

Los errores innatos del metabolismo en Colombia

Ciro Alvear, Alfredo Uribe, Luis A. Barrera

El presente trabajo estuvo dirigido a analizar el avance en el campo de los errores innatos del metabolismo, tanto en el diagnóstico por el laboratorio como en el conocimiento de estas enfermedades en Colombia. Se analizó la forma como se remiten los pacientes, la procedencia de los mismos, la especialidad de los médicos remitentes, la impresión diagnóstica y el diagnóstico final.

Los estudios del laboratorio se enfocaron tomando como base el diagnóstico presuntivo, luego se aplicaron baterías de tipo general para carbohidratos, aminoacidopatías, acidurias orgánicas o para desórdenes neurodegenerativos y se fue profundizando hasta llegar al análisis de la enzima o

proteína que define el diagnóstico. Para tres enfermedades hemos llegado al nivel de DNA.

Hace cinco años publicamos los hallazgos efectuados en este campo en la población colombiana. La comparación entre los dos estudios permite evaluar el avance logrado especialmente con la introducción de la cromatografía de gas acoplada a la espectrometría de masas, para el diagnóstico de las acidemias orgánicas, de nuevas técnicas enzimáticas para el diagnóstico de mucopolisacaridosis y enfermedades neurodegenerativas. Las acidurias glutárica tipo I, tipo II, la piroglutámica y la 3 OH, 3 metilglutámica son los primeros casos que se reportan en Colombia. El porcentaje de pacientes remitidos sin impresión diagnóstica o con solicitud de estudio metabólico no definido, bajó de 75% a 25%; lo anterior permite concluir que hemos hecho notables avances en el diagnóstico clínico y por el laboratorio de los EIM en Colombia.

Introducción

Los errores innatos del metabolismo (EIM), son un grupo de cerca de 550 desórdenes bioquímicos determinados genéticamente, es decir, debidos a defectos en genes que codifican proteínas, generalmente enzimas, lo cual origina bloques metabólicos.

A diferencia de otras enfermedades, en estos desórdenes las mutaciones son submicroscópicas, el daño molecular no se puede identificar mediante las técnicas citogenéticas convencionales y su identificación se hace mediante pruebas bioquímicas o de biología molecular (1,2).

Las proteínas afectadas pueden ser hormonas, proteínas estructurales como el colágeno, transportadoras como la hemoglobina, etc., o una de las tantas enzimas que participan en los distintos caminos metabólicos del organismo (2).

Cuando la mutación incide sobre uno o varios aminoácidos que ocupan un sitio clave en la estructura de la proteína, su actividad puede disminuirse parcial o totalmente, conduciendo en muchos casos a manifestaciones

Dr. **Ciro Alvear** : Profesor Asociado Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena; Dr. **Alfredo Uribe**: Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes; Dr. **Luis A. Barrera**: Director del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá

clínicas que pueden llevar inclusive a la muerte.

La severidad de estos desórdenes es variable y depende fundamentalmente del grado de alteración de la proteína sintetizada, de la importancia metabólica de la vía afectada y de la existencia o no de vías alternas (3).

La sintomatología de los EIM es diversa, puede variar desde situaciones letales en los primeros días de vida (1,4, 5), hasta formas atenuadas que se evidencian en la infancia o después de la tercera o cuarta décadas de la vida. Pueden manifestarse como síntomas aislados de un órgano o tejido o distintas combinaciones que implican compromisos sistémicos.

Por tratarse de errores en las proteínas, podríamos suponer que el número de estas enfermedades es muy amplio y de hecho se sabe que los genes funcionales en una célula humana son del orden de 50.000 a 100.000.

El hecho de que se hayan descubierto tan pocos EIM se debe, entre otras causas, a que muchas de las proteínas humanas no son esenciales en los caminos metabólicos y existen rutas alternas en el metabolismo, que suplen la deficiencia de la enzima o proteína defectuosa.

Los métodos de identificación no son los suficientemente sensibles, por lo cual muchas de estas enfermedades han escapado al diagnóstico. De hecho, en los últimos años se ha descubierto que muchas de las anemias hemolíticas y enfermedades musculares son debidas a defectos en las enzimas de la glucólisis, lo que demuestra que los métodos de detección han ido mejorando ostensiblemente. La transmisión genética de los

EIM en su gran mayoría es autosómica recesiva, esto quiere decir que ambos padres de los individuos afectados tienen que ser necesariamente portadores del gene mutado. En cada embarazo hay una de cuatro posibilidades de que el hijo presente la enfermedad (3).

Unos pocos EIM son recesivos ligados al cromosoma X, caracterizados porque la madre es portadora de la enfermedad y por lo tanto cada hijo varón tendrá un riesgo de 50% de padecerla y las hijas 50% de posibilidades de ser portadoras. Algunos se heredan con carácter autosómico dominante en el que un solo alelo mutado produce la enfermedad y no hay preferencia por ningún sexo, el individuo enfermo tiene una posibilidad de 50% de transmitir la enfermedad a su descendencia.

El estudio de los EIM en la población general empezó en los países desarrollados hace más de 50 años; sin embargo, en la mayoría de los países en vías de desarrollo como Colombia, su diagnóstico y tratamiento no se ha difundido, por el hecho que en general en estos países los EIM no se consideran como una prioridad de salud, comparados con otras enfermedades como las infecciosas. Sin embargo, entre 20 y 30% de la mortalidad pediátrica hospitalaria tiene como base una enfermedad de tipo genético dentro de los cuales los EIM constituyen un grupo importante (6, 7).

El diagnóstico precoz de algunos EIM permite iniciar tratamiento, antes de que ocurra un daño irreversible o sobrevenga la muerte. Aun en los casos en que todavía no hay un tratamiento efectivo, es importante conocer el riesgo

para la familia afectada de tener otro hijo con un problema similar. Por lo tanto, el estudio bioquímico no sólo es indispensable para hacer el diagnóstico del defecto metabólico, sino también para el diagnóstico prenatal, la identificación de portadores y el asesoramiento genético (1-8). El objetivo del presente artículo es analizar de los pacientes estudiados en el Centro de Investigaciones en Bioquímica (CIBI) de la Universidad de los Andes, entre 1992 y 1995 y ofrecer algunas recomendaciones que se consideran pertinentes para lograr un manejo integral de éste tipo de enfermedades en Colombia.

Material y método

Inicialmente se revisaron 761 historias clínicas de los pacientes remitidos al CIBI desde noviembre de 1992 hasta marzo de 1995. Los estudios de laboratorio fueron hechos con base en la impresión diagnóstica del médico y en los exámenes solicitados. Las siguientes pruebas diagnósticas fueron utilizadas para cada grupo de enfermedad:

Aminoácidos

Prueba del cloruro férrico por los métodos de Perry y Reanuart. Prueba de la dinitrofenilhidracina. Prueba del nitrosonaftol por el método de Perry. Prueba del nitroprusiato de sodio y del nitroprusiato de plata (9-11).

Además se realizó cromatografía en capa fina, tanto en plasma como en orina. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina fueron cuantificados fluorométricamente por los métodos de Bremer y colaboradores, Tocci y Ambrose (12-14). La cistina fue cuantificada por un método espectrofotométrico (15).

Errores innatos del metabolismo

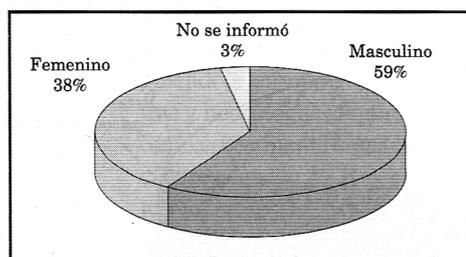


Figura 1. Clasificación de los pacientes estudiados según el sexo.

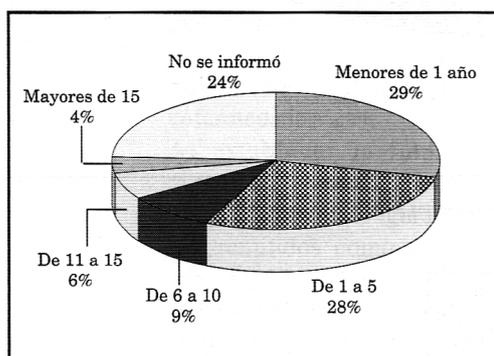


Figura 2. Distribución de los pacientes remitidos según las edades.

Procedencia	No.	%
Santa Fe de Bogotá	626	84.48
Cali	23	3.1
Pereira	14	1.88
Manizales	3	.40
Cartagena	1	.13
Barranquilla	9	1.21
Medellín	9	1.21
Otras	56	7.55
Total	741	100

Tabla 1. Procedencia geográfica de las remisiones.

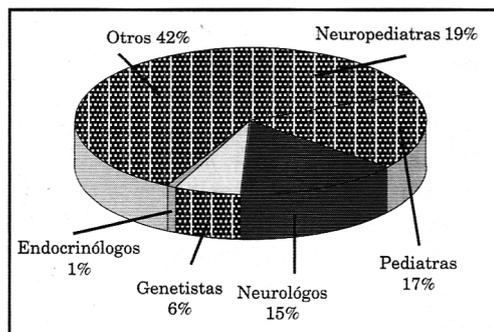


Figura 3. Especialidad de los médicos remitentes.

Acidos orgánicos

Fueron detectados empleando cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS) Perkin Elmer Modelo (16).

Carbohidratos

Se realizaron las pruebas de Benedict, Seliwanoff, glucosa oxidasa y cromatografía en capa fina, en muestras de orina (9-11, 17).

Además se determinó la actividad enzimática para galactosa-1-fosfato - uridiltransferasa y sobrecarga de fructosa en aquellos casos que resultaron positivos en las pruebas de tamizaje, para confirmar o descartar galactosemia e intolerancia hereditaria a la fructosa respectivamente. (18-20).

Mucopolisacáridos

Se utilizaron las pruebas de albúmina ácida y del cloruro de cetil-piridinium, así como la electroforesis de glicosaminoglicanos en orina, usando gel de agarosa (21-24).

Además se hicieron determinaciones enzimáticas de alfa-1-iduronidasa, glucosamina-6-sulfato-sulfatasa y arilsulfatasa B en leucocitos y análisis molecular del gene de las dos primeras enzimas (25).

Enfermedades neurodegenerativas

Se ensayaron muestras de orina para determinación de oligosacáridos por medio de cromatografía en capa fina sobre sílica gel (26).

Se hicieron las determinaciones enzimáticas de arilsulfatasa A tanto en suero como en leucocitos (27-29), hexosaminidasas A y B en leucocitos (25) y aspartilcilsa en leucocitos (30, 31).

Adrenoleucodistrofias y enfermedades peroxisomales

Se realizaron determinaciones de ácidos grasos de cadena larga por cromatografía de gasespectrometría de masas en el Sheffield Children Hospital de Inglaterra.

Lesch-Nyhan

Para determinar la actividad de la enzima hipoxantinuaninafosforribosiltransferasa (HGPRT) se realizó el método radiométrico usando raíz de cabello (3), y el método espectrofotométrico usando eritrocitos (32)

Resultados

Se analizaron 761 historias clínicas desde noviembre de 1992 hasta marzo de 1995 con los siguientes resultados: según el sexo los pacientes se clasificaron en 59% de sexo masculino, 38% de sexo femenino y en 3% de los casos remitidos, no se informó el sexo del paciente (Figura 1).

De acuerdo con las edades de los pacientes se distribuyeron así: 29% menores de un año, 28% entre uno y cinco años, 9% entre seis y diez años, 6% entre 11 y 15 años, 4% mayores de quince y en 24% no se informó la edad (Figura 2).

Las ciudades de los cuales fueron remitidos los pacientes se enumeran en la Tabla 1.

Con relación a la procedencia de los pacientes, la gran mayoría, 84%, provinieron de la capital del país, sitio en el cual está localizado el CIBI (Tabla 1), por tanto estos datos no son representativos de todo Colombia.

La especialidad de los médicos remitentes se aprecia en la Figura 3.

Impresiones diagnósticas con las cuales fueron remitidos los pacientes se señalan en la Figura 4.

Los diagnósticos definitivos establecidos mediante pruebas consideradas confirmativas se pueden ver en la Tabla 2.

En catorce pacientes las pruebas iniciales han sido positivas pero están pendientes de confirmación enzimática bien porque no se dispone de los sustratos correspondientes o porque no se tiene acceso al paciente. Uno de los pacientes murió sin confirmar el diagnóstico, con pruebas de tamizaje positivas para mucopolisacaridosis (Tabla 3).

Discusión

El presente trabajo se concentró en los pacientes remitidos al CIBI durante el período de enero 1992 a marzo de 1995.

Para dar un servicio más oportuno, establecer prevalencia en Colombia y lograr una visión más amplia de los EIM, es necesario crear una red nacional para su estudio, cuyos objetivos principales serían: 1) Permitir un diagnóstico rápido, especialmente en los de presentación catastrófica en el neonato. 2) Hacer más eficiente el uso de los recursos existentes. 3) Disminuir los costos y optimizar el diagnóstico y tratamiento. 4) Iniciar el estudio de otros EIM que no se están diagnosticando en el país. Actualmente grupos distintos del CIBI han comenzado a trabajar en Bucaramanga, Medellín, Cali, Cartagena, Manizales, Pereira y Armenia con los que se pretende lograr los objetivos propuestos.

Ateniéndonos a la especialidad de los médicos remitentes, se puede observar que los que ordenan

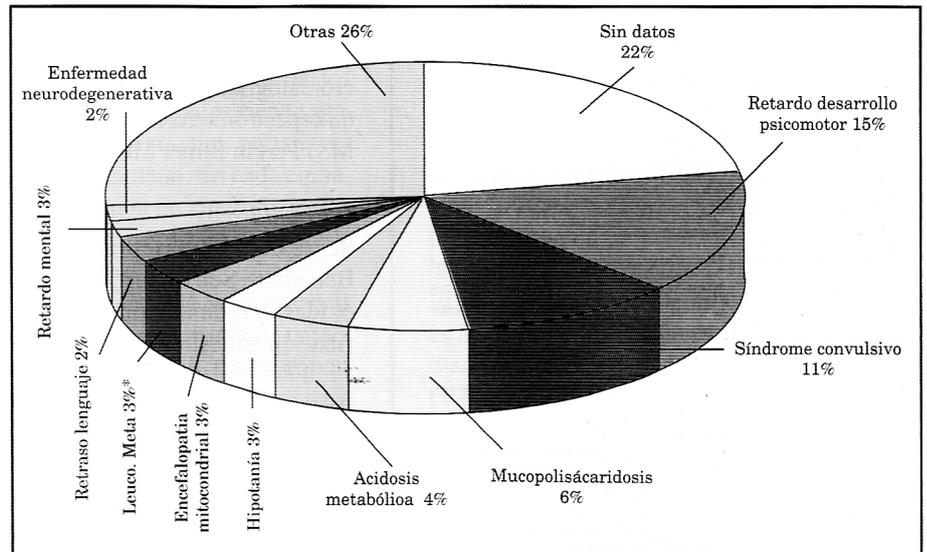


Figura 4. Diagnóstico con el cual fueron remitidos los pacientes para los exámenes de laboratorio.

Diagnóstico definitivo	No.	%
Mucopolisacaridosis	11	3.42
Adrenoleucodistrofias	5	14.28
Tay-Sachs	2	5.71
Homocistinuria	3	8.57
Acidemia glutárica I	1	2.85
Acidemia glutárica II	1	2.85
Acidemia 3-OH-3ME-glutárica	1	2.85
Glicogenesis tipo I	2	5.71
Mucopolipidosis	1	2.85
Hiperfenilalaninemia	2	5.71
Acidemia piroglutámica	1	2.85
Hurler	1	2.85
Sandhoff	1	2.85
Leucodistrofia matacromática	1	2.85
Acidemia propiónica	1	2.85
Lesh-Nyhan	1	2.85
Total	35	

Tabla 2. Diagnóstico definitivo.

Error innato del metabolismo por confirmar	No. pacientes
Mucopolisacaridosis	6
Intolerancia a la fructosa	3
Galactosemia	2
Deficiencia de B cetotiolasa	1
Enfermedad de Cannavan	
Acidemia de cadena media	1

Tabla 3. Diagnóstico por confirmar.

más a menudo este tipo de estudio son los neuropediatras, siguiéndole en número los pediatras y neurólogos (Figura 3).

Sería conveniente crear conciencia en los médicos, especialmente neonatólogos y pediatras, para que se interesen en el estudio de estas enfermedades, para tratar de corregir este vacío. Esto debe ser extendido a otras facultades del área de la salud (bacteriología, nutrición, psicología, trabajo social) para lograr un tratamiento integral de este tipo de enfermedades.

Al establecer la impresión diagnóstica, se pudo notar que 26% de los casos (Figura 4) fueron remitidos como pacientes que presentaban retardo del desarrollo psicomotor y síndrome convulsivo, lo que explica por qué son los neuropediatras, pediatras y neurólogos los que más se interesan por estas enfermedades. Le siguieron en número las mucopolisacaridososis con 6,1% de los casos, porque son enfermedades fenotípicamente más fáciles de reconocer que otros EIM. En lo referente al diagnóstico definitivo se puede observar que, de treinta y cinco pacientes diagnosticados, once corresponden a mucopolisacaridososis, cinco a adrenoleucodistrofias, tres a homocistinuria, dos hiperfenilalaninemias, etc. Llama la atención el muy bajo número de fenilcetonúricos diagnosticados a pesar de que la mayoría de los pacientes estudiados tienen retardo mental y que para fines de los estudios moleculares hemos estudiado más de cuatrocientos pacientes provenientes de los centros de retardo mental de Armenia, Manizales, del Instituto Franklin Delano Roosevelt y otros tres

centros de retardo mental de Bogotá. En contraste el elevado número de pacientes con mucopolisacaridososis no puede ser atribuido sólo al hecho de que son más fáciles de diagnosticar fenotípicamente, sino que por lo menos en el caso de la enfermedad de Morquio parece tener mayor prevalencia en Colombia que en otras partes del mundo. Además de los quince pacientes a los cuales hay que confirmar el diagnóstico, seis corresponden a mucopolisacaridososis (Tabla 2). A estos pacientes se les han realizado pruebas de tamizaje e identificación del GAG que excretan, por lo cual pueden ser clasificados con toda seguridad como mucopolisacaridososis y asignados a un síndrome determinado (San Filippo, Hunter, etc.) y sólo resta la confirmación enzimática.

Es importante señalar que 22,4% de los pacientes fueron remitidos por "sospecha de enfermedad metabólica" (Figura 4). Esto contrasta notablemente con el estudio realizado por nosotros hace cuatro años (8), en el cual se reportaba que cerca de 75% de los pacientes aparecían con este tipo de solicitud, lo que indica a las claras que los médicos conocen más de estas enfermedades en el momento y están orientando mejor los estudios de laboratorio.

Conclusiones

A pesar de tratarse de enfermedades relativamente raras en nuestro país, la enorme diversidad de la enfermedad genética representada tanto por la frecuencia global como por su impacto en la familia y la sociedad, hacen que sea un importante problema de salud pública.

A medida que un país resuelve el problema de enfermedades infecciosas, las enfermedades genéticas pasan a ocupar los primeros lugares como causa de morbimortalidad infantil. De hecho, ya se encuentran en el tercer sitio en nuestro país, por lo tanto es cada vez más urgente estar preparados para su correcto diagnóstico, tratamiento y adecuado asesoramiento genético, psicológico y social.

Dado el trauma que causan estas enfermedades, es indispensable ofrecer a la familia la asesoría necesaria que les permita entender y ajustarse a la evolución de la misma. Por lo tanto es importante educar a la familia en la evolución y manejo de la enfermedad, con el fin de abordar tanto las necesidades del paciente como de su familia, velando por la unión del grupo familiar para así garantizar el mayor bienestar del paciente y toda la familia.

Para el efecto, en Colombia y en los países en vías de desarrollo sería importante disponer de grupos interdisciplinarios de médicos, bioquímicos, nutricionistas, genetistas, psicólogos y psiquiatras. Es además importante integrar equipos interdisciplinarios de trabajo, cuyas acciones estén orientadas a almacenar conocimientos e integrar experiencias para lograr cada vez un mejoramiento en los aspectos de diagnóstico, tratamiento y en el conocimiento básico de estas enfermedades (1,8, 34, 35).

Por lo menos en cada ciudad importante del país se debe tener un laboratorio que disponga de las pruebas esenciales y preparar un equipo de personal médico y paramédico que cuente con los medios necesarios para hacer diagnóstico rápido y tratar

miento oportuno de los pacientes.

Dado que aproximadamente 30% de los pacientes con sospecha de EIM, por limitaciones en los procedimientos, se quedan sin diagnosticar aún en los países más desarrollados, es absolutamente necesario disponer por lo menos de buenos servicios de asesoramiento psicológico para los pacientes y sus familiares. En el año 1993 se creó una asociación de padres de familia de los pacientes diagnosticados como mucopolisacaridosis, con miras a buscar el apoyo psicológico entre ellos y una mejor comprensión del manejo y prevención de las complicaciones asociadas con estos desórdenes, desafortunadamente se desintegró. Es indispensable reactivarla e impulsar la asociación de padres de familia de niños con enfermedades tales como las glicogenosis, leucodistrofias y otras entidades en las cuales ya se han reunido un número considerable de pacientes.

Es importante mencionar que el diagnóstico molecular para estas enfermedades posibilitará el diagnóstico y tratamiento intrauterino temprano, lo que permitirá avanzar en familias en que ya se han identificado pacientes afectados por alguno de los EIM

La detección de portadores mediante análisis enzimáticos y de DNA permitirán brindar adecuado asesoramiento genético en entidades comunes en ciertos grupos poblacionales.

Para el efecto es necesario que tanto los médicos como los padres de familia comprendan que el uso de técnicas moleculares sólo es posible cuando se ha hecho el diagnóstico preciso de la

mutación o se dispone de tejidos del individuo afectado para compararlos con el del feto en estudio.

Abstract

This work was aimed to identify the progress made in the field of Inborn Errors of metabolism, in the laboratory and in assessing the knowledge that the clinicians have of those diseases in Colombia. For that purpose we analyzed the clinical suspicion, before sending the patient to the lab, the specialty of the physicians, and the laboratory findings. The laboratory tests were directed according to medical suspicion and then applying a battery of exams for carbohydrates, mucopolysaccharidosis, amino acids, organic acids, neurodegenerative diseases as so on. The final diagnosis was made measuring the protein or enzyme activity. For Tay Sachs, Morquio and PKU, DNA analysis were performed in some patients.

More than five years ago, we published the results of the first eighth years of work in the field in this country. Now we analyzed two years in which we have advanced in the study of the organic acidemias with the implementation of the gas chromatography mass spectrometry technique and in the enzymatic analyses of disorders such as Morquio A, Hurler, and neurodegenerative diseases. It is remarkable, the report for the first time in Colombia of the acidurias: glutaric type I and II, 3OH 3 methyl glutaric and piroglutamic. It is also noteworthy to mention that the request for analysis with non specified diagnostic impression has been reduced from 75% to 25%. The

results, allow us to conclude that there has been a tremendous improvement in the knowledge of these diseases in Colombia, in a two year period.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el patrocinio financiero de Colciencias, la Universidad de los Andes y la Universidad de Cartagena y se realizó durante una pasantía del profesor Ciro Alvear en el CIBI.

Referencias

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic Basis of Inherited Disease. Vol I. Seventh Edition. New York: MacGraw Hill; 1995: 53-118.
2. Barrera LA. Enfermedades genéticas de origen metabólico. *Pediatría* 1990;25: 64-68.
3. Kolodny EH, Cable WJL. Inborn Errors of Metabolism. *Ami Neurol* 1982; 11: 22-232.
4. Burton HK, Nadler HL. Clinical diagnosis of inborn errors of metabolism in the neonatal period. *Pediatrics* 1978; 61: 398-404.
5. Childs B., Holtzman NA, Kazazian H. Molecular genetics in medicine: progress in medical genetics. New York: Elsevier: JR & Valle Editions; 1988.
6. Bernai JE. Genética Clínica Simplificada. Segunda Edición. Santafé de Bogotá: Pregene División Editorial. 1993.
7. Bernai JE, Ortega G, Umaña A. The contribution of Genetic Disease to Pediatric Mortality in a University Hospital in Bogotá. *J Biosoc Sci* 1983; 15: 465-471.
8. Stanbury JB, Wyngarden J, Fredrickson DS, Golstein JL. The metabolic Basis of Inherited Diseases. 6th Ed. New York: Mc Graw Hill, 1988.
9. Boeckx R. Screening for Inherited metabolic Disease. Washington D.C: American Association for Clinical Chemists. 1985.
10. Graff SL. Análisis de Orina. Atlas color. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1987.
11. Thomas GH, Howell R R. Selected Screening Tests for genetic metabolic diseases. Washington D.C: Yearbook medical publishers. 1973.
12. Bremer H, Durán M, Kamerling J, Przyrembel H, Wadman S. Chemical methods for detection, quantitation and identification of aminoacids in body fluids. Disturbances of aminoacid metabolism; clinical chemistry and diagnosis. Baltimore - Munich: Urban & Schwarzenberg. 1981.
13. Tocci M. Phenylalanine fluorometric method. Selected methods for the small clinical chemistry laboratory. American Association for Clinical Chemistry. 1982; 9: 305-311.

Errores innatos del metabolismo

14. **Ambrose JA.** Fluorometric measurement of tyrosine in serum and plasma. Gerald Cooper Editor. American Association for Clinical Chemistry. 1977; 8: 183-188.
15. **Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW.** Quantitative determination of cystine in Urine. Clin Chem. Principles and technics. Second Edition. Philadelphia: Harper and Row Publishers, Inc. 1974; 18: 592-595.
16. **Tanaka K, West-Dull A, Hiñe D; Lynn T, Lowe T.** Gas Chromatographic method of Analysis for Urinary Organic Acids II. Description of the procedure, and its Application to diagnosis of patients With organic acidurias. *Clin Chem* 1980; 1847-1853.
17. **Tietz NW.** Carbohydrates: Urinary Sugars, Fundamentals of Clinical Chemistry. Second edition. Philadelphia. United States of America: W.B. Saunders Company. 1976.
18. **Beutler E, Baluda MC.** Improved Method for measuring galactose 1-phosphate uridyl transferase activity of erythrocytes. *Clin Chim Acta* 1966;13: 369.
19. **Copenhaner JH, Bauzch LC, Fitzgibbons SF.** A Fluorometric procedure for estimation of galactose 1-phosphate uridyl transferase activity in red blood cells. *Anal Biochem* 1969; 30: 327.
20. **Steinmann B, Gitzelmann R.** The Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance. *Helv Pediatric Acta* 1981; 36: 297.
21. **Dorfman A, Ott ML.** A Turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem.* 1948; 172: 367-375.
22. **Pesce AJ, Kaplan LA.** Errores congénitos del metabolismo: mucopolisacaridosis. Química clínica métodos. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana: 1990; 29: 205-217.
23. **Steiness I.** Acid mucopolysaccharides in urine in gargoylism. *Pediatrics* 1961;27:112-117.
24. **Cappelletti R, Del Rosso M, Chiarugi UP.** A new electrophoretic method for complete separation of all know animal glycosamino-glycans in a monodimension run. *Anal Biochem* 1979; 99: 311-315.
25. **Shapira E, Blitzler MG, Miller JB, Africk DK.** Biochemical genetics. A Laboratory manual. New York: Oxford University Press; 1989.
26. **Sewell AC.** An improved thin-layer chromatographic method for urinary oligosaccharide screening. *Clin Chim Acta* 1994. 92:411-414.
27. **Beratis NG, Arow AM, Hirschhorn K.** Metachromatic leucodystrophy: detection in serum. *J Pediatr* 1973; 83: 824 - 827.
28. **Singh J, Tobella D, Diferrante N.** Measurements of arylsulphatases A and B in human serum. *J Pediatr* 1975; 86: 574 - 576.
29. **Baum H, Dodgson KS.** Studies on sulphatases. The anomalous Kinetics of Arilsulphatase A of human tissues: interpretation of anomalies. *Biochem J* 1958; 69: 573 - 582.
30. **Matalón R, et al.** Aspartoacylase deficiency and N-acetylaspartic aciduria in patients with Canavan disease. *Am J Med Gen* 1988; 29: 463-471.
31. **Bohadan B.** Detection of Lesch-Nyhan Syndrome Carries: Analysis of hair roots for HGPRT. *Clinical Genetics* 1980; 17: 369-374.
32. **Keogh DTT, and Emerson T, Human-HGPRT.** Development of a spectrophotometry assay and its use in detection and characterization of mutant forms. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 301-308.
34. **Barrera LA, Ortiz R.** Aspectos nutricionales y bioquímicos de las enfermedades metabólicas. Memorias V Congreso Colombiano de Nutrición. 1991.
35. **Barrera LA.** Errores innatos del metabolismo. Seis años de investigación en Colombia. *Acta Med Colomb* 1993; 18: 31-40.