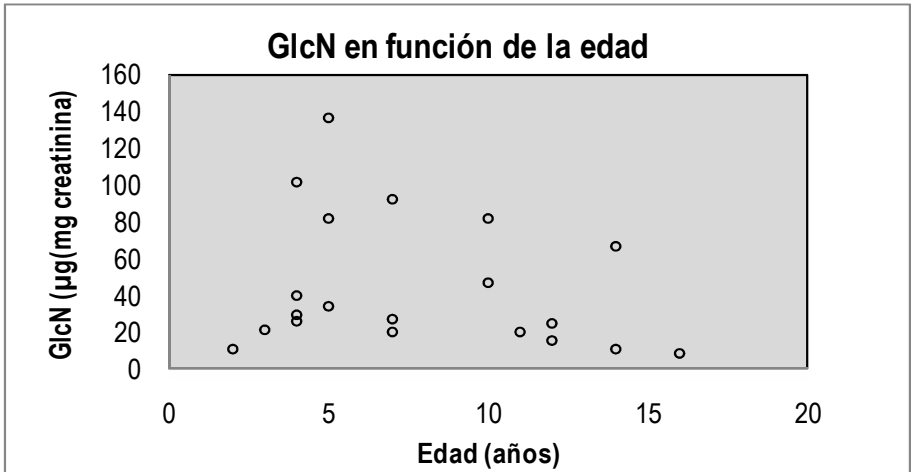


Figura 15. Representación gráfica de la concentración de GlcN frente a la edad

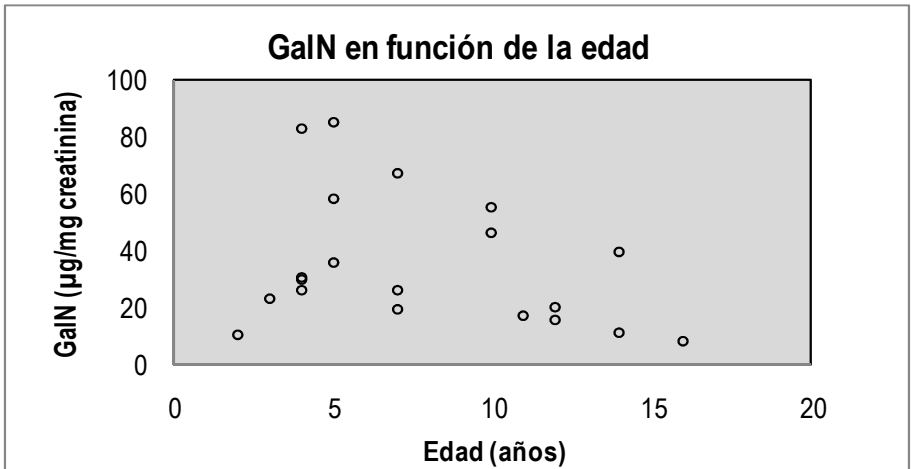


Figura 16. Representación gráfica de la concentración de GalN frente a la edad

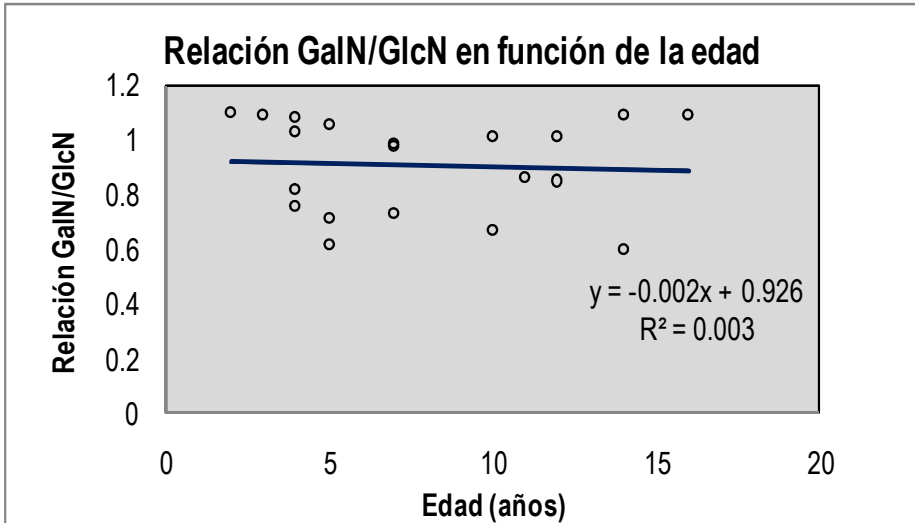


Figura 17. Representación gráfica de la relación de concentraciones GalN/GlcN frente a la edad

	Edad (años)				
	R	N	t _{calc}	t _{tab}	α _{calc} (2 colas)
GlcN (μg/mg creatinina)	-0,2290	20	0.9980	2.1009	0.3315
GalN (μg/mg creatinina)	-0,3192	20	1.4290	2.1009	0.1701
Relación GalN/GlcN	-0.0579	20	0.2460	2.1009	0.8085

Tabla V. Correlación de Pearson de la edad con el resto de parámetros bioquímicos y test t Student

En todos los casos de correlación estudiados se obtuvo que $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ y $\alpha_{\text{calc}} > 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se afirma con un nivel de confianza de 95% que los datos no están correlacionados linealmente. El coeficiente de correlación fue especialmente cercano a 0 en la relación GalN/GlcN

Correlación de GlcN con GalN de pacientes control

También se estudió la correlación de la excreción de GalN respecto a la de GlcN en los pacientes control. En el siguiente gráfico de dispersión se representan los resultados obtenidos (Fig. 16). Se obtuvo una elevada correlación lineal y positiva (test de Pearson; $R = 0.9728$, $\alpha_{\text{calc}} < 0.0001$)

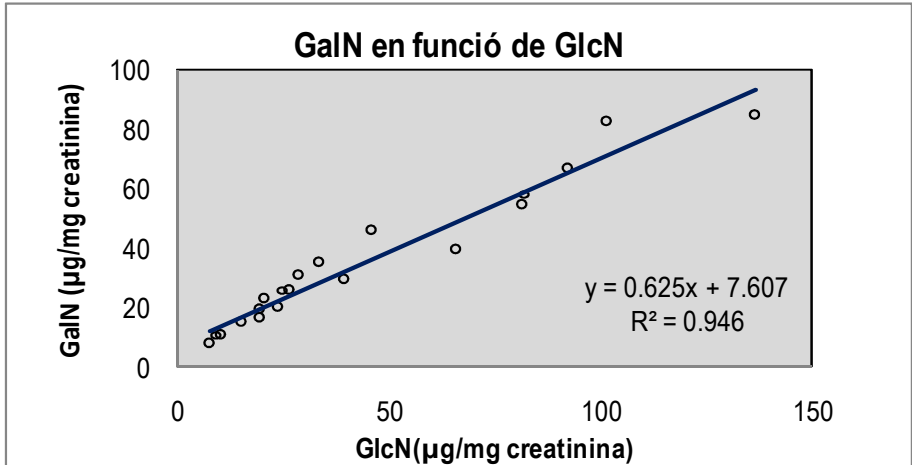


Figura 18. Representación gráfica de la concentración de GlcN frente a la concentración de GalN (pacientes control)

6.2.4. Discusión

Estos resultados indican que no hay una asociación estadísticamente significativa entre los parámetros bioquímicos estudiados y la edad. En cualquier caso, se ha seleccionado una población mayor de dos años, ya que habitualmente a partir de ese momento es cuando se detectan las MPS. Tal y como se ha demostrado anteriormente en otros artículos [8], la excreción de GAGs totales está muy aumentada en los primeros meses de vida de forma fisiológica por lo que es probable que tanto la excreción de GlcN como de GalN también estén aumentada en los primeros meses de vida. En cambio, la relación entre ambos parámetros (relación GalN/GlcN y edad) parece mucho más estable, ya que en la población que hemos estudiado el coeficiente de correlación con la edad es cercano a 0. Este dato se confirma con la correlación casi lineal que se observa para la población control en la excreción de GlcN respecto a GalN, indicando que la relación entre ambos parámetros será probablemente la medida más discriminante para el diagnóstico de las MPS.

Todos estos resultados han conducido al establecimiento de un único intervalo de referencia por edad tanto para la excreción de GlcN y GalN como de la relación entre ambos parámetros.

6.3. Estudio de la capacidad de discriminación de los parámetros estudiados

6.3.1. Métodos estadísticos

Para comparar datos de pacientes con MPS III y controles se utilizó el test F de Fisher para comparar variancias y el test t de Student para compara medias. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Excel 2007. Se consideraron significativos todos los valores de $\alpha < 0.05$

6.3.2. Parámetros y test estadísticos

-Media y desviación estándar

Se determinó la media y la desviación estándar de las cantidades de GlcN, GalN y su relación GalN/GlcN obtenidas en el análisis de muestras de orina de los 20 sujetos control anteriores (grupo 1) y de 9 pacientes con MPS III (grupo 2)

Los resultados se detallan en la tabla VI:

	Grupos	N	Media	Desv. estándar (S)
GlcN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinina)	1	20	44.23	36.48
	2	9	164.83	68.37
GalN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinina)	1	20	35.27	23.46
	2	9	42.41	15.67
Relación GalN/GlcN	1	20	0,91	0,17
	2	9	0,28	0,042

Tabla VI. Media y Desviación Estándar de los parámetros estudiados en los grupos 1 y 2

-Diagramas de caja

En las figuras 19-21, se representan diagramas de caja de ambo grupos de sujetos de estudio y pacientes MPS tipo III. La barra negra del medio de la caja indica la mediana, los bordes de la caja son los cuartiles 25 y 75, y las barras representan el rango de valores obtenidos en cada caso.

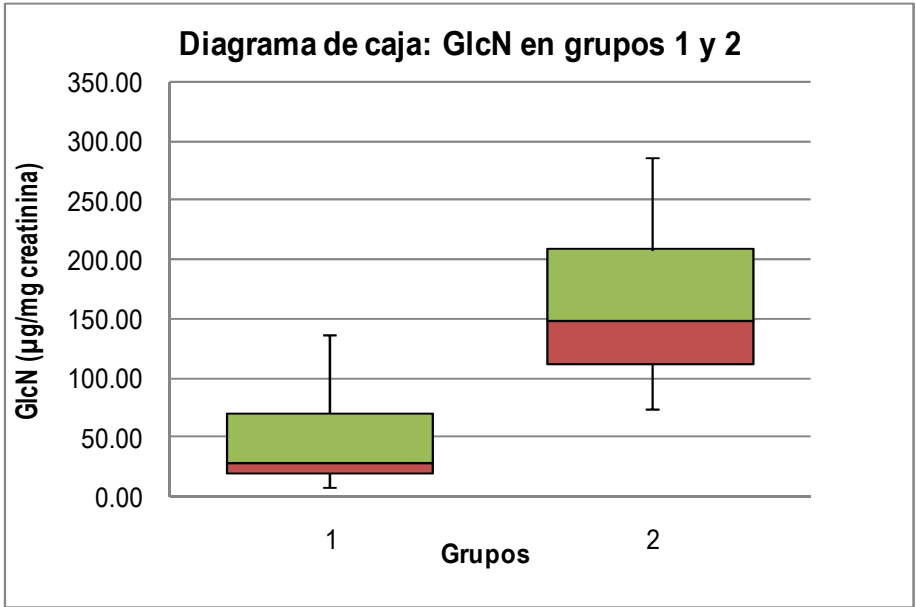


Figura 19. Diagrama de cajas de los grupos 1 y 2 según la excreción de GlcN

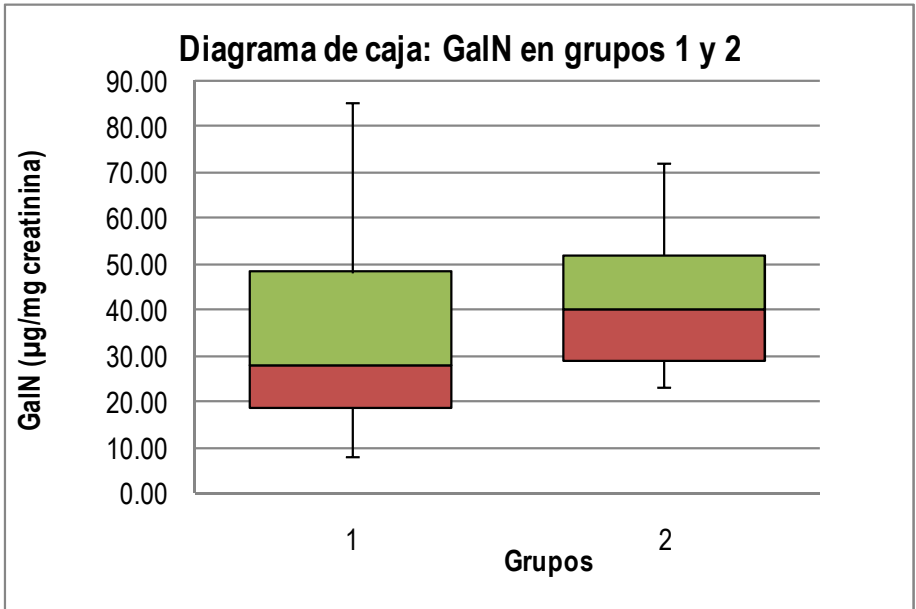


Figura 20. Diagrama de cajas de los grupos 1 y 2 según la excreción de GalN

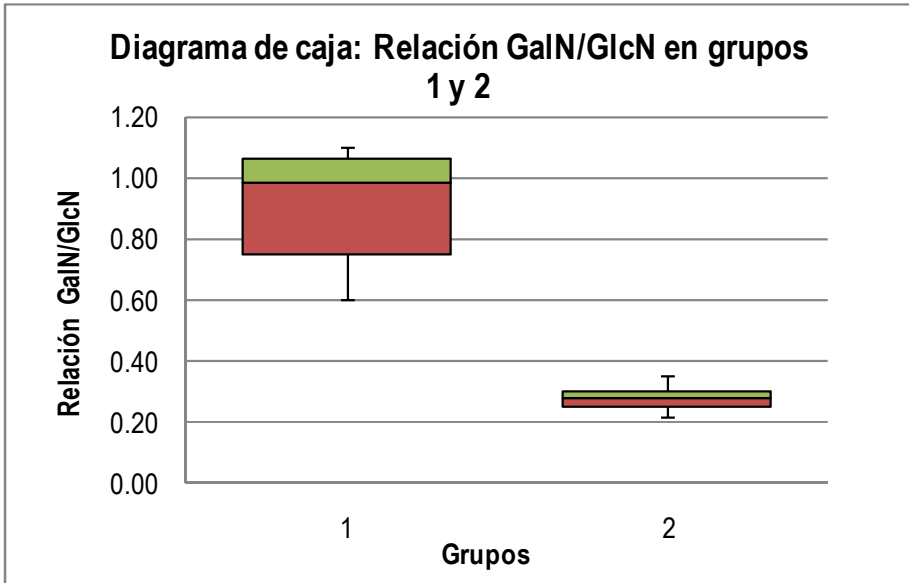


Figura 21. Diagrama de cajas de los grupos 1 y 2 según la ratio GalN/GlcN

-Test F de Fisher para la comparación de variancias

Los datos obtenidos del test F de Fisher se muestran en la tabla VII:

	Grupos	Variancia	gdl	F _{calc}	F _{tab}	α_{cal}	Hipótesis aceptada
GlcN	1	1331.0771	19	3.5118	2.9563	0.0117	$\sigma_1 \neq \sigma_2$
	2	4674.5048	8				
GalN	1	550.2957	19	2.2410	4.0158	0.1220	$\sigma_1 = \sigma_2$
	2	245.5538	8				
Relación GalN/GlcN	1	0.0304	19	17.4139	4.0158	0.0002	$\sigma_1 \neq \sigma_2$
	2	0.0017	8				

Tabla VII: Test F de Fisher para la comparación de variancias

En el caso de la concentración de GlcN y de la relación GalN/GlcN se obtuvo que $F_{calc} > F_{tab}$ $\alpha_{calc} < 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa y se afirma con un nivel de confianza de 95% que sí hay diferencias significativas entre las variancias.

En el caso de la concentración de GalN se obtuvo que $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ $\alpha_{\text{cal}} > 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se afirma con un nivel de confianza de 95% que no hay diferencias significativas entre las variancias.

A continuación, se hace la prueba t de Student para estudiar si existen o no diferencias significativas entre las medias de los parámetros bioquímicos estudiados entre pacientes con MPS III y controles (tabla VIII).

-Prueba t de Student para la comparación de medias

En la tabla VIII se muestran los datos obtenidos del test t de Student

	Hipótesis	gdl	t _{calc}	t _{tab}	α_{calc}	Hipótesis aceptada
GlcN	$\sigma_1 \neq \sigma_2$	10	4.9823	1.8125	0.0003	$\bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$
GalN	$\sigma_1 = \sigma_2$	27	0.8297	1.7033	0.2070	$\bar{X}_1 = \bar{X}_2$
Relación GalN/GlcN	$\sigma_1 \neq \sigma_2$	23	15.2162	1.7139	>0,0001	$\bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$

Tabla VIII. Pruebat de Student para la comparación de medias

En el caso de la concentración de GlcN y de la relación GalN/GlcN se obtuvo que $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$ $\alpha_{\text{cal}} < 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa y se afirma con un nivel de confianza de 95% que **sí hay diferencias significativas entre las medias**.

En el caso de la concentración de GalN se obtuvo que $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ $\alpha_{\text{calc}} > 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se afirma con un nivel de confianza de 95% que no hay diferencias significativas entre las medias.

6.3.3. Discusión

A partir de los resultados obtenidos se determinó que tanto la concentración de GlcN como la relación GalN/GlcN fueron significativamente diferentes en los pacientes diagnosticados con MPS III comparados con los controles. Hay que destacar que en el caso de la concentración de GlcN, se observa un cierto solapamiento entre algunos valores de sujetos control y pacientes con MPS III, por lo que su utilidad en el diagnóstico puede ser algo limitada. En cambio, la relación GalN/GlcN mostró una capacidad de discriminación excelente entre ambos grupos por lo que parece el marcador ideal para el estudio de las MPS III. Desde un punto de vista

biológico, el aumento de GlcN obedece a que el GAG que se acumula en las MPS III es sulfato de heparina (HS), que contienen únicamente GlcN.

Es previsible que el análisis de otras muestras de diferentes tipos de MPS también discriminen los pacientes enfermos de los controles por lo que este sistema sería muy útil en el futuro para una mejor caracterización de pacientes con MPS.

7. CONCLUSIONS

- The chromatographic procedure standardized in the present project for GlcN and GalN analysis in urine was practicable and reliable for the identification of patients with MPS-III.
- Chromatographic analysis of GlcN and GalN displayed adequate metrological data, in terms of intra-day and inter-day analysis coefficients of variations, and limit of detection.
- Reference values for GlcN and GalN excretion in urine, and the GalN/GlcN ratio were not associated with the age of the selected control population. Thus, an unique reference interval was established for every of the 3 parameters studied.
- The correlation between urinary GlcN and GalN was very high (r value near to 1) suggesting that GlcN/GalN ratio must be very stable in control population.
- After the analysis of GlcN and GalN excretion in urine, and GalN/GlcN ratio, significant differences were observed for GlcN and GalN/GlcN ratio in MPS-III patients, as expected. GlcN excretion values overlapped between patients and controls, while GalN/GlcN ratio perfectly discriminated all MPS-III patients studied when compared with controls
- GalN/GlcN ratio is the best parameter for the differential diagnosis of MPS-III patients when compared with controls.

8. REFERENCES AND NOTES

1. Lukacs Z. Mucopolysaccharides. In: Blau N, Duran M, Gibson KM, eds. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Heidelberg, Berlin, New York: Springer; **2008**, 287–325.
2. The Medical Biochemistry Page. <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/glycans-sp.php> (accessed Apr, 2014)
3. Thompson J.N. The mucopolysaccharidoses. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson KM (eds) *Physicians guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*, 2nd edn. Springer, Berlin, **2003**, 377–388
4. Bueno M. y Ramos F.J. Mucopolisacaridosis. Sanjurjo P y Baldellou A, eds. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Madrid, Ediciones Argon, **2009**, 795-804
5. Gray G, Claridge P, Jenkinson L, Green A Quantitation of urinary glycosaminoglycans using dimethylene blue as a screening technique for the diagnosis of mucopolysaccharidoses: an evaluation. *Ann Clin. Biochem.*, **2007**,44,360–363.
6. Oguma T, Tomatsu S., Montano A.M., Okazaki O. Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry *Anal. Biochem.*, **2007**,368, 79–86
7. Coppa G.V., Galeotti F., Zampini L., Maccari F., Galeazzi T., Padelia L., Santoro L., Gabriell O., Volpi N. High-throughput determination of urinary hexosamines for diagnosis of mucopolysaccharidoses by capillary electrophoresis and HPLC *Anal Biochem.*, **2010**:1-13
8. Iwata S, Sukegawa K, Kokuryu M, Tomatsu S, Kondo N, Iwasa S and Orii T Glycosaminoglycans in neonatal urine *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, **2000**,82,:77-78.

9. ACRONYMS

MPS: Mucopolysaccharidoses

GAG: Glycosaminoglycans

CSC: Chondroitin sulfate C

CSA: Chondroitin sulfate A

CSB: Chondroitin sulfate B

DS: Dermatan sulfate

HS: Heparan sulfate

KS: Keratan sulfate

GlcN: Glucosamine

GalN: Galactosamine

