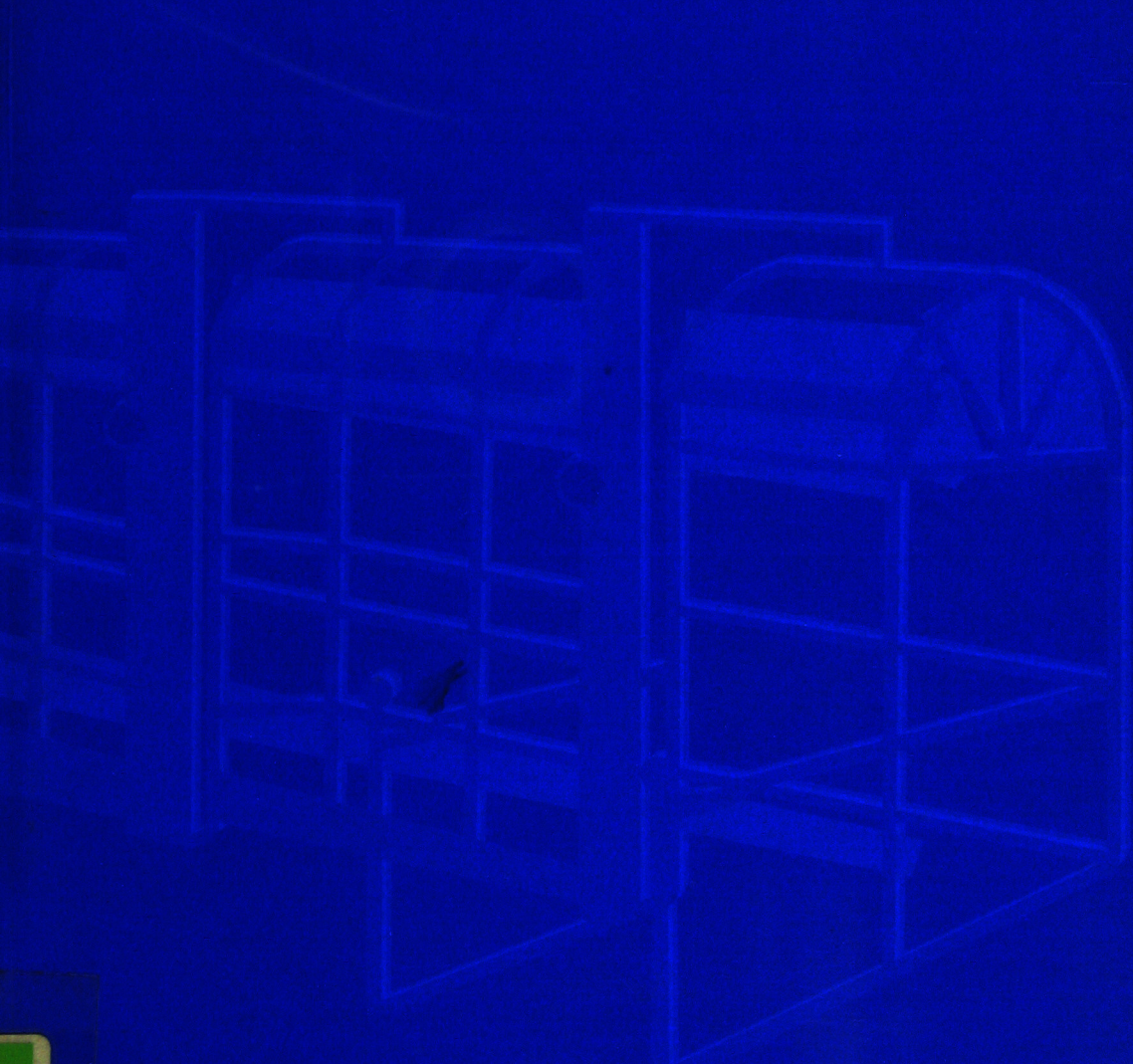


10 AÑOS DEL PREMIO REINA SOFIA
DE INVESTIGACION SOBRE PREVENCIÓN
DE LAS DEFICIENCIAS



D O C U M E N T O S • 40/93



R-10080

**10 AÑOS DEL PREMIO REINA SOFIA
DE INVESTIGACION SOBRE PREVENCION
DE LAS DEFICIENCIAS**

10 AÑOS DEL PREMIO REINA SOFIA DE INVESTIGACION SOBRE PREVENCION DE LAS DEFICIENCIAS

Este Documento del Real Patronato recoge los trabajos presentados en el acto "10 años del Premio Reina Sofía de investigación sobre prevención de las deficiencias", celebrado en Madrid, los días 19 y 20 de octubre de 1992.

. **DOCUMENTOS 40/93** (Circulación institucional)

. **COMPILACION:** Ana Benavides y SIIS-Madrid.

. **CUIDADO DE LA EDICION Y DISTRIBUCION:** SIIS. Centro de documentación e información, concertado con el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía. Serrano, 140. 28006 Madrid.

. **IMPRIME:** Artegraf. Sebastián Gómez. 5. 28026 Madrid.

. **Primera edición:** Diciembre de 1993. 1.000 ejemplares.

Depósito Legal: M - 4.392 - 1994.

SUMARIO

Presentación	7
Trabajos galardonados con el Premio Reina Sofía de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias	9
1. EPIDEMIOLOGIA DE LAS DEFICIENCIAS.	
1.1. Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas. Por María Luisa MARTINEZ FRIAS	13
1.2. Farmacovigilancia y defectos congénitos en el ECEMC. Por Elvira RODRIGUEZ PINILLA	25
1.3. Análisis genético-clínico de recién nacidos con defectos congénitos en el ECEMC: Resultados del período 1988-92. Por Miguel URIOSTE	43
1.4. Valoración del enfoque y metodología del ECEMC. Por Jaime L. FRIAS	53
2. GENETICA MOLECULAR, DIAGNOSTICO Y CONSEJO GENETICO	
2.1. Estado actual de la investigación genética del síndrome de Down: Mapa genotipo-fenotipo. Por José Antonio ABRISQUETA	63
2.2. Citogenética y genética molecular del retraso mental ligado al cromosoma X. Por Félix PRIETO	75
2.3. Contribución de la genética molecular al diagnóstico de enfermedades hereditarias graves. Por Montserrat BAIGET	85
2.4. Limitaciones técnicas y éticas del consejo genético molecular. Por Ricardo CRUZ-COKE	97

3. DAÑO CEREBRAL NEONATAL. RECUPERACION FUNCIONAL Y REORGANIZACION ANATOMICA

- 3.1. Daño prenatal y plasticidad anatómico-funcional del cerebro.
Por Jaime R. VILLABLANCA 109
- 3.2. Cerebral metabolism following neonatal cerebral hemispherectomy:
Reflections of neural plasticity. Por David A. HOVDA 121
- 3.3. Cortical transplants and their trophic molecules rescue damaged
neurons and enhance behavioral recovery. Por Forrest A. HAUN 137
- 3.4. Cells and molecules that form boundaries during brain development
and injury. Por Dennis J. STEINDLER 143

4. METABOLOPATIAS CONGENITAS. DETECCION Y PREVENCION

- 4.1. Errores congénitos del metabolismo: Del fenotipo al genotipo.
Por Magdalena UGARTE 151
- 4.2. Tratamiento y evolución de los errores congénitos del metabolismo.
Por Mercedes MARTINEZ-PARDO 165
- 4.3. Situación actual de los programas de detección precoz neonatal en
España. Por Antonio MAYA 175
- 4.4. Resultados del programa mexicano de tamiz neonatal para
hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Por Antonio VELAZQUEZ 187

5. NUTRICION Y DEFICIENCIAS

- 5.1. Carencia de energía y proteínas y desarrollo mental.
Por Joaquín CRAVIOTO 207
- 5.2. Aspectos destacables en la nutrición y alimentación de individuos
con errores congénitos del metabolismo. Por Francisco J. MATAIX 211
- 5.3. Factores nutricionales preventivos en las funciones físicas
y cognitivas del anciano. Por Pilar RIOBO 219
- 5.4. Carencia de hierro y ejecución mental. Por Leopoldo VEGA 229

6. DEFICIENCIA DEBIDA A HIPOTIROIDISMO

- | | |
|--|-----|
| 6.1. Avance de los conocimientos de las minusvalías causadas por la deficiencia de yodo. Por Francisco ESCOBAR DEL REY | 243 |
| 6.2. Transferencia materno-fetal de hormonas tiroideas en el hipotiroidismo y la deficiencia de yodo. Por Gabriella MORREALE | 253 |
| 6.3. Importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo de la microestructura de la corteza cerebral. Por Antonio RUIZ MARCOS | 261 |
| 6.4. Deficiencia de iodo y su repercusión en el crecimiento y desarrollo mental de los niños y adolescentes. El estudio Galicia. Por Rafael TOJO | 277 |

PRESENTACION

Esta entrega de la colección Documentos del Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía es la expresión sobre papel del acto conmemorativo de los **10 años del Premio Reina Sofía de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias**. Consistió éste en unas "sesiones de revisión" de los trabajos galardonados en el período y que son los que se detallan tras esta presentación, entre los que se incluyen también los que recibieron el Premio en 1992. Tuvo lugar dicho acto en Madrid, los días 19 y 20 de octubre de 1992. Se estructuraron las sesiones en función de estas áreas: 1/ Epidemiología de las deficiencias; 2/ Genética molecular. Diagnóstico y consejo genético; 3/ Daño cerebral neonatal. Recuperación funcional y reorganización anatómica; 4/ Metabolopatías congénitas. Detección y prevención; 5/ Nutrición y deficiencias; 6/ Deficiencia debida a hipotiroidismo. Participaron en el encuentro los galardonados con el Premio Reina Sofía en la modalidad de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias, así como otros prestigiosos investigadores de las citadas áreas.

Este volumen respeta estrictamente la estructura temática de la reunión, a la vez que contiene versiones escritas de todas las intervenciones habidas. Como lo hicieron para la organización de aquellas sesiones científicas, colaboraron en la compilación de los materiales que aquí se presentan, con su competencia habitual, la Dra. Ana Benavides y el SIIS-Madrid.

Septiembre de 1993
Secretaría Ejecutiva del Real Patronato

TRABAJOS GALARDONADOS CON EL PREMIO REINA SOFÍA DE INVESTIGACION SOBRE PREVENCIÓN DE LAS DEFICIENCIAS

1982

INVESTIGACIONES Y ACCIONES ENCAMINADAS A LA PREVENCIÓN DE LA SUBNORMALIDAD DEBIDA A HIPOTIROIDISMO, de los Dres. Francisco Escobar del Rey, Gabriela Morreale y Antonio Ruiz Marcos y su equipo, de España. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 20/89).

DETECCIÓN, PREVENCIÓN E INVESTIGACIÓN DE LA ETIOLOGÍA MOLECULAR DEL ATRASO MENTAL DE METABOLOPATIAS CONGENITAS, de la Dra. Magdalena Ugarte, de España. (Editado por el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid, 1983).

1984

NUTRICIÓN, DESARROLLO MENTAL, CONDUCTA Y APRENDIZAJE, de los Dres. Joaquín Cravioto y Ramiro Arrieta, de Méjico. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 1/85).

1986

PREVENCIÓN DE LAS DEFICIENCIAS DE ETIOLOGÍA GENÉTICA, realizado por la Unidad Estructural de Investigación de Genética Humana del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, de España, de la que es Director el Dr. José Antonio Abrisqueta. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 11/87).

1988

PREVENCIÓN DE MALFORMACIONES CONGENITAS. PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN ESPAÑA (1976-1988), realizado por la Dra. María Luisa Martínez Frías y su Grupo de Investigación del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 18/89).

LA CONTRIBUCION DE LA GENETICA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO DE PORTADORES DE ENFERMEDADES GENETICAS GRAVES, de los Dres. Montserrat Baiget, Xavier Estivill, Pía Gallano y Virginia Nunes, de la Fundació d'Investigació Santa Creu y Sant Pau de Barcelona.

1990

CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR DEL RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X, APLICACION AL DIAGNOSTICO DE PORTADORAS Y PRENATAL, realizado por el Dr. Félix Prieto García y su equipo de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital "La Fe", de Valencia. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 25/91).

RECUPERACION FUNCIONAL Y REORGANIZACION ANATOMICA DEL CEREBRO CON DAÑO NEONATAL", realizado por el Dr. Jaime R. Villablanca, natural de Chile, del Mental Retardation Research Center de la UCLA School de Los Angeles (EE.UU.). (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 26/91).

1992

PREMATURIDAD Y DAÑO CEREBRAL, por el Dr. José M^a Medina, de la Universidad de Salamanca. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 35/93).

UN PROTOTIPO DE INVESTIGACION DESTINADO A LA PREVENCION DE PATOLOGIAS GENETICAS NEURODEGENERATIVAS. LA ENFERMEDAD DE SANDHOFF EN EL VALLE DE TRASLASIERRA, CORDOBA, ARGENTINA, por la Dra. Raquel Dodelson de Kremer, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Editado por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía, en la serie DOCUMENTOS, 36/93)

1. EPIDEMIOLOGIA DE LAS DEFICIENCIAS

1.1. ESTUDIO COLABORATIVO ESPAÑOL DE
MALFORMACIONES CONGENITAS
(ECEMC)

¿Qué es, cuál es su estructura, cómo y para qué se realiza?

M^a Luisa MARTINEZ FRIAS
ECEMC
Dpto. Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid

¿Qué es el ECEMC?

El Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), es un programa de investigación clínica y epidemiológica sobre los defectos congénitos humanos que organizamos hace 17 años [1]. Desde Abril de 1976 el ECEMC ha controlado casi un millón de nacimientos en prácticamente un centenar de hospitales distribuidos por toda España. Aproximadamente el 2% de esos niños (más de 19.000) presentaron defectos congénitos y, a través de la investigación, ha podido identificar la causa de sus alteraciones en alrededor del 45% de ellos. Pero aún resta un gran porcentaje de casos en los cuales se desconoce la razón que provocó la alteración de su desarrollo. Precisamente sobre ese grupo de niños que presentan defectos congénitos de causa desconocida se centran los mayores esfuerzos del trabajo de investigación del ECEMC para intentar averiguar cuál es su origen, ya que sólo así será posible prevenir la aparición de malformaciones en otras gestaciones. Así pues, el objetivo principal del ECEMC es la búsqueda de las causas de los defectos congénitos con el fin de llegar a poder propiciar que los niños nazcan sanos.

¿Cuál es su estructura?

El ECEMC está compuesto por dos grupos básicos: el **Periférico** y el **Coordinador** (Figura 1). Los componentes del **Grupo Periférico** son los aproximadamente 150 médicos de las maternidades que colaboran en el programa. Estos médicos son los encargados de la exploración detallada de todos los niños nacidos en sus hospitales, de la recogida de la información, y del envío mensual de ésta al Grupo Coordinador. Los componentes del **Grupo Coordinador** son los encargados del control de calidad de los datos recibidos, así como de su estudio y análisis sistemático. Ambos grupos trabajan en estrecha colaboración. En el ECEMC se han desarrollado aquellas áreas de investigación necesarias para alcanzar los objetivos propuestos, esto es, conseguir incrementar nuestro conocimiento sobre las causas de los defectos congénitos, así como ahondar en los mecanismos patogénicos mediante los cuales tienen lugar los diferentes procesos malformativos. Con este fin, la estructura del ECEMC consta en el momento actual de dos grandes grupos o áreas de investigación: Genética y Epidemiología.

¿Cómo y para qué se realiza?

Dentro del grupo de **Genética**, el primer aspecto que se aborda en el ECEMC es el estudio **citogenético**, mediante el cual se detectan síndromes cromosómicos (lo que conlleva el diagnóstico y el consiguiente asesoramiento a la familia). Además se han puesto a punto nuevas técnicas de cultivo de tejidos [2], que posibilitan el diagnóstico citogenético en grupos en los que, hasta ahora, era difícil poder efectuarlo. Esto ha supuesto una gran aportación científica, ya que permite ofrecer una información a la familia que antes no era posible, así como la acumulación de casos que permitan el estudio de poblaciones encaminado a identificar la razón de esa anomalía cromosómica.

También dentro del grupo de Genética del que nos estamos ocupando, el ECEMC cubre el estudio de la **Genética clínica** mediante la detección de síndromes conocidos, así como mediante la identificación de nuevos síndromes que no han sido previamente descritos. A este respecto, gracias a la amplitud de la base de datos del ECEMC y la experiencia que avala al grupo, en los últimos años se han podido identificar un buen número de casos con síndromes de difícil diagnóstico,

que han dado lugar a publicaciones en las mejores revistas especializadas, tanto en nuestro país como en el marco internacional [3, 4]. En relación con el delineamiento de nuevos síndromes (que no han sido descritos previamente en la literatura científica), son ya varios los cuadros clínicos perfilados en el ECEMC por primera vez en el mundo [5-7]. Desde el punto de vista del avance científico, la importancia de llegar a definir nuevos cuadros sindrómicos es, sin duda alguna, de un gran valor. Así, determinar la etiología genética de síndromes nuevos permitirá que la Genética Molecular intente identificar dónde se encuentran los genes que controlan su aparición (y en un futuro, quizás su corrección), ya que para la aplicación de las técnicas moleculares es necesario descubrir primero que se trata de un problema genético. Por otra parte, identificar síndromes de difícil diagnóstico conlleva un mejor delineamiento de los defectos incluidos en el cuadro, un mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos existentes, así como el aporte de nuevos casos que permiten clarificar modos de herencia y riesgos de repetición, a veces no claramente establecidos. De este modo, se ofrece una información a los clínicos para que puedan diagnosticar otros casos similares. Desde el punto de vista de la práctica médica, no debemos olvidar el valor inmediato que todo ello supone, no sólo para el asesoramiento genético a las familias en las que se han identificado a los afectados, sino para el mejor conocimiento del pronóstico y atención inmediata de esos niños.

Respecto al **Grupo de Epidemiología**, en él se realiza la **vigilancia epidemiológica** a través del estudio permanente de las frecuencias de los distintos defectos congénitos, así como de las variables relacionadas con la aparición de tales problemas congénitos. A modo de ejemplo de la actividad desarrollada por el grupo, hemos podido establecer en nuestra población el riesgo de aparición de recién nacidos con Síndrome de Down para cada año de edad materna [8]. También, mediante el estudio y análisis de la edad paterna, observamos una relación entre la edad paterna avanzada y la aparición de un tipo de patología congénita de herencia desconocida hasta ese momento (el Enanismo Tanatofórico). Estos resultados apoyan la hipótesis que habíamos establecido de que se trata de una patología con un modo de herencia autosómica dominante, de gran valor a la hora de informar a una pareja que ha tenido un hijo previo con este defecto congénito [9].

Con el estudio y vigilancia de las frecuencias por otro lado, se conoce, de forma inmediata, si un defecto congénito está disminuyendo en su frecuencia de

aparición (en el tiempo o por zonas), o bien si se está produciendo un incremento. Este tipo de estudio es útil para vigilar la introducción o modificación de factores ambientales capaces de provocar la aparición de estas anomalías o un cambio de sus frecuencias. A este respecto, se pudieron estudiar en los datos del ECEMC los posibles efectos que sobre el desarrollo prenatal pudo tener la intoxicación por aceite de colza adulterado en el año 1981, encontrando evidencias de que no existía un incremento del riesgo para defectos congénitos tras dicha intoxicación [10]. Del mismo modo, y más recientemente, podemos hacer mención de una publicación [11] en la que hipotetizamos que el incremento observado en nuestro medio, de recién nacidos con aplasia cutánea del vertex craneal, pueda ser debido al uso descontrolado de metimazol en la alimentación del ganado. De hecho, este producto ha sido relacionado en la literatura científica con la aparición de este tipo de defectos en los recién nacidos de mujeres hipertiroideas tratadas con metimazol durante la gestación. Como consecuencia de nuestra publicación y de la estrecha colaboración que el ECEMC mantiene con otros grupos, tanto de la Comunidad Económica Europea como del continente americano, se ha diseñado un trabajo conjunto entre el ECEMC, el programa italiano (IPIMC) y el latinoamericano (ECLAMC). Por otra parte, después de haberse publicado nuestro trabajo [11] hemos sabido que la Comunidad Europea ha incluido las drogas antitiroideas entre los tests que deben realizarse en las carnes de Argentina que se van a destinar a su exportación a Europa [12].

La vigilancia epidemiológica tiene una aplicación inmediata en la planificación de los recursos, tanto humanos como materiales, necesarios para la atención de los casos que van a nacer. De este modo, si se conoce el número de niños malformados que van a nacer en un área concreta en un período determinado, es posible prever los medios que se requerirán para paliar las secuelas de los defectos que presentan. Así, podremos ejercer la prevención secundaria más eficaz. Es preciso también saber si esa cifra de prevalencia muestra variaciones significativas tanto en el tiempo como en el espacio, ya que la existencia de estas variaciones modificaría las acciones sanitarias derivadas de la magnitud de la frecuencia global. Por consiguiente, si no ejerciéramos una vigilancia témporo-espacial de la prevalencia de los diferentes defectos congénitos, podríamos estar destinando recursos insuficientes (si las frecuencias estuvieran aumentando en un período o lugar) o excesivos (si las frecuencias estuvieran disminuyendo).

Es importante destacar que en el ECEMC, a diferencia de los programas de investigación sobre defectos congénitos existentes en otros países, se ha dirigido

un esfuerzo especial a establecer una estrecha relación entre la Epidemiología y la Dismorfología, en el convencimiento de que de este modo se optimizan los resultados de los trabajos de investigación en estas áreas. A este respecto en el ECEMC se han realizado importantes aportaciones [13], como la confirmación epidemiológica de la relación entre la diabetes materna y la aparición de polidactilia preaxial en los miembros inferiores del recién nacido [14], entre otras.

En el campo de la **Teratología**, en el ECEMC se estudian y analizan los distintos factores ambientales que son considerados de riesgo para la gestación. Como ejemplo de trabajos realizados en este campo, hemos contribuido no sólo a cuantificar el riesgo para espina bífida derivado de la exposición durante la gestación a Acido Valproico [15], sino que también se ha contribuido a delimitar y cuantificar el riesgo existente para otros defectos congénitos tras la exposición a dicho fármaco, así como a describir el cuadro clínico de la llamada embriofetopatía por ácido valproico [16]. También a título de ejemplo, en el año 1989, miembros del grupo del ECEMC publicaron el primer estudio epidemiológico que evaluaba la posible teratogenicidad de la ingesta de altas dosis de **Vitamina A** durante el primer trimestre de la gestación [17, 18], y que llevó a una revisión de las dosis de esta vitamina en los distintos medicamentos. Más recientemente, se ha realizado un amplio estudio sobre el efecto preventivo de una adecuada suplementación de la embarazada con ácido fólico con respecto a la aparición de defectos del tubo neural en el recién nacido por primera vez en la familia [19].

Una de las actividades a las que el ECEMC dedica un especial esfuerzo es la constante labor de **"educación para la prevención"**. Con el fin de poder hacer llegar los conocimientos y los resultados de la investigación del ECEMC directamente a todas aquellas personas que tienen que ponerlos en práctica, hemos estructurado el **Servicio de Información Telefónica sobre Teratógenos Español (SITTE)**. Gracias a este servicio, que comenzó su funcionamiento en Enero de 1991, cualquier profesional médico o persona de la población general puede tener acceso a información actualizada sobre factores de riesgo para el desarrollo embrionario y fetal humano. El servicio está abierto a la población general para todas aquellas consultas que no estén relacionadas con enfermedades o tratamientos médicos, ya que este tipo de cuestiones deben ser formuladas siempre a través del médico que controla a la paciente. Cuando una persona realiza una consulta al SITTE, se recoge telefónicamente toda la

información necesaria para evaluar el riesgo de forma individualizada para cada caso. Luego, esa información es evaluada por un equipo multidisciplinario de profesionales especializados en el tema, seguido de la elaboración del informe que se ofrece, tanto por teléfono (en las 48 horas siguientes a la consulta), como por escrito (mediante el envío por correo).

Otro medio que se utiliza para esta **"educación para la prevención"** es la difusión de los nuevos conocimientos y adelantos técnicos a través de la organización de cursos, reuniones y conferencias, con el objetivo de hacer llegar a los médicos dedicados a la labor asistencial los más modernos conocimientos científicos sobre el tema. Este es el medio más directo para que ejerzan todo su efecto preventivo y de mejora del pronóstico de los afectados al optimizar el nivel de atención del niño con defectos congénitos y la información a su familia.

Así pues, y dado que sería muy arduo citar todos los trabajos llevados a cabo en el ECEMC, podríamos resumir los resultados de su actividad, desarrollada durante los 17 últimos años, en los siguientes puntos:

1. Determinación de las causas en un elevado porcentaje de niños con anomalías congénitas, mediante el análisis citogenético y un exhaustivo estudio clínico de miles de recién nacidos.
2. Monitorización y vigilancia epidemiológica de las frecuencias de defectos congénitos, contrastada con la que se realiza en otros países, tanto de la Comunidad Europea como del continente americano.
3. Identificación de agentes teratogénicos (agentes no genéticos capaces de alterar el normal desarrollo embrionario o fetal, dando lugar por tanto, a un incremento del riesgo para defectos congénitos).
4. Identificación de factores individuales (como las edades paternas, situación sanitaria de la madre, etc.) de riesgo para la aparición de defectos congénitos.
5. Delineación y descripción de nuevos síndromes (no reconocidos previamente) identificando su causa.
6. Asesoramiento genético ofrecido a través de los médicos colaboradores a

centenares de parejas que han tenido hijos con alteraciones del desarrollo.

7. Transmisión de esta información a la población mediante el Servicio de Información Telefónica sobre Teratógenos Español (SITTE).
8. Difusión mediante la publicación de los resultados más relevantes derivados de nuestra investigación.
9. Difusión de los nuevos conocimientos mediante la organización periódica de cursos en nuestro país.
10. Participación en reuniones internacionales de primer nivel, y colaboración con diversos centros extranjeros de investigación sobre defectos congénitos, manteniendo un nivel de investigación igual al que se realiza en los países más desarrollados y, en muchos aspectos, aún mejor.

Como resultado de estas actividades, obtuvo el "**Premio Reina Sofía 1988 de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias**", y del "**Premio Trías Fargas de Investigación sobre Síndrome de Down 1991**".

Para finalizar, quisiera comentar que la obtención del Premio Reina Sofía de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias, supuso para nuestro grupo una mayor credibilidad a nivel nacional, mayores posibilidades de ayudas económicas y un mayor rendimiento científico. Todo ello conllevó un indudable aumento del impacto en el ámbito tanto nacional como internacional. No obstante, pensamos que sería conveniente una mayor difusión del Premio, de modo que sus beneficios fueran más permanentes.

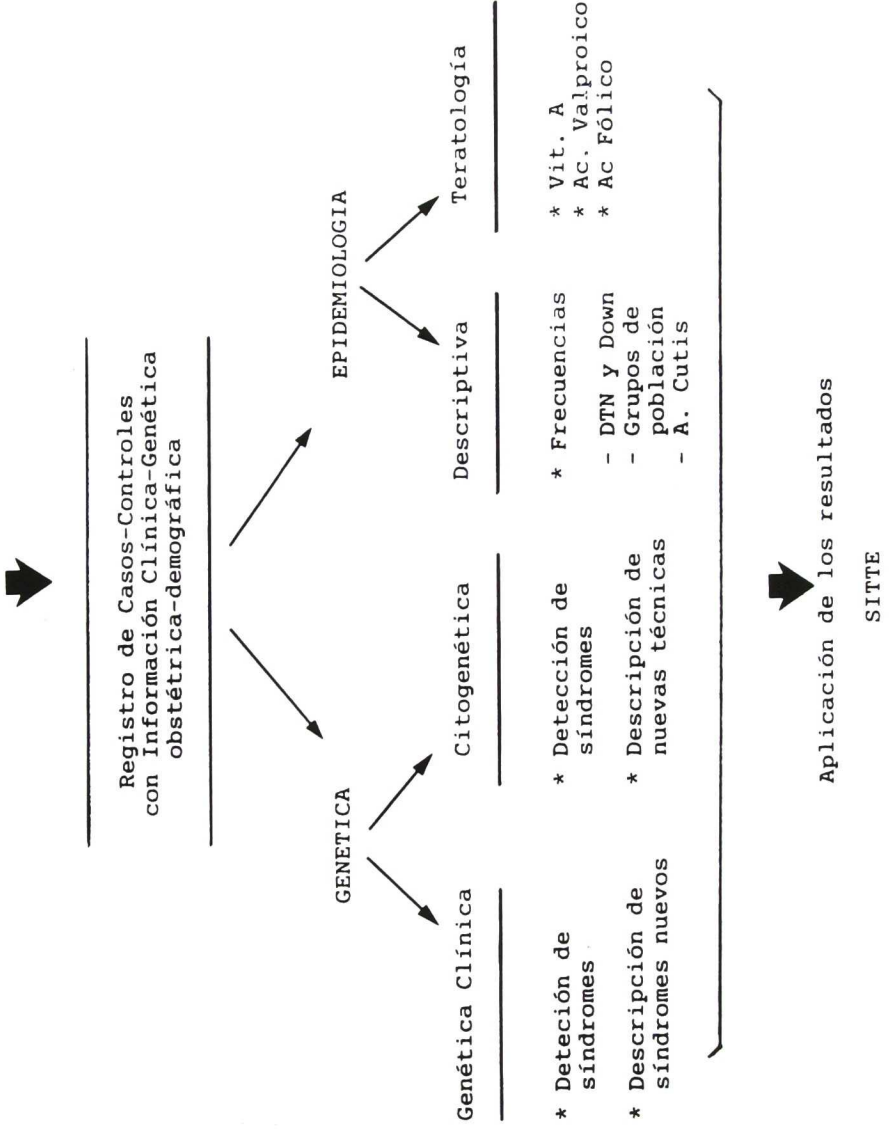
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC). Manual Operacional. Edita M.L. Martínez-Frías. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 1987.
2. Urioste M (1992). Chromosome cultures from human cartilage. Am J Med Genet (en prensa).
3. Urioste M, Arroyo A, Martínez-Frías ML (1991): Campomelia, polycystic dysplasia and cervical lymphocele in two sibs. Am J Med Genet 41:457-477.

4. Urioste M, Paisán L, Martínez-Frías ML. DK-Phocomelia syndrome. Am J Med Genet (en prensa).
5. Martínez-Frías ML, Frías JL, Galán E, Domingo R, Paisán L, Blanco M (1992). New Syndrome?: Tracheoesophageal fistula, gastrointestinal abnormalities, hypospadias, and prenatal growth deficiency. Am J Med Genet 44:352-355.
6. Rodríguez JI, Palacios J, Urioste M (1990): New acrofacial dysostosis syndrome in 3 sibs. Am J Med Genet 35:484-489.
7. Urioste M, Rodríguez JI, Barcia JM, Martín M, Escribá R, Pardo M, Camino J, Martínez-Frías ML. New syndrome: Persistence of müllerian derivatives, lymphangiectasis, hepatic failure, postaxial polydactyly, renal and craniofacial anomalies. Am J Med Genet (en prensa).
8. Salvador J, Martínez-Frías ML (1989). Estudio epidemiológico del Síndrome de Down en España. Edita Ministerio de Sanidad y Consumo, Dirección General de Planificación Sanitaria.
9. Martínez-Frías ML, Herranz I, Salvador J, Prieto L, Ramos-Arroyo MA, Rodríguez-Pinilla E, Cordero JF (1988): Prevalence of dominant mutations in Spain: Effect of changes in maternal age distribution. Am J Med Genet 31:845-852.
10. Martínez-Frías ML, Salvador J, Prieto L (1982): Spanish toxic oil and congenital malformations. The Lancet II:1349.
11. Martínez-Frías ML, Cereijo A, Rodríguez-Pinilla E, Urioste M (1992): Methimazole in animal feed and congenital aplasia cutis. The Lancet 339:742-743.
12. Castilla EE (Argentina). Comunicación personal a ML Martínez-Frías
13. Martínez-Frías ML, Frías JL, Salvador J (1990): Clinical/Epidemiological analysis of malformations. Am J Med Genet 35:121-125.
14. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Cereijo A (1992). Preaxial polydactyly of feet in infants of diabetic mothers: Epidemiological test of a clinical hypothesis. Am J Med Genet 42:643-646.
15. Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Salvador J (1989): Valproate and Spina Bifida. The Lancet 1:611-612.
16. Martínez-Frías ML (1990). Clinical manifestation of prenatal exposure to valproic acid using case reports and epidemiologic information. Am J Med Genet 37:277-282.
17. Martínez-Frías ML, Salvador J (1988): Megadose Vitamin A and Teratogenicity. The Lancet 1:236.
18. Martínez-Frías ML, Salvador J (1990): Epidemiological aspects of prenatal exposure to high doses of vitamin A in Spain. Eur J Epidemiol 6:118-123.
19. Martínez-Frías ML, Rodríguez Pinilla E (1992): Folic acid supplementation and neural tube defects. The Lancet 340:620.

FIGURA 1

ESTUDIO COLABORATIVO ESPAÑOL DE MALFORMACIONES CONGENITAS (ECEMC)



1.2. FARMACOVIGILANCIA Y DEFECTOS CONGENITOS
EN EL ECEMC

Elvira RODRIGUEZ PINILLA
ECEMC
Hospital Universitario S.Carlos
Sección de Teratoepidemiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid

Dentro del Sistema Español de Farmacovigilancia, el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) viene realizando, desde el año 1984, la vigilancia del efecto sobre el desarrollo embrionario y fetal de los distintos productos farmacológicos cuando son utilizados durante la gestación. A este respecto, en el ECEMC se realiza de forma rutinaria y sistemática, el estudio del consumo de medicamentos por la mujer embarazada en nuestro medio, así como, siguiendo la metodología caso-control, el análisis y cuantificación del riesgo teratogénico derivado de la exposición durante la gestación a los distintos productos farmacológicos.

Con los ejemplos que expondremos a continuación, queremos resaltar la importancia de poder contar con cifras de consumo de fármacos por la población de gestantes en nuestro medio. El hecho de analizar en profundidad el consumo temporal y espacial

de los diferentes grupos de medicamentos nos ofrece datos de gran valor en el campo de la farmacovigilancia. De hecho, las cifras obtenidas nos orientan sobre las pautas de prescripción a la embarazada en las distintas áreas y momentos. Estas cifras de utilización de medicamentos, junto con el análisis de los posibles efectos teratogénicos sobre el desarrollo embrionario y fetal derivados de la ingesta materna de los distintos productos farmacológicos, son datos fundamentales para la evaluación de la seguridad de la utilización de las distintas especialidades farmacéuticas por la embarazada. De este modo, en aquellas situaciones en las que la mujer requiera un tratamiento farmacológico durante la gestación, se podrán ofrecer al clínico las distintas alternativas terapéuticas que, controlando el problema materno, conlleven un menor riesgo para el desarrollo embrionario o fetal.

Desde abril de 1976 a Diciembre de 1991 en el ECEMC se recogió, por entrevista directa a la madre durante los tres primeros días postparto, información sobre ingestas de medicamentos durante la gestación a un total de 18.350 madres de recién nacidos malformados y a un total de 18.135 madres de niños sin defectos congénitos (controles). En la Tabla 1 mostramos las cifras globales de consumo de medicamentos durante cualquier momento del embarazo en ambas poblaciones (madres de malformados y madres de controles), utilizando para ello la Clasificación Anatómica de Medicamentos (1985) (1). Podemos observar, que los fármacos más consumidos durante la gestación son aquellos incluidos en el grupo terapéutico "Aparato Digestivo y Metabolismo", ya que incluye las multivitaminas prenatales y los antieméticos, dos grupos terapéuticos muy

prescritos durante la gestación. En segundo lugar en cuanto a las cifras de consumo, aparece el grupo terapéutico "Sangre y Organos Hematopoyéticos" (donde están incluidos los compuestos de hierro), en tercer lugar el grupo de fármacos pertenecientes a "Sistema Nervioso Central" (que incluye a los analgésicos) y en cuarto y quinto puestos con respecto a la frecuencia de utilización por el colectivo de embarazadas en nuestro medio están el grupo de "Antiinfecciosos Via General" y el grupo "Productos Genitourinarios y Hormonas sexuales".

En la Gráfica 1 mostramos la distribución anual del consumo de polivitamínicos prenatales por las embarazadas. Es importante vigilar el consumo temporal y espacial de este tipo de productos ya que nos pueden estar orientando de forma indirecta sobre el grado de atención médica dispensado durante la gestación. Podemos observar, que la ingesta de este tipo de productos por las mujeres gestantes ha aumentado de forma estadísticamente significativa a lo largo de los años estudiados ($p < 0,0005$). En el año 1990, el porcentaje de madres suplementadas con multivitaminas en algún momento de la gestación ascendía a un 38% sobre el total de embarazadas con datos sobre medicamentos especificados (38,3% en las madres de los niños con defectos congénitos, y un 38,7% en las de los controles). Este incremento lo interpretamos como consecuencia de una cada vez mayor atención médica del embarazo. Conclusiones similares podríamos extrapolar al consumo de productos que contienen ácido fólico o alguno de sus derivados. En la Gráfica 2, observamos que la utilización de este tipo de preparativos ha aumentado de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0005$) a lo largo del periodo estudiado. Dicho incremento se inició a

partir de los años 1981 y 1982, momento en que empezaron a proliferar los trabajos que relacionaban la suplementación con folatos y otras vitaminas con la prevención de la recurrencia de defectos del cierre del tubo neural (2, 3). No obstante, es interesante observar (Gráfica 3), como el consumo de ácido fólico durante la gestación no es homogéneo cuando estudiamos su distribución por Comunidades Autónomas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes comunidades. Esto podría indicar que este tipo de información no llega por igual a las diferentes zonas, o si llega, se siguen diferentes pautas a la hora de la prescripción.

En la Gráfica 4 mostramos la vigilancia del consumo de un producto farmacéutico sobre el que ha estado cuestionada su seguridad de utilización por la embarazada. Este es el caso del antiemético Merbental^R (Bendectin^R en EE.UU.), compuesto por Dicicloverina, Doxilamina y Clorhidrato de Piridoxina. A raíz de la polémica que existió en EE.UU. acerca de los posibles efectos adversos sobre el desarrollo embrionario/fetal que podría conllevar su utilización durante la gestación, y aunque su efecto teratogénico nunca fué científicamente probado (4, 5), el laboratorio farmacéutico que lo comercializaba decidió retirarlo del mercado. Podemos observar en la citada gráfica, que el consumo de esta especialidad farmacéutica, sufrió una drástica disminución en el año 1984, como consecuencia de su retirada del mercado. No obstante, este antiemético (que era el más prescrito en nuestro país durante la gestación), fue inmediatamente sustituido por otro producto con idéntica composición que el anterior, el cual ha igualado las cifras de consumo a las habidas anteriormente para el Merbental^R (Gráfica 5).

Por último, dentro de los datos de consumo que como ejemplo estamos ofreciendo, en la Gráfica 6 podemos observar, la distribución anual del consumo del grupo terapéutico **hormonas sexuales** durante la gestación. Con los conocimientos actuales, y si nos ceñimos a las normas básicas sobre uso racional de medicamentos, la utilización de hormonas sexuales por la embarazada estaría justificada sólo en aquellas situaciones en las que se haya demostrado una insuficiencia del cuerpo luteo por biopsia endometrial previa a la gestación y por determinación de progesterona plasmática. Cuando estudiamos la distribución anual del consumo de estos medicamentos (Gráfica 6), observamos una tendencia de descenso que es estadísticamente significativa tanto en malformados como en controles ($p < 0,0005$). Dicho descenso puede ser interpretado como consecuencia de las sospechas de teratogenicidad que existen en relación con la utilización de hormonas sexuales durante la gestación, así como a su **no probada** eficacia terapéutica.

Respecto al análisis específico del efecto de los distintos medicamentos cuando son utilizados por las embarazadas, queremos resaltar un reciente estudio realizado con los datos del ECEMC, acerca de la suplementación con ácido fólico durante la gestación. En un estudio caso-control realizado a este respecto, hemos identificado un efecto protector para defectos del tubo neural tras la suplementación postconcepcional (durante el primer trimestre de la gestación) con este compuesto con o sin otras vitaminas (6). Concretamente, estudiando recién nacidos sin antecedentes en su familia de defectos del cierre del tubo neural, hemos observado que los expuestos durante el primer trimestre de la gestación a ácido fólico, tienen menos riesgo de

presentar defectos del tubo neural que aquellos no expuestos a este principio activo (OR=0,69; p=0,01). Esto implica que el efecto de la suplementación podría también tener un efecto protector para la ocurrencia de defectos del tubo neural y no solo para la recurrencia. Así mismo, en el mismo trabajo, hemos observado también un efecto protector para la aparición de hidranencefalia entre los niños expuestos prenatalmente a suplementos con ácido fólico.

Con objeto de poder hacer llegar los conocimientos en el área de la teratología tanto a los profesionales médicos como a la población general, en enero de 1991 pusimos en marcha el Servicio de Información Telefónica Sobre Teratógenos Español (SITTE). Durante el periodo comprendido entre enero de 1991 y agosto de 1992, en el SITTE se han recibido 1.099 consultas telefónicas. En la Tabla 2 mostramos el tipo de usuarios, pudiendo observarse que el mayor número de llamadas han provenido médicos (42,31%) y en segundo lugar de mujeres embarazadas (36,31). En la Tabla 3, en la que mostramos los motivos por los cuales se realizó la consulta, podemos observar que los medicamentos han sido la principal causa de consulta (40,92%), seguido de enfermedades maternas (10,98), profesión materna (8,49%) y factores físicos (7,98%).

Por último, sólo queremos resaltar que el objetivo de los profesionales que estamos a cargo del SITTE es contribuir, con nuestra información, a incrementar en lo posible el uso racional de medicamentos por la embarazada, de esta forma estaremos contribuyendo a conseguir el fin último de los estudios de teratología: contribuir a la prevención primaria de los defectos congénitos.

BIBLIOGRAFIA

1. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas (1985). Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid.
2. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW (1982). Vitamin supplements and neural tube defects. *Lancet* 1:1186.
3. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Schorah CJ (1983). Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defects recurrences. *Lancet* 1:1027-1031.
4. Holmes LB (1983). Teratogen Update: Bendectin. *Teratology* 27: 277-281.
5. Shiono PH, Klebanoff M (1989). Bendectin and human congenital malformations. *Teratology* 40:151-155.
6. Martínez-Frías ML and Rodríguez-Pinilla E (1992). Folic acid supplementation and neural tube defects. *The Lancet*, vol 340:620.

TABLA 1

ESTUDIO COLABORATIVO ESPAÑOL DE MALFORMACIONES CONGENITAS
(ECEMC)

CONSUMO DE MEDICAMENTOS POR LA EMBARAZADA: periodo 1976 - 1991

GRUPO TERAPEUTICO	MALFORMADOS		CONTROLES	
	NUMERO	%	NUMERO	%
ANTIINFECCIOSOS	2639	14,4	2237	12,3
AP. CARDIOVASCULAR	1224	6,7	1055	5,8
AP. LOCOMOTOR	176	1,0	180	0,9
AP. RESPIRATORIO	1317	7,2	1085	5,9
CITOSTATICOS	1	0,0	0	0,0
DERMATOLOGICOS	365	2,0	312	1,7
DIGESTIVO Y METAB.	11074	60,4	10605	58,4
GENITOURINARIO/HORM. SEXUAL	2425	13,2	2104	11,6
ORGANOS SENTIDOS	18	0,1	18	0,1
ANTIPARASITARIOS	11	0,1	6	0,03
PREP. HORMONALES	131	0,7	76	0,4
SANGRE/OR. HEMATOPOYET	7412	40,4	7438	41,0
SIST. NERVIOSO CENTRAL	4438	24,2	3939	21,7

TABLA 2

SITTE.- DISTRIBUCION DE LAS LLAMADAS POR TIPOS DE USUARIOS

PERIODO: 01.01.91 / 31.08.92

TIPO DE USUARIOS	NUMERO	PORCENTAJE
Médico	465	42,31
Embarazada	399	36,31
No embarazada	121	11,01
Otros	105	9,55
N.E.	9	0,82
TOTAL	1099	100

TABLA 3

SITTE.- MOTIVO PRINCIPAL DE LA CONSULTA

PERIODO: 01.01.91 / 31.08.92

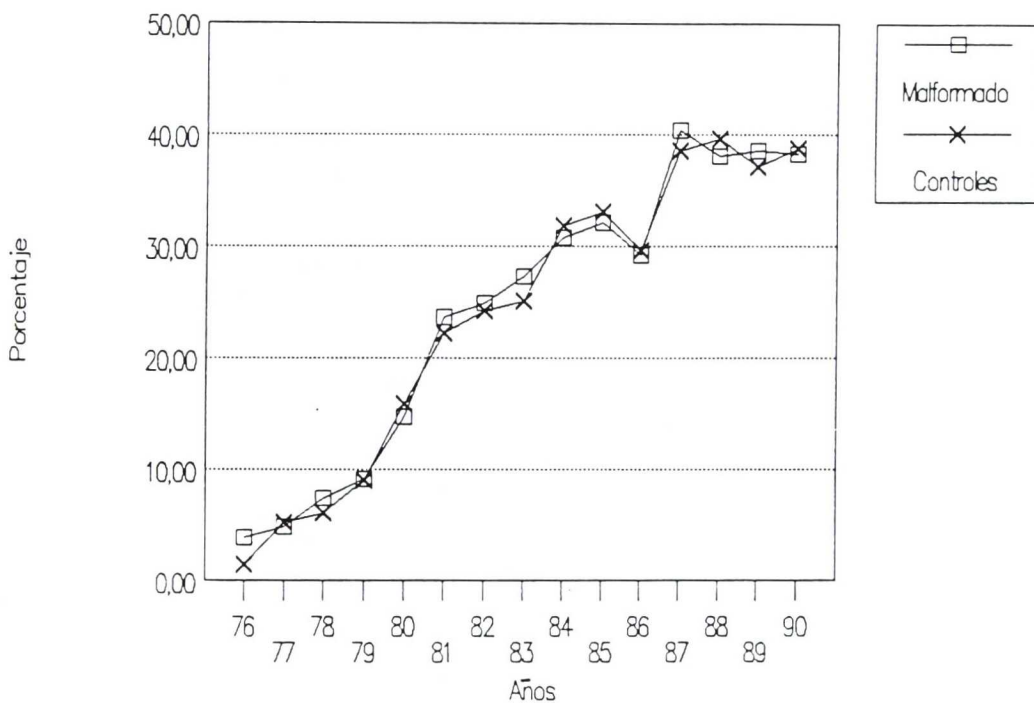
MOTIVO CONSULTA	NUMERO	PORCENTAJE
Medicamentos	559	40,92
Enfermedades	150	10,98
Profesión	116	8,49
Físicos	109	7,98
Químicos	58	4,25
Problema genético	46	3,37
Diagnóstico prenatal	39	2,86
Edad	39	2,86
Tabaco	32	2,34
Alcohol	15	1,10
Drogas	9	0,66
Otros	190	13,91
N.E.	4	0,29
TOTAL	1366	100

GRAFICA 1

A11A1 Polivitamínicos prenatales con minerales

DISTRIBUCION ANUAL DEL CONSUMO

A11A1



Malformados: Homogeneidad: $X_{14}^2 = 887,04$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $X_1^2 = 784,40$ $p < 0,0005$

Controles: Homogeneidad: $X_{14}^2 = 903,28$ $p < 0,0005$

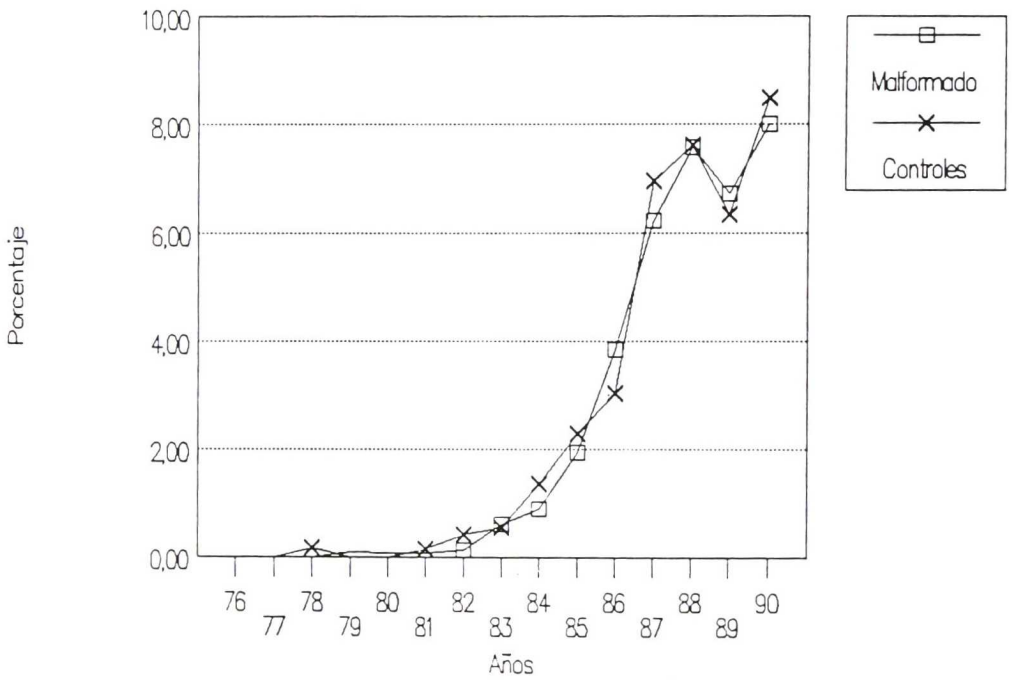
Tendencia lineal: $X_1^2 = 810,01$ $p < 0,0005$

GRAFICA 2

B03C1 Otros antianémicos incluyendo ácido fólico solo

DISTRIBUCION ANUAL DEL CONSUMO

B03C1



Malformados: Homogeneidad: $\chi^2_{14} = 604,40$ $p < 0,0005$

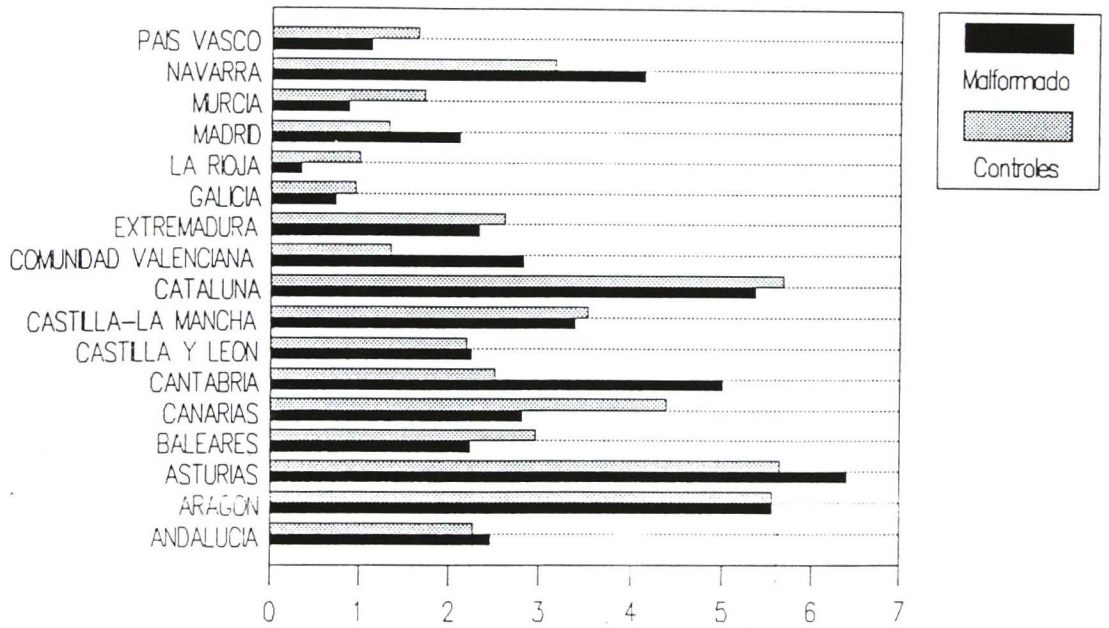
Tendencia lineal: $\chi^2_1 = 500,14$ $p < 0,0005$

Controles: Homogeneidad: $\chi^2_{14} = 594,28$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $\chi^2_1 = 489,17$ $p < 0,0005$

GRAFICA 3

CONSUMO POR AUTONOMIAS (RNV) AC.FOLICO Y COMBINACIONES



Malformados: Homogeneidad: $\chi^2_{16}=151,45$ $p<0,0005$

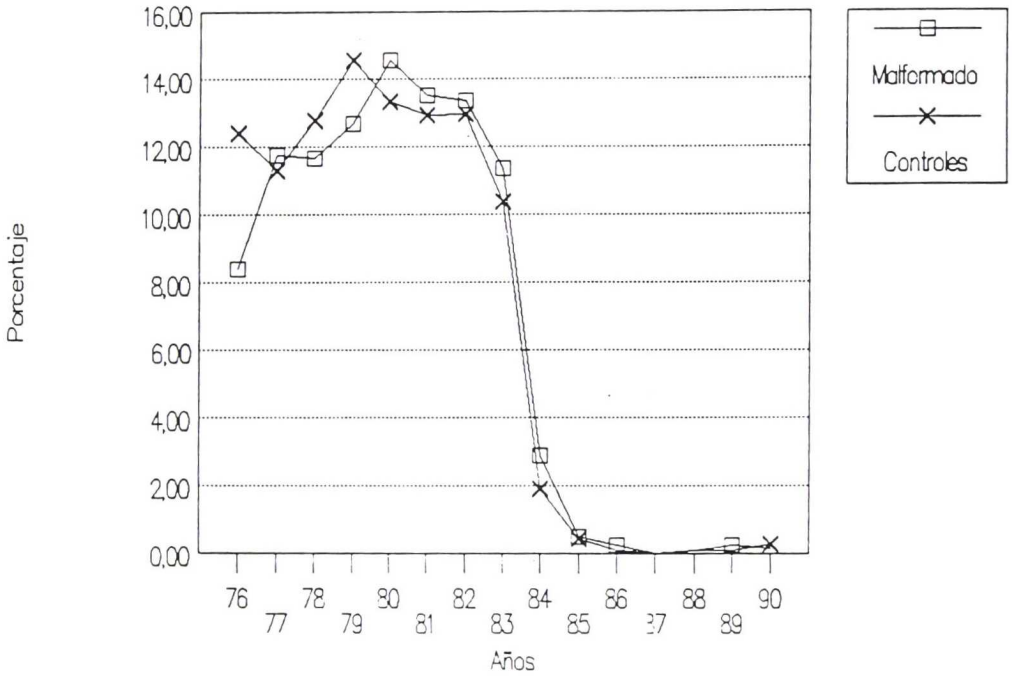
Controles: Homogeneidad: $\chi^2_{16}=137,02$ $p<0,0005$

GRAFICA 4

Merbental

DISTRIBUCION ANUAL DEL CONSUMO

MERBENTAL



Malformados: Homogeneidad: $X^2_{14} = 1068,76$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $X^2_1 = 791,17$ $p < 0,0005$

Controles: Homogeneidad: $X^2_{14} = 1090,80$ $p < 0,0005$

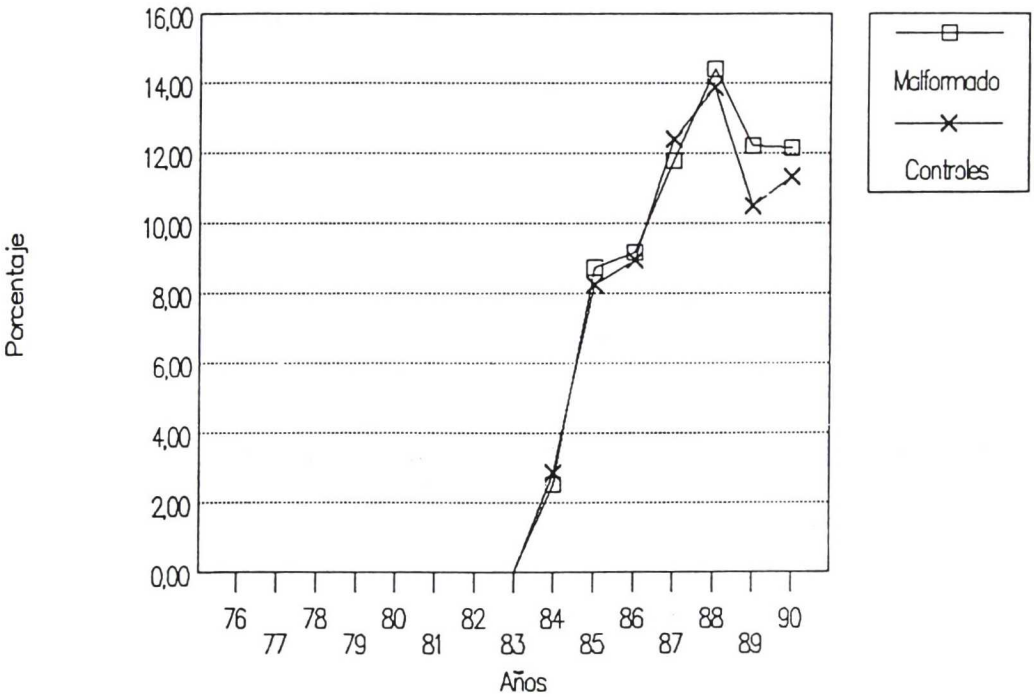
Tendencia lineal: $X^2_1 = 840,29$ $p < 0,0005$

GRAFICA 5

Caribán

DISTRIBUCION ANUAL DEL CONSUMO

CARIBAN



Malformados: Homogeneidad: $\chi^2_{14} = 1063,75$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $\chi^2_1 = 867$ $p < 0,0005$

Controles: Homogeneidad: $\chi^2_{14} = 985,66$ $p < 0,0005$

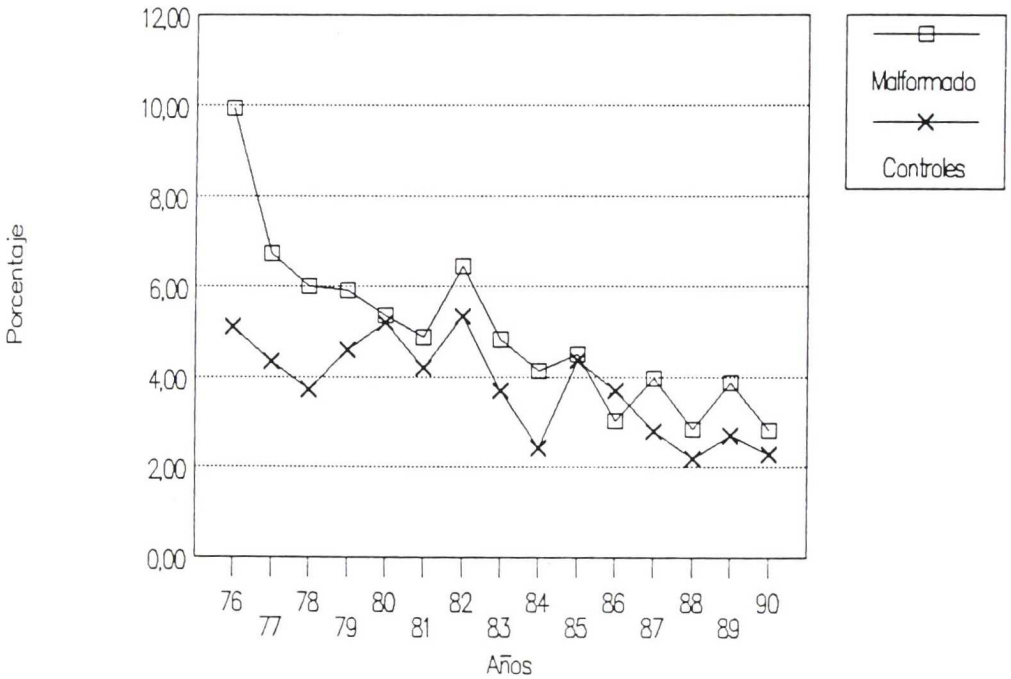
Tendencia lineal: $\chi^2_1 = 785,86$ $p < 0,0005$

GRAFICA 6

G03 Hormonas sexuales y estimulantes genitales

DISTRIBUCION ANUAL DEL CONSUMO

G03



Malformados: Homogeneidad: $X^2_{14} = 61,09$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $X^2_1 = 45,19$ $p < 0,0005$

Controles: Homogeneidad: $X^2_{14} = 53,13$ $p < 0,0005$

Tendencia lineal: $X^2_1 = 29,50$ $p < 0,0005$

1.3. ANALISIS GENETICO-CLINICO DE RECIEN
NACIDOS CON DEFECTOS CONGENITOS
EN EL ECEMC

Miguel URIOSTE
ECEMC y Hospital Univ. S. Carlos
Sección de Genética
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid

El grupo de Genética del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) aborda tanto el estudio genético-clínico como el citogenético de los recién nacidos con defectos congénitos. Este estudio tiene como objetivo esencial el diagnóstico del cuadro malformativo que afecta al recién nacido, para cuyo cumplimiento, en la mayoría de los casos, se sigue un mismo procedimiento que abarca el análisis del patrón malformativo, la realización del cariotipo, y los exámenes de la historia familiar y de los antecedentes del embarazo.

Desde la perspectiva genético-clínica, la labor diagnóstica ha permitido obtener resultados en el terreno de la investigación en dismorfología, especialmente en las áreas de detección de síndromes de difícil diagnóstico y en la descripción de entidades clínicas nuevas no reconocidas previamente. De igual manera, el estudio citogenético sistemático de los niños con defectos congénitos ha aportado hallazgos valiosos, como la detección de variantes cromosómicas poco frecuentes, o la

creación de un nuevo procedimiento para el estudio citogenético de recién nacidos muertos. Estos resultados ayudan a mejorar nuestro conocimiento de los defectos congénitos, lo que deriva en un asesoramiento genético más preciso a las parejas afectadas por estos problemas y, en definitiva, en una mejor prevención de las patologías congénitas. Es evidente que no se puede prevenir aquello que no se conoce, por consiguiente el primer paso en el proceso de prevención de los defectos congénitos es el del diagnóstico, que ha de incluir una definición exacta de las diferentes expresiones clínicas, si las hubiera, tanto como el conocimiento correcto de la etiología y patogenia del cuadro o del defecto que pretendemos prevenir.

En los últimos cinco años, en nuestro grupo se han detectado síndromes que aunque ya habían sido comunicados en la literatura especializada, su cuadro clínico o su modo de herencia no estaba aún bien definido. A este respecto quisieramos resaltar la identificación en dos hermanos, de un síndrome caracterizado por campomelia, displasia poliquistica de diversos órganos internos y linfangioma quístico del cuello (1). Este síndrome ya había sido descrito en una publicación previa (2). Sin embargo, el modelo de herencia de esta condición monogénica no estaba bien definido, ya que la publicación previa incluía un único caso. En nuestro caso, el diagnóstico de esta entidad en dos hermanos permitió constatar que esta enfermedad sigue un modelo de herencia autosómico recesivo.

En otras ocasiones determinados cuadros clínicos no han podido ser etiquetados firmemente como síndromes, bien por una mala definición de la expresividad clínica, bien por desconocimiento de la historia natural, o por ambas cosas a la vez. A este respecto, recientemente hemos estudiado un niño de ocho años de

edad que al nacimiento presentaba un cuadro clínico cuyos rasgos más llamativos eran un encefalocele occipital con anomalías severas de la línea media cerebral, una amelia de extremidades superiores, y alteraciones genitales (3). Un patrón malformativo similar había sido previamente descrito de manera independiente en tres niños que fallecieron poco después del nacimiento (4-6), por lo que se pensó que esta entidad era letal. Nuestro caso, con una supervivencia de ocho años, demuestra que este síndrome, llamado síndrome de DK focomelia (DK son las iniciales de los apellidos de los dos primeros pacientes en los que se diagnóstico este cuadro), no es necesariamente letal, si bien su evolución y pronóstico parecen ser enormemente desfavorables.

También en los últimos cinco años, en el grupo de Genética del ECEMC se han identificado tres nuevos síndromes que han sido debidamente comunicados en la literatura especializada. En 1990 se comunicó una nueva entidad autosómica recesiva perteneciente a la familia de las disostosis acrofaciales, que se identificó en tres hermanos consecutivos, nacidos de una pareja fenotípicamente normal (7). En 1992 se ha descrito un síndrome nuevo con una probable herencia autosómica recesiva, identificado en cinco casos, dos de ellos hermanos, caracterizado por atresia de esófago, hipospadias y otras alteraciones gastrointestinales (8). Por último, otra nueva entidad con un patrón malformativo constituido por alteraciones generalizadas de los vasos linfáticos, presencia de restos Mülllerianos en varones, anomalías genitourinarias y polidactilia postaxial, ha sido identificada en cuatro pacientes. Dos de los pacientes eran hermanos, hecho que apoya una probable herencia recesiva autosómica o ligada al cromosoma X. La resolución de este dilema queda pendiente de la aportación de nuevos casos del síndrome, ya que los cuatro pacientes incluidos en esta primera

publicación eran de sexo masculino (9).

Algunos de los resultados obtenidos durante los últimos cinco años en el campo de la citogenética son la confirmación de una nueva variante cromosómica (10), el estudio con técnicas de hibridación in situ de varios miembros de una familia que eran portadores de un cromosoma extra en mosaico (11), y la descripción de una nueva técnica para análisis cromosómico en recién nacidos muertos (12).

La confirmación de la nueva variante cromosómica (10) fue hecha en dos individuos no relacionados y fenotípicamente normales, que eran portadores de un exceso de material cromosómico en el brazo corto de un cromosomas 16. Existen muy pocas comunicaciones de esta variante. Recientemente hemos observado en nuestro laboratorio dos nuevos casos, un padre y su hija, con esta variante por lo que cabe deducir que puede ser relativamente frecuente en nuestra población.

Las técnicas de hibridación in situ están teniendo una gran repercusión ya que abren unas amplias perspectivas al diagnóstico y a la investigación citogenéticos. En colaboración con el Departamento de Genética de la Facultad de Biológicas de la Universidad Autónoma de Madrid, hemos estudiado con técnicas de hibridación in situ varios miembros de una familia portadores de un cromosoma extra marcador en mosaico (11). Los casos eran una madre, que portaba el cromosoma marcador en el 9% de las células analizadas, y dos de sus hijas, la mayor con 1% de células con el marcador, y la pequeña con el marcador en el 64% de las células analizadas. Estas tres pacientes presentaban rasgos dismórficos o malformaciones congénitas con un grado de severidad que era directamente proporcional al porcentaje de células en las que era evidente la presencia del cromosoma extra

marcador, y que en el caso de la hija pequeña, con un 64% de células con el cromosoma extra, las malformaciones eran compatibles con el síndrome del "cat eye". Con la hibridación in situ, realizada con la sonda de DNA D22S9, se demostró que este marcador era un derivado del cromosoma 22 y que las pacientes presentaban una tetrasomía de la región pericentromérica del brazo largo de este cromosoma, siendo precisamente esta anomalía la responsable de la aparición del síndrome del "cat eye".

Por último, durante los años 91 y 92, se ha puesto a punto en nuestro laboratorio de citogenética, una técnica de cultivo celular de condrocitos que proporciona unos resultados esperanzadores en el estudio cromosómico de recién nacidos muertos (12).

Uno de los mayores problemas en el estudio citogenético de este tipo de pacientes, suele ser la maceración de los tejidos, que en la mayoría de los casos imposibilita el crecimiento celular cuando se pretenden estudiar muestras procedentes de tejidos blandos como la piel o el riñón. Una dificultad añadida suele ser la contaminación de las muestras.

El cartílago, en cambio, es un tejido poco vascularizado, que ofrece mayor resistencia a la maceración y a la contaminación. Ello hace que, tras el fallecimiento del paciente, los condrocitos sean viables durante más tiempo que los otros tipos de células somáticas.

La técnica del tratamiento del cartílago y del posterior cultivo celular, son procedimientos sencillos y permiten obtener el cariotipo en un tiempo inferior al habitualmente utilizado en la técnica de cultivo de órganos por el método de explantos. El porcentaje de casos en el que se obtiene un resultado final valioso es muy superior al obtenido con otros tejidos y/o con otras técnicas. Por consiguiente, ya que el cultivo celular de

condrocitos permite obtener el cariotipo en casos en los que otras técnicas, con otros tipos de tejidos, fracasan, es lógico pensar que el cartílago procesado por este método, sea de elección cuando se pretende estudiar citogenéticamente muestras procedentes de recién nacidos muertos, especialmente cuando estos existan signos de maceración.

REFERENCIAS

- 1.- Urioste M, Arroyo A, Martínez-Frías ML (1991): "Campomelia, polycystic dysplasia, and cervical lymphocele in two sibs". *Am J Med Genet* 41: 475-477.
- 2.- Cumming WA, Ohlsson A, Ali A (1986): "Brief clinical report: Campomelia, cervical lymphocele, polycystic dysplasia, short gut, polysplenia". *Am J Med Genet* 25: 783-790.
- 3.- Urioste M, Paisán L, Matínez-Frías ML (1992): "DK phocomelia syndrome". *Am J Med Genet*, (en prensa).
- 4.- von Voss H, Kramer H, Göbel V, Kemperdick H (1979): "Klinische Genetik in der Pädiatrie". Kiel, 70.
- 5.- Cherstvoy E, Lazjuk G, Lurie I, Ostrovskaya T, Shved I (1980): "Syndrome of multiple congenital malformations including phocomelia, thrombocytopenia, encephalocele, and urogenital abnormalities". *Lancet* II: 485.
- 6.- Kahler SG (1983): "Phocomelia, encephalocele, and urogenital abnormalities". *Proc Greenwood Gen Cent* 2: 134.
- 7.- Rodríguez JI, Palacios J, Urioste M (1990): "New acrofacial dysostosis syndrome in 3 sibs". *Am J Med Genet* 35: 484-489.
- 8.- Martínez-Frías ML, Frías JL, Galán E, Domingo R, Paisán L, Blanco M (1992): "New syndrome?: Tracheoesophageal fistula, gastrointestinal abnormalities, hypospadias, and prenatal growth deficiency". *Am J Med Genet* 44: 352-355.
- 9.- Urioste M, Rodríguez JI, Barcia JM, Martín M, Pardo M, Camino J, Martínez-Frías ML (1992): "New syndrome: Persistency of Müllerian derivatives, lymphangiectasis, severe hepatic

failure, postaxial polydactyly, renal and craniofacial anomalies". Am J Med Genet (en prensa).

10.- Pinel I, Díaz de Bustamante A, Urioste M, Felix V, Ureta A, Martínez-Frías ML (1988): An unusual variant of chromosome 16. Hum Genet, 80: 194.

11.- Urioste M, Visedo G, Sanchís A, Sentís C, Villa A, Ludeña P, Martínez-Frías ML, Fernández-Piqueras J (1992): Dynamic mosaicism involving an unstable supernumerary der(22) chromosome in cat-eye syndrome. Am J Hum Genet (en prensa).

12.- Urioste M (1992): Chromosome cultures from human cartilage. Am J Med Genet (en prensa).

1.4. VALORACION DEL ENFOQUE Y METODOLOGIA
DEL ECEMC

Jaime L. FRIAS
Departamento de Pediatría
Universidad de Florida del Sur

Quiero, en primer lugar, agradecer al Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía su gentil invitación a participar en esta celebración de los 10 años del "Premio Reina Sofía de investigación sobre prevención de las deficiencias". Este es para mí un honor y un enorme placer. Y lo es por dos motivos: uno, por la importancia y trascendencia que el Premio Reina Sofía tiene en el mundo científico iberoamericano; y el otro, por la oportunidad que me ofrece para comentar y valorar la labor científica del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), grupo con el que he tenido el privilegio de colaborar durante más de una década.

Un axioma universalmente aceptado dice que para prevenir un problema es necesario conocer sus causas. Este concepto es especialmente válido en el campo de los defectos congénitos. Desgraciadamente, y a pesar de que éstos son conocidos desde la antigüedad, sus causas -en la mayoría de los casos- no han sido aún establecidas.

Alrededor de 1970, Wilson, en los EE.UU., estimó que el 30% de los defectos congénitos tenían una causa genética y el 12% una causa ambiental, mientras que en el 58% restante, la causa era desconocida. Desde el inicio de sus actividades, 17 años atrás, el ECEMC ha controlado más de 900.000 nacimientos en aproximadamente 60 hospitales distribuidos por toda España. De este número, aproximadamente el 1,8%, ó sea, alrededor de 18.000 han presentado defectos congénitos cuyas causas han sido identificadas en más de un 50% de los casos.

Llama la atención que, a pesar del alto número de factores ambientales potencialmente nocivos a los que está expuesto el embrión/feto, éstos representan un

porcentaje relativamente bajo dentro de las causas reconocidas de defectos congénitos. Es especialmente llamativo si recordamos que fue la tragedia de la talidomida la que demostró la posibilidad de que factores ambientales pudieran interferir con el desarrollo prenatal normal. Esto, a pesar de que ya en 1920 Ashensheim, en Viena, y Boltaro y Bengoa, en Montevideo, habían demostrado que los Rayos X eran teratogénicos, y que más adelante, en 1941, Gregg, un oftalmólogo australiano, había descrito un patrón de malformaciones congénitas en niños cuyas madres habían tenido rubeola durante el embarazo.

Para evitar la repetición del episodio causado por la talidomida, numerosos países establecieron registros de malformaciones congénitas, con el fin de tener acceso a un seguimiento epidemiológico estructurado. El ECEMC es uno de ellos, pero, a diferencia de los demás, éste ha sido organizado fundamentalmente como un programa de investigación de las malformaciones congénitas que tiene, además, la capacidad de conducir seguimientos epidemiológicos.

Pruebas de ello son , entre otras:

1. La demostración de una ausencia de efecto teratogénico del aceite de colza adulterado, durante las intoxicaciones observadas en el año 1981.
2. La corroboración de la teratogenicidad del ácido valproico, un anticonvulsivante de amplia difusión; y,
3. La identificación de la acción teratogénica del metimazol administrado ilícitamente a animales de consumo humano para aumentar su peso, como ya lo discutiera la Profesora Martínez Frías.

Dentro de su interés por la investigación de las malformaciones congénitas, los mayores esfuerzos del grupo del ECEMC han estado dirigidos a establecer una estrecha relación entre la epidemiología y la dismorfología clínica. Sus aportes en este área incluyen:

1. La determinación de cifras de prevalencia de síndromes específicos en la población española o en determinadas regiones o grupos étnicos.
2. La identificación de factores etiológicos.
3. La determinación de riesgos de preocurrencia, que son equivalentes a los riesgos de recurrencia.
4. El estudio de relaciones patogénicas.

Permítanme que les dé un ejemplo usando una anomalía específica, el paladar hendido. Invariablemente, los estudios epidemiológicos existentes, con excepción del ECEMC, clasifican las anomalías congénitas observadas desde un punto de vista exclusivamente anatómico. En el caso del paladar hendido, por ejemplo, sólo separan los casos en que éste es una anomalía aislada de aquéllos en los que el defecto es parte de un patrón de anomalías congénitas. Este enfoque, como veremos, tiene problemas inherentes. Desde el punto de vista del pronóstico para el niño o del riesgo de recurrencia para sus familiares, no es lo mismo que el paladar hendido sea el resultado de:

1. Una malformación (defecto primario del proceso de morfogénesis), ya sea aislada o múltiple.
2. Una secuencia deformativa, o
3. Una disrupción, ya sea como una interferencia en el proceso de la morfogénesis por factores extrínsecos o una destrucción de tejidos ya formados.

Volviendo a nuestro ejemplo, un paladar hendido en forma de "V" es, por lo general, el resultado de un defecto primario, mientras que uno en forma de "U" representa un problema en el cierre del paladar, causado por interferencia de la lengua en la fusión de las valvas palatinas. Esto es lo que sucede en la secuencia de Pierre Robin, que es causada por un mentón pequeño (micrognatia), que hace que la lengua caiga hacia atrás

(glosoptosis) y se interponga entre las valvas palatinas. El paladar hendido es, en este último caso, un defecto secundario a otro defecto, la micrognatia.

En un estudio reciente de la distribución de un grupo de malformaciones seleccionadas, los investigadores del ECEMC observaron que de 271 niños con paladar hendido, en 130 (48%) éste era una malformación aislada, mientras que en 141 (52%) era parte de un patrón malformativo. En un paso que va más allá de la metodología de otros estudios epidemiológicos, el ECEMC tiene la capacidad de separar los casos de malformaciones múltiples. En este estudio, separaron 141 casos con un patrón malformativo en las siguientes categorías:

1. Síndromes	32 (23%)
Cromosómicos	9
Monogénicos	13
Ambientales	6
Causa desconocida	4
2. Secundarios	47 (33%)
3. Otros	62 (44%)

El grupo de los "otros" incluía categorías de patrones malformativos importantes, que también fueron estudiadas en detalle. Estas eran:

1. Defectos de zona de desarrollo
2. Asociaciones
3. Espectros
4. Patrones no encuadrables

Análisis de este tipo, que pueden ayudar a definir el comportamiento epidemiológico de cuadros específicos, han permitido demostrar a un nivel clínico y de laboratorio, que cuadros considerados anteriormente como diferentes, son parte del espectro de manifestaciones de una misma entidad. Un ejemplo es la secuencia de Di George, caracterizada por anomalías faciales, cardiovasculares, hipoplasia del timo y paratiroides.

Este es un cuadro de causas sumamente heterogéneas incluyendo las cromosómicas, monogénicas y ambientales. Utilizando estudios cromosómicos de alta resolución y sondas moleculares, diferentes investigadores han confirmado que la forma más frecuente de esta anomalía se debe a una deleción cromosómica o molecular a nivel de la banda 1.1 del brazo largo del cromosoma 22. Además, el síndrome de Shprintzen (Velo-cardio-facial) tiene exactamente la misma deleción. Más aún, se ha visto que individuos con cardiopatías congénitas del mismo tipo patogénico que las observadas en la secuencia de Di George y el síndrome de Shprintzen pueden tener también una deleción similar en el cromosoma 22. Estas observaciones abren nuevos caminos en la investigación de las malformaciones congénitas.

Si bien es cierto que el reconocimiento, tanto nacional como internacional del ECEMC es debido fundamentalmente a su labor científica en las áreas de la epidemiología y la dismorfología, es importante destacar otras actividades de este grupo que, aún siendo menos evidentes, no son por ello menos importantes.

Una de ellas es el SITTE, ya discutido por la Dra. Rodríguez Pinilla. Este representa un servicio de enorme valor, tanto para el cuerpo médico del país, como para la población general, especialmente las embarazadas.

La otra es la constante labor educativa -de difusión de nuevos conocimientos y adelantos técnicos en el área de la genética clínica- que el ECEMC viene realizando entre los miembros de su grupo periférico. Este está constituido por más de 150 médicos de los 60 hospitales que participan en el programa. Esta labor, tiene una influencia enorme sobre el nivel de atención del niño con defectos congénitos y de su familia.

Quiero también resaltar el espíritu de trabajo de este grupo que cuenta con recursos tan limitados. Personalmente, como jefe de un Departamento de Pediatría en los EE.UU., que cuenta con fuentes de ayuda tanto estatal, como federal y privada para financiar sus programas, me es difícil comprender - y a la vez me maravilla ver- cómo el ECEMC ha podido realizar una labor de tan alta calidad científica, y a la vez tan productiva,

con un presupuesto exiguo y, lo que es peor aún, inestable. Esto les ha obligado a dedicar constantemente gran parte de sus esfuerzos a la búsqueda de formas alternativas de financiación. Esta situación mejoró notablemente cuando les fue otorgado el Premio Reina Sofía en 1988, pero, por desgracia, este no fue un cambio definitivo.

Para terminar, quiero citar las palabras suscritas por el Real Patronato, cuales son que "uno de los objetivos prioritarios de la Ciencia debe ser la prevención de las necesidades de los seres menos favorecidos". El ECEMC ha hecho realidad estos postulados y, como tal, merece todo nuestro reconocimiento y todo nuestro apoyo.

**2. GENETICA MOLECULAR.
DIAGNOSTICO Y CONSEJO GENETICO**

2.1. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION
GENETICA DEL SINDROME DE DOWN:
MAPA GENOTIPO-FENOTIPO

José Antonio ABRISQUETA
Unidad Estructural de Genética
Humana - CSIC
Madrid

En la línea de la investigación sobre "**Prevención de las deficiencias de etiología genética**", que constituyó nuestro trabajo del Premio Reina Sofia de Investigación sobre Prevención de la Subnormalidad 1986 y en el que el síndrome de Down ocupó un lugar destacado, trato de ofrecer ahora una revisión sobre el estado actual de los conocimientos del cromosoma 21, marcador citogenético del citado síndrome de Down.

El progreso en la construcción de mapas del genoma humano ha sido espectacular en los últimos años. Estos mapas constituyen el centro de todas las técnicas genéticas y su aplicación más importante se desarrolla en la correlación de fenotipos y genes. En nuestro caso, desde 1959 se conoce que el cromosoma 21 es el marcador genético del síndrome de Down, pero en la actualidad interesa saber si toda la información genética contenida en los aproximadamente 50 millones de pares de bases (Mb) del cromosoma 21 es necesaria por igual para la fenogénesis del síndrome. Partiendo del nivel citogenético hasta alcanzar el nivel molecular, se ha logrado la construcción, cada vez más detallada, de los mapas físico y genético del cromosoma 21. De esa manera, se ha conseguido perfilar la región cromosómica llamada "crítica" del síndrome, sin que ello signifique que el resto del cromosoma sea irrelevante. Mediante la correlación entre los resultados del análisis citogenético y las características del fenotipo se ha podido establecer un mapa indicativo de las regiones mínimas implicadas en la producción de un determinado rasgo. Posteriormente, con el análisis fenotípico y molecular de individuos con trisomias parciales del 21, se ha realizado la definición molecular de segmentos mínimos del cromosoma 21 responsables de diferentes características del síndrome de Down. Por último, se puede elucubrar sobre qué perspectivas de curación existen, aun cuando en el estado actual de los conocimientos sea una meta inalcanzable.

ORIGEN DE LA TRISOMIA 21.

La no-disyunción es la causa de la segregación cromosómica anómala que origina la trisomía 21 libre o primaria, la cual sucede en el 95% de los casos con síndrome de Down. En la década de los 80, la utilización de los heteromorfismos o variantes cromosómicas ha permitido la determinación del origen parental de la no-disyunción. Así, las cifras obtenidas giraban en torno al 75% para la madre y el 25% para el padre, en una relación 3:1, que es también lo que nosotros publicamos en su día (Del Mazo y col. 1982). Más recientemente, con el empleo de las secuencias polimórficas de ADN del cromosoma 21, han variado los datos sobre la frecuencia materna o paterna de la no-disyunción. Antonarakis y col. (1991) en un estudio con 200 familias encuentra que el 95% de los casos de síndrome de Down por trisomía primaria del 21 son de origen materno, y sólo el 5% de origen paterno. Recopilando, sin embargo, resultados de diferentes estudios realizados, puede estimarse que alrededor del 85% de los casos son de origen materno y del 15% de origen paterno. Estamos todos de acuerdo, por otro lado, en que el error sucede en ambos sexos con mucha mayor frecuencia en la primera división meiótica que en la segunda, aproximadamente en el 80% de los casos. En nuestra experiencia, los fallos son 5 veces más frecuentes en la primera que en la segunda división meiótica. Muchas pueden ser las causas que expliquen la génesis de este fenómeno, pero no cabe duda de que las diferencias existentes entre el proceso meiótico femenino y masculino constituyen una de ellas.

La aneuploidía, condición en la cual el número de cromosomas de una célula u organismo está aumentado o disminuido respecto al número diploide normal, es la clase más común de anomalía cromosómica en el hombre, ocurriendo, en el caso de las trisomías, al menos en el 4% de las concepciones (R.R.Angell,1991).

Entre los posibles factores implicados en la génesis de la trisomía 21 debe mencionarse en primer lugar la edad materna. Se ha observado un aumento de la no-disyunción en ovocitos de mujeres de edad avanzada. La mayoría de los ovocitos de mujeres de 40 años y más puede ser aneuploide (Hassold,1985). La edad paterna puede influir, pero menos. Existe una discusión entre grupos de Europa (Stene y Stene,1989) y de Estados Unidos (Hook y Cross,1990) sobre el efecto de la edad paterna en el síndrome de Down. Pienso que la edad paterna puede tener alguna influencia en edades superiores a los 40 años y sobre todo por encima de los 50. El mosaicismo cromosómico de los padres, aparentemente asintomático, puede ser en algunos casos (alrededor de un 2%) un factor etiológico (Uchida,1985). Ciertos desequilibrios hormonales, sobre todo en irregularidades en los ciclos asociados con el período premenopáusico, podrían ser también factores críticos en la inducción de las aneuploidías (Lyon y Hawker,1973). Algunos cromosomas marcadores, como la inversión del 9 (Tibiletti,1981), los cromosomas bisatelizados (Ramos

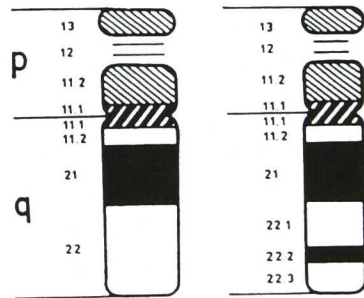
y col.1979), ciertos heteromorfismos de los acrocéntricos (Hansson,1980), podrían ser causas predisponentes a la no-disyunción. De igual manera, en relación a la actividad de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR), que suele visualizarse mediante la tinción con plata (AgNOR), se ha descrito que cuando aquella varía o se excede, al sobrepasar un umbral óptimo de actividad, puede originar alteraciones a nivel meiótico (Pérez-Castillo y col.1986). Resulta también de interés contabilizar y analizar los abortos precoces que sucedan en una progenie, ya que cuando son trisómicos, pueden ser sintomáticos y de alguna manera pronosticadores de futuros embarazos con trisomía 21 (Alberman,1981). Por otro lado, suelen aducirse factores de origen ambiental, como los anticonceptivos hormonales orales (Lejeune y Prieur,1979), algunas infecciones virales (Evans,1967) o la contaminación radiológica, como en el caso del accidente nuclear de Chernobil, por cuya causa, al parecer, se ha detectado un alto porcentaje de niños con el síndrome de Down en la región de Bielorrusia (El Médico,1992). Se ha observado, finalmente, una correlación entre alteración de la secuencia de la separación centromérica parental, es decir, cuando cada cromátida en vez de ir a los polos se queda separada en la placa ecuatorial, y trisomías en la descendencia (Bajnóczky y Méhes,1988).

GENOTIPO DEL SINDROME DE DOWN.

Los avances logrados en el conocimiento de la etiología, de la base genética del síndrome de Down, han sido importantes tanto en extensión como en profundidad.

En primer lugar, el desarrollo experimentado en ese conocimiento, partiendo del **nivel citogenético hasta alcanzar el nivel molecular**. Las técnicas citogenéticas más refinadas diferenciaban 3 regiones en el cromosoma 21: el segmento NOR (región organizadora del nucleolo), el área pericentromérica y una zona en el brazo largo, comprendiendo la banda q22, como más responsable del fenotipo Down. FIGURA 1.

La genética molecular ha llevado a la construcción cada vez más detallada de los mapas físico y genético. En el mapa

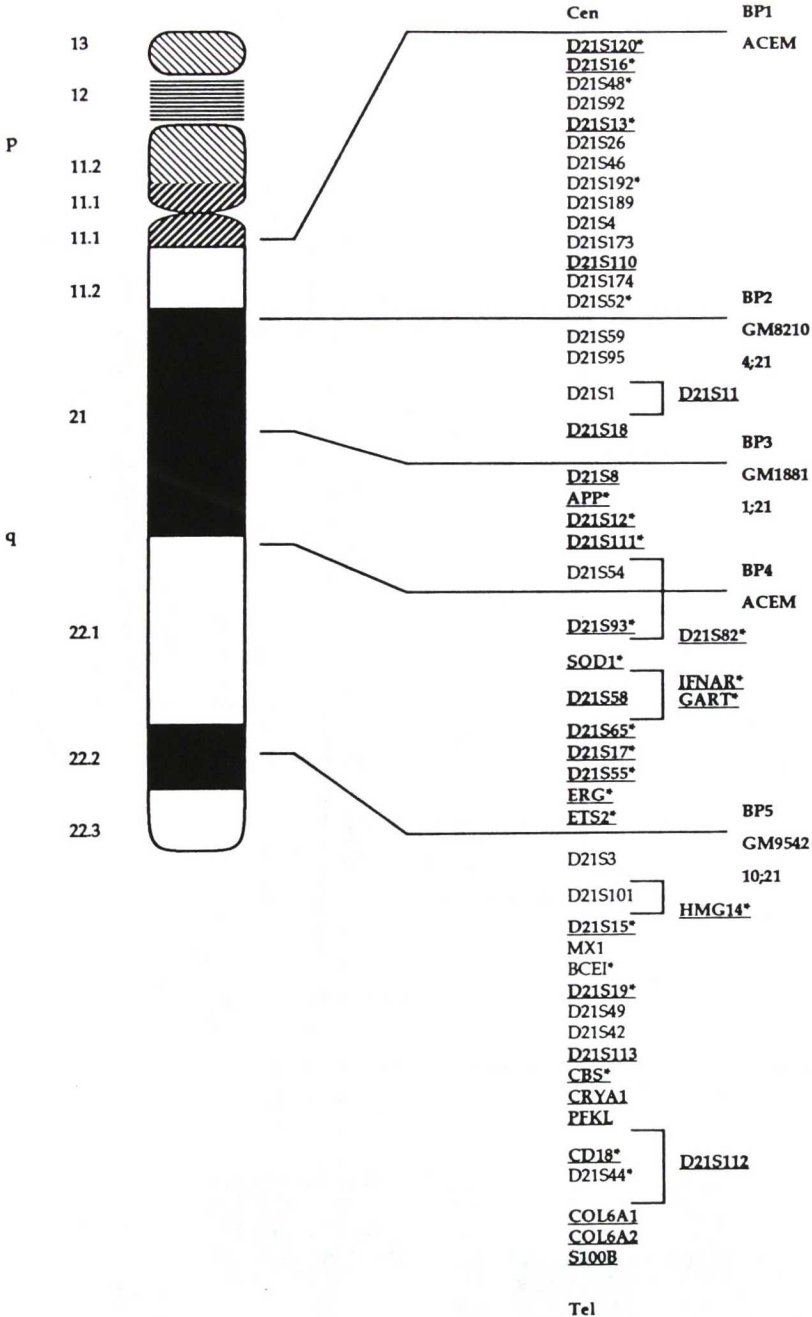


21

FIGURA 1

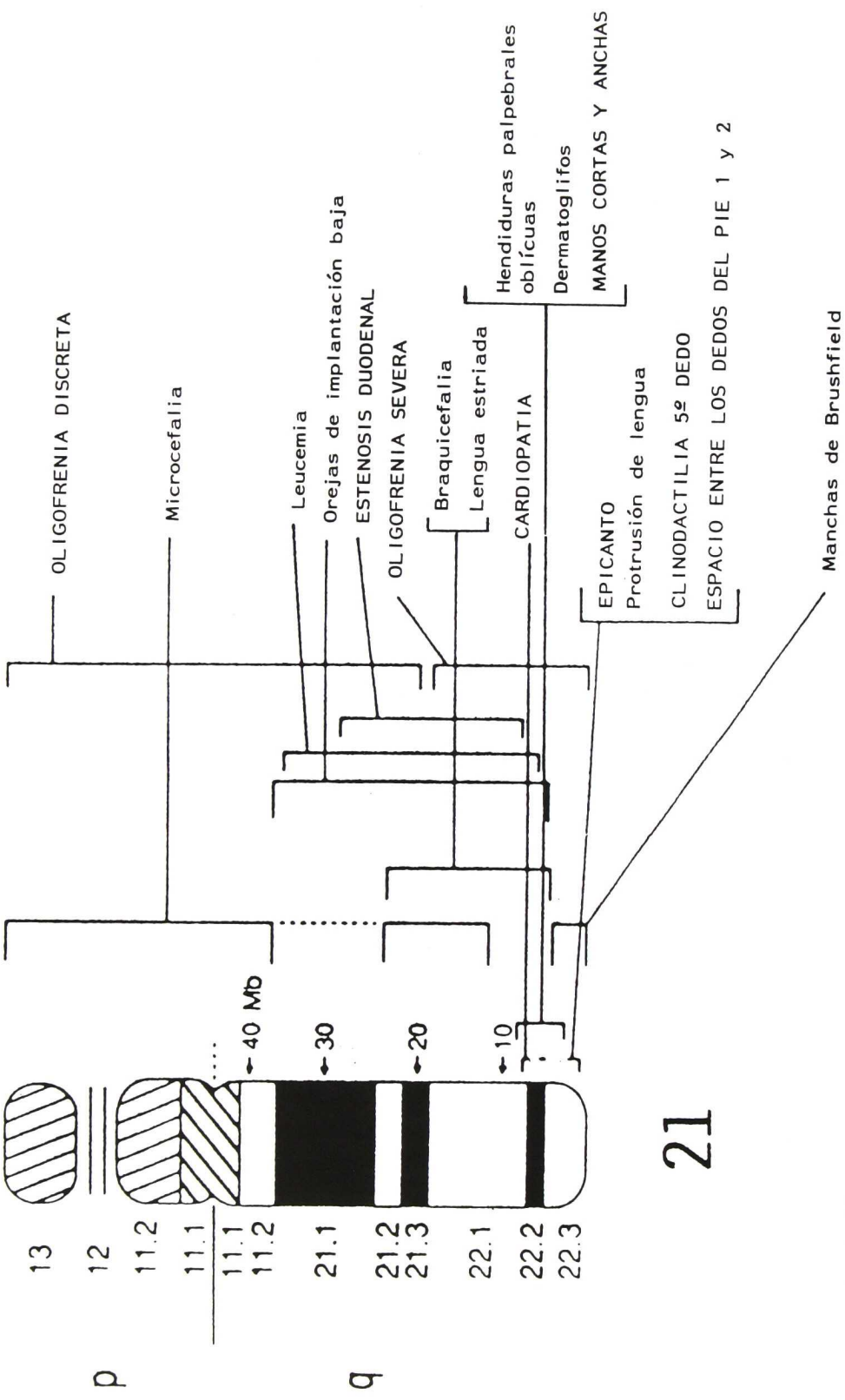
físico las distancias entre los lindes identificables se expresan en número de pares de bases (pb) o nucleótidos. El **mapa citogenético** viene a ser un mapa físico de baja resolución. El **mapa genético** o de **ligamiento genético** indica el orden y las distancias relativas medidas en centimorgans (cM), que es la unidad de distancia derivada de la frecuencia de recombinación entre marcadores genéticos. Se han diferenciado 5 "breakpoints" (BP) bien caracterizados, que dividen el cromosoma 21 en 6 regiones distintas. Esas regiones sirven como puntos de referencia para el mapa físico del cromosoma. En ellas se alinean los 54 marcadores que se han seleccionado por conocerse su orden y su posición física en el cromosoma (Diciembre 1991). Los **segmentos de ADN anónimos** (con el símbolo D y el número del cromosoma) son fragmentos de ADN que contienen un gen desconocido y que han sido localizados dentro de un cromosoma. De acuerdo con toda esa información ha podido construirse el mapa físico del cromosoma 21. FIGURA 2.

Otro punto de interés consiste en perfilar la **región crítica del síndrome de Down**. Desde una perspectiva citogenética las 3 sub-bandas del segmento 21q22 compartían la región denominada crítica. La genética molecular ha permitido una mejor definición de esa región, comprendiendo un corto segmento de 400 a 3000 kilobases (kb), que abarca la secuencia D21S55 localizada en la parte proximal de la banda 21q22.2 ó el área del "locus" D21S55 al "locus" COL6A1. En efecto, 18 de 23 rasgos característicos del síndrome de Down resultan de la trisomía para un pequeño segmento del cromosoma 21 próximo a D21S55 (FIGURA 4). Recientemente, se ha descrito el caso de una mujer, con un fenotipo característico del síndrome de Down y cariotipo normal, que presenta la trisomía para un segmento muy distal de la banda 21q22.3, con un punto de rotura entre D21S112 y COL6A1 (Annerén y col.1991). Esa pequeña zona terminal podría constituir la región crítica del síndrome de Down. De hecho, los genes suelen ser 15 veces más frecuentes en las isocoras (regiones de composición homogénea) ricas en bases G-C, como la banda R de la región 21q22.3, o en isocoras muy ricas en bases G-C, como la banda T (terminal o telomérica), que en las isocoras pobres en G-C, como las bandas G. Aunque se hable de región crítica, sin embargo, ello no significa que el resto del cromosoma sea irrelevante. Así, mediante la correlación entre los resultados del análisis citogenético y las características del fenotipo se ha podido establecer el mapa de la FIGURA 3. Es un mapa indicativo de las regiones mínimas implicadas en



MARCADORES DEL CROMOSOMA 21. Este mapa se ha elaborado utilizando datos de los siguientes autores: Cox y col.1990; Burmeister y col.1991; Owen y col.1990; Gardiner y col.1990; Crete y col.1991; Delabar y col.1991; Ichikawa y col.1991; Van Hul y col.1991 y McInnis y col.1991. Los marcadores que están subrayados representan "loci" de sitios de secuencia marcada (STSS). Los marcadores señalados con* representan "loci" por los que se han aislado cromosomas artificiales de levadura (YACs).

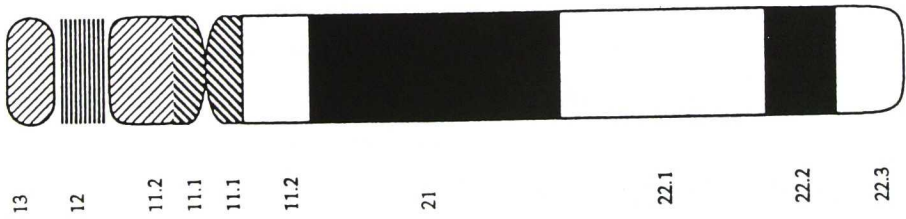
FIGURA 2



21

MAPA FENOTIPICO DEL SINDROME DE DOWN BASADO EN EL ANALISIS CITOGENETICO, 1973-1989 (Korenberg, 1991)

FIGURA 3



13
12
P
11.2
11.1
11.1
11.2
21
q
22.1
22.2
22.3

23 RASGOS DEL SINDROME DE DOWN (Sinet y col. 1991)

REGION 1 : (q22.2-q22.301)

Puente nasal plano, macroglosia, paladar estrecho y arqueado, orejas plegadas, manos cortas y anchas, clinodactilia 5 dedo, espacio ancho entre 1 y 2 dedos del pie, hiperlaxitud articular, hipotonía muscular, corta estatura e índice de Cummins alto.

REGION 2 : (q22.2-q22.304)

Fisura ocular oblícua, epicanto, iris moteado ("manchas de Brushfield"), pliegue palmar transverso, t" palmar y presilla ulnar hipotenar.

REGION 3 : (q22.2-q22.306)

Cuello corto.

REGION 4 : (q22.101-q22.307)

Cardiopatía congénita.

REGION 5 : (q11.2-q22.2)

Lengua estriada.

REGION 6 : (pter-q22.304)

Braquicefalia.

Además, al menos dos Regiones contribuyen probablemente a la patogénesis del Retraso Mental: REGION 1 y REGION 7 (pter-q22.100).

FIGURA 4

la producción de un determinado rasgo. Posteriormente, con el análisis fenotípico y molecular de individuos con trisomías parciales del 21 se ha realizado la definición molecular de regiones mínimas del cromosoma 21 responsables de diferentes rasgos del síndrome de Down: FIGURA 4.

En cuanto a las técnicas de diagnóstico de que dispone hoy la genética, cabe comentar que se ha introducido la hibridación "in situ" (citogenética molecular), que utiliza secuencias de ADN marcadas con radioisótopos, como el tritio, detectando los sitios de hibridación mediante autorradiografía, o, según la alternativa más reciente, usando sondas de ADN marcadas con sustancias no-radiactivas, como la biotina, que luego permiten reconocer el lugar de hibridación mediante anticuerpos o proteínas con gran afinidad por el nucleótido modificado, tales como la avidina acoplada a la tinción fluorescente. Con esta nueva técnica, el diagnóstico puede hacerse tanto en cromosomas metafásicos como en núcleos interfásicos. Las técnicas moleculares, igualmente, han posibilitado diferenciar lo que, por el análisis citogenético, se ha considerado como una translocación robertsoniana 21q/21q, entre los brazos largos de dos cromosomas 21 diferentes, de lo que es un isocromosoma del 21, compuesto por brazos largos genéticamente idénticos. Mediante el estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLPs), se ha podido descubrir que la mayoría de las translocaciones 21q/21q son en realidad isocromosomas derivados de un cromosoma 21 parental (Shaffer y col.1991).

Un comentario adicional sobre el mosaicismo en el síndrome de Down. Se detecta en alrededor del 2% de las trisomías 21. La evolución de esos niños, como es conocido, suele ser más favorable que la de los que presentan un cariotipo homogéneo trisómico 21. En nuestra experiencia, en un estudio llevado a cabo a lo largo del tiempo entre probandos con mosaicismo trisomía 21/normal, hemos observado en general un descenso de las células trisómicas y un aumento de las células normales (Aller y Abrisqueta,1992).

FENOGENESIS DEL SINDROME DE DOWN.

Las observaciones demuestran que la mayoría de las alteraciones de la organogénesis en el síndrome de Down representan una diferenciación "incompleta", más que "anormal", o, equivalentemente, una persistencia de estados embrionarios o fetales.

Los neonatos trisómicos 21 representan solamente una pequeña parte de las concepciones con trisomía 21, Para un nacido vivo trisómico 21, hay 5-8 abortos con dicha trisomía. En un aborto con trisomía 21, el desarrollo se detiene la mayoría de las veces alrededor de la 7-8 semanas. Se observa un grave retraso del crecimiento de la placenta. En efecto, la placenta tiene un papel importante en la supervivencia intrauterina del feto. El examen patológico de la placenta de trisómicos 21 viables ha mostrado un destacado retraso de la maduración de las vellosidades, con frecuente persistencia de la forma embrionaria, que suele ir acompañada de una alta concentración de la gonadotropina coriónica (hCG). Se ha observado, igualmente, una correlación entre valores bajos de la alfa-fetoproteína en suero materno (AFPSM) y en líquido amniótico y síndrome de Down. Por todo ello, el estudio de la AFPSM y la hCG en suero materno, como marcadores bioquímicos, realizada hacia la semana 16-18 de gestación, combinado con la edad materna, permite establecer unas tablas de riesgo de que el feto tenga una cromosopatía. En efecto, mediante este "screening" puede identificarse hasta un 70-75% de todos los síndromes de Down (Sabater,1991; Villa y col.1992). Una vez conocido el índice de riesgo, se decidirá si realizar o no el análisis del cariotipo como prueba verdaderamente diagnóstica.

Los mecanismos que se invocan para explicar la génesis del fenotipo suelen basarse en el 50% de incremento y decremento en la síntesis del producto génico en las trisomías y monosomías respectivamente. Cabe preguntar si en el síndrome de Down la expresión fenotípica de la trisomía constitucional del cromosoma 21 es el resultado de la ruptura generalizada de la homeostasis (mantenimiento del equilibrio dinámico de un sistema biológico) o es consecuencia de la sobre-expresión o sobredosis de genes específicos del cromosoma 21. Los resultados parecen sugerir que esa misma alteración en la dosificación génica es la causa de la ruptura de la homeostasis (Bardsley y col.1990). Este desequilibrio en la armonía genética del individuo parece constituir la razón de la patogénesis del síndrome de Down, aun cuando su total comprensión sea todavía remota. La inteligencia humana, comenta Lejeune (1991), es el mayor logro, la hazaña más importante, el "tutti" de la orquesta genética, que requiere la integración de un conjunto enorme de funciones morfológicas y químicas. La causa de la deficiencia mental se debe a la ruptura de un sistema fantásticamente coordinado. La metáfora de una orquesta "en concierto", continúa Lejeune, no es puramente teórica. En este sentido, la trisomía 21 resultaría un elemento "desconcertante".

CONTROL DE LA REGULACION GENICA : ¿UTOPIA O REALIDAD?

¿Podrá curarse el síndrome de Down? Una sobredosis génica ¿puede ser insensible a un tratamiento?. Ciertamente, la curación en el estado actual de los conocimientos se mantiene inalcanzable. No obstante, cabe elucubrar sobre las posibilidades teóricas que ofrece el conocimiento, escaso pero creciente, de la regulación génica. Los genes suelen incluir un elemento codificador de proteínas y elementos reguladores, que controlan la transcripción del segmento codificador. Entre estos últimos se han descubierto los "silenciadores", que reprimen la expresión de los genes y pueden ejercer su acción génica desde grandes distancias del elemento codificador (McKnight,1991). La naturaleza, que es más ingeniosa que nosotros, sabe silenciar perfectamente uno de los dos cromosomas X que tiene la mujer. Esta inactivación del cromosoma X está asociada con el fenómeno de la "metilación" (adición de un grupo metilo a las citosinas), que constituye uno de los principales mecanismos "epigenéticos" (Hall,1991) y que también se asocia a otro fenómeno de creciente interés genético como es la "impronta genómica", un proceso que marca diferencialmente a los genes de manera transitoria y reversible según se transmitan a través de la madre o del padre (Surani,1991). Tras el advenimiento en la última década de las técnicas para clonar o multiplicar genes también es posible pensar en la inactivación o modificación selectiva de la actividad de cualquier gen. Uno de los métodos será la creación de moléculas de ADN o ARN "anti-sentido" que hibriden específicamente con el ARN mensajero de un gen diana, bloqueando así la fina maquinaria molecular mediante la cual un gen se expresa en una proteína (Weintraub, 1990).

Realmente, nos encontramos aun muy lejos de conocer en profundidad todos estos mecanismos y, por consiguiente, de poder utilizarlos como métodos eficaces de curación de una trisomía 21. Nadie sabe si estaremos en condiciones de poder "silenciar", en un futuro próximo, uno de los tres cromosomas 21 que presentan los sujetos con el síndrome de Down.

2.2. CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR DEL
RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X

Félix PRIETO
Unidad de Genética y Diagnóstico
Prenatal.
Hospital La Fe.
Valencia

Entre más de 70 entidades que cursan con retraso mental de causa genética, debidas cada una de ellas a un gen mutante ligado al cromosoma X (1); el síndrome del cromosoma X frágil es el más importante con una incidencia de uno por cada 1.500 varones.

Esto explica que acudan a las consultas de genética y diagnóstico prenatal mujeres gestantes normales solicitando asesoramiento, porque en sus familias hay antecedentes de hermanos, tíos o primos con retraso mental. Estas mujeres, aún siendo normales, por el hecho de pertenecer a estas familias con antecedentes de retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX), forman parte de una población de alto riesgo; por ello, es importante saber si estas mujeres son o no portadoras del gen mutante, porque en el caso de serlo, el 50% de sus hijos varones padecerían la enfermedad y el 50% de sus hijas serían portadoras, con riesgo a su vez de transmitirlo a su descendencia.

Así pues, para abordar el problema del RMLX, es necesario no solo disponer de métodos que permitan hacer el diagnóstico diferencial de los distintos síndromes, sino también poder hacer el diagnóstico de portadoras.

La citogenética puede identificar un síndrome asociado a retraso mental, que fue descrito por Martin y Bell en 1943 (2). Este síndrome está asociado con un marcador citogenético (3). Se trata de un punto frágil localizado en los brazos largos del cromosoma X a nivel de la banda Xq27.3 (4).

El estudio del árbol genealógico en familias con pacientes afectos del síndrome, sugiere un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X con penetrancia incompleta, por tanto, también las hembras pueden ser afectas. La experiencia obtenida del estudio citogenético realizado en distintas familias, aún en las condiciones más favorables para detectar el cromosoma X frágil (medio de cultivo carente de ácido fólico)(5), demuestra que la utilidad del marcador citogenético para el diagnóstico de portadoras es limitada, dado que aproximadamente el 50% de estas manifiestan un fenotipo normal y no presentan el X frágil, ni siquiera en el 1% de las metafases analizadas,

mientras que su utilidad para el diagnóstico prenatal, ha resultado ser también poco fiable. Además no permite detectar los varones transmisores no penetrantes.

Todo ello representa una seria limitación para asesorar genéticamente a estas familias y limita en gran medida las posibilidades para hacer un diagnóstico prenatal correcto; a lo que habría que añadir en el caso de ser una hembra portadora el interrogante de si sería o no retrasada mental.

Las modernas técnicas de Genética Molecular permiten el estudio y diagnóstico de portadores del gen responsable de este síndrome con mayor fiabilidad. Se basan en el uso de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs) de gran utilidad como marcadores genéticos.

Como las sondas de ADN disponibles durante los primeros años de aplicación de las técnicas de genética molecular, no reconocían polimorfismos muy próximos al locus del X frágil (FRAXA), los estudios tenían una menor fiabilidad que actualmente (4), porque la posibilidad de producirse una recombinación entre el locus reconocido por la sonda y FRAXA está en función de la distancia existente entre ambos.

Recientes investigaciones mediante análisis de ADN de alto peso molecular por electroforesis en geles mediante campos pulsátiles (PFGE) permiten reconocer en varones normales un fragmento de 620 Kb, el cual es ausente o presente en menor cantidad en varones con retraso mental debido a X frágil (6). La falta del fragmento parece ser debida a un cambio en las dianas de restricción, por metilación anormal de una zona rica en dinucleótidos CpG (6-8). Esta metilación anormal no se evidencia en el varón normal transmisor, por lo cual este método no es útil para su detección.

Estos hallazgos han servido de base para el aislamiento y caracterización de un gen candidato responsable del síndrome del cromosoma X frágil (9) y para identificar una región de ADN de 1Kb (9-11) que puede ser ya estudiada o valorada mediante técnica de Southern utilizando enzimas de restricción y sondas adecuadas, lo cual permite reconocer diferencias entre individuos normales, varones afectados, varones normales transmisores y hembras portadoras al poner en evidencia fragmentos anormales de ADN surgidos como consecuencia de amplificaciones o inserciones, que se producen en un punto común y que constituyen las mutaciones del X frágil. Igualmente se pudo confirmar que la región está hipermetilada en varones afectados de igual manera que en el cromosoma X inactivo de la mujer normal.

Los métodos actuales, al utilizar sondas intragénicas (9-11), no sólo permiten el seguimiento de la mutación dentro de cada familia; sino que permitirán hacer predicciones sobre el estado clínico de los pacientes al ser factible un diagnóstico más específico, reconociendo mutaciones del gen candidato (inserciones o amplificaciones) en los varones afectados, en las hembras portadoras, en los varones sanos transmisores y también en las células de biopsia corial; todo lo cual es indispensable para realizar una prevención primaria.

Las sondas usadas por nosotros (12,13) para el análisis de la mutación (amplificación repetitiva anormal CGG en el gen FMR-1) en 16 familias con pacientes diagnosticados de síndrome X frágil, eran pP2 y PX6 las cuales son subclones de pE5.1 y reconocen fragmentos de ADN digeridos con EcoR I y Pst I respectivamente.

La figura 1A muestra el árbol genealógico de una familia con un varón diagnosticado de síndrome X frágil. ADN genómico de cada uno de los miembros de la familia era obtenido de leucocitos de sangre periférica. Muestras de 10 µg de ADN eran digeridos con la enzima EcoR I. Los fragmentos eran separados sobre geles de agarosa mediante electroforesis y después transferidos a membranas Hybond-N según el método de Southern.

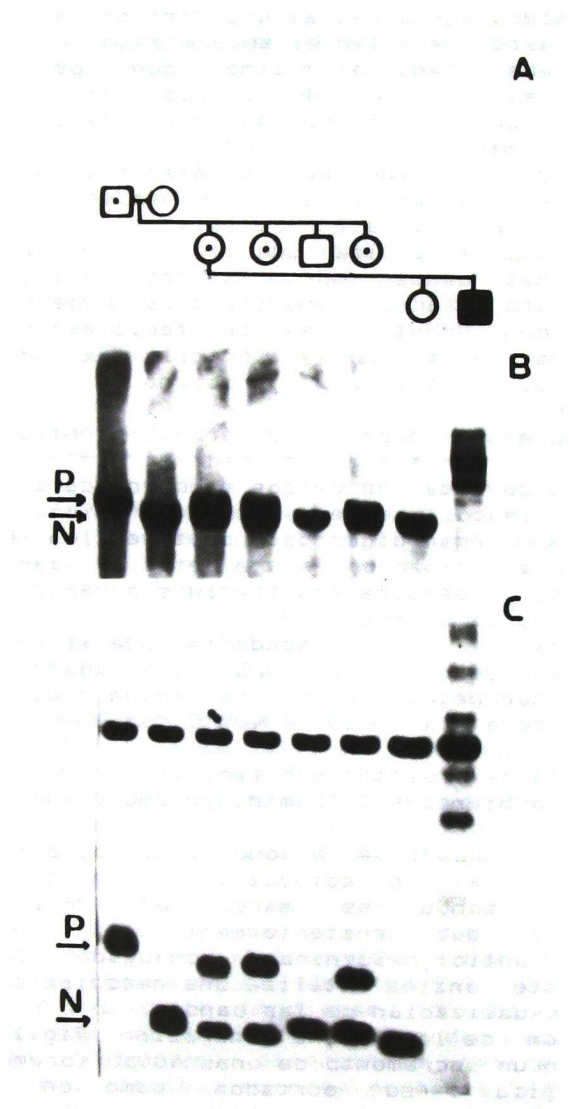
La hibridación con la sonda marcada se realizó en SSC 5x, lauroilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, agente de bloqueo (Boehringer Mannheim) 5% y formamida desionizada 50%, incubándose toda la noche a 42° C con 20-40 µg de sonda marcados por ml.

Los lavados fueron 2x5 min. en SSC 2x, SDS 0,1% a temperatura ambiente y 2x15 min. en SSC 0,1x/0,5x, SDS 0,1% a 65°.

Para el marcaje de la sonda y su posterior detección se utilizó el kit no radioactivo de la casa Boehringer Mannheim. La sonda se marca por oligomarcaje con Digoxigenina, que posteriormente es reconocida por anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. Este enzima cataliza una reacción coloreada que permite la visualización de las bandas.

El varón de la primera generación (Fig.1,B) presenta un alelo con un incremento de unas 400pb (premutación), lo cual identifica a su portador como un varón normal transmisor. Esta premutación la ha transmitido a sus tres hijas, las cuales ya pueden producir la mutación completa en sus gametos; de hecho, una de ellas ha tenido un hijo con retraso mental debido a X frágil en el que se ha detectado el típico patrón de la mutación completa.

La utilización de la enzima Pst I produce fragmentos de menor tamaño y por tanto permite diferenciar mejor el alelo normal (N) del correspondiente a la premutación (P) (Fig.1,C).



Más recientemente han sido descritos también pacientes con fenotipo del síndrome de X frágil, sin expresión citogenética de FRAXA, ni amplificación repetitiva anormal CGG, ni hipermetilación de la zona CpG pero que presentaban una delección de parte o todo el locus FMR-1 (14,15) o una mutación en FMR-1 (16).

Estos logros conseguidos recientemente van a servir de base para que en un breve plazo de tiempo, se pueda conocer de forma más completa la genética molecular, la bioquímica y los mecanismos etiopatogénicos de esta enfermedad.

Se estima que el síndrome X frágil puede representar el 40% de los RMLX (17), lo que quiere decir que hay al menos otro 60% de pacientes con otros síndromes que se asocian a retraso mental y que dependen de mutaciones en otros genes localizados en el cromosoma X.

Excluyendo los síndromes con RMLX de causa conocida (bioquímica, neurológica) quedan unas 40 entidades ligadas al cromosoma X en las que el retraso mental es de causa desconocida, que se denominan también como primarios o inespecíficos (18-20). Kerr et al. (19) proponen la denominación de retraso mental no específico (MRX) para los pacientes con RM y apariencia física normal, diferenciándolos así de las formas sindrómicas en las que el RMLX iría asociado a otros defectos malformativos.

La falta de un marcador específico para estos síndromes hace indispensable en las familias que reúnen condiciones adecuadas (número suficiente de pacientes y portadoras) hacer estudio de ligamiento genético que permitirá la localización aproximada en el cromosoma X del gen responsable de estos síndromes. Solo de esta forma se podría reconocer aquellas sondas moleculares próximas al gen, que harían factible el diagnóstico de portadoras sanas y el diagnóstico prenatal de la familia sometida al estudio de ligamiento.

En los últimos años, 17 de estas entidades han sido localizadas en el cromosoma X mediante estudio de ligamiento genético (18) a los que habría que añadir algún otro publicado posteriormente a esta revisión (21). Estos estudios han puesto de manifiesto que síndromes con fenotipo similar, en realidad son debidos a genes diferentes, que se localizan en distintos "loci" en el cromosoma X (22). Además otros síndromes que por la sintomatología clínica podrían considerarse diferentes; sin embargo bajo el punto de vista genético, sus fenotipos dependen de un mismo gen alelomorfo; es decir, que diferentes mutaciones (mutación puntual, delección, etc.) en el mismo gen, genera diferentes fenotipos (23).

Los resultados de estas investigaciones están aportando información para diferenciar o relacionar síndromes ligados al cromosoma X, que hasta hace muy poco solo se podían diferenciar por su descripción clínica fenotípica, a la vez que permiten un mejor asesoramiento genético y hacen posible el diagnóstico de portadoras y el

diagnóstico prenatal no sólo en el síndrome del cromosoma X frágil, sino también en el resto de los síndromes ligados al cromosoma X que cursan con retraso mental.

BIBLIOGRAFIA

1. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-Linked Phenotypes. Baltimore, London: The John Hopkins University Press, 8th Edition (1988).
2. Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1943; 6: 154-157.
3. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969; 21: 231-244.
4. Sutherland GR, Mulley JC. Diagnostic molecular genetics of the fragile X. *Clinical Genetics* 1990; 37: 2-11.
5. Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Amer J Hum Genet* 1979; 31: 136-148.
6. Vincent A, Heitz D, Petit C, et al. Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* 1991; 349: 624-626.
7. Heitz D, Rousseau F, Devys D, et al. Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* 1991; 251: 1236-1239.
8. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, et al. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 1991; 64: 861-866.
9. Verkerk A, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
10. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550 base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-1102.

11. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1179-1181.
12. Martinez F, Badia L, Prieto F. A fragile X family with high penetrance in females: risk heterogeneity?. *Clin Genet* 1992; 42: 22-26.
13. Martinez F, Badia L, Montero R, Prieto F. Analysis of the fragile X mutation region in families associated to X-linked mental retardation. *Clin Genet* (en prensa).
14. Gedeon AK, Baker E, Robinson H, et al. Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genetics* 1992; 1: 341-344.
15. Wohrle D, et al. A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 299-306.
16. De Bouille K, Verkerk A JMH, Reyniers E, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genetics* 1993; 3: 31-35.
17. Opitz JM. Editorial comment: On the gates of hell and a most unusual gene. *Am J Med Genet* 1986; 23: 1-10.
18. Neri G, Gurrieri F, Gal A, Lubs HA. XLMR Genes: Update 1990. *Am J Med Genet* 1991; 38: 186-189.
19. Kerr B, Turner G, Mulley J, Gedeon A, Partington M. Non-specific X-linked mental retardation. *J Med Genet* 1991; 28: 378-382.
20. Glass IA. X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991; 28: 361-371.
21. Gedeon A, Kerr B, Mulley J, Turner G. Localisation of the MRX3 gene for non-specific X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991; 28: 372-377.
22. Arveiler B, Alembik Y, Hanauer A, et al. Linkage analysis suggests at least two loci form X-linked non-specific mental retardation. *Am J Med Genet* 1988; 30: 473-483.
23. Gal A, Wieringa B, Smeets D, Bleeker L, Ropers HH. Submicroscopic interstitial deletion of the X chromosome explains a complex genetic syndrome dominated by Norrie disease. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 42: 219-224.

2.3. CONTRIBUCION DE LA GENETICA MOLECULAR AL
DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES
HEREDITARIAS GRAVES

Montserrat BAIGET
Unidad de Genética Molecular
Hospital Santa Creu y Sant Pau
Barcelona

La principal causa de mortalidad en la primera mitad del siglo XX fue las enfermedades infecciosas. Con el descubrimiento de los antibióticos y la mejora de las medidas higiénico-sanitarias, la patología infecciosa juega, hoy, un papel menor en los países industrializados. En consecuencia, las enfermedades genéticas o con un claro componente genético aparecen a finales de nuestro siglo como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental.

Un buen parámetro para evaluar este cambio es la tasa de mortalidad infantil (número de niños que mueren en su primer año de vida/1000 recién nacidos). En Inglaterra, por ejemplo, la tasa de mortalidad infantil (TMI) en el año 1900 fue aproximadamente de 160/1000, siendo 5 de estas muertes debidas a enfermedades genéticas. En 1980, la TMI se situaba en 12/1000, gracias a la mejora de la sanidad, pero el número de muertes por enfermedades genéticas permanecía inalterado. De este modo, la contribución de dicha patología a la TMI pasó del 3% al 40% en el periodo señalado.

Las enfermedades genéticas pueden subdividirse en: cromosómicas, monogénicas y multifactoriales. Numéricamente, las multifactoriales son, con mucho, las más numerosas ya que por un lado engloban las malformaciones congénitas y por otro están involucradas en patologías crónicas de la vida adulta en las que se ha demostrado un componente genético determinante.

Alrededor del 7,5% de todas las concepciones tienen una anomalía cromosómica, pero la mayoría de ellas abocan a un aborto espontáneo precoz, siendo la frecuencia de estas anomalías en recién nacidos no seleccionados cercana al 1%.

El grupo de las enfermedades monogénicas comprende alrededor de 4000 trastornos debidos a la presencia de un gen anormal. En nuestra sociedad, aproximadamente uno de cada cien recién nacidos está afectado por este tipo de patología genética. En un buen número de casos se dispone de tratamiento sintomático y en algunas ocasiones las medidas terapéuticas pueden llegar a ser francamente efectivas a pesar de la existencia de un genotipo anormal. A pesar de ello, existen enfermedades genéticas monogénicas graves y frecuentes para las que no existe tratamiento paliativo y en las que las medidas preventivas son las de elección .

Existen dos niveles en la prevención de las anomalías genéticas: la prevención primaria de un genotipo anormal, antes de la concepción y la prevención secundaria que incluye el diagnóstico prenatal en todos sus aspectos, con la posibilidad de una terminación voluntaria del embarazo cuando se diagnostica la existencia de un feto afectado por una enfermedad genética grave, sin tratamiento ni curación.

En los últimos años ha tenido lugar un extraordinario progreso en el conocimiento de la estructura y función de los genes humanos.

Se han desarrollado tecnologías para la manipulación y el estudio de dichos genes tanto en su estado normal como patológico y muchos de estos logros han sido extremadamente importantes en medicina puesto que han hecho posible el disponer de un diagnóstico a nivel del ADN -a nivel molecular- y han aclarado los mecanismos bioquímicos de un buen número de enfermedades.

Existen distintas estrategias diagnósticas para abordar el estudio de la patología hereditaria monogénica: **el análisis directo** que lleva a la identificación de la lesión molecular específica y **el análisis indirecto** que, sin identificar el gen mutado, permite seguir su herencia en una familia en estudio.

El análisis directo es posible, teóricamente, siempre que se aborda el estudio de un gen con una estructura conocida. En la práctica se aplica cuando se da alguna de las circunstancias siguientes:

- Cuando la patología delecional sea la causa mayoritaria de la enfermedad, por ejemplo en la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), una distrofia muscular progresiva de evolución fatal, debida a anomalías en el gen de la Distrofina(1), situado en Xp21. Puesto que en alrededor del 60% de los varones afectados de DMD poseen una deleción en dicho gen, el diagnóstico molecular de elección en estos casos es el análisis directo para evidenciar la existencia de deleciones mediante amplificación selectiva (PCR) de las

distintas zonas del gen (2). La ausencia de una o más bandas en el producto amplificado evidencia no solo la presencia de la delección sino su tamaño y localización. La Figura 1 muestra un diagnóstico prenatal de DMD efectuado mediante PCR.

- Cuando una o pocas mutaciones puntuales sean las responsables del fenotipo anormal en estudio. Es el caso de la hemoglobinopatía S debida a una mutación A T en el codon 6 del gen de la globina β . Esta mutación destruye una diana de restricción para el enzima MstII. El análisis directo se efectúa amplificando (PCR) la zona del gen que contiene el primer exon y digiriendo con MstII el ADN amplificado. La electroforesis posterior de los fragmentos generados permite evaluar la presencia o ausencia de dicha diana de restricción.

El diagnóstico directo por análisis de restricción solo es aplicable en el 5-10% de las mutaciones puntuales conocidas, circunstancia que limita su aplicación en la práctica diaria.

En el caso de la fibrosis quística de páncreas, en el que alrededor del 60% de los pacientes poseen una delección de tres nucleótidos en el codon 508 del gen CFTR que comporta la pérdida de un residuo de fenilalanina. La delección se evidencia amplificando selectivamente (PCR) la zona de gen que contiene el exon 10 y sometiendo a electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida el producto amplificado.

La estrategia indirecta de análisis genotípico se fundamenta en el empleo de los FRLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). En el ADN humano, uno de cada pocos cientos de nucleótidos varía de un individuo a otro, sin que exista una expresión fenotípica de esta variación. Estas diferencias o polimorfismos pueden evidenciarse gracias al empleo de combinaciones adecuadas enzima/sonda que muestran los cambios individuales en el tamaño de los fragmentos de restricción. La denominación de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica responde a estas diferencias y dado que se transmiten con carácter mendeliano pueden utilizarse como marcadores genéticos. Un marcador genético será, pues, aquel polimorfismo que permita distinguir los diferentes alelos que ocupan un determinado locus en el genoma humano (3,4).

El análisis indirecto se aplica en los siguientes casos:

- En las enfermedades hereditarias monogénicas en las que se ha identificado el gen responsable y existe una gran heterogeneidad en las mutaciones causan el fenotipo anormal. En la práctica es imposible identificar en cada familia cual es el defecto molecular. De hecho lo que pretende el diagnóstico molecular es identificar el gen anormal y poder seguir su herencia a través de una o mas generaciones en cada familia. El único requisito para poder efectuar un diagnóstico de portadores o el diagnóstico prenatal es la capacidad para

poder reconocer o identificar el gen anormal y ésto puede lograrse empleando los polimorfismos del ADN como marcadores. Este es el caso del análisis genotípico de la hemofilia A. En cada familia en la que exista un gen hemofílico, éste tendrá una mutación distinta y el análisis directo es, en la práctica, imposible a pesar de que el gen del Fc VIII está perfectamente caracterizado. En el gen del factor VIII existen cinco dianas de restricción polimórficas y mediante al análisis de los FRLP que se generan es posible el diagnóstico de hembras portadoras y el diagnóstico prenatal en aproximadamente el 60% de las familias con hemofilia A. La Figura 2 muestra el diagnóstico de portadoras efectuado mediante el análisis del polimorfismo BclI situado en el intrón 18 del gen del Fc VIII (5). Recientemente, se ha descrito el procedimiento completo para efectuar un diagnóstico prenatal de hemofilia A, incluyendo la determinación del sexo fetal, que puede efectuarse en un lapso de tiempo no superior a 48 horas. En el resto de los casos hay que recurrir al estudio de marcadores extragénicos.

- En las enfermedades monogénicas en las que se conoce la ubicación del gen responsable pero éste no ha sido aún clonado y caracterizado. En esta situación es posible efectuar un diagnóstico genotípico indirecto en base a la segregación de marcadores polimórficos situados en regiones adyacentes al gen en cuestión. Un ejemplo que ilustra esta situación es el

análisis de familias afectadas de Atrofia Muscular Espinal, que se lleva a cabo empleando los polimorfismos existentes en la región del cromosoma 5, en donde se ha localizado el gen mediante estudios de ligamiento.

La estrategia directa de análisis es siempre la de elección pero es condición indispensable el conocer "a priori" la mutación que se desea identificar. La estrategia indirecta que es útil en un gran número de casos tiene algunas limitaciones como son la necesidad de un estudio familiar para delinear el haplotipo que se segrega con el gen mutado y el hecho de los resultados que se obtienen son siempre probabilísticos en base a las recombinaciones que puedan ocurrir entre el gen mutado y los marcadores empleados.

La posibilidad de un tratamiento adecuado para algunas enfermedades monogénicas graves y frecuentes se preve factible en un futuro si se tiene en cuenta el creciente conocimiento de la naturaleza de los genes humanos y de sus productos proteicos. En la actualidad, sin embargo, la contribución de la genética molecular en la prevención de la patología hereditaria monogénica radica en una mejora espectacular de la capacidad diagnóstica de las enfermedades monogénicas y del asesoramiento genético (7).

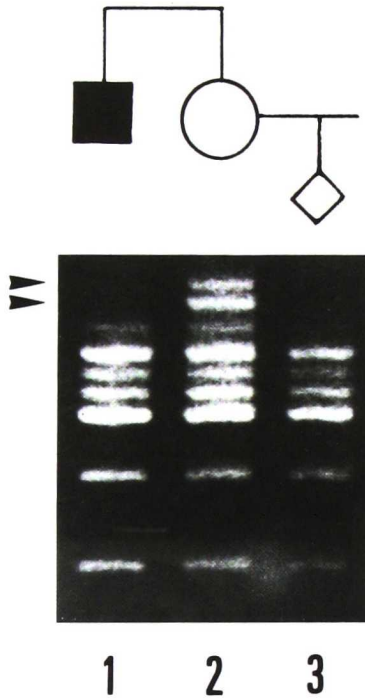


Figura 1.- Separación electroforética de los distintos fragmentos de ADN amplificadas por PCR, correspondientes a 9 exones distintos del gen de la Distrofina. La muestra 1 en la que se evidencia la falta de dos bandas, señaladas con flechas, correspondientes a dos exones del gen pertenecen al varón con un diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne de la familia que solicita el diagnóstico prenatal. La muestra 2 corresponde al patrón normal. La muestra 3, ADN fetal en estudio, posee idéntico patrón que el varón DMD y se trata, por lo tanto, de un feto varón DMD.

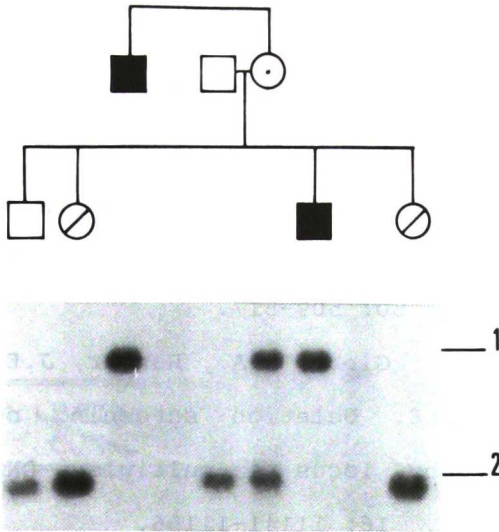


Figura 2.- Diagnóstico de portadoras de Hemofilia A mediante análisis de un polimorfismo situado en el interior del gen del Fc VIII. En esta familia, la Hemofilia A se hereda ligada al alelo 1, puesto que es el que poseen los varones hemofílicos. Las dos mujeres de la segunda generación, a riesgo de ser portadoras de hemofilia A, no han heredado, de su madre, el alelo de riesgo. La probabilidad de que sean portadoras de la enfermedad es, prácticamente, negligible.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., Kunkel, L.M. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 50: 509-517.
- 2.- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-11156.
- 3.- Hodgson AV, Walker A, Cole C et al. The application of linkage analysis to genetic counselling in families with DMD *J Med Genet* 1987; 24: 152-159.
- 4.- Goodship J, Malcolm S, Robertson ME, Pembrey ME. Service experience using DNA analysis for genetic prediction in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1988; 25: 14-19.
- 5.- Kogan, S.C., Gistchier, J. 1990. Genetic prediction of Hemophilia A. p. 288-299. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc.
- 7.- Davies, K.E. Application of molecular genetics to the diagnosis of inherited disease. RCP publications. 1990. London

2.4. LIMITACIONES TÉCNICAS Y ÉTICAS DEL
CONSEJO GENETICO MOLECULAR

Ricardo CRUZ-COKE
Unidad de Genética Médica
Hospital J.J. Aguirre
Universidad de Chile
Santiago de Chile

Introducción

El consejo o asesoramiento genético es un proceso de comunicación que trata problemas humanos asociados a la ocurrencia o riesgo de recurrencia de un desorden genético en una familia. Tiene como objetivo ayudar a un individuo o una familia a comprender el rol de la herencia, los hechos médicos, los riesgos de recurrencia de la enfermedad y a escoger el curso de acción según sea el caso.

El consejero genetista debe dar información básica sobre las magnitudes de los riesgos, el lastre de la enfermedad en la familia y poder predecir la evolución del caso. (1)

El consejo genético era originalmente hace 50 años un ejercicio intelectual basado en una predicción de segregación mendeliana. Con el progreso de las tecnologías de prevención, diagnóstico y tratamiento genético, se ha aumentado considerablemente el poder del médico para intervenir en el destino de las personas y en las familias, al descubrir los riesgos morbidos y facilitar la toma de decisiones sobre la reproducción.

En esta última década, la aplicación de los métodos de genética molecular permite identificar directamente en toda persona los genes mutantes y, por tanto, especificar los riesgos de recurrencia, con gran exactitud.

Biología molecular

Las técnicas de biología molecular permiten detectar indirectamente y directamente los genes mutantes en una familia. (2)

El método indirecto usa marcadores de genes ligados que exigen requisitos estrictos difíciles de cumplir. Debe conocerse la fase del ligamento, la familia debe ser "informativa" y no debe haber recombinación entre marcador y gen.

El método directo está basado en la detección directa de una mutación conocida mediante métodos para DNA, Southern; para RNA, Northern; PCR (Polimerasa chain reaction) y análisis de secuencias del DNA. (1,2,3)

Estas técnicas se han estandarizado y es posible hacer detección masiva en poblaciones mediante el tamizaje (screening).

Los principios y requisitos para el programa de tamizaje de una enfermedad genética son muy estrictos. La enfermedad genética debe ser diagnosticada con fenotipo definido, de relativa alta prevalencia y posible de ser tratada médica o quirúrgicamente. El test debe ser rápido, barato, masivo y sin falsos negativos y pocos falsos positivos. Debe ser posible hacer consejo genético con control y seguimiento de los casos.

Limitaciones técnicas

Todos estos progresos técnicos, si bien permiten mejorar el rendimiento y utilidad del consejo genético, presentan grandes limitaciones técnicas y éticas que exigen una correcta evaluación de sus posibilidades reales de beneficio al paciente, a la familia y a la población.

En efecto, en primer lugar debemos recordar que el consejo genético tiene un impacto en la carga o lastre de genes mutantes en la familia y en la población. El lastre genético es una medida de selección natural relacionada con la variabilidad genética en las poblaciones. Se expresa en muerte, esterilidad y dolor. Cada mutación génica impone una carga de muerte genética en la familia o en la población. La intervención médica redistribuye la carga en el reservorio de genes de la especie. Para trasladar la carga de la familia a la población se usa la terapéutica, la prohibición de matrimonios consanguíneos y el aumento de heterocigotos. (1)

A la vez, la carga se traslada de la población a la familia mediante el consejo genético, la anticoncepción, la eugenesia, la promoción de los matrimonios consanguíneos y el rechazo de la terapéutica. No podemos eliminar la carga genética de un gen mutante recurrente en el reservorio de la especie humana.

De este modo, el consejo genético influye negativamente en el lastre genético de las familias, ya que aumenta la carga de esterilidad y muerte en sus miembros.

Limitaciones éticas

La detección de un gen mutante deletéreo en personas aparentemente sanas presenta una serie de limitaciones éticas. En efecto, los resultados pueden no ser exactos y existir muchos casos falsos negativos, además de falsos positivos, que bajan el rendimiento y alteran el costo-beneficio del método. (1)

El método invade la privacidad de personas que tienen derecho a no saber cómo es su genotipo. Puede haber falta de confidencialidad en los bancos de datos. Esto puede acarrear estigmas por calificación de defectuoso o minusválido que abre discriminaciones en la educación y en el empleo. Por otra parte, el consentimiento informado para hacer el test puede obtenerse por compulsión.

Es importante destacar el hecho de que actualmente existen dos importantes Códigos de Ética Médica, el de Nuremberg (1947) y el de Valencia (1990) que abren reservas éticas a los programas de detección genética molecular. En efecto, estos códigos establecen que éticamente lo más importante es la protección del consentimiento voluntario que no puede ser delegado. Tampoco debe hacerse daño innecesario, físico o mental. La información genética debe ser reservada y propiedad del individuo. El mal uso del conocimiento genético trae implicaciones éticas, legales y sociales negativas. La sociedad debe respetar la diversidad humana y las variaciones genéticas.

Experiencias en Chile

Para analizar más detalladamente estos conceptos básicos sobre las limitaciones técnicas y éticas del consejo genético en biología molecular, tomaremos como ejemplo la situación epidemiológica de enfermedades genéticas en Chile.

En este país, hay una población general que es una mezcla de europeos e indígenas en proporción aproximada de 2/3 de genes venidos de Europa. Las minorías étnicas son muy reducidas y las tasas de inmigración intercensal son menores del 3%. Por tanto, en Chile hay una patología autosómica recesiva diversa a la europea. Hay ausencia de hemoglobinopatías y bajas frecuencias de fibrosis quística, por lo que los problemas del consejo genético son más complejos y relevantes que en Europa. (8)

Hemoglobina S

Desde luego, la Drepanocitosis (Hbs) es tan rara que se han descrito sólo 3 casos en Chile, en aislados étnicos. La genealogía de una familia rural de Cerrillo Alto presenta 1 homocigoto Hbs/Hbs y 20 heterocigotos Hbs/Hba identificados por electroforesis. Es una genealogía de nivel de miseria, sin identificación civil y analfabetos. Presentaban rasgos negroides. En esta familia se dio consejo genético explicando los riesgos de

recurrencia y la necesidad de evitar los matrimonios consanguíneos. La mayoría de los nietos emigraron a las zonas urbanas a mezclarse con homocigotos Hba/Hba. Así difundieron el mutante Hbs en la población urbana donde, afortunadamente, las tasas de consanguinidad son muy bajas, por lo cual disminuye el riesgo de originar enfermos drepanocíticos. (4)

Sin embargo, al romperse el aislado rural, el gen mutante pasa de la familia a una población y de ésta, a otras familias. El efecto fundador puede originar una enfermedad que no existía en América precolombina.

Recientemente, se ha diagnosticado otra familia portadora del rasgo Hbs en Puerto Montt, al sur de Chile. Se trata de una familia de origen europeo, con un caso homocigoto y cuatro hermanos y padres portadores. Fueron estudiados con electroforesis de Hb clásica con sondas de DNA. Se utilizó la enzima de restricción D de I y se hibridizó con sonda pSS 1.8, que contiene la secuencia complementaria 5' específica del gen de la Betaglobina humana. (5)

La enferma de drepanocitosis tenía 29 años en 1990 y una anemia moderada por ser de grupo étnico diferente a negros. Se dio consejo genético para evitar matrimonios consanguíneos. En todo caso, la enfermedad se difundirá en la población chilena por el efecto fundador.

Fibrosis quística

La segunda experiencia chilena en diagnóstico de fibrosis quística es que esta enfermedad tiene una prevalencia estimada en 1/3.500 casos, muy baja en comparación con Europa (1/2.000). (6)

Los casos chilenos llegan al centro nacional de referencia en el Hospital Calvo Mackenna, en Santiago. Se han estudiado con PCR 15 familias y la frecuencia del alelo mutante Delta F508 es de sólo 0.30. No se han identificado aún otros alelos. (7)

El consejo genético está muy limitado por la variabilidad del diagnóstico clínico y la imposibilidad de hacer screening y de identificar a los portadores mediante métodos moleculares debido a la baja frecuencia del alelo F508 en la población. La mayoría de las mutaciones (CF) chilenas no son detectables aún.

Estos ejemplos revelan que en países, como Chile, que tienen diversas estructuras genotípicas de enfermedades genéticas, no es posible aplicar con la misma eficiencia el consejo genético molecular como en Europa.

Cuadro Nº 1

GENOTIPOS Δ F508 EN PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

Genotipos F = 508	Porcentajes (%)	
	Europa(1) N = 293	Chile(2) N = 15
508/508	52	13.3
508/otro	40	33.3
otro/otro	8	53.3
	----- 100	----- 100.0
Frecuencia alelo 508	0.72	0.30

(1) Kerem et al (1990) (1)

(2) Riveros et al (1992) (7)

REFERENCIAS

1. Thomson & Thomson (5th Edition)
Genetics in Medicine.
Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1991, págs. 395-410.
2. Singer, M. y Berg, P.
Genes & Genomes
Oxford, Blackwell, 1991.
3. Baiget, M.
DNA diagnosis of genetic diseases in Spain
El proyecto del genoma humano, Valencia, 1990, pág. 33.
4. Roizen, Z., Salinas, A., Rivera, L., Cruz-Coke, R.
Drepanocitosis: Genealogía chilena
Rev. Med. Chile, 105, 1977, 905-910.
5. Vega, I., León, G., Muñoz, R., Zapata, C., Kranskopf, M.
Sonda de DNA específica en confirmación de anemia falciforme
Rev. Med. Chile, 118, 1990, 306-312.
6. Editorial
Screening for cystic fibrosis
Lancet, 2, 1992, 209-210.
7. Riveros, N., Ríos, J., Orellana, O., Aspillaga, M., Avendaño, I.
Estudio genético molecular de la fibrosis quística en la población chilena
Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile
XXV; Agosto 1992, págs. 51-52.
8. Rothhammer, F. y Cruz-Coke, R.
Curso básico de genética humana
Santiago, Edit. Universitaria, 1977.

3. DAÑO CEREBRAL NEONATAL.
RECUPERACION FUNCIONAL Y REORGANIZACION
ANATOMICA

3.1. DAÑO PRENATAL Y PLASTICIDAD
ANATOMO-FUNCIONAL DEL CEREBRO

Jaime R. VILLABLANCA
Mental Retardation Research
Center
UCLA School of Medicine
Universidad de California
Los Angeles

En el trabajo premiado en 1990 demostramos que a continuación de hemisferectomía cerebral hay mayor recuperación funcional en gatos que reciben la lesión en edad temprana (entre 5 y 20 días después del nacimiento) que en los animales que reciben la misma lesión pero en edad adulta. Demostramos además que dos grupos de procesos anatómicos parecen ser reponsables de esta mayor recuperación después de la lesión neonatal : a) menor degeneración de estructuras subcorticales; b) mayor reinervación de áreas parcialmente denervadas por fibras nerviosas proveniente de neuronas en el hemisferio intacto. Hay además fenómenos plásticos del metabolismo cerebral que también dependen de la edad del animal al momento de la lesión y que el Dr. D. Hovda describirá en la segunda conferencia. Estas conclusiones se aplican a los sistemas motor-somatosensorial y visual.

Dos razones principales nos llevaron a extender estos estudios a la época fetal de la vida del gato. Primero, el anhelo de completar nuestros investigaciones acerca del efecto del factor edad, en el momento del daño cerebral, sobre las consecuencias de la lesión; esto es, agregando los estudios prenatales a los postnatales

resumidos mas arriba habriamos estudiado este aspecto a lo largo de toda la vida del gato. Segundo, el concepto que ha dominado esta área de investigación por largo tiempo es que mientras mas joven es el individuo en el momento de ocurrir la lesión cerebral mayores son las posibilidades de recuperación (este concepto es conocido como el "Principio Kennard" o "Efecto de Lesión Temprana"). Aunque nuestras conclusiones en el primer párrafo se ajustan a este "Principio", numerosos otros resultados en diferentes especies animales no lo siguen (ver ejemplo más abajo); por lo tanto, nos parecía necesario comprobar si el "Principio Kennard" se aplica a la lesión cerebral fetal en el gato y, al mismo tiempo, tratar de aclarar la confusión, que según ahora nos parece, dicho concepto ha creado.

Para los estudios de lesiones fetales utilizamos gatos con lesión unilateral de la corteza cerebral frontal producida entre los días 43 a 52 de la gestación (duración de la gestación en el gato : 63-65 días) o entre los días postnatales 5 a 15. La ubicación y extensión de estas lesiones se ilustra esquemáticamente en la Fig.1. Inicialmente intentamos hemisferectomía cerebral en los fetos pero pronto descubrimos que los animales morían antes de llegar al termino de la gestación (ver mas adelante). Después que los animales hubieron crecido hasta llegara a la edad juvenil o adulta temprana (más de 6 meses de edad), empezamos la evaluación neurológica-conductual para, posteriormente, analizar la anatomía cerebral. Nuestros principales hallazgos, expuestos en detalle en la conferencia (y en este momento en proceso de ser publicados en

revistas especializadas cuyos apartados pueden ser solicitados por los lectores interesados) demuestran que, a diferencia de lo esperado de acuerdo con el "Principio Kennard", los animales con la lesión fetal muestran menor recuperación funcional que aquellos con la lesión postnatal. Paralelamente, encontramos que en los animales con lesión prenatal hay acentuados fenómenos anatómicos regresivos consistentes en: a) alteración bilateral de la topografía de surcos y circunvoluciones cerebrales (o "disgenesia"); b) disminución de volumen (o "hipogenesia") de la corteza cerebral y tálamo ipsilateral a la lesión con aparente conservación de la densidad celular (y consecuencias de menor envergadura en el hemisferio contralateral); c) falta de reinnervación de áreas subcorticales (resultados preliminares). El núcleo caudado hace excepción ya que esta hipertrofiado en los gatos con la lesión fetal. Estas consecuencias tan acentuadas de una lesión relativamente pequeña tal vez explican porqué los fetos no toleraron la mucho más extensa hemisferectomía cerebral.

Los resultados resumidos apretadamente más arriba tienen, en primer lugar, el mérito de describir en detalle los procesos de plasticidad neural (o falta de ella) que ocurren a largo plazo luego de una lesión cerebral en épocas claves de la vida del gato. Agregan además otra conclusión de extraordinario interés. Esta es, que hay un "período crítico" durante el cual el cerebro despliega las mejores condiciones de plasticidad adaptativa frente a la injuria (Fig. 2). En el gato este período es predominantemente postnatal ya que hemos demostrado que los resultados de

recuperación funcional (Fig.2). y de plasticidad cerebral adaptativa son óptimos entre los 5 y 20 días de edad en tanto que son peores, ora en la edad adulta ora durante el último tercio de la gestación. La duración exacta de este período queda aún por ser determinada.

Considerando otras especies animales, sólo se ha hecho estudios de daño cerebral prenatal en el mono (ver Tabla resumen). En aparente contradicción con nuestros resultados, en esta última especie los mejores resultados funcionales y anatómicos se obtienen cuando la lesión es fetal (último tercio de la gestación); las consecuencias son peores cuando la lesión ocurre en la infancia o en la edad adulta. En roedores no existen estudios fetales; sin embargo, los estudios postnatales en ratas muestran que también hay un período óptimo (a partir aproximadamente de los 10 días de edad); sin embargo, antes (entre 1 y 7 días de edad) y después de esta fecha (en edad adulta), los resultados son peores. Qué determina la discrepancia en la ubicación del "período óptimo" en relación con la fecha de nacimiento en estas 3 especies animales?. Proponemos que es el estado de maduración cerebral del cerebro en el momento de la lesión. Al respecto, es sabido que, al momento de nacer, el cerebro del mono es más maduro que el cerebro del hombre, en tanto que, el de la rata es considerablemente menos maduro que el del hombre y el del gato se ubica entre el del mono y el de la rata (resultando el más parecido al del hombre en cuanto a este aspecto de la ontogenia).

El conjunto de los hechos analizados nos permiten postular lo siguiente:

- a) A lo largo del desarrollo, existe un "período crítico" durante el cual la recuperación funcional y la reorganización anatómica que ocurren luego de lesión cerebral son óptimas;
- b) tal "período crítico" ocurre en diferentes épocas de la vida dependiendo de la especie animal;
- b) la ubicación temporal del "período crítico" está ligada al estado de maduración del cerebro en el momento de la lesión cerebral;
- c) el "período crítico" ocurre durante un "período óptimo de maduración cerebral" (Fig.2); en vista que este último hecho es clave para el concepto mismo de período crítico proponemos que el nombre de tal etapa sea "período óptimo de maduración " (en vez de "período crítico");
- d) en vista que la duración del "período óptimo de maduración" no ha sido determinada con exactitud en ninguna especie animal, es difícil describir con precisión los hechos ontogénicos cerebrales específicos que ocurren durante este período del desarrollo; basado en lo que sabemos en las 3 especies animales mencionadas sugerimos que parece darse después de la máxima neurogénesis y morfogénesis cerebrales y durante el período en que ocurre muerte neuronal espontánea y estabilización de la sinaptogénesis y de los árboles dendríticos.

Es importante continuar definiendo y demostrando el "período óptimo

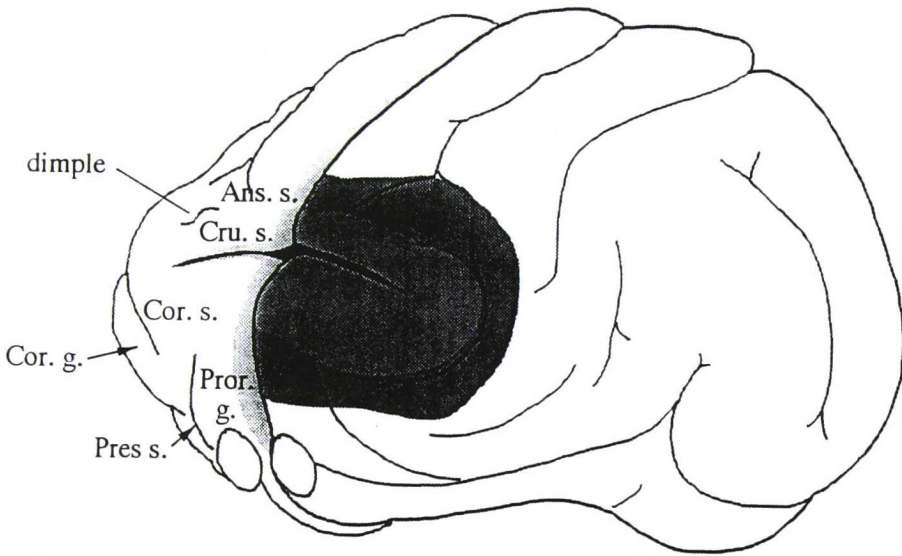
de maduración cerebral" para los mejores resultados reparativos post-lesionales ya que esto permitiría: a) correlacionarlo con los fenómenos ontogenéticos que lo acompañan; b) tratar de identificar cuáles son los procesos básicos que lo hacen posible (lo cual, a su vez, puede sugerir intervenciones "terapéuticas" para lograr la mayor plasticidad adaptativa en otras épocas de la vida); c) identificar cuando ocurre este período en el hombre para aprovecharlo con fines terapéuticos (ejemplos: transplante de tejido cerebral; intervenciones quirúrgicas o farmacológicas-humorales).

En general, estos estudios en mi laboratorio han demostrado y continúan definiendo: a) la extraordinaria plasticidad funcional, anatómica y metabólica del cerebro dañado; b) las fluctuaciones de esta plasticidad cerebral a través de las diferentes épocas de la vida; y, c) aquellos mecanismos básicos que hacen posible esta capacidad adaptativa del cerebro. La meta final es poder usar estos conocimientos en el tratamiento paliativo o curativo del daño cerebral perinatal en el hombre.

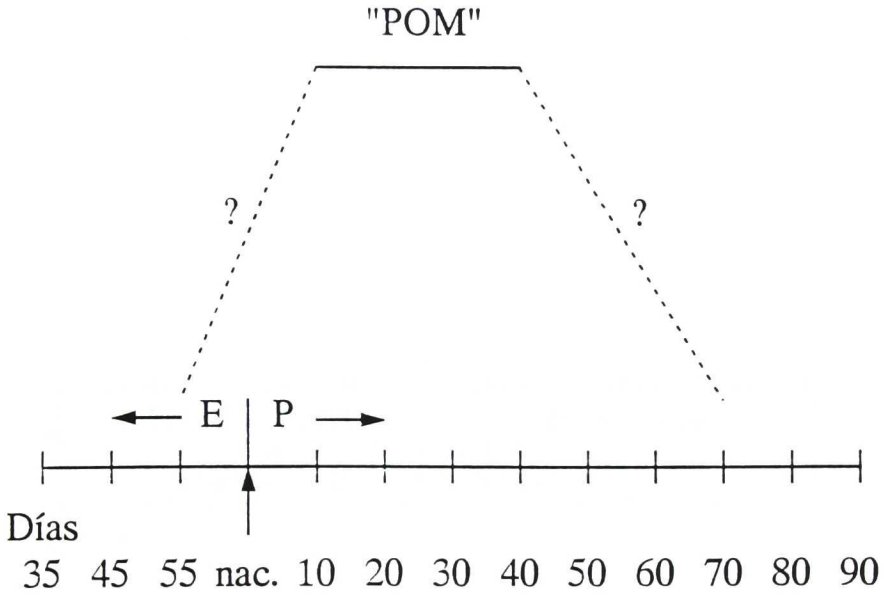
CONSECUENCIAS DE LESIONES CEREBRALES EN DIFERENTES EPOCAS DE LA VIDA EN TRES ESPECIES DE MAMIFEROS.

		RECUPERACION FUNCIONAL	PROCESOS DEGENERATIVOS	PROCESOS DE REINERVACION
<u>EPOCA DE LA LESION</u>				
PRENATAL:	Gato	Deficiente	Marcados	Deficientes?
(último 1/3	Mono	Optima	Reducidos	Optimos
gestacion)	Rata	?	?	?
NEONATAL:	Gato	Optima	Reducidos	Optimos
	Mono	Deficiente	Marcados	Deficientes
	Rata			
	1-7 ds	Deficiente	Marcados	Deficientes
	10+ ds	Optima	Reducidos?	Optimos
EDAD ADULTA:	Gato	Deficiente	Marcados	Deficientes
	Mono	Deficiente	Marcados	Deficientes
	Rata	Deficiente	Marcados	Deficientes

? = Información incompleta o no existente



Esquema del cerebro del gato adulto mostrando el polo frontal. En el hemisferio izquierdo se muestra la ubicación y extensión de la lesión. Practicamos dos tipos de lesiones, Una mas pequeña (área en gris claro) que incluye el surco cruciatus y la corteza que lo rodea (area motriz). La otra más extensa (área en gris oscuro) incluye áreas somatosensoriales. En general, los resultados funcionales y anatómicos fueron proporcionales a la extensión de la lesión. Abreviaciones: Ans.s., surco ansatus; dimple, hendedura; Cru.s., surco cruciatus; Cor.s y g., surco y circunvolución coronalis; Pror.g., circunvolución proreus; Pres. s., surco presilvius.



Esquema mostrando la ubicación temporal del "período óptimo de maduración cerebral" ("POM"). Las porciones marcadas con ? son enteramente hipotéticas. E = período embrionario; P = período postnatal; nac. = nacimiento.

3.2. CEREBRAL METABOLISM FOLLOWING NEONATAL
CEREBRAL HEMISPHERECTOMY:
REFLECTIONS OF NEURAL PLASTICITY

David A. HOVDA
Division of Neurosurgery
UCLA School of Medicine
Los Angeles

Following cerebral hemispherectomy in the neonatal kitten, cats grow up to exhibit very few sensory-motor defects compared to when this same surgical procedure is conducted in adulthood^{1,2,23}. These age-at-lesion effects have been thought to be the result of a combination of less degeneration within denervated structures^{9,10,17,18,21,22,26} and a lesion-induced reorganization of the remaining intact hemisphere^{5,6,11,24,25}.

Although the correlation between these anatomical and behavioral changes is quite strong^{1,2,11,23}, direct physiological assessment of the affected structures has remained to be conducted. In order to begin to assess the functional characteristics of these age-at-lesion structural changes have utilized [¹⁴C]2-deoxy-D-glucose autoradiography(2DG)²⁰ to determine the extent of cerebral glucose metabolic alterations following neonatal as compared to adult cerebral hemispherectomy in the cat. It is well known that under a "steady state" environment glucose utilization directly reflects the degree and extent of neuronal firing^{12,16,19}.

Methods

Subjects: Sixteen adult cats underwent studies of cerebral glucose utilization. Seven animals served as intact adult controls, five received a left cerebral hemispherectomy as a neonate (NH; mean days of age=11.4) and four had the same surgery only in adulthood (AH). All animals were allowed to survive at least 9 months following the surgical procedure before being studied for cerebral metabolism.

Surgery and Maintenance: Kitten surgery was performed under combined chlorpromazine (5 mg/kg, i.p.) and pentobarbital (10-15 mg/kg, i.p.) anesthesia, while only the standard dose of pentobarbital (35 mg/kg, i.p.) was used for adults. Hypothermia (30° to 35° C rectal temperature) was used in all cases. The surgical procedure has been described in detail²³.

In brief, using blunt dissection with a suction pipette the left cerebral hemisphere was separated from the thalamus at the level of the internal capsule and caudate nucleus. Thereafter, the pedicle of the middle cerebral artery was ligated and sectioned, the frontal pole was dissected from the olfactory bulb and the entire hemisphere was removed in a block. The cranial defect was covered with the temporal muscle, which was reattached to the midline (in cats) or with the skull bone flap which was sutured in place (in kittens). The hemisphere removed was always the left. After surgery the animals were gradually warmed and the kittens were maintained for the night in a thermostatically controlled incubator.

All animals were closely monitored for the first few days of post-surgical recovery and all cats received periodical neurological testing using selected tests from the battery described previously²³. There were no complications and neurological evaluations indicated no remarkable deviations from previous reports²³.

Metabolic Rate Determinations: Measurements of ICMRGlc were obtained using the 2DG method of Sokoloff et al. (1977)²⁰. Animals were anesthetized with halothane gas (1%), the femoral triangle was surgically exposed, and the femoral artery and vein were cannulated with polyethylene tubing (PE50). After testing the catheters to assure patency, local anesthesia (xylocaine HCl) was topically applied to the wound to minimize discomfort, and the skin sutured closed. The animals were then restrained with a loose-fitting padded plaster cast from the lower thorax to the abdomen, and by securing the hind limbs to an aluminum splint. At least 3 hours were allowed for recovery from anesthesia. During this time, the body temperature was thermostatically controlled with a rectal probe and heating pad.

The 2DG (specific activity=50-55 mCi/mmol;; New England Nuclear Corp.), in the amount of 100 μ Ci/kg in 0.5-1.0 ml of normal saline, was administered over a 30-s period via the intravenous catheter. Timed arterial blood samples were drawn during the subsequent 45 min.

Blood samples were immediately centrifuged in a Beckman Microfuge B, and the plasma separated and stored on ice until further analysis. One arterial blood sample was used to analyze pH and blood gases (pO_2 , pCO_2) in order to insure a normal physiological state. The animals were monitored during the entire 45 min and their general behavior noted. If animals became drowsy (closing their eyes), they were awakened by a gentle tap to the nose. In order to insure a standardized and stable environment, the animals were otherwise not disturbed and noise in the laboratory was kept to a minimum.

At the end of the 45 min, the cat was killed with a intravenous overdose of pentobarbital, and the brain quickly removed and frozen in pulverized dry ice. The frozen brain was stored at -70°C , and subsequently coated with chilled embedding medium (Lipshaw) just prior to sectioning into $20\ \mu\text{m}$ coronal slices at -22°C in a cryostat (American Optical Cryo-Cut II). The sections were then autoradiographed together with calibrated [^{14}C]methylmethacrylate standards (Amersham). Adjacent sections were taken and stained with thionine to assist in identification of anatomical regions on the autoradiographs.

The arterial plasma samples were assayed for concentrations of 2DG, by liquid scintillation counting and glucose, by means of a glucose analyzer (Beckman). Optical densities of 50 selected brain structures were determined from the autoradiograms using a computer supported image analysis system (JAVA; Jandel Scientific). For each structure, at least 10 readings were taken and averaged into one value. The optical densities, the ^{14}C standard curve, the plasma glucose values, and the 2DG input function were used to calculate ICMRGlc in $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ using the operational equation of Sokoloff et al. (1977)²⁰.

Results

Histological Analysis: The results from both thionine stained sections indicated that the extent of the cerebral hemispherectomy was similar in the two age-at-lesion groups. Serial

reconstructions of the thionine stained sections indicated that in all cats the lesion represented an almost complete hemiteleniencephalotomy. There was no evidence of surgical damage to the dorsal thalamus. The most caudal tip of the lateral geniculate nucleus, being intercalated between the fascia dentata, was removed or damaged in all cats. There was no damage to the brain stem, including the superior colliculus, or the contralateral hemisphere. Further analysis of the lesions in the current study indicated that some telencephalic areas were spared on the left side including in all cats: olfactory bulb and tract, ventral aspect of the gyrus preceus, areas of the ventral brain surface medial to the olfactory bulb and sulcus rhinal anterior-posterior, ventral amygdala nuclei, ventral-most aspects of the head of the caudate nucleus, and small, variable, ventral portions of the claustrum and putamen. Dorsally, there were cortical remnants only in the midline, rostral to the genu of the corpus callosum, including variable portions of the gyri rectus and cinguli.

Measurements of Cerebral Glucose Metabolism: In general, cerebral hemispherectomy resulted in a marked depression of glucose metabolism in all regions measured for both age-at-lesion groups ($p < 0.05$). However, the main finding was that although metabolically depressed, the neonatal-lesioned brain exhibited a higher rate of cerebral glucose utilization (ICMRGlc; $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$) compared to adult-lesioned animals ($p < 0.05$). In addition, for both age groups the structures which were ipsilateral to the site of the cortical removal were more depressed than those within the contralateral hemisphere. Two major exceptions to this feature of a greater ipsilateral depression was the basal ganglia and cerebellar cortex. In both of these structures the depression of the glucose metabolism was more marked in the hemisphere contralateral to the lesion ($p < 0.05$).

The basal ganglia exhibited only a 4.6% (ICMRGlc=54.23) and a 21.8% (ICMRGlc=44.40) depression in the left (ipsilateral to the lesion) hemisphere for both neonatal- (NH) and adult-

lesioned (AH) animals respectively. However, the same structures in the contralateral (right) hemisphere showed a 31.4% (NH:ICMRGlc=38.98) and a 40.3% (AH:ICMRGlc=33.92) depression in metabolism for these respective groups. This same relationship was seen within the cerebellum, where the left (ipsilateral) cerebellar cortex (lateral lobe) exhibited only a 4.6% (NH:ICMRGlc=54.23) and a 21.8% (AH:ICMRGlc=44.40) depression in the left (ipsilateral) hemisphere for both neonatal and adult lesioned animals respectively. However, the contralateral (right) cerebellar cortex showed a 31.4% (NH:ICMRGlc=38.98) and a 40.3% (AH:ICMRGlc=33.12) depression for each respective group. As for the rest of the affected structures, both the basal ganglia and the cerebellum demonstrated a metabolic depression within the contralateral hemisphere which was always greater in the adult- as compared to the neonatal-lesioned animal.

In contrast to these metabolic differences between the two age-at-lesion groups, some structures, although exhibiting a clear depression of metabolic functioning compared to intact controls, was not affected by the age at which the lesion was conducted. These structures included the dentate nucleus of the cerebellum, the inferior colliculus and the ectosylvian gyrus of the right (intact) cerebral cortex.

Some of the more outstanding differences between the age-at-lesion groups involved the remaining intact cerebral cortex and the underlying thalamus (see Figure 1). For the cerebral cortex both the sensory-motor cortex (posterior sigmoid) and the primary visual cortex (area 17 & 18) exhibited a great deal of differentiation between the two age-at-lesion groups. For the posterior sigmoid, although the neonatal-lesioned animals exhibited a 25.7% reduction in ICMRGlc (49.23), the adult lesioned animals exhibited a 56.0% depression (ICMRGlc=29.11). The primary visual cortex demonstrated similar results with the degree of ICMRGlc in the neonatal and adult-lesioned animals reaching a 27.0% (ICMRGlc=81.65) and 45.9% (ICMRGlc=60.82) respectively.

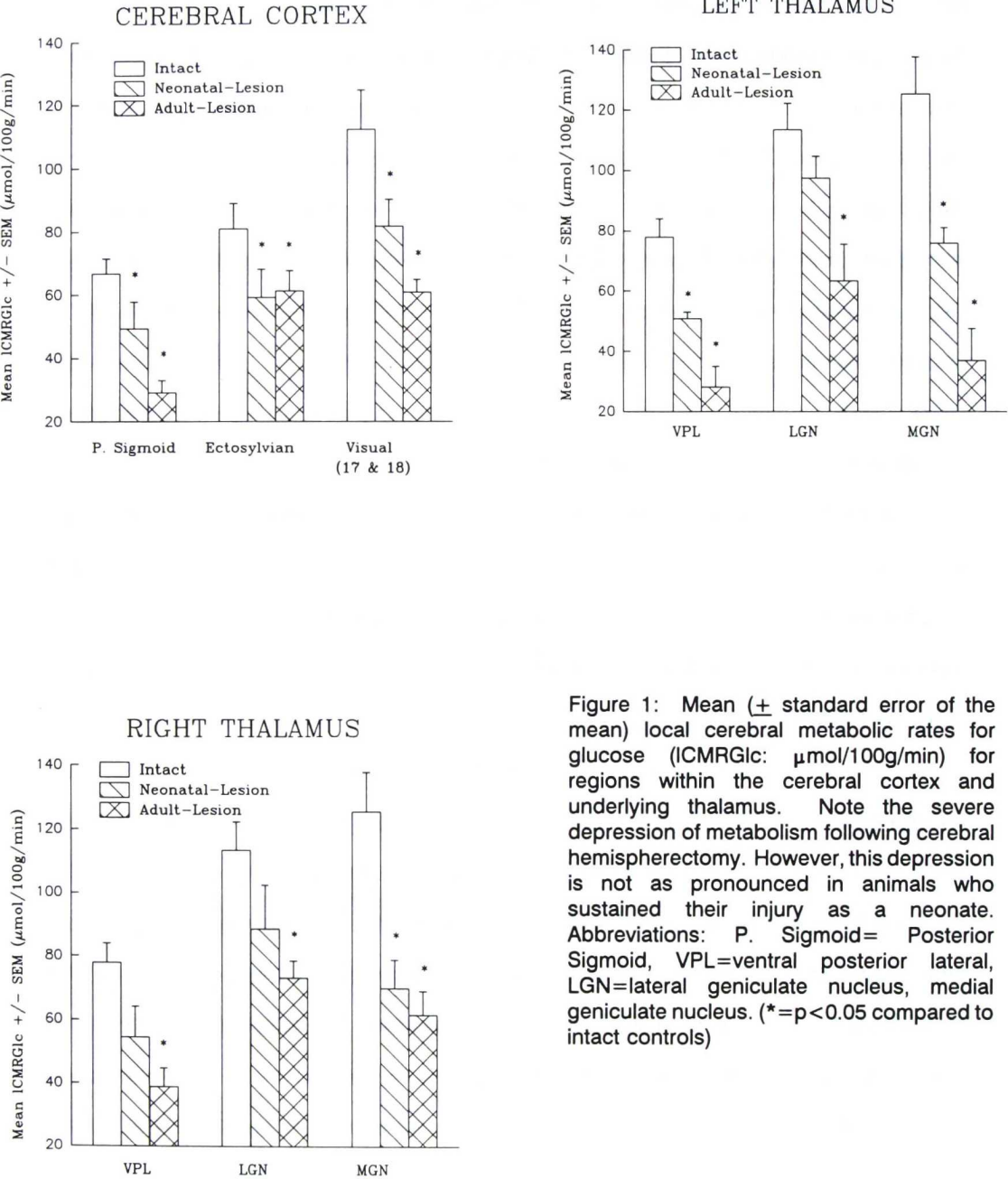


Figure 1: Mean (\pm standard error of the mean) local cerebral metabolic rates for glucose (ICMRGlc: $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$) for regions within the cerebral cortex and underlying thalamus. Note the severe depression of metabolism following cerebral hemispherectomy. However, this depression is not as pronounced in animals who sustained their injury as a neonate. Abbreviations: P. Sigmoid= Posterior Sigmoid, VPL=ventral posterior lateral, LGN=lateral geniculate nucleus, medial geniculate nucleus. (*= $p < 0.05$ compared to intact controls)

Within the thalamus, the difference between the age-at-lesion groups were primarily seen within the thalamus of the lesioned hemisphere (left). Although the contralateral (right) thalamus exhibited a pronounced depression of ICMRGlc for both lesioned groups, the degree of metabolic depression was quite similar. For the ipsilateral (left) thalamus the ventral posterior lateral (VPL) and medial geniculate (MGN) nuclei both exhibited a moderate degree of depression in the neonatal-lesioned animal (VPL=30.7%, MGN=40.0%). However, the adult-lesioned animals showed a severe depression of glucose metabolism representing a 63% (VPL: ICMRGlc=28.17) and a 70.5% (MGN: ICMRGlc=36.83) reduction of rates respectively.

Finally, the lateral geniculate nucleus (LGN), showed no statistically significant depression in either hemisphere of the neonatal hemispherectomized animals compared to intact controls. However, in the adult-lesioned cats, this nucleus was markedly depressed primarily within the LGN ipsilateral to the lesion. Compared to intact controls the left and right LGN of the adult-lesioned animals exhibited a 44.2% and 35.3% depression of metabolism reaching a mean ICMRGlc level of 63.33 and 73.10 respectively.

Discussion

The depression of glucose metabolism following damage and/or injury to the cerebral cortex has been reported previously by others^{3,4,7,8,13-15,27,28}. However, in the current model of cerebral hemispherectomy in the cat extensive knowledge regarding the degree and extent of anatomical and behavioral changes provide a unique opportunity to assess functional-structural relationships. For example, the metabolic differences within the two age-at-lesion groups most likely reflect the marked changes in anatomical reorganization^{5,6,11,24,25}. As was demonstrated in the current paper the sensory-motor and primary visual (areas 17 & 18) cortex exhibit a distinct

age-at-lesion effect with the greatest severity of metabolic depression occurring within the cerebral cortex of the adult-lesioned animals. Previous work has demonstrated that following hemispherectomy early in life the remaining undamaged sensory-motor cortex and primary visual cortex alters their descending projections to innervate subcortical structures bilaterally. Whereas the adult lesioned animals retain more of their normal unilateral projection. This lesion-induced bilateral descending projection suggests that in the young central nervous system the cerebral cortex maintains a significant degree of plasticity and supports the concept that, in the neonatal lesioned animal, the spared cerebral cortex develops the anatomical pathways to support functions which would normally have been lost following cerebral hemispherectomy.

The subcortical structures which receive the above mention new innervation also demonstrate less neuronal degeneration presumably because of this sustaining input. Specific examples of this lack of degeneration within the thalamus following neonatal cerebral hemispherectomy studied in the current study metabolically include the ventral posterior lateral nucleus (VPL), the medial geniculus nucleus (MGN) and the lateral geniculus nucleus (LGN). All of these thalamic nuclei exhibited extensive neuronal degeneration and gliosis following cerebral hemispherectomy. However, these anatomical changes are quite reduced in animals who sustain this surgical procedure early in life. Evidence has been presented that, particularly for the VPL, cell survival following neonatal cerebral hemispherectomy is most likely due to the new crossed cortical thalamic pathway exhibited in these animals. Taken together with the current metabolic finding, this suggests that these anatomical age-at-lesions differences within the thalamic nuclei play an important role the thier post-surgical metabolic vitality.

Finally, the general finding of the currently study regarding the basal ganglia and cerebellum compliments previous studies and adds to our understanding of how these structures react to a dysfunctional or damaged cerebral cortex. Furthermore, the metabolic results reported

in the current paper regarding the lateral lobe of the cerebellum supports the concept of a crossed cerebellar metabolic diaschisis following unilateral damage to the cerebral cortex.

These metabolic-lesion studies will contribute to our understanding of how the brain response to injury early in life. Given the direct relationship of this study to clinical positron emission tomography investigations the current results will have great implications with regards to how we treat a developing central nervous system which has been subjected to injury.

References

1 Burgess, J.W. and Villablanca, J.R., Recovery of function after neonatal or adult hemispherectomy in cats. II. Limb bias and development, paw usage, locomotion and rehabilitative effects of exercise, *Behav. Brain Res.*, 20 (1986) 1-18.

2 Burgess, J.W., Villablanca, J.R. and Levine, M.S., Recovery of functions after neonatal or adult hemispherectomy in cats. III. Complex functions: open field exploration, social interactions, maze and holeboard performances, *Behav. Brain Res.*, 20 (1986) 217-230.

3 Colle, L.M., Holmes, L.J. and Pappius, H.M., Correlation between behavioral status and cerebral glucose utilization in rats following freezing lesion, *Brain Res.*, 397 (1986) 27-36.

4 Feeney, D.M., Sutton, R.L., Boyeson, M.G., Hovda, D.A. and Dail, W.G., The locus coeruleus and cerebral metabolism: Recovery of function after cortical injury, *Physiol. Psych.*, 13 (1985) 197-203.

5 Fisher, R.S., Sutton, R.L., Hovda, D.A. and Villablanca, J.R., Corticorubral connections: Ultrastructural evidence for homotypical synaptic reinnervation after developmental

deafferentation, *J. Neurosci. Res.*, 21 (1988) 438-446.

6 Gomez-Pinilla, F., Villablanca, J.R., Sonnier, B.J. and Levine, M.S., Reorganization of pericruciate cortical projections to the spinal cord and dorsal column nuclei after neonatal or adult cerebral hemispherectomy in cats, *Brain Res.*, 385 (1986) 343-355.

7 Hovda, D.A., Becker, D.P. and Katayama, Y., Secondary injury and acidosis, *J. Neurotrauma*, 9 (Supp. 1) (1992) S47-S60.

8 Hovda, D.A., Sutton, R.L. and Feeney, D.M., Recovery of tactile placing after visual cortex ablation in cat: A behavioral and metabolic study of diaschisis, *Exp. Neurol.*, 97 (1987) 391-402.

9 Hovda, D.A. and Villablanca, J.R., Differential brain stem nuclei degeneration after neonatal or adult cerebral hemispherectomy in cats, *Anat. Rec.*, 214 (1986) 56A.(Abstract)

10 Hovda, D.A. and Villablanca, J.R., Quantitative study of neural degeneration following neonatal or adult cerebral hemispherectomy in cats. I. Retrograde effects in the medial geniculate thalamic nucleus, *Brain Dysfunct.*, 2 (1989) 221-236.

11 Hovda, D.A., Villablanca, J.R. and Adelson, P.D., Anatomical and metabolic corticotectal neuroplasticity after neonatal cerebral hemispherectomy: Correlations with visual field sparing, *Brain Dysfunct.*, 5 (1992) 3-26.

12 Mata, M., Fink, D.J., Gainer, H., Smith, C.B., Davidsen, L., Savaki, H., Schwartz, W.J. and

Sokoloff, L., Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflects sodium pump activity, *J. Neurochem.*, 34 (1980) 213-215.

13 Pappius, H.M., Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain, *Ann. Neurol.*, 9 (1981) 484-491.

14 Pappius, H.M., Dexamethasone and local cerebral glucose utilization in freeze-traumatized rat brain, *Ann. Neurol.*, 12 (1982) 157-162.

15 Pappius, H.M. and Wolfe, L.S., Effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral metabolism and blood flow in traumatized brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 3 (1983) 448-459.

16 Shinohara, M., Rapoport, S. and Sokoloff, L., Cerebral glucose utilization: Local changes during and after recovery from spreading cortical depression, *Science*, 203 (1979) 188-190.

17 Shook, B.L. and Villablanca, J.R., Differential degeneration of the cat's dorsal lateral geniculate after neonatal and adult cerebral hemispherectomy, *Soc. Neurosci.*, 12 (1986) 438.(Abstract)

18 Shook, B.L. and Villablanca, J.R., Quantitative cytoarchitectural analysis of cellular degeneration in the dorsal lateral geniculate nuclei of cats and kittens with cerebral hemispherectomy, *Exp. Neurol.*, 111 (1991) 80-94.

19 Sokoloff, L., Relationship among local functional activity, energy metabolism and blood flow in the central nervous system, *Fed. Proc.*, 40 (1981) 2311-2316.

20 Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinohara, M., The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat, *J. Neurochem.*, 28 (1977) 897-916.

21 Sutton, R.L. and Villablanca, J.R., Reorganization of cortical projections to the nucleus of Darkschewitsch in cats with neonatal or adult cerebral hemispherectomy, *Brain Dysfunct.*, 3 (1990) 58-71.

22 Villablanca, J.R., Burgess, J.W. and Benedetti, F., There is less thalamic degeneration in neonatal-lesioned than in adult-lesioned cats after cerebral hemispherectomy, *Brain Res.*, 368 (1986) 211-225.

23 Villablanca, J.R., Burgess, J.W. and Olmstead, C.E., Recovery of function after neonatal or adult hemispherectomy in cats: I. Time course, movement, posture and sensorimotor tests, *Behav. Brain Res.*, 19 (1986) 205-226.

24 Villablanca, J.R. and Gomez-Pinilla, F., Novel crossed corticothalamic projections after neonatal cerebral hemispherectomy. A quantitative autoradiography study in cats, *Brain Res.*, 410 (1987) 219-231.

25 Villablanca, J.R., Gomez-Pinilla, F., Sonnier, B.J. and Hovda, D.A., Bilateral pericruciate cortical innervation of the red nucleus in cats with adult or neonatal cerebral hemispherectomy, *Brain*

Res., 453 (1988) 17-31.

26 Villablanca, J.R. and Hovda, D.A., Quantitative study of neural degeneration following neonatal or adult cerebral hemispherectomy in cats. II Transsynaptic effects in the superior colliculus and mammillary nuclei, *Brain Dysfunct.*, 2 (1989) 237-254.

27 Yoshino, A., Hovda, D.A., Katayama, Y., Kawamata, T. and Becker, D.P., Hippocampal CA3 lesion prevents post-concussive metabolic dysfunction in CA1, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 12 (1992) 996-1006.

28 Yoshino, A., Hovda, D.A., Kawamata, T., Katayama, Y. and Becker, D.P., Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral concussion in rats: Evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state, *Brain Res.*, 561 (1991) 106-119.

3.3. CORTICAL TRANSPLANTS AND THEIR TROPHIC
MOLECULES RESCUE DAMAGED NEURONS AND
ENHANCE BEHAVIORAL RECOVERY

Forrest A. HAUN
Dept. Anatomy & Neurobiology
Medical College of Pennsylvania
Philadelphia

**CORTICAL TRANSPLANTS AND THEIR TROPHIC MOLECULES RESCUE
DAMAGED NEURONS AND ENHANCE BEHAVIORAL RECOVERY**

Damage to the posterior cortex in neonates and adults of many species leads to degeneration of neurons that connect with the area of damage, even though these neurons may be a considerable distance away from the site of direct injury. We have been using transplants of embryonic cortex cells placed into the site of direct damage to rescue those distant neurons that would otherwise die. The transplants produce neurotrophic molecules that also rescue the same neurons, when the molecules themselves are infused into the cortical site of damage instead of the transplants. In neonatal rats with complete removal of posterior cortex, both cortex cell transplants and a fraction of culture medium conditioned by these cells rescue neurons in both the dorsal lateral geniculate nucleus of the thalamus, and in the frontal cortex. There is also a behavioral improvement in these animals, they have an increased ability to learn difficult visual pattern discriminations. In adult animals with smaller lesions of the posterior cortex, a fraction of culture medium from cultures of posterior and anterior cortex cells also rescues degenerating neurons in the frontal cortex, and improves the animals' ability to attend to visual patterns contralateral to the side of the damage. These results point to a rational approach for discovering neurotrophic molecules that have therapeutic value: retrieve these factors from tissues that comprise the anatomical pathways responsible for the behaviors of interest. Delivering these system-derived molecules to the damaged pathway may then increase neuron survival and functioning in that pathway.

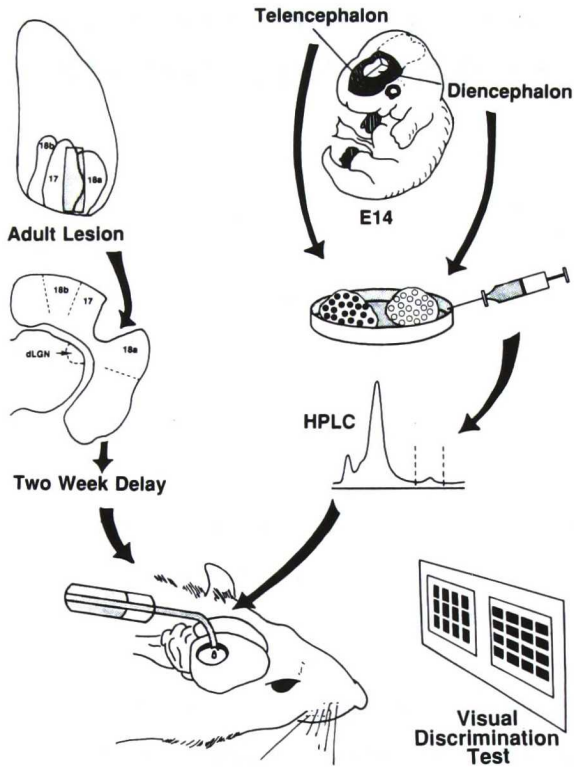


Figure 1. Schematic drawing of one experiment testing the behavioral effects of neurotrophic molecules. In an adult rat, a lesion is made in the lateral part of visual cortex (shaded area, left). This lesion, in cortical areas 17 and 18a, results in the death of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN). Two weeks after the lesion a fraction of culture medium is delivered into the lesion site and the animal is tested on several visual discriminations. The fraction of culture medium is derived from embryonic telencephalon and diencephalon, which are dissected from a rat embryo on the 14th day of gestation (E14, right). The dissected pieces are placed in culture for several days, then the culture medium "conditioned" by the presence of these pieces is withdrawn, and a particular molecular weight fraction is separated by high-pressure liquid chromatography (HPLC). This particular fraction (indicated by the dotted lines on the HPLC graph) has previously been shown to keep dLGN neurons alive *in vitro*. This fraction is delivered into the visual cortex lesion site by an implanted pump.

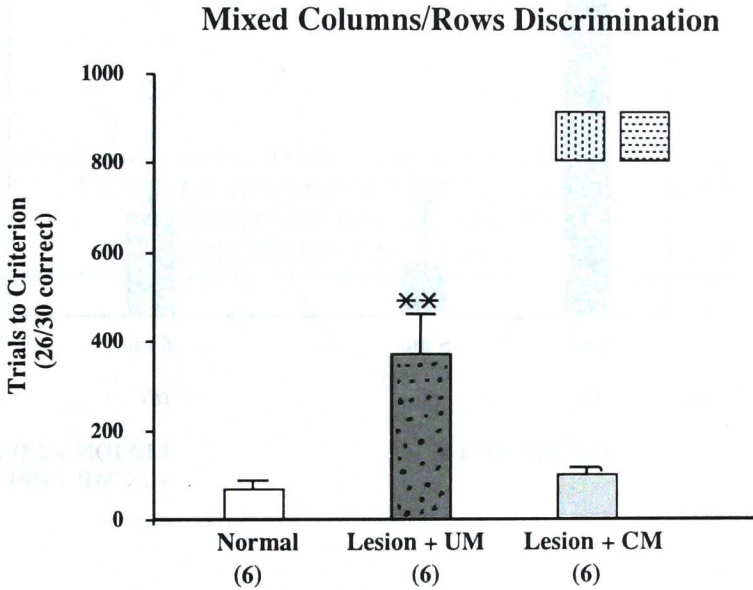


Figure 2. Two months after receiving the conditioned medium fraction described in Figure 1, the animals are tested on several visual discriminations in order of increasing difficulty. The most difficult of these tasks requires the animal to distinguish between columns of squares and rows of squares. The squares are either black on a white background or white on a black background ("mixed"; an example of the black-on-white patterns is shown in Figure 1). Animals with the visual cortex lesion shown in Figure 1, and receiving regular un-conditioned culture medium (UM) into the lesion site, take almost 7 times as many trials to learn this visual discrimination as do normal animals. However animals with the same lesion but receiving the fraction of conditioned medium (CM) described in Figure 1, learn this visual discrimination as readily as normals. (** = $p < .01$; 6 animals in each condition).

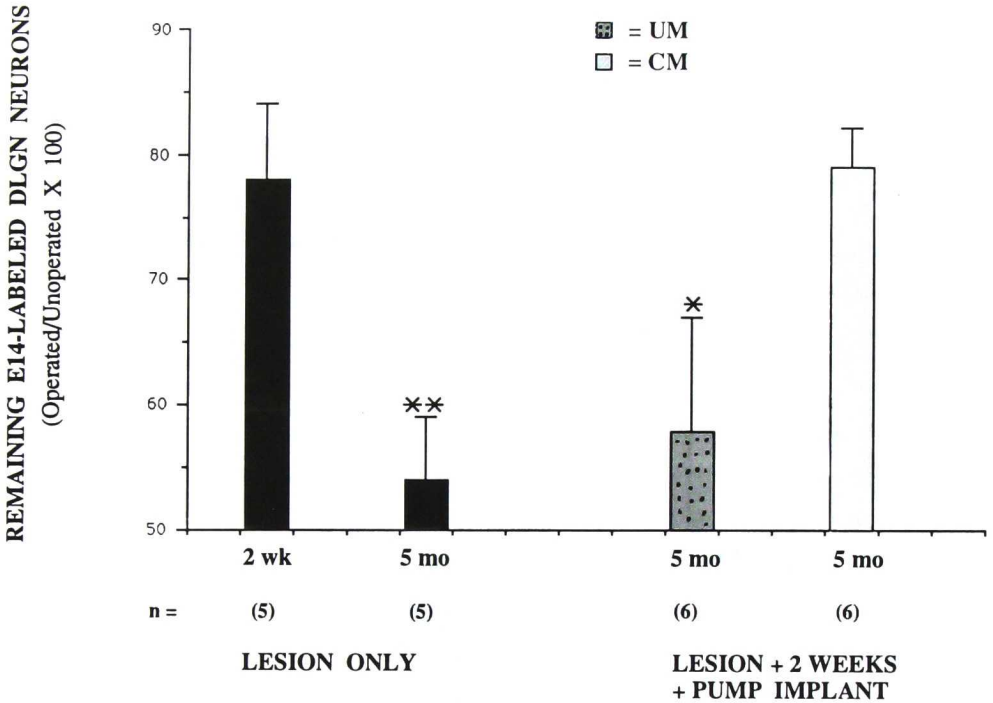


Figure 3. After the animals are finished behavior testing, the numbers of neurons in their dorsal lateral geniculate nucleus (DLGN) are counted. (These neurons were labeled with a radioactive tag when the animals were still in utero, on the 14th day of gestation.) Animals receiving just the visual cortex lesion show a 20-25% loss of these neurons by two weeks after the lesion, and a 45% loss by 5 months following the lesion. When the unconditioned culture medium (UM) is delivered into the injury site through an implanted pump, it is ineffective at halting the death of the DLGN neurons that die between two weeks post-lesion and five months post-lesion. However the fraction of conditioned medium (CM) completely prevents any further neuron death when it is delivered into the injury site beginning two weeks after the lesion. Thus the fraction of CM derived from the embryo (Figure 1) improves visual discrimination ability (Figure 2) and rescues DLGN neurons that would otherwise die after a visual cortex lesion. Moreover the CM fraction was delivered for only a two-week period (the capacity of the pump), yet still was able to result in chronic rescue of these neurons, as well as produce a chronic behavioral improvement. (** = $p < .01$; * = $p < .05$; the number of animals in each condition (n) is shown.)

3.4. CELLS AND MOLECULES THAT FORM
BOUNDARIES DURING BRAIN
DEVELOPMENT AND INJURY

Dennis J. STEINDLER
Dept. Anatomy & Neurbiology
College of Medicine
University of Tennessee
Memphis

Many studies over the years have hypothesized that there may be common programs for brain development and reorganization following injury. Even though there is, for the most part, failed regeneration in the mammalian brain following trauma during adulthood, only recently have experimental neuroanatomical studies revealed the re-expression of developmentally-regulated molecules in the injured adult brain.

Our laboratory has utilized the characteristic structure and function of the primary somatosensory cerebral cortical "vibrissae barrel field" of rodents as a template in which to examine the roles of particular macromolecules during brain pattern formation and plasticity. Boundaries have been discovered, composed of distinct astroglia and glycosylated molecules that they synthesize and release into the extracellular matrix (ECM), around these cortical whisker barrels during a critical period in their development (see Figure 1A). ECM molecules may have important roles during brain development in the establishment of appropriate cytoarchitecture and synaptic connectivity. One astrocyte molecule in particular, a glycoprotein of the ECM referred to as "tenascin", has been shown to be developmentally regulated within these boundaries while barrels are forming, and it disappears when development is complete. Boundary expression seems to depend on the presence of ingrowing afferent axons and activity during the critical period of the first postnatal week, and lesioning studies have shown a plasticity in the expression of this molecule that coincides with reorganization of cortical barrels following peripheral whisker lesions. Lesions within the developing cortex itself has shown that these molecules may be involved in wound repair and plasticity that is more pronounced in the young versus adult brain. The presence or absence of tenascin may have important implications for the sequelae of CNS injury. We chose to examine the effects of cerebral cortical lesions on tenascin expression in the adult. Even though the function of the molecule during development and in adult brain wounds is still uncertain, it may act in association with other glycoconjugates to modulate neuritic patterning by either inhibiting or facilitating growth.

Stab wounds of the adult mouse cerebral cortex result in an enhanced expression of

tenascin in areas and amounts considerably in excess of unlesioned brain. This finding was demonstrated most consistently using *in situ* hybridization with an mRNA probe to mouse tenascin. It is our impression that, immunocytochemically (see Fig. 1B), the protein sometimes exhibited variable levels of expression across cases. It is important to use both *in situ* hybridization and immunocytochemical approaches whenever one makes penetrating lesions of the brain, because cellular sources of novel molecular expressions are difficult to resolve with immunocytochemistry alone; fibroblasts have been reported to produce tenascin, and these and other cells such as vascular-derived macrophages or endothelial cells that may or may not express tenascin could have infiltrated the lesion site. Tenascin up-regulation in the lesioned adult cerebral cortex can be attributed to a discrete population of GFAP-positive astrocytes around the wound site. Lesion-associated astrocytes may recapitulate the differentiation sequences of biochemical changes seen during development, or they may possibly de-differentiate or divide in response to lesion-associated events such as the release of substances from injured cells, growth factors and mitogens (e.g. PDGF; cytokines (e.g. interleukin 1), and other vascular or macrophage-derived molecules.

Thus, in the injured adult cerebral cortex of rodents, following small stab wounds, immunocytochemistry and *in situ* hybridization studies looking at the tenascin glycoprotein and mRNA have shown an upregulation that is strictly correlated with the wound site. That is, following trauma in the adult brain, particular astrocyte-derived, developmentally-regulated, glycoproteins are re-expressed in close proximity to the site of injury. They do not seem to be upregulated in any other areas.

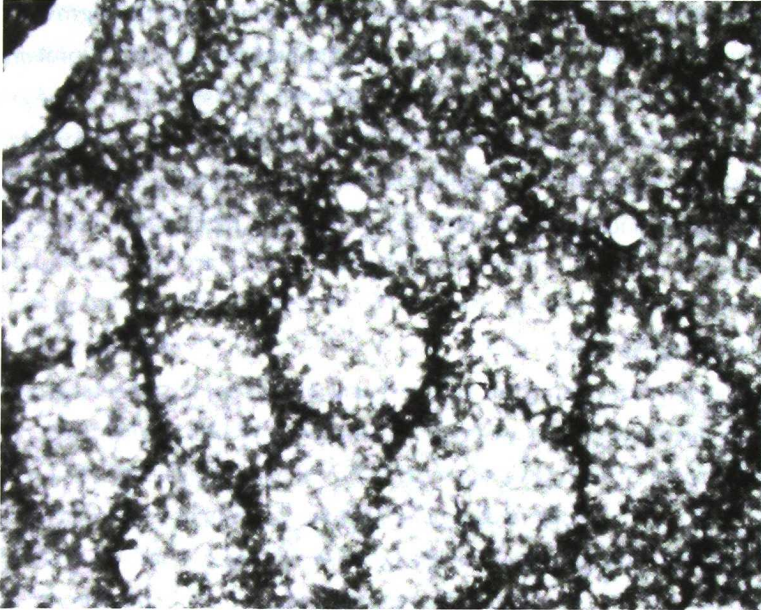
It is interesting that tenascin reappears or is upregulated in both central and peripheral nervous system responses to injury; however, there are some interesting differences between the injured adult CNS and both the injured adult PNS and the developing CNS in terms of the nature of tenascin expression. While our results have not warranted quantification, it is clear that there is a strikingly small amount of tenascin immunoreactivity in the lesioned adult cortex compared to both the developing brain and the lesioned adult sciatic nerve where the molecule persists until the transected nerve has regenerated.

The discrete localization of tenascin-expressing astrocytes in adult brain wounds, compared with a widespread distribution of boundary astrocytes during development, suggests that components of the glial scar may be related to a class of astrocytes involved in

global brain pattern formation events. Tenascin and tenascin-binding glycoconjugates, including certain proteoglycans, may act together to affect neurite patterning during development and to influence, through yet undefined mechanisms, the regrowth of neurites in adult brain wounds. In all, these results suggest that putative "inhibitory" proteins expressed by astrocytes during brain development, that may function to spatially confine growing neurites to particular functional patterns, may be re-expressed at the site of injury in the adult brain to possibly block neurite- regenerative attempts. Studies are underway that attempt antibody-blocking of such inhibitory proteins to encourage regeneration in the injured adult brain.

Figure 1

A. Tenascin immunostaining in the developing mouse cerebral cortex shows boundaries around developing whisker barrels.



B. Tenascin immunostaining in the adult mouse cerebral cortex, following a small stab wound, shows upregulation of the glycoprotein in a discrete layer around the lesion site.



**4. METABOLOPATIAS CONGENITAS.
DETECCION Y PREVENCION**

4.1. ERRORES CONGENITOS DEL METABOLISMO:
DEL FENOTIPO AL GENOTIPO

Magdalena UGARTE
Centro de Diagnóstico de Enfermedades
Moleculares
Dpto. Biología Molecular
Universidad Autónoma
Madrid

INTRODUCCION

Los Errores Congénitos del Metabolismo (ECM), son trastornos bioquímicos de origen genético debidos a un defecto específico en la estructura o función de las moléculas de proteínas. La investigación sobre alteraciones congénitas del metabolismo ha proporcionado uno de los mejores ejemplos de como el desarrollo de la Bioquímica y la Biología Molecular han hecho posible el descubrimiento de la base genética y molecular de muchas enfermedades.

El origen de los ECM es siempre una modificación en la estructura del ácido desoxirribonucléico (DNA) que codifica la síntesis de una molecula protéica. La mayoría de las mutaciones que modifican la estructura del DNA, no afectan sustancialmente a la estructura espacial de las proteínas que codifican. Pero cuando la mutación incide sobre algunos aminoácidos que ocupan en la secuencia un lugar clave para mantener la estructura activa de la proteína, puede disminuirse, e incluso anularse la capacidad funcional de la misma. Si la mutación o cualquier otro tipo de alteración de la molecula de DNA es de suficiente

entidad como para desequilibrar el conjunto, ese nuevo genotipo, es el que producirá una alteración del fenotipo y se manifestará la enfermedad.

La severidad de la afección es muy variable y dependerá de varios factores, fundamentalmente, del grado de incapacidad de la nueva proteína sintetizada, de la importancia metabólica de la vía afectada y de la existencia o no de vías alternativas.

Los avances recientes en las técnicas de DNA recombinante ha supuesto la posibilidad de estudiar estas enfermedades a nivel molecular y en muchas de ellas, se puede saber ya que tipo de mutación o mutaciones son las responsables de un ECM determinado, lo que es de gran importancia para su aplicación tanto al diagnóstico genético directo como para la terapia génica.

El primer programa para la detección precoz de ECM en España -Fenilcetonuria y otras aminoacidopatías tratables- lo iniciamos en Granada en 1968. Posteriormente, como consecuencia de la aplicación del Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad se dotaron los centros necesarios para la recogida de muestras y análisis de todos los recién nacidos del país.

La finalidad de nuestro grupo, como se exponía en la Memoria del trabajo que obtuvo el Premio Reina Sofía de Investigación en su primera convocatoria en 1982, era por una parte la detección precoz de aquellas metabolopatías para las que se podía aplicar un tratamiento preventivo y por otra, la investigación de nuevas enfermedades y de su etiología molecular con el mismo objetivo de prevención.

A lo largo de estos diez años nuestra investigación se ha centrado principalmente, en los siguientes aspectos de los ECM: 1) Caracterización de nuevas aminoacidopatías y acidemias orgánicas a nivel metabólico, enzimático y de localización de la proteína deficiente; 2) Estudio de las bases moleculares de la deficiencia en Biotina, como modelo para investigar la neuropatología en la Deficiencia Múltiple en Carboxilasas; y 3) Genética Molecular de Fenilcetonuria.

A continuación se resumen los trabajos realizados en cada uno de los apartados descritos.

1. CARACTERIZACION DE NUEVAS AMINOACIDOPATIAS Y ACIDEMIAS ORGANICAS

En la tabla 1 se detallan las aminoacidopatías y defectos de transporte diagnosticadas en los diez últimos años, en comparación con el periodo anterior. En la tabla 2, se relacionan las acidemias orgánicas estudiadas en ambos periodos. Como se observa, el número de nuevas enfermedades descritas ha aumentado considerablemente, y en especial en lo que se refiere a las

TABLA 1

AMINOACIDOPATIAS Y ALTERACIONES DE TRANSPORTE

	Período (1974-1982)	Período (1982-1992)
Nº niños estudiados	7194	4000
AMINOACIDOPATIAS		
ALCAPTONURIA	5	2
DEF. CICLO DE LA UREA:		
Def. CPS	--	1
Def. OTC	1	--
Portadores OTC	2	1
Citrulinemia	--	5
Arginin succínico aciduria	--	1
HIPERFENILALANINEMIA:		
PKU	33	10
HFA (no PKU)	--	3
Def. DHPR	--	1
Def. PTS	--	1
HIPERGLICINEMIA NO CETOSICA	4	8
HIPERGLICINURIA	3	--
HIPERLISINEMIA	--	1
HIPERMETIONINEMIA	--	2
HOMOCISTINURIA	--	12
TIROSINEMIA:		
Tipo I (hepatorenal)	3	18
Hawkinsinuria	--	4
JARABE DE ARCE	9	13
ALTERACIONES DE TRANSPORTE		
CISTINOSIS	4	4
CISTINURIA-LISINURIA	1	--
CISTINURIA	14	25
PORTADORES CISTINURIA	--	7
IMINOGLICINURIA FAMILIAR	--	4
ENFERMEDAD DE HARTNUP	1	--
SIND. DE FANCONI	2	--
Total casos diagnosticados	82	123

TABLA 2

ACIDEMIAS ORGANICAS

	Período (1974-1982)	Período (1982-1992)
Nº niños estudiados	7194	4000
ACIDURIA ORGANICA INESPECIFICA	2	--
ACIDURIA DICARBOXILICA	--	5
Def. MCADH	--	3
Def. LCHADH	--	4
ACIDURIA 3-OH-3-METIL GLUTARICA	--	5
ACIDURIA GLUTARICA	--	3
ACIDEMIA ISOVALERICA	--	2
ACIDOSIS LACTICA:	6	12
Def. PC	1	3
Def. PDH	1	3
Def. oxidación piruvato	--	3
Def. COX	--	1
Def. fructosa 1,6 difosfatasa	--	1
ACIDEMIA METILMALONICA	7	8
ACIDEMIA METILMALONICA+HOMOCISTINURIA	--	4
ACIDEMIA PROPIONICA	5	17
DEF. BIOTINIDASA	--	2
DEF. β -CETOTIOLASA	--	3
DEF. SUCCINIL CoA TRANSFERASA	--	1
HIPEROXALURIA TIPO I	--	6
TIPO II (A. L-Glicérica)	--	2
Total casos diagnósticados	22	88

acidemias orgánicas. Sin embargo, el número total de muestras a la que se refiere este estudio ha disminuido casi a la mitad, lo que demuestra una mejor selección por parte de los especialistas clínicos en la sospecha de un ECM. Los casos estudiados provienen de los servicios de Pediatría de todos los hospitales de España. El seguimiento bioquímico del tratamiento de los casos diagnosticados se ha realizado igualmente, en nuestro grupo del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Universidad Autónoma de Madrid.

2. BASES MOLECULARES DE LA DEFICIENCIA EN BIOTINA

Como aproximación experimental al estudio de las bases moleculares de la deficiencia en biotina en sistema nervioso, se ha caracterizado y utilizado el cultivo primario de astrocitos de rata. Se ha estudiado el perfil de desarrollo de las carboxilasas mitocondriales en astrocitos cultivados en relación con el tejido nervioso "in vivo". El crecimiento de los astrocitos en medio con avidina, permite generar un estado de deficiencia en biotina sin alterar el crecimiento y desarrollo del cultivo. Las carboxilasas mitocondriales reducen su actividad hasta el 15%. Asociado a esta reducción de las actividades - no de las apoproteínas como se demuestra por electroforesis en geles de poliacrilamida - se observa una excreción aumentada de 3-HIVA, metabolito característico de la deficiencia múltiple en carboxilasas. La deficiencia en biotina provoca una reducción en los niveles de glutamato, glutamina y, en menor medida, de aspartato y arginina intracelulares, posiblemente como resultado de una disminución en el flujo metabólico a través del ciclo de Krebs. Concordante con estos datos, estas células presentan unos niveles de ATP disminuidos.

3. GENÉTICA MOLECULAR DE FENILCETONURIA

La Fenilcetonuria (PKU; Mckusick 26160) es una enfermedad genética humana de transmisión autosómica recesiva, debido a un defecto en la proteína hepática Fenilalanina Hidroxilasa (PAH). En los últimos años, la PAH ha sido clonada y mapeada en el cromosoma 12, en la banda q22-q24. El gen completo tiene una longitud de 90 Kb y está compuesto de 13 exones. El cDNA de la PAH está siendo utilizado para estudiar la heterogeneidad en el locus citado.

Nuestro grupo, ha caracterizado más de 100 casos de PKU. Se ha podido determinar el fenotipo en la mayoría de estos pacientes, de acuerdo con los parámetros establecidos. Se observa una clara prevalencia de la forma suave de la enfermedad (57%) frente a la forma clásica o severa (16%). Las hiperfenilalaninemias ligeras, también por deficiencia en PAH, pero que no requieren tratamiento, representan el 27%.

Se ha iniciado el estudio de los haplotipos y mutaciones que se asocian al gen mutante en la población española. La distribución de haplotipos encontrada, muestra una gran dispersión, siendo los más frecuentes el 1 (34%), el 6 (18%) y el 9 (10%).

Hemos identificado las mutaciones IVS10, I65T, P281L, E280K, y Y414C, previamente descritas en otras poblaciones. Recientemente, hemos encontrado, por secuenciación del DNA genómico de uno de los pacientes PKU y su familia, una nueva mutación en el exon 7 del gen, que origina una sustitución de un aminoácido Prolina por una Leucina en el codón 244 (P244L). Mediante los estudios de transfección y expresión en curso, podremos conocer en que medida la nueva mutación afecta a la proteína PAH y a su actividad catalítica.

Las frecuencias obtenidas hasta ahora en la población española estudiada son las siguientes: IVS10 (20.3%) asociada al haplotipo 6; I65T (11.6%) asociada al haplotipo 9; P281L (4.6%) y E280K (4.6%) asociadas al haplotipo 1; Y414C (1.5%) asociada al haplotipo 4, y la descrita por primera vez, la P244L (1.5%), asociada al haplotipo 12 (Tabla 3). En general, la distribución de haplotipos y mutaciones es similar a la de otros países mediterráneos y difiere claramente de la del centro y norte de Europa.

Nuestro objetivo final es estudiar la correlación entre los diferentes fenotipos y genotipos, de importancia en poblaciones de gran heterogeneidad molecular como la española y al parecer con una proporción grande de mutaciones diferentes a las descritas hasta el momento en el resto de la población caucásica. Conocer la expresión real de cada una de las mutaciones y la de los diferentes compuestos genéticos que encontremos, servirá, sin duda, de orientación para la aplicación de una terapia más adecuada a cada individuo y para un mejor asesoramiento genético.

Por último mencionar, que la investigación de las bases moleculares de las enfermedades genéticas, están haciendo avanzar con mayor celeridad de la esperada, los protocolos experimentales de sustitución del gen mutado por el normal, lo que significará, en un futuro, la curación definitiva de las enfermedades genéticas.

TABLA 3

Mutación	Exon/ intron	Haplotipo	Frecuencia (%)	Población
I65T	E1	9	11.6	Canadá (Quebec)
P244L	E7	12	1.5	España
L249F	E7	1	0	Portugal
R252W	E7	1	0	Francia, Italia
R261Q	E7	1	0	Francia
E280K	E7	38,4,1	4.6	Francia, Argelia
P281L	E7	1,4	4.6	Italia
IVS10	I10	6	20.3	Mediterráneo
R408W	E12	2	0	Dinamarca
IVS12	I12	3	0	Dinamarca
Y414C	E12	4	1.5	Dinamarca

PUBLICACIONES (1982-1992)

Libros

M. Ugarte. Grupo Español para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo. "Neonatal Screening Programme for Aminoacids Disorders and Congenital Hypothyroidism in Spain". En Neonatal Screening. Excerpta Medica, 1982.

M. Ugarte. "Detección, Prevención e Investigación de la Etiología Molecular del Retraso Mental de Metabolopatías Congénitas". Premio Reina Sofia 1982. Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, 1983.

M. Ugarte. "Patología Molecular de los errores congénitos del metabolismo". En La lucha contra la enfermedad. Lilly Ind. España, 1985.

M. Ugarte. "Prevención de la Subnormalidad (Metabolopatías)". Libro Expociencia. Ministerio de Educación y Ciencia, 1985.

B. Merinero, M.J. Garcia, J.A. Del Valle y M. Ugarte. "Diagnóstico diferencial de Acidosis Láctica Congénita (ACL)". En Biología Perinatal. Sociedad Española de Bioquímica, 1985.

M. Ugarte. "Tratamiento de los errores congénitos del metabolismo de aminoácidos". En Sustrato Proteico. Jarpyo Ed, 1986.

M. Ugarte y F. Valdivieso. "Patología Enzimática". En Recientes Progresos en la Etiología del Cancer y Patología Molecular. Fundación Ramón Areces, 1989.

G. Morales, J.M. Requena, A. Jimenez, M.J. Garcia, M.C. López, M. Ugarte y C. Alonso. "Fenilcetonuria. Análisis molecular y de haplotipos del gen de la Fenilalanina Hidroxilasa en familias fenilcetonúricas". En Fenilalaninemias. Mead Johnson, 1989.

M.J. Garcia, B. Merinero, C. Pérez-Cerdá y M. Ugarte. "Diagnóstico neonatal de errores congénitos del metabolismo". En Aspectos moleculares en las patologías metabólico-genéticas. Ed. Ceura, 1990.

Artículos

"Dietary treatment and biochemical studies on a neonatal case of propionyl-CoA carboxylase deficiency". J.A. del Valle, B. Merinero, A. Jiménez, M.J. Garcia y M. Ugarte. J. Inher. Metab. Dis. (1982) 5:121-124.

"Biochemical findings in a patient with neonatal methylmalonic acidemia". J.A. del Valle, B. Merinero, M.J. Garcia, R. Gracia, A. Peralta y M. Ugarte. J. Inher. Metab. Dis. (1982) 5:53-54.

"Inhibition by valproic acid of pyruvate uptake by brain mitochondria". J. Benavides, A. Martín, M. Ugarte y F. Valdivieso. Biochem. Pharmacol. (1982) 31(2):1633-1636.

"Tratamiento combinado de exanguino-transfusión y diálisis peritoneal en un caso neonatal de acidemia metilmalónica con hiperamonemia severa". P. Sanjurjo, C. Jaquotot, A. Vallo, R. Uriarte, J.M. Prats, M. Ugarte y J. Rodriguez Soriano. Anales de Pediatría (1982) 7(4):317-320.

"Banco de fibroblastos humanos para el estudio de aminoacidopatías y acidemias orgánicas". J.A. del Valle, B. Merinero, C. Pérez-Cerdá y M. Ugarte. Revista Española de Fisiología (1982) 38:207-210.

"Patología Molecular de las Hiperglicinemias". J. Benavides y M. Ugarte. Revista Española de Fisiología (1982) 38:199-206.

"Inhibición por dipropilacetato y análogos estructurales del sistema glicina sintasa en mitocondrias de hígado y de cerebro". A. Martín, J. Benavides y M. Ugarte. Revista Española de Fisiología (1982) 38:59-62.

"Hiperamonemia neonatal por deficiencia en la actividad ornitina transcarbamilasa". J.A. del Valle, A. Urbón, M.J. Garcia, P. Cuadrado y M. Ugarte. Anales Españoles de Pediatría (1982) 16:416-420.

"Estudio de tres pacientes con la enfermedad de "Jarabe de Arce"". B. Merinero, J.A. del Valle, M.J. Garcia, M. Miguel, M.J. Barrio, J. Hortelano, J. Aparicio, E. Saez, M. Martínez-Pardo y M. Ugarte. An. Esp. Pediatr. (1983) 19:393-400.

"Acidemia propiónica de presentación neonatal. Evolución en los dos primeros años". M. Martínez-Pardo, F. Barrio, C. Ludeña, R. del Olmo, I. Onsurbe, M.S. Martín Romero, C. Pérez-Cerdá, J.A. del Valle, B. Merinero, F. Román, M.J. García y M. Ugarte. Nutrición Hospitalaria, (1983) 3:29-37.

"A new patient with dicarboxylic aciduria suggestive of medium-chain acylCoA dehydrogenase deficiency presenting as Reye's-like syndrome". J.A. del Valle, B. Merinero, C. Pérez-Cerdá, F. Román, A. Jiménez, M. Ugarte, M. Martínez Pardo, C. Ludeña, C. Camarero, R. del Olmo, M. Duran y S.K. Wadman. *J. Inher. Metab. Dis.* (1984) 7:62-64.

"Programa español de detección precoz de errores congénitos del metabolismo". M. Ugarte. *Boletín de Estudios y Documentación de Servicios Sociales* (1984) 14:17-26.

"Atypical nonketotic hyperglycinemia with a defective glycine transport system in nervous tissue". F. Mayor Jr., A. Martín, P. Rodríguez, M.J. García, J. Benavides y M. Ugarte. *Neurochem. Pathology* (1984) 2:233-249.

"Maple syrup disease variant form: Presentation with psychomotor retardation and CT scan abnormalities" A. Verdú, J. López-Herce, I. Castroviejo, A. Martínez-Bermejo, M. Ugarte & M.J. García. *Acta Paediat. Scand.* (1985) 74:815-818.

"Effects of dipropylacetate on the glycine cleavage enzyme system and glycine levels: A possible experimental approach to non-ketotic hyperglycinemia". A. Martín, P. Rodríguez, M. López, J. Benavides & M. Ugarte. *Biochemical Pharmacology* (1985) 34(16):2877-2882.

"Results of neonatal and selective screening for biotinidase deficiency". C. Pérez-Cerdá, P. Martínez, B. Merinero, P. Rodríguez Pombo, F. Román, M.J. García, M. Martínez-Pardo & M. Ugarte. *J. Inher. Metab. Dis.* (1987) 10(2):296-298.

" β -Ketothiolase deficiency: two siblings with different clinical conditions". B. Merinero, C. Pérez-Cerdá, M.J. García, S. Carrasco, R. Lama, M. Ugarte & B. Middleton. *J. Inher. Metab. Dis.* (1987) 10(2):276-278.

"Diagnóstico diferencial de hiperfenilalaninemias". M.J. García. *J. Belloque, P. Sanz, A. Jiménez y M. Ugarte. Química Clínica* (1987) 6(2):74.

"Diagnóstico y seguimiento de las hiperfenilalaninemias". M.J. García. *J. Belloque, P. Sanz, A. Jiménez, M. Martínez-Pardo y M. Ugarte. Química Clínica* (1988) 7(4):230.

"Acidosis láctica congénita debida a deficiencia aislada de piruvato carboxilasa". B. Merinero Cortés, J.A. del Valle Martínez, C. Pérez-Cerdá Silvestre, M.J. García Muñoz, M.T. Cortés Coto, J. García Aparicio, E. Saez Pérez y M. Ugarte Pérez. *An. Esp. Pediatr.* (1988) 29:57-60.

"Análisis molecular de la fenilcetonuria en España: polimorfismo y haplotipos". G. Morales, M.C. López, M.J. García, C. Alonso y M. Ugarte. *Rev. Soc. Esp. Quim. Clin.* (1988) 7:230.

"Successful first trimester diagnosis in a pregnancy at risk for propionic acidemia". C. Pérez-Cerdá, B. Merinero, P. Sanz, A. Jiménez, M.J. García, A. Urbón, J. Díaz Recasens, C. Ramos, C. Ayuso & M. Ugarte. *J. Inher. Metab. Dis.* (1989) 12(2):274-276.

"Non-ketotic hyperglycinemia: Glycine/serine ratio in amniotic fluid. An unreliable method for prenatal diagnosis". M.J. García, J. Belloque, B. Merinero, C. Perez-Cerdá, P. Sanz & M. Ugarte. *Prenatal Diagnosis*, (1989) 9:473-476.

"Sequence and expression of phenilalanine hidroxilase mRNA". G. Morales, J.M. Requena, A. Jiménez-Ruiz, M.C. López, M. Ugarte y C. Alonso. *Gene*, (1990) 93:213-219.

"Mutations in medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency" I.Yokota, K. Tanaka, P.M. Coates and M. Ugarte. *Lancet*, (1990) 336, 8717,748.

"Detección neonatal y prevención de metabolopatías". M. Ugarte. *Infancia y Sociedad*, (1991) 11, 33-46.

"Biotin transport in primary culture of astrocytes: Effect of biotin deficiency". P. Rodriguez-Pombo and M. Ugarte. *Journal of Neurochemistry*, (1992) 58, 1460-1463.

"Primary cultures of astrocytes from rat as a model for biotin deficiency". P. Rodriguez-Pombo. L. Sweetman and M. Ugarte. *Molecular and Chemical Neuropathology*, (1992) 16, 33-44.

"Investigation of enzyme defects in children with lactic acidosis". B. Merinero, C. Pérez-Cerdá and M. Ugarte. *J. Inher. Metab. Dis.* (1992) 15, 696-706.

"A new case of Succinyl CoA: Acetoacetate deficiency". C. Pérez-Cerdá, B. Merinero, P. Sanz, A. Jimenez, C. Hernandez, M.J. García and M. Ugarte. *J. Inher. Metab. Dis.* (1992) 15, 371-373.

"Mutation analysis of phenylketonuria in Spain, prevalence of two Mediterranean mutations". B. Pérez, L.R. Desviat, M. Die and M. Ugarte. *Human Genetics*, (1992) 89, 341-342.

"A new PKU mutation associated with haplotype 12" Lourdes R. Desviat, Belén Pérez and Magdalena Ugarte. *Human Molecular Genetics* (1992) 1, 9, 765-766.

"Prevención de los errores congénitos del metabolismo". M. Ugarte. En *Curso de Prevención de Deficiencias. Documentos 33/92.* pp 195-213, (1992). Ed. Real Patronato de Prevención y Atención a Personas con Minusvalía .

"Errores congénitos del metabolismo". M. Ugarte. *Acta Pediátrica Española.* (1993), 50:501-505.

"First report of prenatal diagnosis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in a pregnancy at risk". C. Pérez-Cerdá, B. Merinero, A. Jimenez, M.J. Garcia, L. LJ1st, R. J. A. Wanders and M. Ugarte. Prenatal Dignosis (1993). En prensa.

"Phenylketonuria in Spain: RLFP Haplotypes and Linked mutations". Lourdes R. Desviat, Belén Pérez and Magdalena Ugarte. Human Genetics. (1993) En prensa.

**4.2. TRATAMIENTO Y EVOLUCION DE LOS ERRORES
CONGENITOS DEL METABOLISMO**

Mercedes MARTINEZ PARDO
Servicio de Pediatría
Hospital Ramón y Cajal
Madrid

En el desarrollo, en los últimos diez años, del Programa de Prevención en Madrid, hemos detectado los siguientes casos:

HIPERFENILALANINEMIAS: 87 casos.

HIPERTIROSINEMIAS: 4 casos

JARABES DE ARCE: 4 casos

HOMOCISTINURIAS: 11 casos

ACIDEMIAS ORGANICAS: 18 casos

CICLOS DE LA UREA : 5 casos

También hemos detectado un conjunto de enfermos que venían diagnosticados de "Enfermedad Metabólica" y que posteriormente hemos demostrado que se trataba de una enfermedad mental de la madre, siendo etiquetados como MÚNCHAUSEN BY PROXY. Este Síndrome lo nombro en este trabajo, por ser causa de 5 fallecimientos en los 11 casos detectados. Se trata de una enfermedad mental, habitualmente materna, en la cual la madre "envenena" al niño para poder acudir al Hospital con el niño y así sentirse protegida. Al efectuar el estudio metabólico, detectamos el "veneno" utilizado (diacepán, fenobarbital, col men, etc...). El tratamiento a seguir es exclusivamente psiquiátrico en la madre.

Volviendo de nuevo al tema que nos ocupa en esta charla, voy a desarrollar mi experiencia en el tratamiento y control de los casos referidos anteriormente.

HIPERFENILALANINEMIAS

Cuando en el screening detectamos un caso con fenilalanina en sangre mayor de 3 mg%, ingresa durante 24 horas en el Hospital para efectuar recogida de muestras de orina congelada sin luz, sangre en papel y sangre líquida, que remitimos al Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, dirigido por la Dra Ugarte. Allí se estudian: niveles de fenilalaninemia en suero, actividad dihidrobiopterin reductasa en papel, ácidos orgánicos, aminoácidos y pterinas en la orina. Del estudio conjunto de todo ello etiquetamos al niño como:

1.-Deficiencia en fenilalanina hidroxilasa, caracterizados por la siguiente analítica: fenilalaninemia superior a 3 mg%, actividad dihidrobiopterin reductasa normal en eritrocitos, y estudio de pterinas según método de Niederweiser 1982 en el área correspondiente a deficiencia de Fenilalanina hidroxilasa. En estos enfermos el tratamiento es ALIMENTACION LIMITADA EN FENILALANINA SI LOS NIVELES DE ESTA EN SANGRE SON SUPERIORES A 10 mg%.

2.-Deficiencia de Tetrahydrobiopterinsintetasa: se caracterizan por la siguiente analítica, fenilalaninemia muy variable desde 4 a 50 mg%, ácidos orgánicos en orina dependiendo de los niveles de fenilalanina en sangre, ausencia de eliminación de BIOPTERINAS en orina y lo que es más importante, con sobrecarga oral de tetrahydrobiopterina la fenilalaninemia disminuye hasta valores normales. En estos enfermos el tratamiento es ALIMENTACION NORMAL Y MEDICACION CON TETRAHIDROBIOPTERINA Y NEUROTRANSMISORES.

3.-Deficiencia de Ciclohrolasa: analíticamente son iguales a la deficiencia de tetrahydrobiopterinsintetasa pero en el estudio de pterinas no encontramos ni biopterinas ni neopterinas. El tratamiento es igual que en el caso anterior.

4.-Deficiencia de Dihydrobiopterin reductasa: la actividad de este enzima está muy disminuida en eritrocitos (muestra de sangre en papel). El tratamiento en estos enfermos es similar al de los grupos 2 y 3 anteriores.

Una vez diagnosticado el niño, comenzamos el tratamiento adecuado para cada caso.

1. Deficiencias en fenilalanina hidroxilasa: de los 87 hiperfenilalaninemicos detectados, corresponden 85. En este grupo de enfermos hemos observado diferencias importantes en cuanto a tolerancia a la fenilalanina y así hemos diferenciado tres grandes grupos de tolerancia:

GRUPO I : aquellos que toleran a lo largo de su vida un aporte máximo de fenilalanina de 350 mg/24 horas, equivalente a un máximo aporte de proteínas naturales de 7 gr/24 horas. Este grupo de enfermos los denominamos Fenilcetonuria Clásica.

De los 85 detectados como hiperfenilalaninemia, corresponden a 20 niños.

GRUPO II: aquellos que toleran entre 400 y 800 mg de fenilalanina/24 horas, equivalentes a un aporte de proteínas naturales entre 8-16 gr/24 horas sin que su fenilalaninemia sobrepase los 10 mg%. Los denominamos Fenilcetonuria de tolerancia media y corresponden a 40 niños de los 85 detectados.

GRUPO III: aquellos que toleran una alimentación rigurosamente normal, que no precisan de dieta limitada en fenilalanina ya que sus niveles de fenilalaninemia son siempre menores de 10 mg%, coman lo que coman. A este grupo los denominamos Hiperfenilalaninemias y corresponden a 25 casos de los 85 detectados.

Tratamiento de las Deficiencias de la Fenilalanina

Hidroxilasa: es exclusivamente dietético en los Grupos de tolerancia I y II. Limitamos ingesta de fenilalanina; para ello limitamos aporte de proteínas naturales en cantidad suficiente para mantener niveles de fenilalanina en sangre menores de 10 mg%, el resto de proteínas, hasta un total de 2-3 gr/kg/día lo damos en forma de preparado especial exento de fenilalanina, pero que contenga todos los aminoácidos esenciales, así como oligoelementos y vitaminas. El aporte de Kcal es el normal, indicado por ESPGAN, para cada edad.

La dieta más restringida en alimentos naturales corresponde a los Fenilcetonúricos del Grupo I. Estas dietas las elaboramos teniendo en cuenta el contenido proteico de cada alimento: así 100 cc de leche natural contienen 3,5 gr de proteínas (175 mg de fenilalanina), 100 gr de verduras y patata contienen 1 gr de proteínas naturales (50 mg de fenilalanina), 10 gr de chorizo, salchichón, embutido etc... contienen 2 gr de proteínas (100 mg de fenilalanina) etc... por lo que Uds pueden lógicamente pensar que las dietas son terriblemente restringidas. Desde hace unos años, el mercado de alimentos especiales se ha ido desarrollando y en el momento actual tenemos, leche, pasta, arroz, yogoures, harinas, cremas especiales de bajo contenido en proteínas; todo ello junto con alimentos naturales de bajo contenido proteico (frutas y verduras), constituyen la base alimenticia de estos niños.

Evolución de las deficiencias en Fenilalanina Hidroxilasa

a.-Desarrollo estaturoponderal: todos los niños que pertenecen a los grupos I y II se desarrollan dentro de los límites normales en las curvas de peso y talla.

b.-Desarrollo psicomotor: 1.-Fenilcetonúricos tratados en el 1º mes de la vida, que pertenezcan a los grupos I y II de tolerancia, tienen CI superior a 95 todos ellos excepto un caso que tiene un CI de 76. Dentro de estos niños hay 14 con CI superior a 120. 2.-Fenilcetonúricos de los grupos I y II de tolerancia tratados a partir del 1º año de la vida: hay dos casos, uno de ellos tiene actualmente con 16 años un CI de 50 el otro caso comenzamos con CI de 45 y actualmente a los 8 años tiene un CI de 80. 3.-Fenilcetonúricos de los grupos de tolerancia I y II que han comenzado la dieta a los 3,5 años: tenemos asimismo 2 casos, uno de ellos comenzó con CI de 35 y actualmente a los 5 años tiene un CI de 60, el otro caso comenzó con CI de 50 y la última valoración a los 11 años fue de 83.

En líneas generales el tratamiento dietético de los grupos I y II de tolerancia a la fenilalanina es extraordinariamente efectivo.

En los enfermos pertenecientes al grupo III el desarrollo estaturoponderal y psicomotor es rigurosamente normal, con alimentación normal.

2.-Deficiencia de Tetrahydrobiopterinsintetasa: de las 87 hiperfenilalaninemias detectadas, 2 casos han sido debidos a la deficiencia de la tetrahydrobiopterinsintetasa. Ambos niños han seguido un tratamiento con alimentación rigurosamente normal y tratamiento médico con: Tetrahydrobiopterina a 15 mg/kg/día, repartida en 6 dosis/día junto con neurotransmisores L-DOPA a dosis de 8-14 mg/kg/día y 5-OH triptófano 5-8 mg/kg/día ambos repartidos asimismo en 6 dosis/día. La evolución del desarrollo estaturoponderal es en ambos casos inferior al percentil 3 y el desarrollo psicomotor ha ido normalizándose paulatinamente.

No tenemos experiencia de tratamiento en las deficiencias de Ciclohidrolasa ni de dihydrobiopterinreductasa.

HIPERTIROSINEMIAS

Se han detectado 4 casos: uno de ellos fué una tirosinemia hepatorenal tipo I que falleció al 1º año de vida, negándose los padres al trasplante hepático. En este tipo de tirosinemia el tratamiento dietético, limitando fenilalanina y tirosina, sólo es coadyuvante y preparatorio para el trasplante hepático que se efectúa cuando el niño pesa 10 kg.

Dos casos han sido hawkinsinurias (deficiencia en dioxigenasa) y hasta la actualidad llevan dieta limitada en fenilalanina y tirosina con aporte máximo de proteínas de 1,8 gr/kg/día suficiente para mantener niveles de tirosina en sangre de 3-5 mg% y dando un suplemento de preparado especial con aminoácidos esenciales exento de fenilalanina y tirosina. La evolución de ambos casos ha sido excelente tanto desde el punto de vista estaturoponderal como de desarrollo psicomotor.

El cuarto caso con hipertirosinemia fué una hepatitis congénita de Células Gigantes.

JARABES DE ARCE

Hemos detectado 4 Jarabes de Arce, dos de presentación neonatal con actividad decarboxilasa menor del 5% y dos en su forma de presentación intermedia con actividad decarboxilasa del 10%. Todos ellos han seguido tratamiento dietético limitando ingesta de aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina), los de presentación neonatal con tolerancia a proteínas naturales entre 0,5 y 0,9 gr/kg/día y los Intermedios con tolerancia a proteínas naturales entre 1,8-2 gr/kg/día. En todos los casos se les dio un preparado comercial con aminoácidos esenciales exentos de ramificados hasta un total aporte proteico de 3,5 gr/kg/día.

La evolución estaturoponderal y psicomotora en los intermedios ha sido rigurosamente normal. En los casos de presentación neonatal, uno de ellos falleció a los 13 meses por

sepsis(pertenecía a un nivel social muy bajo) y el otro niño a los 14 meses tiene un desarrollo estaturponderal en percentil 50 y un desarrollo psicomotor con hipotonía central y retraso en la mielinización en la resonancia magnética nuclear.

ACIDEMIAS ORGANICAS

Hemos detectado 18 casos de acidemias orgánicas:5 propiónicas, dos metilmalónicas por mutasa 0,2 casos de 3-OH-metilglutárico aciduria,4 casos de aciduria glutárica tipo I,2 casos de acidosis láctica por deficiencia de piruvato carboxilasa,y 3 casos de alteración en la betaoxidación de acidos grasos que debutaron como Síndrome de Reye.

De las 5 propiónicas viven 3 en buenas condiciones tanto de desarrollo estatur ponderal como psicomotor con alimentación limitada en 4 aminoácidos esenciales(metionina,treonina,valina e isoleucina)y aporte de L-carnitina a 200-250 mg/Kg/día.Dos propiónicoacidemias fallecieron a la edad de 4 meses y 13 meses por complicaciones cardiacas y neurológicas.

De las dos metilmalónicoacidemias,1 falleció creemos que por decisión de la madre y la otra vive sin problemas con alimentación dada por sonda nasogástrica igual que para las propiónicoacidemias.

De las demás acidemias orgánicas el pronóstico es peor.Las glutárico tipo I a pesar del tratamiento con dieta limitada en lisina y triptófano,aporte de L-carnitina y estimuladores del GABA la evolución neurológica es catastrófica y apenas se recuperan.Lo mismo ocurre con las acidemias lácticas por deficiencia de la piruvato carboxilasa.De las acidemias organicas por alteracion de la betaoxidación de ácidos grasos las que evolucionan mejor son las debidas a la deficiencia en la acil-Co A deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media sensibles a la riboflavina ya que con aporte de ésta última a dosis farmacológicas de 300 mg/día están normales.Las debidas a la deficiencia de 3-OH-acildeshidrogenasa de ac.grasos de cadena larga evolucionan desfavorablemente ya que muchos de ellos presentan cardiomiopatía por depósito de grasas mitocondriales.

CICLOS DE LA UREA

Hemos diagnosticado 3 heterocigotes hembras de deficiencia en OTC que han seguido alimentación limitada en proteínas con aporte de 1 gr prot naturales /kg/día y aminoácidos esenciales de 0,7 gr/kg/día. En estos casos es fundamental dar arginina a dosis de 0,2 gr/kg/día. La evolución en los 3 casos ha sido buena. Una de las niñas estando normal, a los 15 años, falleció por hepatitis a citomegalovirus que descompensó por completo la hiperamonemia. Asimismo hemos diagnosticado dos casos de citrulinemia con excelente evolución clínica y neurológica con alimentación limitada en proteínas a 1,8 gr/Kg/día y arginina a 0,7 gr/kg/día.

HOMOCISTINURIAS

De los 11 casos detectados la evolución ha sido muy heterogénea por lo que no podemos sacar conclusiones concretas.

Para concluir podemos decir que la detección de enfermedades metabólicas es imprescindible en un país moderno, no sólo para detectar familias de alto riesgo, sino para tratar dichas enfermedades, ya que si no se tratan, conducen al niño bien a la muerte o bien a un retraso psicomotor grave y retraso mental severo. Si por el contrario se tratan, el enfermo se convierte en una persona sana, que en el futuro, es capaz de hacer revertir su estado de salud sobre el país que le ha puesto medios suficientes para desarrollarse normalmente.

4.3. SITUACION ACTUAL DE LOS PROGRAMAS DE
DETECCION NEONATAL EN ESPAÑA

Antonio MAYA
Instituto de Bioquímica Clínica
Cerdanyola del Vallés

En primer lugar, quiero agradecer al Real Patronato y a la Dra. Ugarte el haberme invitado como ponente en estas jornadas y saludar a todos los participantes de esta mesa redonda.

La situación actual de los programas de detección precoz neonatal en nuestro país va a ser desarrollada desde dos puntos de vista: el de los profesionales que realmente trabajamos en estos programas, a los cuales represento como Presidente de la Comisión de Errores Metabólicos Congénitos de la S.E.Q.C., y el de nuestras autoridades sanitarias, a través de la encuesta realizada por la Dirección General de Planificación Sanitaria, de cuyos resultados hemos tenido conocimiento hace escasas semanas.

Los inicios de los programas de detección precoz neonatal en nuestro país se debieron a algunos investigadores cuya inquietud propició el desarrollo de estos programas. Cronológicamente, comienzan en el año 1968 en la ciudad de Granada, por el Prof. F. Mayor Zaragoza y la Dra. M. Ugarte Pérez, que pusieron en marcha el primer programa. Posteriormente, en 1969, Barcelona, por los Dres. J. Sabater Tobella y A. Maya Victoria; en 1973, Madrid, de nuevo por el Prof. F. Mayor Zaragoza y la Dra. M. Ugarte Pérez; en 1975, Murcia, por el Dr. J.A. Lozano Teruel; en 1978, Santiago de Compostela, por el Dr. J. Peña Guitián. En los años siguientes, se completa el mapa nacional hasta un total de 21 centros de detección diferentes.

Estas iniciativas, que hoy día nos permiten tener una cobertura efectiva de la población española, fueron impulsadas por la existencia de algunas instituciones, entre las que debe destacarse el Real Patronato de Educación Especial. Los diversos hechos institucionales acontecidos han configurado la evolución en la gestión de los programas a nivel nacional, destacando entre ellos:

1974: Constitución del Patronato para Ayuda a Subnormales.

1976: El Real Patronato de Educación Especial elabora y confecciona un Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad (PNPS).

1977: Se aprueba el PNPS.

1978: El Real Decreto 2176/1978 encomienda la gestión del PNPS al Ministerio de Sanidad y Consumo.

1978: Se transfieren competencias a las Comunidades Autónomas.

1982: El PNPS deja de existir como plan, contemplándose sus acciones en un conjunto de conceptos presupuestarios en Salud Pública, transferidos a las Comunidades Autónomas e Insalud, como Programa Individual.

1990: Se aprueba el Programa Integrado de Salud Materno Infantil en el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud.

Es evidente que esta sucesión de cambios institucionales dio lugar a confusión, ya que algunos programas se hallaban funcionando con anterioridad y durante el desarrollo del PNPS, bajo unas directrices de organización establecidas y elaboradas por los grupos de trabajo constituídos por el Real Patronato.

En los primeros años de haberse transferido los programas de detección precoz neonatal a las CCAA, los profesionales que nos hallábamos trabajando en este campo, notamos la ausencia de acciones coordinadas en los aspectos tecnológicos entre los diferentes programas nacionales. La reacción ante ello fue la de agruparnos en el seno de una sociedad científica, y así nació en el año 1986 la Comisión de Errores Metabólicos de la S.E.Q.C., que integra a todos los profesionales de los Centros de Detección nacionales.

Los objetivos de la misma desde su fundación son:

1. Mejorar la calidad y unificar criterios en los programas de detección.
2. Mantener la unión y comunicación profesional entre todos los centros nacionales.

Las acciones a destacar en su desarrollo:

- a. Intercambiar experiencias entre los centros.
- b. Evaluar métodos analíticos e instrumentos.
- c. Promover el control de calidad nacional.
- d. Establecer los criterios de detección de los casos positivos.
- e. Elaboración y estadística de resultados conjuntos.
- f. Realizar comunicaciones y publicaciones.
- g. Establecer recomendaciones a nivel nacional.
- h. Aumentar el rendimiento de los programas.
- i. Registro de los casos detectados.

Desde el punto de vista de esta Comisión, la situación actual de estos programas que cubren la geografía nacional se refleja de forma resumida a continuación.

El número de centros en el año 1992 es de 21 y se hallan localizados en las siguientes ciudades:

Alicante	Málaga	Santiago
Badajoz	Murcia	Sevilla (2)
Barcelona	Palma de Mallorca	Toledo
Bilbao	Pamplona	Valencia
Granada	Oviedo	Valladolid
La Laguna	Santander	Zaragoza (2)
Madrid		

Los datos analíticos correspondientes a 1991 se relacionan en base al número de nacimientos del último año conocido, año 1990 (INE provisionales), representando un avance importante frente a cualquier otra encuesta nacional, quedando reflejados en la siguiente tabla:

DETECCIONES	ANALIZADOS	CASOS POSIT.	INCIDENCIA
FENILCETONURIA	385.972	22	1/17.544
HIPERFENILALANINEMIAS	385.972	36	1/10.721
HIPOTIROIDISMO	390.030	158	1/ 2.468

Aunque existe una diferenciación diagnóstica entre los casos de fenilcetonuria e hiperfenilalaninemias, ambas deben tratarse conjuntamente como casos positivos de anomalías del metabolismo de la fenilalanina, significando una incidencia de 1/6654, ciertamente importante.

Con respecto a la cobertura, en los últimos años se ha conseguido alcanzar unos porcentajes muy altos, siendo posible que el del año 1991 sea ligeramente superior al indicado, por ser provisional el número de nacimientos conocido y dada la tendencia a su disminución en los últimos años.

AÑO	COBERTURA
1981 *	30
1985 *	79 - 86
1989 *	94
1991 **	97 - 98

* Ministerio de Sanidad y Consumo

** Comisión de Errores metabólicos de la S.E.Q.C.

Estos porcentajes alcanzados representan el esfuerzo de muchos profesionales a quienes hay que reconocer públicamente su dedicación por el éxito alcanzado en estos programas de prevención. Por ello les alentamos a mantener esta cobertura y procurar elevarla para acercarnos al máximo teórico del 100%, ciertamente inalcanzable en la práctica.

Desde el punto de vista de nuestras autoridades sanitarias, la situación actual de estos programas se refleja en una encuesta llevada a cabo por la Dirección General de Planificación Sanitaria elaborada y remitida a las Comunidades Autónomas en el mes de noviembre de 1990. La fecha de cierre fue en mayo de 1991 y la de sus resultados en el presente año 1992, refiriéndose la información recogida a los datos de 1989 englobando a todos las Comunidades Autónomas, excepto Baleares y La Rioja.

Antes de continuar con la exposición de sus diferentes apartados, cabe manifestar que se trata de un documento válido sólo desde el punto de vista conceptual, ya que el contenido del mismo es erróneo en cuanto a los datos aportados y, sobre todo, porque algunas de sus propuestas finales son inaceptables.

En el apartado 1, se describen los trastornos metabólicos investigados: fenilcetonuria e hipotiroidismo congénito en todas las Autonomías; otros trastornos: tirosinemia, jarabe de arce, galactosemia, cistinuria, iminoglicinuria, hiperglicinemia no cetósica, déficit de biotinidasa, hiperplasia adrenal congénita, organicoacidurias, hiperfenilalaninemias y todas las aminoacidopatías, investigados parcialmente en las Comunidades de Cantabria, Castilla-León, Extremadura, Galicia y Murcia.

Cabe comentar en este apartado: 1º) Las detecciones de la fenilcetonuria y del hipotiroidismo congénito son las únicas que comprendía el PNPS, como base para la dotación presupuestaria correspondiente, realizándose las demás adicionalmente; 2º) No se especifica en la encuesta si las detecciones adicionales se realizan como

"screening" neonatal o como de alto riesgo; 3º) Otras Comunidades Autónomas no citadas en la encuesta realizan estas detecciones adicionales; 4º) Se incluye la hiperfenilalaninemia entre las adicionales, cuando debe detectarse con el "screening" de la fenilcetonuria.

En el apartado 2, se citan las Comunidades Autónomas que realizan las pruebas de detección, no citándose Murcia, ni las excluidas en la encuesta: La Rioja y Baleares.

En el apartado 3, se describen las técnicas utilizadas en las Comunidades Autónomas para la detección de fenilcetonuria (fenilalanina por cromatografía, inhibición bacteriana, fluorimetría o combinaciones entre anteriores) e hipotiroidismo (tirotropina y tiroxina).

La mayoría de las Comunidades Autónomas realizan la cromatografía para la detección de fenilcetonuria. Todas determinan tirotropina (TSH) para la detección del hipotiroidismo y además, Asturias, Cantabria, Murcia, Navarra y Valencia determinan tiroxina (T₄). La información es errónea al interpretarse que las Comunidades Autónomas citadas practican ambas determinaciones para la detección, cuando en realidad determinan la T₄ sólo cuando los valores de TSH son elevados, además, no sólo las Comunidades Autónomas citadas realizan la comprobación, sino todas.

En el apartado 4.1 se citan las diferentes coberturas por Comunidades Autónomas, que no coinciden con las aportadas por los propios centros, abundando en exceso la cifra del 99.9%, no alcanzada en el año 1989 por algunos programas.

En el apartado 4.2 se citan las diferentes coberturas de otros trastornos metabólicos que se hallan fuera de contexto por las consideraciones descritas anteriormente en el apartado 1.

En el apartado 4.3 se citan los costes de cada prueba por Comunidades Autónomas, oscilando entre un mínimo de 141 Ptas. para el País Vasco y 1.250 Ptas.- para Asturias. es evidente que esta gran diferencia pueda ser motivada por los diferentes recursos humanos, metodológicos o instrumentales disponibles, pero también pueda ser debida a haber valorado, bien sólo el coste de reactivos, bien el coste global, aspectos no definidos en la encuesta. Por tanto, no deben tenerse en cuenta estas cifras, ni tan sólo considerarse un valor promedio.

En el apartado 5 se muestra el intervalo de tiempo en las distintas fases del programa, siendo la media entre las fechas de nacimiento-recepción de 10 días, la recepción-resultado de 4-5 días y la de nacimiento-tratamiento en los casos positivos, de 18 días.

En el apartado 6 se muestran los casos detectados por los programas y sus frecuencias. Los datos no son coincidentes con los aportados por nuestra Comisión, en parte por excluirse las Comunidades de Baleares y La Rioja de la encuesta y, en parte, por serias deficiencias de información. Coincidimos en los 13 casos de fenilcetonuria, pero no en los casos de hiperfenilalaninemia, 2 en la encuesta frente a los 27 reportados por nuestra Comisión. La frecuencia de la fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia para la encuesta es de 0.3 y 0.14/mil (se advierte la falta de un cero), frente a 0.035 y 0.073/mil de la Comisión.

Para el hipotiroidismo, los casos y frecuencias tampoco son coincidentes, siendo de 118 casos y 3.3/mil (se advierte de nuevo la falta de un cero) y de 130 casos y 0.34/mil, respectivamente.

En el mismo apartado se proporciona el coste por niño detectado, que queda invalidado por lo expuesto en el punto 4.3, contemplándose además un coste por hiperfenilalaninemia detectada, cuando ésta se realiza con el mismo coste de la detección de la fenilcetonuria.

En el apartado 7 se indica que todas las Comunidades Autónomas hacen el seguimiento clínico, a excepción de Cantabria, Castilla-León y Murcia, afirmación incorrecta, ya que lo llevan a cabo en unidades pediátricas propias o concertadas.

Finalmente, los autores de la encuesta elaboran unas propuestas, considerando válidas y deseables las siguientes:

1. Conseguir la cobertura de todos los recién nacidos.
2. Hacer la toma de muestras accesible a la población objeto del programa.
3. Incrementar el seguimiento clínico y del desarrollo psicomotor de los casos detectados, valorando los resultados de esta actividad.
4. Contactar con las asociaciones de padres de niños afectados y controlar que no haya ningún caso detectado sin seguimiento.

En cambio, rebatimos el contenido de otras propuestas:

- Abogar por una descentralización de la recogida de muestras sin aumentar el número de laboratorios. Mejorada la cobertura, plantear la necesidad de realizar una sola toma entre el 5º y el 14º día de vida.
- Entretanto, mejor realizar una primera toma en el centro de nacimiento para asegurar tener hecha la muestra de hipotiroidismo, mucho más frecuente que la fenilcetonuria.

Se afirma además textualmente:

- a) La primera toma se hace en el hospital maternal generalmente antes del 4º día de vida.
- b) Antes del 4º día, la muestra no es válida para detectar la fenilcetonuria.
- c) Hay que hacer la segunda toma unos días más tarde (entre el 5º y el 14º) para detectar la fenilcetonuria.

Estos puntos que los consideramos inaceptables, demuestran un amplio desconocimiento de la realidad de los programas de detección precoz neonatal y pueden

contestarse del siguiente modo:

- . No es cierto que la muestra antes del 4º día no sea válida para detectar la fenilcetonuria.
- . No debe realizarse una segunda toma sin justificación, y menos aún planificar un programa de detección con esta base.
- . No debe esperarse hasta el 14º día para la toma de muestras y posterior detección de la fenilcetonuria.
- . No puede admitirse la proposición de hacer una primera toma para asegurar la detección del hipotiroidismo por su mayor frecuencia, y posponer la de la fenilcetonuria, máxime cuando los medios necesarios para hacerla conjunta se hallan disponibles.

Concluimos nuestra exposición sobre la situación de los programas de detección actualmente funcionando en nuestro país, manifestando la existencia de una problemática centrada en una falta de estrategias y coordinación, ya que no es suficiente alcanzar unas coberturas elevadas, sino que hemos de dirigir nuestros esfuerzos a unificar y mejorar el rendimiento de estos programas.

4.4. RESULTADOS DEL PROGRAMA MEXICANO DE
TAMIZ NEONATAL PARA HIPOTIROIDISMO
CONGENITO Y FENILCETONURIA

Antonio VELAZQUEZ y otros
Unidad de Genética de la Nutrición
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma
México

RESULTADOS DEL PROGRAMA MEXICANO DE TAMIZ NEONATAL PARA HIPOTIROIDISMO CONGENITO Y FENILCETONURIA

Título abreviado: Tamiz neonatal para hipotiroidismo y fenilcetonuria

Antonio Velázquez^{1,2,5}, Antonio Loera Luna², Blanca Estela Aguirre², Salvador
Gamboa², Humberto Vargas³, Jaime Laguna³ y Carlos Robles⁴

Con la participación técnica de las Q.F.B. Edna García Cruz, Pilar García Tapia, Martha
Elva Pérez Andrade, y Araceli Urióstegui Toscano³

¹ Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
UNAM y del Instituto Nacional de Pediatría.

² Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental de Origen Metabólico, Secretaría
de Salud.

³ Dirección General de Atención Materno-Infantil de la Secretaría de Salud.

⁴ Instituto Nacional de Pediatría.

⁵ Centro de Estudios Metabólicos y Genéticos.

Favor de dirigir la correspondencia a Dr. Antonio Velázquez, Unidad de Genética de la
Nutrición UNAM-INP, Instituto Nacional de Pediatría, Apartado Postal 101-48,
04530 México, D.F. FAX: 606-3489

INTRODUCCION

El tamiz neonatal para enfermedades metabólicas lo iniciamos en México por primera vez entre 1973 y 1977 (1). Inicialmente estaba dirigido a la detección neonatal de fenilcetonuria, galactosemia, enfermedad de orina de jarabe de maple, homocistinuria y tirosinemia y fue cancelado en 1977, a pesar de que se demostró su factibilidad y de que resultó en el descubrimiento y tratamiento oportuno de varios niños con estas enfermedades. Se estableció un nuevo programa en 1986, esta vez dirigido a la detección de hipotiroidismo congénito y fenilcetonuria. Este programa, inicialmente ubicado en la Ciudad de México, se ha institucionalizado y empieza a extenderse a todo el país. En el presente trabajo comunicamos los resultados encontrados, que muestran frecuencias de hipotiroidismo congénito y de fenilcetonuria diferentes a las observadas en otros países. Además, se describen los problemas que el programa ha enfrentado y que pueden ser similares a los de otras naciones con un grado similar de desarrollo.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron a niños de entre 48 horas y 3 meses de edad, que nacieron en 48 hospitales, pertenecientes a los tres tipos de instituciones que conforman el sistema de salud de México: 4 en maternidades privadas, 13 en instituciones gubernamentales de seguridad social (Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado, Secretaría de Defensa, Secretaría de Marina y Servicios Médicos de Petróleos Mexicanos) y 31 en hospitales dependientes de la Secretaría de Salud, que atienden a la llamada "población abierta", integrada en su mayoría por personas sin empleo permanente. Estos hospitales se encuentran ubicados en el centro del país, en 3 entidades federativas (Distrito Federal, Estado de México y Tlaxcala). Los pacientes atendidos en ellos pertenecen a diferentes niveles socioeconómicos y habitan áreas con diferentes condiciones ecológicas (residencial, fabril, rural).

A todos se les tomaron seis gotas de sangre capilar, que fueron colectadas en tarjetas de papel filtro Schleicher & Schuell # 903 (Keene, NH). Las muestras siempre se tomaron después de las 48 horas de vida. Para ser totalmente efectivo, el tratamiento de ambas enfermedades debe iniciarse antes del primer mes de edad (2). Sin embargo, dadas las dificultades para la obtención temprana de las muestras en hospitales gubernamentales, se decidió prolongar en ellos su recolección hasta los tres meses de edad, aunque se hicieron

todos los esfuerzos para obtenerlas lo más tempranamente posible. En hospitales gubernamentales en México, debido a escasez de camas obstétricas, muchos de los recién nacidos son dados de alta antes de las 12 horas de vida cuando el parto no estuvo complicado. Por ello solo se tomó la muestra de sangre en la maternidad a aquellos neonatos que permanecieron en ella por más de 48 horas (por ejemplo, cuando el parto fue por cesárea). En el caso de los demás, se invitó a sus madres a traerlos al hospital en la siguiente semana, para la toma de la muestra.

La detección de hipotiroidismo congénito se realizó mediante la determinación de la concentración de tirotropina (TSH) por un ensayo inmunoenzimático, utilizando estuches diagnósticos ("kits") marca Spectraplate (Tokio, Japón) (3). El valor de corte utilizado para separar a los casos normales de los sospechosos, fue de 30 μ UI/ml. La fenilcetonuria se buscó utilizando el ensayo de inhibición bacteriana de Guthrie (4), con un valor de corte de 4 mg/dl. En los casos positivos se envió una muestra de sangre en papel filtro al Dr. Edwin Naylor (Magee-Women's Hospital, Pittsburgh, Estados Unidos) para la determinación de pteridinas, con objeto de descartar una hiperfenilalaninemia por deficiencia de cofactor (5).

Además de los controles internos de calidad, el Programa está adscrito a los Programas de Control Externo de Calidad para fenilcetonuria de la Universidad de Heidelberg, Alemania (6), y para fenilcetonuria e hipotiroidismo congénito de los Centers for Disease Control, Atlanta (7). En ningún caso se han detectado resultados falsamente negativos.

RESULTADOS

En total se estudiaron a 104,163 niños. Su distribución por tipo de sistema de salud (para población abierta, seguridad social y hospitales privados) se muestra en el CUADRO I, junto con el número de nacimientos correspondientes y el porcentaje de nacidos que fueron tamizados. La menor proporción correspondió a maternidades que atienden a población abierta. La principal razón del tamizaje incompleto es porque muchos de los niños dados de alta en forma temprana no regresaron para la toma de la muestra. Menos del 5% de las muestras fueron inaceptables por haber sido insuficientes o mal tomadas; este porcentaje no varió significativamente entre hospitales y diferentes sistemas de salud.

La distribución por edad se muestra en el CUADRO II. En la primera semana de vida fueron muestreados casi todos los niños nacidos en maternidades privadas, pero solo aproximadamente la mitad de los que nacieron en las gubernamentales, la menor proporción (43.4%) correspondiendo a las que atienden a población abierta. El porcentaje de recién nacidos que fueron muestreados en los cuñeros, antes de haber sido dados de alta de las maternidades, o en consulta externa, al regresar al hospital para la toma de la muestra, es muy diferente entre los distintos tipos de institución de salud (CUADRO II). Casi todos los nacidos en maternidades privadas fueron muestreados en los cuñeros, pero menos del 20% lo fueron cuando nacieron en maternidades que atienden a población abierta, en las que los neonatos son dados de alta en las primeras 12 horas de vida cuando no hay complicaciones. Entre los dados de alta en forma temprana, muchos de los que regresaron para la toma de la muestra de tamiz, lo hicieron antes de los 7 días de edad (CUADRO II). Los nacidos en hospitales que atienden a derecho habientes de la seguridad social, tuvieron una frecuencia intermedia entre los privados y la población abierta.

En total se descubrieron 78 casos de hipotiroidismo congénito, que fueron posteriormente confirmados, lo que da una frecuencia de 1:1,797, con límites de confianza al 95% de 1:1,470 a 1:2,315. La frecuencia en cada una de las tres clases de instituciones no fue significativamente diferente entre sí o del global (CUADRO III). La distribución de los casos de hipotiroidismo por tipo anatómico aparece en el CUADRO IV. No se observó agrupamiento de los casos por zona geográfica (residencial, industrial o rural) ni asociación con otros parámetros en la ficha de identificación, tales como ocupación de los padres o medicación durante el embarazo. Los resultados del seguimiento físico y psicomotor serán presentados en otro trabajo; baste aquí mencionar que en términos generales ha sido satisfactorio.

Respecto al tamiz neonatal para fenilcetonuria, solo se descubrieron dos pacientes con esta enfermedad, ambas del sexo femenino y de padres no consanguíneos; una nacida en una maternidad para población abierta y la otra, en un hospital privado. Esto da una frecuencia de 1 en 70,082 pero, debido a que el tamaño de la muestra (140,163) es pequeño en relación a la frecuencia observada, los límites de confianza al 95% varían de 0 a 1 en 4,762 casos. Ambas pacientes eran mestizas, predominando en apariencia el componente caucásico, probablemente de origen español, aunque en los dos casos se desconocen los antepasados europeos. Ninguna de ellas tuvo evidencia de un defecto en

el metabolismo de bipteridinas (precursores del cofactor de la hidroxilasa de la fenilalanina). No se descubrieron casos con otras variedades de hiperfenilalaninemia.

DISCUSION

El programa de tamiz

Nuestros resultados muestran las dificultades de llevar a cabo el tamiz neonatal en países como el nuestro. A pesar de existir desde septiembre de 1988 una ley (8) que lo hace obligatorio en toda la República Mexicana, actualmente sólo se tamizan en forma sistemática a niños nacidos en hospitales de uno de los sistemas de salud de México (de la Secretaría de Salud, que atiende a población abierta), en sólo 3 de las 32 entidades federativas de la República Mexicana. Recientemente se han equipado 3 nuevos laboratorios que cubrirán a 12 estados más. En el sistema privado, sólo en algunas maternidades del país se realiza el tamiz neonatal. Por lo que respecta a la población derecho habiente de las distintas instituciones de seguridad social, que cubren a la mayor parte de la población del país, está por iniciarse el programa en las maternidades del Instituto Mexicano del Seguro Social en la ciudad de México, así como en todos los hospitales de la Secretaría de la Defensa Nacional, mediante convenios entre estas instituciones y la Secretaría de Salud. Cabe señalar, además, que cerca de un 40% de los niños mexicanos no nacen en hospitales sino en sus hogares y son generalmente atendidos por parteras empíricas. Habitan en comunidades rurales pequeñas y aisladas o en áreas marginadas de las grandes ciudades. La mayoría de estos niños no podrán ser tamizados en el futuro cercano.

Las dificultades logísticas se ponen de manifiesto por el hecho de que sólo la mitad de los recién nacidos en maternidades de seguridad social, y menos de la mitad en las que atienden a población abierta, fueron tamizados (CUADRO I). La escasez de camas obstétricas es la razón de que un número importante de los recién nacidos, aquellos cuyo parto no fue complicado, sean dados de alta antes de las 24 horas de vida. Se han hecho diversos esfuerzos para invitar a las madres a que posteriormente lleven a sus hijos a la toma de la muestra de sangre (9). En cada hospital, una trabajadora social o una enfermera sanitarista les explica la importancia de esta muestra y se les da una historieta gráfica, elaborada por uno de los mejores y más populares artistas que dibujan este tipo de historietas en México, que relata los destinos diferentes de un bebé que fue tamizado y otro que no lo fue, para reforzar dicha invitación. Su uso ha aumentado

significativamente el número de madres que llevan a sus hijos a la toma de la muestra de tamiz, pero aún así la mayoría de los niños se quedan sin ser tamizados.

Hipotiroidismo congénito

La frecuencia de hipotiroidismo congénito que encontramos en la población estudiada es de las más altas en zonas no bociógenas. Por ejemplo, en Cuba es de 1:2,503 (10); en Argentina, 1:3,447 (11); en España, 1:2,468 (12); en Brasil, 1:4,042 en Porto Alegre (13) y 1:9,868 en Sao Paulo (14); en Estados Unidos, 1:3,600 (15) y en Japón, 1:7,700 (16). Es interesante señalar que en el estado de Texas se ha encontrado un número desproporcionadamente grande de recién nacidos con hipotiroidismo congénito, que tienen apellidos de origen español, la mayor parte de ellos probablemente de origen mexicano (17,18). Esto sugiere que la alta frecuencia de hipotiroidismo congénito encontrada por nosotros en la Ciudad de México está asociada a la composición genética de la población estudiada. Será importante comparar dicha frecuencia con la que encontremos en otras regiones del país, ahora que hemos establecido 3 nuevos laboratorios regionales del Programa, en el norte (Torreón), centro (León) y sureste (Mérida) de México.

La gran mayoría de los niños estudiados proceden del área metropolitana de la Ciudad de México, en donde fueron concebidos y transcurrió el embarazo. México es un país étnicamente heterogéneo (19), predominando la población mestiza (mezcla de español e indoamericanos), si bien la distribución cambia en diferentes regiones; al norte y al centro-oeste teniendo mayor frecuencia de individuos de origen europeo y el sur y sureste, más amerindios.

No se observaron asociaciones importantes entre la presencia de hipotiroidismo congénito y la edad, ocupación o estado socioeconómico de las madres de los niños afectados, su lugar de residencia, o los medicamentos y alimentos consumidos durante el embarazo. En particular, cabe mencionar que ninguno de los niños con hipotiroidismo congénito provino de zonas de deficiencia de yodo o de bocio endémico. Es posible, sin embargo, que en nuestra población exista una asociación entre hipotiroidismo congénito y autoinmunidad tiroidea materna. Recientemente estudiamos, en colaboración con el Dr. Luis Terán, a varios de los pacientes con hipotiroidismo congénito y a sus madres (manuscrito en preparación). Todas ellas tuvieron títulos elevados de anticuerpos antitiroglobulina y antimicrosomas tiroideos. Esta asociación ya ha sido reportada previamente (20) y pudiera jugar un papel etiopatogénico. Los fenómenos autoinmunes

están a su vez asociados con algunos haplotipos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA). En la población mexicana, por razón del mestizaje, se encuentran ciertos haplotipos con mayor frecuencia que en otros grupos étnicos (21). El grupo de Donato Alarcón-Segovia y Julio Granados ha explicado en esta forma la mayor frecuencia en México de varias enfermedades autoinmunes (22). Es posible que un mecanismo similar contribuya a la mayor frecuencia de hipotiroidismo congénito en nuestra población. Próximamente iniciaremos un estudio colaborativo con los Doctores Alarcón y Granados para poner a prueba esta hipótesis.

Al igual que en los casos descubiertos más tardíamente, por presentar ya manifestaciones clínicas (23), la agenesia tiroidea, seguida de nódulo sublingual, fue el tipo anatómico de hipotiroidismo congénito que encontramos más frecuentemente por medio del tamiz neonatal.

Fenilcetonuria

Sorprende la baja frecuencia de fenilcetonuria en el área metropolitana de la Ciudad de México. Cabe señalar que, para esta frecuencia, el tamaño de la muestra es pequeño, los límites de confianza al 95% son enormemente amplios (¡desde 0 hasta 1:4,762!) y por ello la frecuencia real pudiese ser muy diferente a la observada hasta ahora. En poblaciones europeas nórdicas es de aproximadamente 1 en 10,000 nacimientos (24), o aún mayor, como en Irlanda, en donde es de 1 en 6,000 (25). La distribución de fenilcetonuria en España, de donde proceden la mayoría de los genes caucásicos de la población mexicana, es de 1 en 22,792, aunque varía de una región a otra (12). No existe ninguna información sobre su frecuencia en indios mesoamericanos, pero las escasas informaciones existentes sobre fenilcetonuria en poblaciones indoamericanas en Canadá y los Estados Unidos (24) sugieren que es también poco frecuente en ellas. Por lo tanto, la aparente baja frecuencia de fenilcetonuria que observamos en niños mexicanos podría estar explicada por el mestizaje. Para otros países latinoamericanos, sólo se cuenta con la frecuencia de fenilcetonuria para Brasil, ya que el tamiz neonatal para esta enfermedad no se lleva a cabo en otros países o apenas está empezando. En Sao Paulo es de 1 en 15,042 (26) y en Porto Alegre es de 1:12,127 (13). Dado que su composición genética es diferente de la de la población mexicana, no pueden establecerse comparaciones estrictas.

De 19 familias con pacientes fenilcetonúricos que hemos estudiado en el Instituto Nacional de Pediatría en los últimos 15 años (27), sólo 6 proceden de la Ciudad de México. Por otro lado, 9 (47.4%) son originarias del estado de Jalisco. En contraste, solo

el 3.6% de 55 familias en las que hemos diagnosticado alguno de otros 21 defectos genéticos del metabolismo de aminoácidos, hidratos de carbono y ácidos orgánicos, proceden de dicho Estado mexicano (manuscrito en preparación). Estos datos sugieren que la existencia de una zona de mayor agregación de casos en Jalisco. Esta región recibió en el siglo pasado, una importante migración de franceses e italianos. Uno de los laboratorios regionales de nuestro programa (el de la Ciudad de León), realizará el tamiz neonatal de esta zona y así se podrá poner a prueba esta hipótesis.

Otra posible causa de la baja frecuencia de fenilcetonuria observada por nosotros es que una baja sensibilidad de la prueba de Guthrie en nuestras manos, no haya permitido la detección de algunos pacientes (falsos negativos). Pero esta causa es poco probable, no sólo porque no hemos tenido un resultado falsamente negativo en las pruebas de control de calidad externo, sino porque el 83.4% de los niños tamizados nacidos en maternidades para población abierta y el 46.7% de los nacidos en hospitales para derecho habientes (CUADRO II) fueron estudiados hasta después del quinto día de vida, cuando la concentración de fenilalanina en sangre en los pacientes fenilcetonúricos es considerablemente mayor que el valor de corte empleado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo estuvo parcialmente subvencionado por donativos de la Fundación Miguel Alemán, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Programa Universitario de Investigación de Investigación en Salud de la UNAM. El Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental de Origen Metabólico está financiado por la Secretaría de Salud a través de su Dirección General de Atención Materno Infantil. Queremos agradecer de manera muy especial el apoyo constante y irrestricto del Secretario de Salud, Dr. Jesús Kumate Rodríguez; sin su apoyo no se hubieran vencido los múltiples obstáculos que el Programa ha enfrentado y éste no hubiera llegado a ser una realidad. También queremos destacar el impulso inicial que le dio el anterior Secretario de Salud, Dr. Guillermo Soberón, así como el Dr. José Manuel Septién González y la Lic. Yolanda Senties.

CUADRO I
Características de la muestra de recién nacidos tamizados

	Población abierta	Derecho- habientes	Pacientes privados
Número de hospitales	31	13	4
Total de muestras y porcentaje que fueron aceptables	74,101 (96.7)	30,266 (96.4)	35,796 (98.9)
Porcentaje de recién nacidos que fueron tamizados*	44.3	50.8	92.4

(*) Este porcentaje varió mucho de un hospital a otro en instituciones para población abierta y para derechohabientes.

CUADRO II

Porcentaje de los recién nacidos por edad a la que fueron muestreados y por lugar (cunero o consulta externa) en donde se obtuvo la muestra

	Población abierta	Derecho-habientes	Pacientes privados
Edad a la toma de la muestra:			
Menos de 1 semana	43.4	56.8	99.2
1 semana a 15 días	29.2	20.8	0.6
16 días a 1 mes	21.0	10.5	0.2
1 a 2 meses	8.3	9.1	0.0
2 a 3 meses	1.1	2.8	0.0
Lugar de toma de la muestra:			
Cunero	16.6	56.3	99.3
Consulta externa	83.4	46.7	0.7

CUADRO III

Frecuencia de hipotiroidismo congénito en la población mexicana

Nacidos en hospitales que atienden a:	Frecuencia
Población abierta	1:1,950
Derechohabientes	1:1,593
Pacientes privados	1:1,705
T O T A L	1:1,797*

(*) Límites de confianza al 95% = 1:1,470 a 1:2,315

CUADRO IV

Distribución porcentual de los tipos anatómicos de hipotiroidismo congénito

Agenesia	56.8
Nódulo sublingual	35.1
Hipoplasia	2.7
Bocio	5.4

REFERENCIAS

1. Velázquez A, Villarreal ML, Galindo, LM. Newborn genetic screening: the Mexican program. En: Armendares S, Lisker R, Ebling FJG, Henderson IW, eds. *Human Genetics* Amsterdam: Excerpta Medica, 1977. Págs 214-224.
2. American Academy of Pediatrics. New issues in newborn screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 1982;69:104-108.
3. Naruse H, Suzuki E, Kumada J. Non-radioactive methods for neonatal hypothyroid screening. En: Therrell BL, ed. Amsterdam: Excerpta Medica, 1987. Págs. 115-119.
4. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-343.
5. Scriver C, Kaufman S, Woo SLC. The hyperphenylalaninemias. En: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Nueva York: McGraw-Hill, 1989. Págs. 495-546.
6. Mathias D. Quality control in neonatal screening for inborn errors of metabolism. En: Wilcken B, Webster D, eds. *Neonatal Screening in the Nineties*. Australia: Proceedings of the 8th International Neonatal Screening Symposium, 1991. Págs. 262-264.
7. Hannon WH, Adam BW. International cooperative interactions ("networking") among quality assurance programs. En: Wilcken B, Webster D, eds. *Neonatal Screening in the Nineties*. Australia: Proceedings of the 8th International Neonatal Screening Symposium, 1991. Págs. 293-294.
8. Diario Oficial de la Federación (México). Norma Técnica No. 321 para la prevención del retraso mental producido por hipotiroidismo congénito. 22 de septiembre de 1988. Págs. 88-90.
9. Casanueva E. et al. Programa de prevención del retardo mental por tamiz neonatal: Estrategias para aumentar la cobertura. *Perinatol. Reprod. Hum.*, 2: 149-154, 1988.
10. Güell R, Alvarez MA, Robaina R, Fernández-Yero JL. Neonatal thyroid screening: the Cuban programme. En: Schmidt BJ, Diamant AJ, Loghin-Grosso NS, eds. *Current Trends in Infant Screening*. Amsterdam: Excerpta Medica 1989. Págs. 109-112.
11. Iorcansky S, Papendiek LG, Arriazu MC, Prieto L, Rivarola MA, Bergada C. Argentine experience in screening for congenital hypothyroidism. En: Schmidt BJ,

- Diamant AJ, Loghin-Grosso NS, eds. *Current Trends in Infant Screening*. Amsterdam: Excerpta Medica 1989. Pág. 129.
12. Alonso-Fernández JR. Resultados y situación de la tria neonatal en España. *Prevenç Enferm Metab Congén* 1992;5:5-12.
 13. Camargo-Neto E, Schulte J, Lewis E, Giugliani R. Two-year report from a comprehensive multi-regional Brazilian screening program. En: Wilcken B, Webster D, eds. *Neonatal Screening in the Nineties*. Australia: Proceedings of the 8th International Neonatal Screening Symposium, 1991. Págs. 45-46.
 14. Spinola-Castro A, Barbosa RLV, Matsumoto M, Pires MC, Shimizu MSO, Schmidt BJ. En: Schmidt BJ, Diamant AJ, Loghin-Grosso NS, eds. *Current Trends in Infant Screening*. Amsterdam: Excerpta Medica 1989. Págs. 131-137.
 15. Bellisario R, Brown SK, Beblowski D, Hedden MB, Postulka J. En: *Advances in neonatal screening* En: Therrell BL, ed. Amsterdam: Excerpta Medica, 1987. Págs. 35-39.
 16. Irie M, Nakajima H, Inomata H, Naruse H, Suwa S, Takasugi N. Screening of neonatal hypothyroidism in Japan. En: *Advances in neonatal screening* En: Therrell BL, ed. Amsterdam: Excerpta Medica, 1987. Págs. 41-48.
 17. Therrell BL, Meyer D, Brown LO y Peter WP. Incidence of primary congenital hypothyroidism in Texas by race and sex. *Proceedings of the National Newborn Screening Symposium*. Chicago, 1982. Págs. 57-60.
 18. Texas Department of Health, Newborn Screening Program. Summary of newborn screening for 1986. Document 8/87. Austin, TX.
 19. Lisker R, Ruiz E, Pérez-Briseño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
 20. van der Gaag RD, Drexhage HA, Dussault JH. Role of maternal immunoglobulins blocking TSH-induced thyroid growth in sporadic forms of congenital hypothyroidism. *Lancet* 1985; 1:246-250.
 21. Lisker R, Pérez-Briseño R, Granados J, Babinsky V, De Rubens J, Armendares A, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1986;71:203-207.
 22. Granados J, Olivares I, Melín H, Andrade F, Alarcón-Segovia D. Evidence of the role of complement genotype in the susceptibility to systemic lupus

- erythematosus obtained from Mexican family studies. *Arthritis & Rheumatism* 1987;30(Suppl):S21.
23. Dumont JE, Vassart G, Refetoff S. Thyroid disorders. En: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Nueva York: McGraw-Hill, 1989. Págs. 1843-1880.
24. Levy H. Genetic screening. *Adv Hum Genet* 1973; 4:1-104.
25. Thalhammer O. A collaborative study: frequency of inborn errors of metabolism, especially PKU, in some representative newborn screening centers around the world. *Humangenetik* 1975; 30:273-282.
26. Schmidt BJ, Martins AM, Grosso NL, *et al.* PKU screening in Sao Paulo-Brazil. En: Wilcken B, Webster D, eds. *Neonatal Screening in the Nineties*. Australia: Proceedings of the 8th International Neonatal Screening Symposium, 1991. Págs. 64-65.
27. Velázquez A. Descifrando lo cotidiano a través de lo excepcional: errores innatos del metabolismo, vitaminas y desnutrición. Libro del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. México D.F.: Dirección General de Publicaciones de la UNAM, 1993. En prensa.

5. NUTRICION Y DEFICIENCIAS

5.1. CARENCIA DE ENERGIA Y PROTEINAS Y
DESARROLLO MENTAL

Joaquín CRAVIOTO
Instituto Nacional de Ciencias y
Tecnología de la Salud del Niño
México

Resumen

Hace ocho años comprobamos que la baja estimulación en el hogar favorece el agravamiento de la desnutrición energético-proteica, y con sobreestimulación sistematizada se evita, tanto en animales de experimentación como en humanos, hasta un 75 % de la pérdida de células nerviosas que acompañan a la desnutrición. Esto nos llevó a modificar las normas de actuación en la desnutrición grave, incorporando al tratamiento del desequilibrio electrolítico y de la infección la estimulación sistematizada del lactante al ingreso en el hospital.

Estos problemas no afectan a los países desarrollados, en los que sí tiene importancia el número de niños que nacen con desnutrición intrauterina, esto es, nacidos a término (más de 37 semanas y menos de 42) simétricos desde el punto de vista estado ponderal, pero con bajo peso, alrededor del 8 - 9 % de los recién nacidos en estos países son de bajo peso y tienden a conservarlo en percentiles inferiores a lo largo de todo su desarrollo.

Cuando se controla a estos niños a los 150 días y al año de edad, siguen manteniéndose en los percentiles más bajos. Esto apoya la teoría de que los factores que moderan el crecimiento intrauterino son tan importantes como los factores postnatales del primer año de vida. Estos niños a la edad adulta (23 años) siguen manteniendo una talla final más baja que el grupo control.

Este déficit en la talla final repercutirá sobre todo en las gestantes, con talla inferior de 150 cm., a la hora del parto, ya que se ha constatado un aumento (hasta tres

veces más) de la mortalidad perinatal por trauma obstétrico en su descendencia.

Otro punto a considerar es la importancia de la lactancia materna. En una valoración del cociente intelectual de un grupo de niños de 7 años, en relación con la edad en que se produjo el destete, ofrece los siguientes resultados: Nos encontramos que la proporción de niños con un C.I. superior a 91 es máximo en el grupo de niños destetados entre los 7 y 18 meses, y disminuye significativamente en aquellos destetados más tempranamente (antes de los 6 meses) o más tardíamente (después de los 18 meses).

Finalmente, quiero resaltar como conclusión de estos estudios que: Todo niño debe poseer desde el nacimiento, como derecho humano inalienable, la disponibilidad de alimento, de estimulación, de protección a la salud y a la educación.

5.2. ASPECTOS DESTACABLES EN LA NUTRICION Y
ALIMENTACION DE INDIVIDUOS CON ERRORES
CONGENITOS DEL METABOLISMO

Francisco J. MATAIX
Instituto de Nutrición y
Tecnología de los Alimentos
Universidad de Granada

El título de esta ponencia desea indicar que cuando se quiere suministrar una adecuada nutrición a los individuos, no solamente hay que prestar atención a aspectos nutricionales exclusivos que se basan en necesidades fisiológicas y características fisiopatológicas sino a los aspectos alimenticios que además de considerar la nutrición, comprenden aspectos socioculturales y económicos. Con respecto a los socioculturales debe incluirse lo que es puramente gastronómico, es decir, la apetecibilidad de las dietas, ya que si esto no se consigue será difícil que exista una adecuada adherencia a las mismas. Los aspectos económicos son obvios y son también en gran parte determinantes de que se puede seguir o no la dieta adecuada.

IMPORTANCIA DE LA NUTRICION EN LOS ERRORES CONGENITOS DEL METABOLISMO (ECM)

Del enorme conjunto de enfermedades que con un sentido amplio se integran hoy en el grupo de errores congénitos del metabolismo (ECM), tan solo en muy pocos casos es dudosa o ineficaz el papel de la dieta. Ahora bien dentro de la gran casuística existente, los problemas más importantes en relación con la dieta se encuentran en aquellos casos que hay alteraciones del metabolismo intermediario de aminoácidos y de hidratos de carbono y especialmente los primeros por la dificultad de establecer una dieta adecuada. De ahí que las consideraciones posteriores se centren en estos.

Antes de pasar a concretar las particularidades de la dieta en alteraciones del metabolismo de aminoácidos, lo primero que sorprende es que tanto en los productos comerciales como en el conjunto de la dieta, se resuelve el problema de sobrepasar la ingesta del aminoácido "problema" pero quedan sin resolver otros problemas nutricionales que afectaran sin duda en mayor o menor grado y a un plazo más o menos prolongado, la salud del individuo en cuestión.

DIETA DEL LACANTE AFECTO DE UNA ALTERACION CONGENITA DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS.

Lactancia materna.

La dieta de un neonato normal debe ser cuidadosamente estudiada, dada la situación fisiológica del mismo, que implica un acelerado crecimiento, una falta de madurez tisular y funcional destacando la cerebral y asimismo la inmadurez de las funciones responsables de la

eliminación de catabólitos de excreción, fundamentalmente hepáticas y renales. A esta vulnerabilidad hay que añadirle a un neonato con alteraciones congénitas del metabolismo de aminoácidos, su propia incapacidad metabólica, que además puede afectar de una manera especial al funcionalismo cerebral.

La falta de lactancia materna total o parcial está privando al neonato con ECM, de todas las propiedades nutricionales y también las no nutricionales, (factores de crecimiento y maduración, defensa inmunológica, etc.) que posee la leche materna. Esta es la primera consideración que hay que tener en cuenta, por lo que en principio hay que aportar siempre que sea posible y en las cantidades permisibles, la leche de la madre.

Aporte protéico

En la figura 1 se indica el esquema general de como se lleva a cabo el aporte proteico a un niño ECM.

El aminoácido "problema" o "a controlar", debe estar presente sólo en la cantidad necesaria para cubrir las demandas de crecimiento y desarrollo y será aportado por leche materna o formula o alimentos normales. El resto de aminoácidos lo suministrarán esos alimentos y los productos semisintéticos y sintéticos, que obviamente no contendrán el aminoácido problema.

Independientemente de que una buena estimulación digestiva (secreciones, hormonas gastrointestinales, etc.) requiere un aporte de proteína en condición nativa, es decir, sin hidrolizar, existen otros problemas a considerar. Aunque estamos comenzando a conocer lo que se va a indicar no deja de tener su importancia. Según el tipo de patrón aminoacídico puede haber una distinta respuesta gastrointestinal de tipo hormonal que afecta diversas respuestas fisiológicas, incluyendo incluso el desarrollo de la célula β pancreática, de especial importancia en la primera fase de la vida. Por otra parte, diversas fórmulas comerciales preparadas para la condición patológica que nos preocupa, utilizan hidrolizados de caseína o mezcla de aminoácidos. Si el hidrolizado es de caseína y no se le modifica en la proporción de aminoácidos para que se acerque al modelo humano, y si la mezcla no tiene tampoco en cuenta esto, estamos ante una situación evidente de "imbalance de aminoácidos", lo que encierra una clara peligrosidad, semejante a la que presentan aquellos lactantes a los que se les suministra leche entera de vaca, a similares concentraciones de proteína.

Aporte hidrocarbonado.

Dentro de las fórmulas comerciales se encuentran distintos hidratos de carbono (maltosa, sacarosa, dextrinomaltosa, almidón). Llama la atención la presencia de almidón, el cual según las normas ESPGAN (Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica), debe estar ausente en las fórmulas de inicio para lactantes, dada la escasa o nula cantidad de amilasa pancreática en esa época de la vida. El almidón especialmente cuando alcanza un cierto nivel, provoca en el neonato desde diarreas yatrogénicas hasta retrasos evidentes de crecimiento por impedimento de la biodisponibilidad mineral.

Siguiendo las normas internacionales lo recomendable en el uso de lactosa y/o dextrinomaltosas, que son fácilmente digeribles y contribuyen a la instauración de demandas fisiológicas del neonato, como son una adecuada absorción mineral, especialmente de hierro, calcio y cinc y el establecimiento de la flora bífida característica del lactante.

Aporte lipídico

También en el aporte lipídico se encuentran transgresiones nutricionales en bastantes de los productos comercializados. El uso de aceites de semillas y especialmente de maíz es una de las causas más importantes de las transgresiones citadas.

Respecto al ácido linoleico, existen preparados con unos niveles que llegan casi a duplicar el nivel máximo recomendado de la ESPGAN que desde mi punto de vista es ya elevado (18% del valor calórico total frente a 4,5-10,8%)

El ácido γ -linolénico, que debe ser apartado en un 0,5% de la energía total no se considera en prácticamente en ningún caso.

Otro ácido de enorme importancia neonatal es el docosahexanoico (DHA) fundamental en la estructura y funcionalidad del encéfalo y retina, hasta el punto que la falta en la dieta puede llegar a afectar determinadas funciones nerviosas superiores como el aprendizaje. Este ácido se forma endógenamente a partir del ácido -linolénico, constituyendo el último miembro de la fórmula n-3; pero en niños prematuros y en neonatos, hay o puede haber problemas de síntesis endógena, lo cual se obvia a través de leche materna, que contiene cantidades adecuadas de DHA. Sin embargo las fórmulas adaptadas no lo contienen.

Dado que el neonato fenilcetonúrico y otros con errores congénitos del metabolismo de aminoácidos y otros nutrientes, tienen un peligro potencial de daño cerebral, parecería una norma obligada para prevenir el citado daño, la administración aunque sea aisladamente del ácido docosahexanoico.

Por último, el aporte de ácido oléico es inferior a la demanda fisiológica. Piensese que este ácido representa un 40% de los ácidos grasos totales y ese nivel es muy inferior en las fórmulas usuales, especialmente cuando en su composición entra aceite de maíz y otros tipos de aceites de semillas.

La incorporación de ácido oléico, a través de aceite de oliva no sólo cubre el nivel adecuado, sino que puede afectar a un mejor nivel de DHA. En la figura 2 se muestra un trabajo llevado a cabo por nosotros en nuestro Instituto con niños prematuros, en donde las dos fórmulas utilizadas variaban en los niveles de ácido oléico. Como se puede comprobar cuando la fórmula tenía los niveles fisiológicos, el DHA de membrana era mayor que con una fórmula con menor nivel del ácido oléico, lo cual nos hace deducir unas posibles ventajas de indudable repercusión fisiológica.

Aporte vitamínico y mineral

El panorama que ofrecen los productos comercializados es muy diverso, pudiendo generalizarse diciendo que en las fórmulas adaptadas hay un adecuado aporte, pero no ocurre así cuando vemos los productos dietéticos para niños mayores. La importancia de los mismos en el conjunto de la dieta y la evidencia reciente de posibles alteraciones metabólicas que afectan los niveles corporales de aminoácidos, obligan a reconsiderar la situación nutricional respecto de aminoácidos en los errores congénitos del metabolismo.

LA DIETA DEL INDIVIDUO NO LACTANTE

La disminución o reducción drástica de grupos de alimentos como carnes (que incluyen legumbres, huevos, pescados,etc.) y lácteos (leche, quesos,etc.) y la reducción del grupo de cereales, deja al individuo en ECM de aminoácidos, con unas posibilidades escasísimas de hacer una dieta apetecible, además de estar en peligro serio de presentar deficiencias vitamínicas y minerales de mayor o menor gravedad.

La solución pasa por un esfuerzo en el diseño de productos comerciales sucedáneos o derivados de los grupos a eliminar con bajos niveles protéicos, y adecuado enriquecimiento vitamínico-mineral. Este hecho y una cocina imaginativa, puede solucionar el problema de la palatabilidad de las dietas y asimismo el nutricional.

APORTE PROTEICO EN LAS METABOLOPATIAS DE AMINOACIDOS

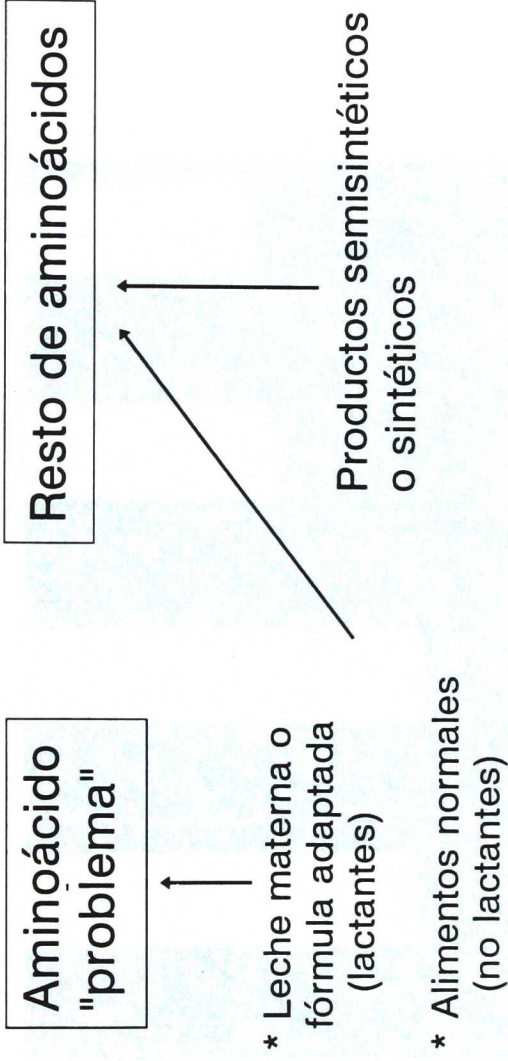


FIGURA 1

AGP W3 > 18 C (ESFINGOMIELINA)

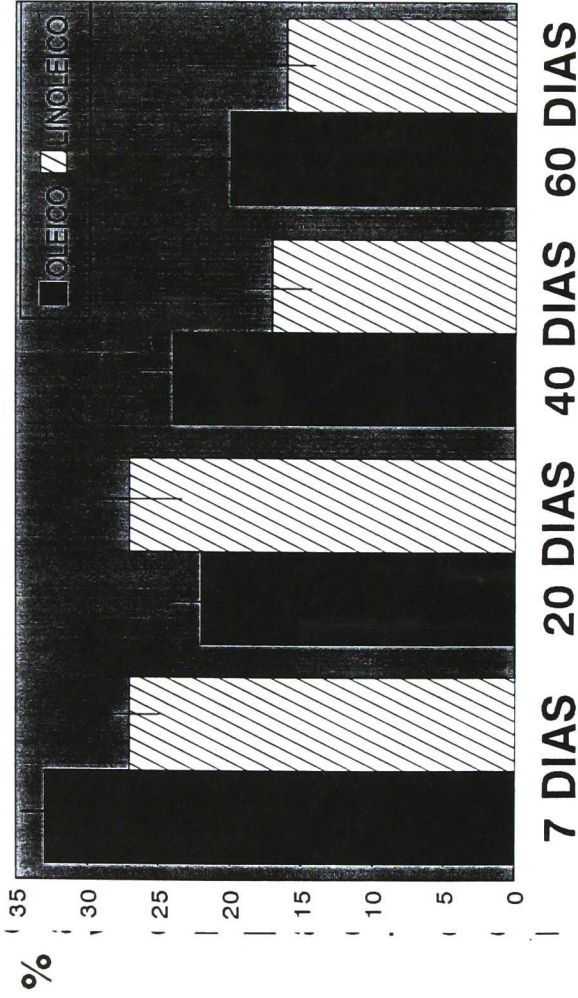


Figura 2
Níveis de ácidos W-3 em niños rematuros alimentados com fórmulas de distinta riqueza em ácido oleico.

5.3. FACTORES NUTRICIONALES PREVENTIVOS EN LAS
FUNCIONES FISICAS Y COGNITIVAS DEL ANCIANO

Pilar RIOBO
Servicio de Endocrinología y
Nutrición
Fundación Jiménez Díaz
Madrid

La calidad de vida de los ancianos depende, en gran medida, de su capacidad para la movilidad física, y la función mental. La independencia para la vida diaria y la sensación de autoestima dependende de la capacidad mental y física. En diferentes estudios se ha examinado la relación entre los factores nutricionales y el tipo de vida y el mantenimiento de la capacidad funcional. La hipótesis planteada es que, es posible que, al menos parcialmente, la disminución de las funciones cognitivas asociadas con el envejecimiento sean prevenibles o reversibles con una mejor nutrición.

Nutrición y función muscular

Uno de los cambios más llamativos que se producen con el envejecimiento es el cambio en la composición corporal, sobre todo, la disminución de la densidad ósea y el aumento del porcentaje de grasa corporal. Ello está íntimamente relacionado con la osteoporosis y la posible aparición de fracturas y dificultad en la movilidad y la morbilidad cardiovascular. Sin embargo, la disminución de masa magra, también puede ser importante en cuanto a la disminución de fuerza muscular, función respiratoria y capacidad deambulatoria. Para una función muscular adecuada es necesario mantener una adecuada actividad física y también una dieta correcta, tanto en proteínas, minerales y vitaminas. Así, se ha observado una relación entre el Magnesio en la dieta y la capacidad muscular (Fiatarone, 1990). También los sujetos con menor fuerza muscular tenían niveles circulantes más bajos de vitamina D. Además hay que considerar el efecto de la vitamina D, no sólo sobre el hueso, sino también sobre la función muscular. Existe controversia sobre si la deficiencia de vitamina D produce debilidad por su efecto sobre el Calcio y el Fósforo circulante versus a un efecto directo sobre la función muscular y la capacidad contráctil. Son necesarios más estudios sobre suplementación con vitamina D y movilidad física.

Otra función alterada en el anciano, con gran importancia por la incapacidad que conlleva, por la frecuencia con que se produce y por el coste del tratamiento, y que puede tener una interacción nutricional es la ceguera debido a catarata. Jacques et al, (1988), establecieron una relación entre el estado nutricional y la ingesta de determinados nutrientes con la presencia de catarata senil. En este estudio, los sujetos ancianos de Boston con ingesta dietética de vitamina C en el quintil inferior, tenían un riesgo aumentado 14 veces de catarata subcapsular posterior y un riesgo aumentado 3.7 veces de catarata central, en relación con los sujetos con ingesta más alta. También se encontró una relación, aunque menos estrecha, con la ingesta de otros nutrientes antioxidantes, incluyendo tocoferoles y carotenoides totales. La catarata es un proceso degenerativo que depende, en parte, del daño de los rayos ultravioletas y otros nutrientes antioxidantes a las proteínas del cristalino, y quizás los oxidantes podrían proporcionar protección; esto sería de enorme importancia funcional y económica, y un factor crítico que afectaría a la calidad de vida.

Nutrición y función inmune

La disminución de función inmune con la edad, aunque menos evidente que la catarata, no es menos importante. No podemos olvidar las implicaciones del sistema inmune en la defensa ante las infecciones y la vigilancia ante los cambios malignos. Walford demostró la alteración de la hipersensibilidad retardada que se produce en la población anciana. Casi cualquier deficiencia de nutrientes conocidos produce una alteración de la función inmune. Los datos no son completamente concluyentes pero Meydani (1989), realizó un estudio con sujetos suplementados con vitamina E ó con placebo, y se comparó la inmunidad celular a los 30 días, siendo mejor (sobre todo la hipersensibilidad retardada) en el grupo suplementado.

En resumen, es posible que la disminución de la inmunidad que se encuentra en el envejecimiento esté modulada, en parte, por factores nutricionales, como vitamina E y Zinc. ¿Podría ser esta otra situación en que el estado nutricional y dietético influyera en la calidad de vida?.

Vitaminas y función neurocognitiva en ancianos

Una circunstancia fundamental causante de incapacidad física y psíquica es la alteración mental del anciano. Lo más característico es la pérdida de la función cognitiva, que es variable desde una simple pérdida de memoria, a una demencia profunda, tipo Enfermedad de Alzheimer. La pregunta que se plantea es ¿hasta qué punto sería posible prevenir o revertir estas alteraciones neuropsicológicas mediante factores nutricionales?.

Determinados déficits vitamínicos se han asociado clásicamente a alteraciones neurológicas, y es conocido que las vitaminas son necesarias para la función normal del SNC. Es raro que se produzca un déficit claro; sin embargo, es probable que existan deficiencias vitamínicas leves o subclínicas, que pudieran tener un papel en la patogénesis de las alteraciones mentales del anciano.

Esta fue la hipótesis planteada en el trabajo de Goodwin (1983), quien encontró que los ancianos sanos que tenían niveles plasmáticos bajos de ciertas vitaminas (folatos, B12, C) tenían un mal rendimiento en los test de memoria y de pensamiento abstracto no verbal. A pesar de las limitaciones que tiene siempre un estudio correlacional indujo a la realización de nuevas investigaciones sobre el tema.

En otro estudio, (Tucker, 1990) se evaluó el estado nutricional en 20 personas sanas, mayores de 60 años y se relacionó con la función cognitiva y con los índices electroencefalográficos de función neuropsicológica. Se encontraron correlaciones con la tiamina, riboflavina y hierro. En este estudio no se encontró correlación del nivel de folato con la función cognitiva, aunque sí con los cambios del EEG.

Más recientemente, Bell (1990) ha encontrado niveles bajos o normales-bajos de B12 y folatos en los ancianos con depresión. Asimismo el 17% de los pacientes geriátricos con depresión mayor tenían niveles plasmáticos aumentados de homocisteína; y estos niveles estaban aumentados en relación con los niveles en depresivos adultos más jóvenes. La importancia de este dato se verá más adelante.

Es conocido que el 30% de los mayores de 60 años padecen una gastritis atrófica y el pH alcalino dificulta o impide la absorción de B12 y de folatos. Además, la prevalencia de esta alteración aumenta con la edad. Se ha encontrado que los ancianos, en principio sanos, tienen concentraciones de B12 más bajas que los controles más jóvenes.

Con respecto a la B6, en un estudio de Ribaya-Mercado se ha demostrado que la repleción de B6 según la RDA, en sujetos sometidos a dieta exenta de B6 durante 20 días, no era suficiente para normalizar la concentración de piridoxal. Ello sugiere que quizás en los ancianos (que presentan un riesgo aumentado de deficiencia de folatos, B12 y B6 debido a sus alteraciones gastrointestinales), los requerimientos vitamínicos no sean los mismos que los de los adultos jóvenes.

Las evidencias que sugieren que las deficiencias vitamínicas alteran al SNC se deben, además de los síndromes clínicos en humanos, a los estudios en animales de experimentación.

1. Estudios experimentales

-Con respecto a la B12, se realizan mediante:

- a) Con exclusión de B12 de la dieta del animal se han producido lesiones neuropatológicas.
- b) Con inhibición directa del enzima metionina sintetasa, que es B12 dependiente mediante
 . exposición al Oxido nitroso que produce oxidación irreversible
 . Tratamiento con un análogo del aminoácido, como la cicloleucina, que es un inhibidor competitivo.

-Los estudios en animales con dietas con deficiencia de B6 demostraron ataxia, debilidad, convulsiones y diferentes lesiones en los animales tratados.

-En casos de déficit folatos en ratas (en estudios de Bachevalier), el aprendizaje está alterado y los niveles de serotonina están disminuidos. Como es conocido por ustedes, los niveles bajos de serotonina se han implicado en la etiología de la depresión en humanos.

Déficitis en humanos

El déficit B12 en humanos y sus efectos sobre el SNC son bien conocidos. Se produce desmielinización (degeneración subaguda combinada) con parestesias, ataxia, alteración del humor.

La B6 es un cofactor en la síntesis de neurotransmisores esenciales, incluyendo epinefrina, norepinefrina, serotonina y gamma-aminobutírico. El déficit clínico de B6 en humanos produce neuropatía periférica y convulsiones.

El déficit de folatos se ha asociado con irritabilidad, amnesia y paranoia y neuropatía periférica.

También, es interesante conocer los déficits enzimáticos genéticos que afectan a estas vitaminas:

- Los pacientes con déficit del enzima cistationin-sintetasa, necesario para la conversión de Homocys a Cistationina presentan retraso mental por necrosis y gliosis focal y pérdida neuronal. Los heterocigotos presentan aumento de Homocys y tienen riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular (Brattstrom, Boers).
- Si el déficit es de metilen-Tetrahidrofolato reductasa, enzima necesario para el paso de 5,10 metilen THF a 5 metil THF, presentan desmielinización y demencia/parkinson.

Deficiencias subclínicas

En la senectud, pueden persistir durante años concentraciones en el límite bajo de estas vitaminas, sin aparecer las características clínicas. En ciertas ocasiones, puede ser posible compensar, y en otras no. Voy a hacer una revisión de los estudios más significativos realizados sobre alteraciones mentales y déficits leves o subclínicos de vitaminas.

Lindenbaum (1988) -> el 28% de los pacientes con deficiencia clínica de B12 presentaban síntomas neurológicos sin anemia ni macrocitosis, sobre todo a edades avanzadas. La suplementación de B12 mejoró los síntomas neurológicos. La conclusión que se extrae es que las alteraciones neurológicas debidas a deficiencias subclínicas de B12 en los ancianos pueden pasar desapercibidas si únicamente se tienen en cuenta las alteraciones hematológicas.

Chomé (1986) -> realizó una evaluación psicométrica a ancianos con déficits vitamínicos, incluyendo B12 y folatos. En comparación con los ancianos control, sin deficiencias, estos sujetos tenían una peor graduación en los tests psicométricos.

Bell (1990) -> encontró una correlación positiva entre las concentraciones de vitamina B12 y las pruebas cognitivas en pacientes geriátricos con depresión mayor.

Sommer -> correlación entre niveles de folatos y pruebas cognitivas en pacientes con Alzheimer.

La utilidad de las correlaciones establecidas en los estudios previos es limitada. Es posible que las alteraciones neurológicas y psicológicas conlleven alteraciones de la dieta, y por lo tanto, estas alteraciones produzcan déficits vitamínicos; asimismo pueden ser hechos coincidentes, es decir, que no estén relacionados la alteración neurológica y el déficit vitamínico. También, las alteraciones neurológicas podrían deberse a déficit de algún otro nutriente asociado.

Vamos a recordar brevemente las bases bioquímicas de las neuropatologías inducidas por déficits de B12, B6 y de folatos. Estas vitaminas están involucradas en el metabolismo del aminoácido azufrado, Homocys. En la vía de la remetilación, la homocys adquiere un grupo metilo del metiltetrahidrofolato para formar metionina y Tetrahidrofolato (THF). El enzima responsable, la metil THF- Homocys metil transferasa requiere vitamina B12 como cofactor. La metionina pasa a formar proteínas o recibe un grupo adenosil del ATP para formar S-Adenosil-Metionina (SAM). SAM cede su grupo metilo a uno de los más de 100 aceptores de metilos y se forma S-Adenosil Homocys, que posteriormente pierde su grupo adenosyl y se regenera Homocys.

En la vía "transulfuración", la homocys se condensa con serina para formar cistationina. El enzima, requiere B6 como cofactor. Posteriormente, en otra reacción que también precisa de B6, se escinde en alfa-ceto-glutarato y Cisteína

¿Cuál sería el mecanismo por el que estos déficits producirían las alteraciones neuropatológicas?

1a Hipótesis: acúmulo de homocisteína

Las deficiencias de B12, B6 y Folato conllevan acúmulo de homocisteína (en sangre y orina). Se ha propuesto que el aumento de riesgo de enfermedad cerebro-vascular que he mencionado previamente en sujetos heterozigotos para el déficit del enzima metionina-sintetasa se debe a un efecto tóxico de la homocisteína sobre el tejido vascular. Los sujetos expuestos crónicamente a concentraciones bajas de B6, B12 y folatos podrían tener también riesgo de toxicidad por la homocisteína y, por consiguiente, de enfermedad cerebrovascular.

2a Hipótesis: hipometilaciones.

La disminución de vitaminas conllevaría bloqueo, más o menos intenso, según el nivel del déficit vitamínico, de la vía de la remetilación, y por lo tanto, disminución de síntesis de SAM, y la consiguiente inhibición de la metilación de aceptores (mielina, neurotransmisores, y fosfolípidos de membrana) fundamentales para la integridad del SNC. Esto se apoya por los estudios que demuestran eficacia de SAM como antidepresivo.

Es evidente que deficiencias leves ó subclínicas de vitaminaaminas pueden afectar la función del Sistema Nervioso Central

Queda abierta la hipótesis de que existan defectos subclínicos de vitaminas en el anciano que expliquen parte de las alteraciones neuropsiquiátricas asociadas al envejecimiento y, lo que es más importante, pudieran corregirse con un nutricional adecuado.

Retraso del envejecimiento mediante restricción dietética

Hace más de 50 años que McCay y asociados describieron el aumento de esperanza de vida en ratas en respuesta a la disminución de ingesta alimenticia. En este estudio el diseño no era muy bueno, la composición de la dieta no era uniforme, pero este efecto se ha reproducido en posteriores estudios en animales. Se ha demostrado que:

- . El envejecimiento se asocia con cambios de tipo degenerativo. La restricción calórica retrasa y previene la mayoría de estos cambios, ya que:
 - Evita el aumento de colesterol
 - Disminuye la pérdida de receptores de dopamina del cuerpo estriado.
- . La restricción también retrasa la aparición de las enfermedades asociadas al envejecimiento en las ratas (nefropatía, cardiopatía y neoplasia) a edades más avanzadas, en estudios de Masoro (1991).

La restricción enlentece el aumento de la tasa de mortalidad específica debida a la edad. Este es un buen índice del envejecimiento de la población. Examinando 4 estudios intervencionales con restricción dietética, el tiempo necesario para doblar la tasa de mortalidad era de 102 días (ratas con ingesta libre) y 198 días en las ratas con limitación.

Primera cuestión: ¿Cuál es el nutriente/s responsable de la acción anti-envejecimiento con la restricción de ingesta?

Está claramente demostrado que se debe a disminución de la ingesta energética total, más que a un nutriente específico.

Segunda cuestión: ¿Cuándo se debe comenzar la restricción?. Evidentemente, si se hace en individuos en edad de crecimiento y desarrollo, ello podría alterar estos parámetros.

Resultados de Yu et al expresan que en ratas es suficiente comenzar la restricción a partir de las 6 semanas (vida adulta jóvenes).

Tercera cuestión: ¿Cuál es el mecanismo?.

Sacher: la restricción en la ingesta retrasa el envejecimiento reduciendo el índice metabólico por unidad de masa corporal. Sin embargo, el gasto energético diario (Kcal/Kg masa magra) no está disminuido en las ratas con restricción. Se debe a la disminución de la masa corporal que se produce con la restricción, de forma que permanece estable el gasto energético.

La hipótesis de la cascada de glucocorticoides del envejecimiento fué propuesta por Sapolsky, 1986. Esta hipótesis propone que uno de los principales factores en el envejecimiento de ratas es una pérdida de la retroregulación de los glucocorticoides plasmáticos debido a cambio en las neuronas del hipocampo. Por lo tanto, al avanzar la edad se produce un hiperadrenocorticismos, que es el responsable de las características del fenotipo del viejo: inmunosupresión, osteoporosis y alteraciones mentales.

Esta hipótesis ha sido rechazada posteriormente.

Hipótesis de disminución de la glucemia y glucoamilación (Masoro)

Las ratas con restricción tenían concentraciones de glucosa plasmática media en 24 horas unos 15 mg/dl más bajas que las ratas con alimentación libre. La concentración de glucemia es uno de los factores determinantes de la glucoamilación de proteínas que se ha demostrado que tiene consecuencias nocivas y que sería el mecanismo subyacente en el envejecimiento. Además las ratas con restricción tenían niveles de insulina plasmática en concentraciones más bajas. Reaven ha demostrado que la hiperinsulinemia puede tener consecuencias nocivas, ya que favorece la aterogénesis.

También la composición de la dieta podría jugar un papel, ya que se ha demostrado, tanto en estudios animales como en humanos, mediante técnicas de clamp glucémico o con el modelo mínimo, que el porcentaje de carbohidratos y de fibra de la dieta se correlacionan directamente con la sensibilidad a la insulina, y que el porcentaje de grasas inversamente.

También es posible que la restricción proteja a los animales de la acción dañina de los radicales libres. Puede deberse a una producción disminuída de estas moléculas ó un aumento de la capacidad de metabolizarlas por la acción de enzimas como la suuperóxido dismutasa y catalasa, a un aumento de capacidad para reparar el daño, o a una combinación de todas ellas.

En este momento, es evidente que la restricción energética es un buen modelo experimental. Sin embargo no debe recomendarse de forma generalizada, ya que no están claros los riesgos y beneficios a la población anciana, pero abre el camino a futuras investigaciones.

5.4. CARENCIA DE HIERRO Y EJECUCION MENTAL

Leopoldo VEGA
Dpto. Epidemiología
Facultad de Medicina
México

Quisiera en primer término agradecer al Real Patronato para la Prevención y Atención de Personas Minusválidas, hacer factible mi participación en este Simposium, conjuntamente con mi querido maestro D. Joaquín Cravioto. Expondré a uds. la información actual acerca del efecto de la deficiencia de hierro sobre el desarrollo mental.

A la luz de las evidencias acumuladas en años recientes, - que indican cierta asociación entre la deficiencia de hierro y un retraso en la adquisición de las habilidades psicomotrices de los niños, esta enfermedad adquiere particular - importancia como problema de salud pública; cabe señalar que la Organización Mundial de Salud (OMS) estima que en - los países en vías de desarrollo cuatro de cada diez niños menores de 5 años, padecen de anemia por carencia de hie - rro.

Aun cuando la importancia que ordinariamente se le da al - hierro en la salud del hombre, se contempla en términos de la anemia que se genera por la carencia de este elemento en la dieta, cabe reconocer que la enfermedad se acompaña de - múltiples manifestaciones clínicas, que de manera directa, o indirecta, obedecen a la falta de hierro en la alimenta - ción.

Si se considera que este mineral interviene en la composi - ción química de varias enzimas, es fácil comprender que en condiciones de carencia haya ciertas alteraciones en algu - - nos sistemas enzimáticos . A un lado de la presencia del

hierro en la hemoglobina y la mioglobina, se le encuentra tambien en algunas enzimas oxidativas como: la citocromo--oxidasa C, la monoamino-oxidasa, la oxidasa xantínca, la --oxidasa alfa glicerofosfato y en las catalasas; actua como cofactor de la aconitasa, y participa activamente en la sín^utesis de los ácidos nucléicos. Es por esta razón que el -hierro no solo es un elemento indispensable para el trans--porte de oxígeno por los eritrocitos, sino que contribuye al funcionamiento de diversos ámbitos biológicos del orga--nismo. Si se revisan los signos y síntomas de las perso -nas afectadas por anemia ferropriva, llama la atención la di--versidad de manifestaciones clínicas; ésto hace pensar que la deficiencia cobra importancia en diferentes organos y -sistemas, y no unicamente en el área cardio pulmonar.

Para quienes nos dedicamos a preservar y promover la salud de los niños, es de interes la elevada prevalencia de ane--mia por deficiencia de hierro en las mujeres embarazadas. A este respecto, la UNICEF estima que 60 por ciento de las mujeres de los países en desarrollo, cursan sus embarazos con anemia, mientras que en las naciones industrializadas esta frecuencia es de 15 por ciento.

Cabría, pues, formular la siguiente pregunta: ¿qué importanucia tiene el hierro en el desarrollo y crecimiento de los -niños?. De acuerdo con las experiencias de Winddowson y -Spray (1), durante la etapa intrauterina se establece una -estrecha relación directa entre el crecimiento corporal y la cantidad de hierro que se incorpora a los tejidos orgániucos; en una gráfica de correlación, la pendiente de regre--sión de estas dos variables casi coinciden con la bisectriz del ángulo recto. Al nacer los niños, al tér^umino de la gesutación, tienen cerca de 280 mg de hierro corporal.

Hace ya algún tiempo, teníamos interes por estudiar el imupacto que pudiera tener la deficiencia de hierro so-

bre el crecimiento intrauterino del encéfalo. con esta finalidad nos dimos a la tarea de reproducir experimentalmente esta enfermedad en ratas y al mismo tiempo tomamos un grupo de animales como control (2). Al nacer las ca ma das fue factible reconocer que el crecimiento corporal de las crias de las madres anémicas, había sido significativamente menor que el observado en los animales nacidos en el grupo control. Una vez sacrificadas las crias se determinó, en un homogeneizado del encéfalo, la concentración de los ácidos deoxiribonucléico (DNA) y ribonucléico (RNA), así como las proteínas totales; los resultados mostraron diferencias significativas al comparar los promedios obtenidos en ambos grupos (ver cuadro 1). La menor concentración de DNA en las crias del grupo experimental se consideró como indicador de la presencia de un menor número de neuronas en el encéfalo, por efecto de la deficiencia de hierro en la fase del crecimiento por hiperplasia del tejido nervioso.

Si es válido extrapolar estos hallazgos al hombre, era razonable pensar en la posibilidad de que la disminución en el número de neuronas afectara, de alguna manera, el desarrollo psicomotriz de los niños. Movidos por éste interés, en 1978, Oski y Honing (3) investigaron el cambio que ocurría al aplicar la prueba de Bayley a niños lactantes deficientes en hierro; con esta finalidad valoraron el desarrollo psicomotriz de los niños, antes de recibir hierro por vía intramuscular y una semana después de haber sido tratados. Los resultados obtenidos en estos niños los compararon con los de un grupo que permaneció como control. A pesar de que en las dos evaluaciones el cociente de desarrollo (CD) se ubicó en el ámbito de lo normal, los puntajes obtenidos por los niños que recibieron el hierro aumentaron de manera significativa después de ser tratados.

Varios investigadores (4-8) confirmaron estos hallazgos ampliando sus observaciones a niños preescolares; las contri-

buciones de todos ellos permitieron reafirma que los niños deficientes mejoran en su desarrollo psicomotriz, después de recibir hierro.

En los escolares anémicos no parecen ocurrir, después del tratamiento, cambios en el cociente intelectual (9), pero mejoran en algunas de sus funciones cognitivas (10), en su rendimiento escolar y en su capacidad de aprendizaje(11). Así, todo parece indicar que la deficiencia influye desfavorablemente sobre el sistema deparminérgico (12) interfiriendo en el proceso de maduración del sistema nervioso central y alterando la evolución de algunas de las funciones psicomotrices y cognitivas de los niños.

En esta línea de investigación nos interesó estudiar el efecto de la carencia de hierro sobre la capacidad de atención de los niños escolares. Nuestra preocupación se fundamentó en el hecho de que actualmente cursan sus estudios primarios 10,000,000 de niños mejicanos y, de acuerdo a varios estudios epidemiológicos, alrededor de 18 por ciento de ellos tienen cifras de hemoglobina compatibles con anemia; tal estimación plantea la posibilidad de que 1,800,000 niños tengan anemia por deficiencia de hierro que eventualmente puede interferir con su capacidad para mantener la atención, mermando así su rendimiento escolar

Para responder a nuestras inquietudes se investigaron, desde el punto de vista hematológico, 169 escolares entre 6 y 11 años de edad; con los resultados de laboratorio se clasificaron en tres grupos: sanos, deficientes y deficientes en hierro con anemia. Sin saber aún los resultados de laboratorio se aplicaron a cada uno de ellos cuatro pruebas de atención.

A los niños deficientes, se les dió tratamiento con hierro por 12 semanas y a los sanos se les proporcionó la recomendación diaria de este mineral. Al término de las 12 semanas fueron revalorados con las pruebas de atención.

En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos con la prueba de "laberintos"; como se puede apreciar, los niños sanos no mostraron cambios significativos en el número de puntos ni en el tiempo que precisaron para realizar la prueba, antes y después del tratamiento. De manera opuesta, -- los escolares deficientes, con y sin anemia, tuvieron cambios favorables después de haber sido tratados con sulfato ferroso. Una observación semejante fué hecha al analizar los resultados del subtest de "claves", de la prueba de -- Wechsler para niños (WISC); en el cuadro 3 se puede observar que un número significativo de niños anémicos, mejoraron sus puntajes cuando la anemia desapareció.

El cambio favorable acontecido en los puntajes registrados por los niños deficientes, y el hecho de que en los niños sanos este cambio no sea significativo, permite inferir que la carencia de hierro interfiere con la capacidad de atención. La trascendencia de estos hallazgos es suficiente -- para fundamentar el desarrollo de programas de enriquecimiento de alimentos con hierro y el empleo de estos alimentos en los programas de desayunos escolares.

1. Widdowson EM, Spray CM: Chemical development in utero. Arch Dis Child 1951;26:205-212.
2. Vega Franco L, Ojeda RF, Jiménez CE: Hiposiderosis y - crecimiento intrauterino del encéfalo. Rev Inv Salud Pública 1976; 36:151-154.
3. Oski FA, Honing AS: The effects of therapy on the - - development scores of iron-deficient infants. J Pediatr 1978; 92:21-25.
4. Lozoff B, Brittenham GM, Viteri FE, Wold AW, Urrutia - JJ: Developmental deficits in iron-deficiency infants: Effects of age and severity of iron lack. J Pediatr -- 1982; 101:948-952.
5. Oski FA, Honing AS, Helu B, Howanitz P: Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron- - deficiency infants. Pediatrics 1983; 71:877-880.
6. Walter T, Kovaloskys J, Stakel A: Effects of mild iron deficiency on infants mental development scores. J - Pediatr 1983; 102:519-522.
7. Aukett MA, Parks YA, Scott PH, Warthon BA: Treatment with iron increases weight gain and psychomotor - - development. Arch Dis Child 1986; 61-849-857.
8. Lozoff B, Brittenham GM, Wolf AW et al: Iron deficiency anemia and iron therapy effects on infants development test performance. Pediatrics 1987;79:981-995.
9. Pollitt E, Hathirat P, Kotchabhandki NJ, Missell L, Valyyasevi A: Iron deficiency and educational achievement in thailand. Am J Clin Nutr 1989;50:687-697.
10. Soemantri AC, Pollitt E, Kim I: Iron deficiency anemia and educational achievement. Am J Clin Nutr 1985; 42: 1221-1228.
11. Seshadri S, Gopaldas T: Impact of iron supplementation on cognitive function in preschool and school-age children: The indian experience. Am J Clin Nutr 1989; 50:675-686.
12. Youdim M B H, Yehuda S, Ben Shachar D, Ashkenazi R: Behavioral and brain biochemical changes in iron-deficient rats: The involvement of in dopamine receptor function. En: E. Pollit, R.L. Leible: Iron deficiency: Brain - Biochemistry and behavior. New York: Raven Press 1982: 39-56.

CUADRO 1

CRECIMIENTO INTRAUTERINO DEL ENCEFALO
EN CRIAS DE RATAS ANEMICAS

VARIABLES	GRUPO EXPERIMENTAL		GRUPO CONTROL	
	\bar{X}	(s)	\bar{X}	(s)
Peso Corporal (g)	5.41	(0.93)	5.84	(0.42)*
Proteínas (ug)	0.23	(0.03)	0.24	(0.01)*
DNA (ug)	732.00	(93.9)	799.4	(29.6)*
RNA (ug)	544.30	(73.7)	766.8	(76.5)*
Proteínas/DNA	14.50	(2.8)	19.5	(2.0)*

* $p < 0.05$

Fuente: Vega Franco L, Ojeda R F, Jiménez CE:

Hiposiderosis y crecimiento intrauterino del
encéfalo. Rev Inv Salud Pública (Méx) 1976;
36:151-159.

CUADRO 2

CAMBIOS HABIDOS EN EL PUNTAJE Y EL TIEMPO REQUERIDO PARA RESOLVER LA PRUEBA DE LABERINTOS (WALTHER), DESPUES DE ADMINISTRAR A LOS NIÑOS SULFATO FERROSO.

C A M B I O S E N P U N T A J E	C A M B I O S E N T I E M P O					
	Niños sanos		Niños deficientes		Niños anemicos	
	menos	más	menos	más	menos	más
<u>Favorables</u>						
Con puntaje máximo	44	13	11	1	16	2
Aumento en puntos	14	0	5	1	3	1
<u>Desfavorables</u>						
Disminución en puntos	16	5	2	2	1	3
<u>Sin cambio</u>	3	1	0	1	0	0
<u>Total:</u>						
Cambios favorables+	58	13	16	2	19	3
Cambios desfavorables++ y sin cambio	19	6	2	3	1	3
Valor de X^2	0.38		5.50*		7.18**	

+ Tendencia líneal: $X^2=0.43$ ($p > 0.05$)

++ Tendencia líneal: $X^2=5.16$ ($p < 0.02$)

* $p < 0.02$

** $p < 0.01$

CUADRO 3

DISTRIBUCION DE NIÑOS ESCOLARES CON RESPECTO A LA MEDIANA DE PUNTAJES OBTENIDOS CON EL SUBTEST DE CLAVES (WISC), ANTES Y DESPUES DE RECIBIR SULFATO FERROSO.

A N T E S	DESPUES		X ²
	≥ Md	< Md	
<u>Sanos</u>			0.00
< Md	18	29	
≥ Md	16	47	
<u>Deficientes en hierro</u>			0.03
< Md	2	9	
≥ Md	13	1	
<u>Deficientes anémicos</u>			6.40*
< Md	9	7	
≥ Md	12	1	

Antes: < Md = 10

Despues: ≥ Md = 11

* p < 0.02 (McNemar)

6. DEFICIENCIA DEBIDA A HIPOTIROIDISMO

6.1. AVANCE DE LOS CONOCIMIENTOS DE
LAS MINUSVALIAS CAUSADAS POR LA
DEFICIENCIA DE YODO

Francisco ESCOBAR DEL REY
Dpto. Endocrinología Experimental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
CSIC y Fac. Medicina
Universidad Autónoma
Madrid

"Sólo el hombre familiarizado con el arte y la ciencia del pasado está preparado para ayudar a su progreso en el futuro" (Theodore Billroth).

En la década que ha transcurrido desde que el Real Patronato nos concedió el primer Premio Reina Sofía se ha avanzado considerablemente en todos los temas de que constaban las investigaciones premiadas en aquella ocasión. Nuestro grupo ha publicado desde entonces 46 artículos en revistas científicas, internacionales en su mayoría, y 24 capítulos y revisiones solicitadas desde el extranjero relacionados con nuestros temas de trabajo. Se han realizado además 6 tesis doctorales.

Personalmente, y sobre el tema "Avance en los conocimientos de las alteraciones debidas a deficiencia de yodo", presento de forma muy resumida los estudios que se han realizado últimamente en España. Estos demuestran que en muchas zonas de la mayoría de la Autonomías en que está dividida la Nación sigue encontrándose bocio endémico, indicador de deficiencia de yodo (DY). Se trata de estudios realizados a partir de 1987 y por tanto posteriores a los incluidos en el volumen 34, suplemento 2, de la revista Endocrinología, 1987, número que fue reeditado en parte como documento 20/89 por el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía. Se han realizado desde entonces un cierto número de estudios epidemiológicos en los que se ha evaluado la prevalencia de bocio y algunas otras consecuencias de la DY, y que ya han sido resumidos en un Editorial publicado recientemente en la misma

revista (1). Parece pertinente volver a exponer aquí las conclusiones: La DY está aún muy extendida por toda España, siendo en la mayoría de las zonas afectadas de grado I ó II de gravedad, aunque queden algunas zonas en que la DY es tan intensa, que hay que considerarla como de grado III. En estas poblaciones hay riesgo de que nazcan individuos con cretinismo neurológico, y de que haya más niños con hipotiroidismo congénito permanente, o transitorio. En todos estos estudios se ha medido la ingestión de yodo de forma indirecta valorando la concentración de yodo en orina, encontrándose que es baja. Sucede esto a pesar de que se dispone de sal yodada en el mercado desde el año 1982, de lo que se deduce que su consumo no ha sido promocionando adecuadamente y no ha penetrado en las regiones donde más se necesita. La asociación de salineros de España nos ha informado de que la producción anual de esta sal se ha estabilizado en unas 16.200 tm, lo que representa tan sólo el 12% de toda la sal de cocina que se produce; no se produce más sal yodada porque no hay más demanda. En algunas Autonomías se ha hecho obligatorio por decreto el condimentar con sal yodada la comida que se prepara en los comedores escolares y demás establecimientos que reciben subvenciones de los gobiernos autonómicos. Pero los datos obtenidos indican que el yodo extra ingerido así en una sola comida condimentada con sal yodada, da lugar a un aumento de la yoduria, pero no es suficiente para erradicar la endemia cuando ésta era de grado II ó III. La cantidad de yodo excretada en la orina de los escolares gallegos que reciben la comida escolar condimentada con sal yodada se encuentra alrededor de los 100 ug por litro, pero siguen teniendo bocio, ya que para erradicar la deficiencia pre-existente habría que alcanzar la cifra de 150-200 ug. Actualmente se recomienda que las mujeres que van a ser madres tomen más de los 200 ug por día, para que el tiroides del feto en formación se encuentre con abundante yodo disponible, y para que el recién nacido siga recibéndolo durante la lactancia. Debe promoverse que ésta sea materna, ya que muchos preparados de leche humanizada no contienen yodo suficiente.

La corrección de la deficiencia de yodo, que en general afecta a toda España, tendría indudables y generalizados efectos positivos. La desaparición del bocio no es ni el fin único ni el más importante a perseguir, sino que lo es la erradicación de las otras secuelas de la deficiencia de yodo, tanto más graves cuanto mayor sea la carencia y cuanto más tempranamente se comience a padecer, tal y como se resume en el Cuadro que sigue.

Espectro de Alteraciones por Deficiencia de Yodo (Iodine Deficiency Disorders, IDD)

Periodo biológico	alteración
Feto	abortos nacidos muertos anomalías congénitas mayor mortalidad perinatal mayor mortalidad infantil cretinismo neurológico deficiencia mental sordo-mudez diplejia o tetraplejia espástica estrabismo cretinismo mixodematoso enanismo deficiencia mental
Recien nacidos	defectos psicomotores bocio neonatal hipotiroidismo neonatal
Niños y adolescentes	bocio hipotiroidismo juvenil deterioro de las facultades mentales retraso en el desarrollo somático
Adultos	bocio y sus complicaciones hipotiroidismo deterioro de las facultades mentales hipotiroidismo imputable a carencia de yodo

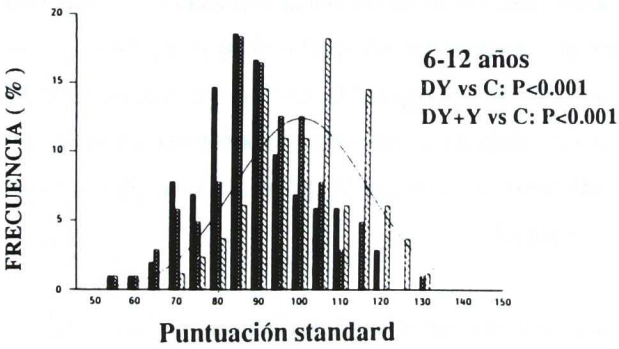
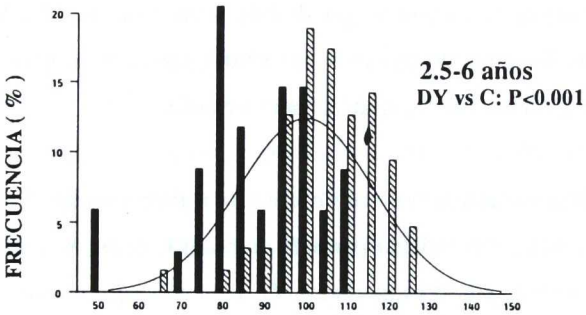
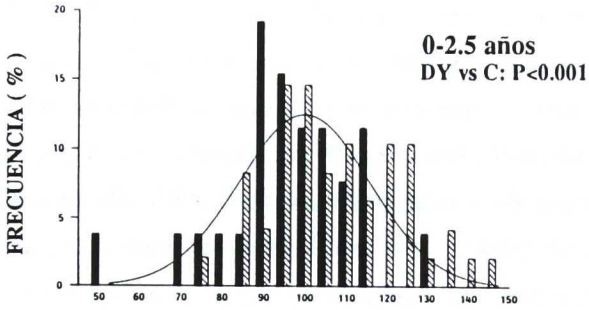
Aparte todas estas alteraciones, el padecer esta deficiencia hace que toda la patología tiroidea sea más frecuente, ya que según han puesto en claro los estudios de Studer (2) la celularidad del tiroides está condicionada por la cantidad de yodo que recibe el feto durante la formación de la glándula. Las células epiteliales del folículo, o tirocitos, no son monoclonales sino policlonales, y en su respuesta a los diversos estímulos de crecimiento y mitosis actúan de forma distinta en unos y otros folículos. Resulta de ello que, ante una situación de carencia de yodo, comienzan a dividirse más rápidamente aquellas células que tienen más sensibilidad a dicha carencia, formando nuevos folículos hasta dar lugar a hiperplasia e hipertrofia del tiroides (bocio). Si se prolonga la situación de deficiencia de yodo llegan a formarse nódulos, y algunos

de estos sufren procesos hemorrágicos en su interior, porque los capilares no han podido seguir proliferando al par que lo hacían las células foliculares.

Es en el época fetal cuando la DY produce las alteraciones más importantes y trascendentes, y de estas la más dramática es la conocida como cretinismo endémico, cuadro éste que en su modalidad neurológica es irreversible ya al nacimiento. El dramatismo de la situación resulta aún más evidente desde que se demostró que el nacimiento de cretinos neurológicos es fácilmente evitable si se corrige la DY, tal y como fue la experiencia clara de los investigadores australianos en Papua Nueva Guinea (3). El cuadro clínico completo del cretinismo endémico es tan abigarrado, que Marañón postulaba un origen pluriglandular de esta afección. Hoy sabemos que no es así, y que, como acabó de indicar, deja de presentarse cretinismo endémico neurológico si se corrige la DY de las madres antes de que se queden embarazadas. El cuadro puede presentarse de forma incompleta, con la aparición únicamente de síntomas aislados. La deficiencia mental profunda, la sordomudez, la diplegia o tetraplegia espástica, o el estrabismo, pueden presentarse aislados, tal y como se ha documentado en Suiza durante el proceso de corrección de la DY (4). Aparte lo publicado sobre cretinismo endémico en las Hurdes (5), no sabemos que se hayan publicado otras observaciones similares en España en los últimos años, y es probable que el cuadro parcial pueda encontrarse aún, pero pase desapercibido al médico de familia e incluso al especialista endocrinólogo, si éstos no conocen bien los marcadores neurológicos para identificarlo.

Creemos que actualmente la peor manifestación de la DY, tal y como aún se da en España, es la que se manifiesta en los niños de apariencia normal que, como demostramos en los escolares de las Hurdes, tienen afectado tanto su desarrollo psicomotor como su capacidad intelectual (6). Resultados similares a estos de las Hurdes han sido obtenidos por el Dr. Tojo y colaboradores en zonas de Galicia, en las que había una prevalencia de bocio muy semejante a la que se había encontrado en las Hurdes. Nuestros resultados se presentaron en el simposio "Iodine and the Brain" en 1989 (7) y se resumen en la Figura 1. En esta aparecen las distribuciones de frecuencia de las puntuaciones obtenidas por los niños estudiados, divididos en tres grupos según su edad, de una zona control, una con DY, y otra con DY que había recibido yodo en forma de Lipiodol tres años antes (DY+Y). Los controles eran niños que

DESARROLLO INTELECTUAL



▨ Control (C) ■ Deficiente en yodo (DY)
■ Deficiente en yodo tras Lipiodol (DY + Y)

tenían la misma situación socio-cultural, pero una mejor nutrición de yodo. Esta sin embargo no era óptima, por lo que presentaban una prevalencia de bocio del 19%. La prevalencia de bocio en las zonas DY era muy superior, del 66%, habiendo disminuído al 33% en los DY+Y. Había una diferencia altamente significativa en el desarrollo intelectual de los niños DY frente a los controles, desde la edad más temprana, y esta diferencia ya no se corrigió con la administración de Lipiodol a los escolares. El porcentaje de niños que se encuentra en las categorías límite (coeficiente de desarrollo mental entre 70 y 79), sumado al porcentaje con retraso mental más grave (coeficiente de desarrollo mental inferior a 70) es el 11,6% en el grupo más joven, el 20,6% en el grupo de edad intermedia y el 21,5% en el grupo de edad mayor. Esto contrasta dramáticamente con los correspondientes porcentajes en la zona control, 2,1 1,6 y 1,6%, respectivamente. Resultan desoladores estos hallazgos si se tiene en cuenta que habría bastado el cocinar habitualmente con sal yodada para evitarlo.

Otras alteraciones debidas a la DY, como son una mayor frecuencia de abortos, nacidos muertos, anomalías congénitas, mortalidad perinatal e infantil, se hacen más evidentes después de haber corregido la deficiencia. Como dice J.T. Dunn (7) en un editorial reciente "La suplementación con yodo disminuyó a la mitad la incidencia de sordera congénita en Suiza, aumentó la supervivencia y el peso de los recién nacidos en Zaire, previno el cretinismo y disminuyó la mortalidad infantil en Papua Nueva Guinea, mejoró el rendimiento escolar en Ecuador y aumentó la educabilidad y producción económica en el noreste de China. Estos dramáticos resultados muestran que corregir la DY es una inversión altamente rentable tanto en salud como en desarrollo social".

En Alemania, donde también persiste la deficiencia de yodo, especialmente en el sur, se ha calculado que el exceso de patología debida a la no existencia de una profilaxis con yodo, le cuesta al Estado unos 200.000 D M diarios, por lo que desde hace varios años se está promocionando allí vigorosamente el consumo de sal yodada (8). La OMS, La UNICEF, las Sociedades Internacionales de Tiroides urgen a todos los Estados como el nuestro a la promoción del consumo de sal yodada y a tomar medidas de vigilancia continuada para conocer el estado de nutrición en dicho oligoelemento y corregir su deficiencia, porque de otra manera no se podrán erradicar las alteraciones por deficiencia de yodo. Este es uno de los objetivos

prioritarios del Plan "Salud para todos en el Año 2000", ya que en el momento actual hay entre 800 y 1000 millones de personas con riesgo de padecer las secuelas de la DY en mayor o menor grado.

Una de las primeras publicaciones sobre bocio y cretinismo en España se debe al Dr. Federico Rubio y Galí quien en 1899 los describía en el Principado de Asturias. El denunciaba a la enfermedad calificándola de social. España tiene ahora un Ministerio de Asuntos Sociales y parece indudable que la corrección de la deficiencia de yodo tendría unos resultados sociales extraordinariamente beneficiosos.

Esta es la conclusión a la que se ha llegado internacionalmente. Al establecer una iniciativa de 5 millones de dólares para promover la lucha contra la deficiencia de yodo y vitamina A en los países en subdesarrollo, Monique Landry, Ministro de Relaciones y Desarrollo Internacionales de Canadá declaró que "la deficiencia de yodo dificulta el desarrollo mental de innumerables millones de niños. Este anuncio pone de manifiesto la preocupación de Canadá por aquellos que se ven afectados con mayor intensidad por las deficiencias nutricionales: los niños". Esta decisión fue tomada en Canadá para iniciar el cumplimiento de los compromisos adquiridos por su Primer Ministro en la Cumbre para la Infancia, celebrada en Nueva York en Octubre de 1990. Este compromiso también fue suscrito por el Gobierno de España. Es de señalar que en Canadá no hay bocio endémico, y en España sí.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar. Iodine deficiency in Spain: A continuing concern. *Endocrinología* 39, 171-175, 1992.
- 2.- H. Studer y F. Gebel. Simple and nodular sporadic goiter. En: *Werner's The Thyroid*. S. H. Ingbar y L. E. Braverman (eds.), Lippincott Co, Filadelfia, 5ª edición, 1986.
- 3.- P.O.D. Pharoah, I. H. Butfield y B. S. Hetzel. Neurological damage to the fetus resulting from severe iodine deficiency during pregnancy. *Lancet* 1: 308-310, 1971.
- 4.- H. Burgi. How Switzerland eliminated IDD with iodized salt. *IDD Newsletter* 7: nº3, 1991.
- 5.- F. Sánchez Franco, L. Ferreiro Alaéz, L. Cacicedo, M. D. García, G. Morreale de Escobar, y F. Escobar del Rey. Alteraciones por deficiencia de yodo: III. Cretinismo. *Endocrinología* 34: 88-94, 1987.
- 6.- I. García, C. Rubio, E. Alonso, C. Turmo, G. Morreale de Escobar y F. Escobar del Rey. Alteraciones por deficiencia de yodo en las Hurdes: II. Evaluación del desarrollo psicomotor de escolares. *Endocrinología* 34: 74-84, 1987.
- 7.- N. Bleichrodt, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar, I. García y C. Rubio. Iodine Deficiency: Implications for mental and psychomotor development in children. En: *Iodine and the brain*. G. R. DeLong, J. Robbins y P. G. Condliffe (eds.) Plenum Press, New York, 1989.
- 8.- J. T. Dunn. Iodine deficiency: The next target for elimination? *New Engl. J. Med.* 326: 267-268, 1992.
- 9.- P. Pfannenstiel. Direct and indirect costs caused by continuous iodine deficiency. En: *Thyroid disorders associated with Iodine Deficiency and Excess*. R. Hall y J. Kobberling (eds.), Raven Press, New York, 1985.

6.2. TRANSFERENCIA MATERNO-FETAL DE
HORMONAS TIROIDEAS EN EL HIPOTIROIDISMO Y LA
DEFICIENCIA DE YODO

Gabriella MORREALE
Dpto. Endocrinología Experimental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
CSIC y Fac. Medicina
Universidad Autónoma
Madrid

Hay tres situaciones principales en las que hay una relación casual entre una alteración de la función tiroidea y retraso mental.

La más grave es la que se da en casos de carencia extrema de yodo en los alimentos (zonas de bocio endémico), situación caracterizada por el nacimiento de cretinos neurológicos. El cretinismo neurológico es ya irreversible para cuando nace el niño, y únicamente puede prevenirse evitando la deficiencia de yodo antes del comienzo del embarazo, o muy al principio del mismo.

En caso de que el feto tenga función tiroidea nula o disminuída (hipotiroidismo congénito), también se produce retraso mental si no se detecta y trata a tiempo, pero no se presentan la mayoría de las lesiones neurológicas más graves encontradas en el cretinismo neurológico por deficiencia de yodo. Además, la deficiencia mental del hipotiroideo congénito se puede evitar tratándole con tiroxina (T4) desde el nacimiento.

También se ha observado que las mujeres con niveles bajos de T4 (libre) durante el embarazo (hipotiroxinemia materna) tienen más alto riesgo de tener hijos con un cociente intelectual disminuído que aquellas en las que se corrige esta situación mediante administración de T4.

En las tres situaciones el daño al sistema nervioso central se produce durante fases cruciales del desarrollo del mismo. Si bien podía explicarse que la falta de función tiroidea del feto podría dar lugar a daño cerebral, el daño permanente observado en casos de hipotiroxinemia materna resultaba más difícil de comprender, así como el hecho de que en situación de deficiencia de yodo el daño neurológico fuese más grave que en el hipotiroidismo congénito. Para comprender estas situaciones se hacía necesario involucrar la función tiroidea materna, ya que tanto las mujeres hipotiroxinémicas como las deficientes en yodo tienen niveles bajos de T4 durante el embarazo. Pero existía la creencia generalizada de que la placenta de los mamíferos es impermeable a las hormonas tiroideas, T4 y T3 (tri-yodotironina), por lo que las hormonas maternas no llegarían al feto. Decidimos revisar a fondo las bases sobre las que se asentaba esta creencia. Los trabajos principales sobre los que se basa el presente resumen aparecen al final del mismo (1-13). Son el fruto del esfuerzo constante de un grupo, durante más de una década. Se han obtenido gracias al desarrollo de radioinmunoensayos de alta sensibilidad para la valoración de T4 y T3, la validación de

procesos de extracción de tejidos embrionarios, el desarrollo de métodos para el ensayo de la actividad de los enzimas desyodantes de T4 a T3 (5'D), y la utilización de técnicas de equilibración isotópica. Los experimentos se han llevado a cabo en ratas, que tienen una placenta del mismo tipo que la humana.

Con esta metodología hemos intentado contestar las siguientes preguntas:

- 1) ¿Hay T4 y T3 en tejidos embrionarios con anterioridad al comienzo de la función tiroidea del feto?
 - 2) De ser así, ¿son de origen materno?
 - 3) ¿Dejan de pasar T4 y T3 de la madre al feto cuando éste ya tiene función tiroidea?
 - 4) ¿Qué papel juegan la T4 y T3 maternas? Para explorar este punto se han estudiado las siguientes situaciones:
 - a) Disminución de la función tiroidea materna
 - b) Disminución de la función tiroidea fetal
 - c) Disminución de ambas, escogiendo para ello la deficiencia de yodo.
- 1) Se ha demostrado que hay T4 y T3 en tejidos embrionarios desde mucho antes de que se desarrolle el tiroides fetal.
 - 2) Asimismo, se encontró que cuando la madre es hipotiroidea, las concentraciones de T4 y T3 en tejidos embrionarios son indetectables, confirmando el origen materno de ambas hormonas. Este hallazgo contradice la idea de que el embrión no necesita de hormonas tiroideas durante su desarrollo inicial, basada exclusivamente en la hipótesis de que éstas no le llegan de la madre. Otros autores han encontrado receptor nuclear para T3 en dichas fases tempranas, y con ello se abre la necesidad de identificar los procesos biológicos que se derivan de la interacción entre la hormona y su receptor durante fases diversas de la embriogénesis.
 - 3) Hemos podido demostrar que la aportación materna no se interrumpe con el comienzo de la actividad tiroidea del feto, sino que sigue hasta el final de la vida fetal. Hay datos recientes (14) que lo demuestran también para el hombre.
 - 4a) Cuando falta la aportación materna, pero el feto tiene una función tiroidea normal, hay un aumento compensatorio de la secreción de T4 y T3 por el tiroides fetal, que llega a suplir la carencia inicial de hormonas de procedencia materna. De esta forma las concentraciones de T4 y T3 en tejidos fetales son prácticamente normales para cuando

el feto llega a término. Sin embargo, los tejidos embrionarios y fetales han estado deficientes en T4 y T3 durante la mayor parte del desarrollo intrauterino. Esto puede contribuir al establecimiento de lesiones cerebrales permanentes observada en la progenie de madres hipotiroxinémicas.

- 4b) Cuando la función tiroidea materna es normal, pero no funciona adecuadamente el tiroides fetal, la aportación materna de T4 y T3 es suficiente para mitigar el hipotiroidismo fetal. No es suficiente para suplir totalmente la falta de función tiroidea del feto, pero es crucial para el cerebro. Así la T4 materna es suficiente para la protección preferente del cerebro fetal, en el que se llegan a encontrar concentraciones normales de T3 (que es la forma intracelularmente activa), aunque no sea suficiente para prevenir esta deficiencia en otros tejidos. La T3 materna, sin embargo, no mitiga la deficiencia en T3 del cerebro fetal. Hemos demostrado que esto se debe a que el cerebro fetal depende totalmente de la conversión de T4 a T3 por acción local de la 5'D- II, no pudiendo obtener T3 directamente del plasma. Esto pone de relieve la importancia de concentraciones normales de T4 en la madre, ya que ésta protege al cerebro del hipotiroideo congénito hasta el momento del nacimiento. Se explica así que no suelen producirse lesiones profundas e irreversibles hasta después del nacimiento, momento a partir del cual ya no hay protección materna. Esto pone de relieve la importancia de los programas de detección precoz, y del comienzo rápido del tratamiento. Asimismo, estos hallazgos explican porqué en caso de hipotiroxinemia materna no se protege el cerebro fetal, aunque haya niveles séricos normales de T3 en la madre y no aparezcan signos clínicos de hipotiroidismo.
- 4c) Cuando son anormales tanto la función tiroidea materna como la fetal por carencia de yodo, las madres tienen concentraciones muy bajas de T4, aunque normales de T3. En esta situación los embriones y fetos son deficientes en T4 a lo largo de toda la gestación y van siendo cada vez más deficientes en T3. Cuando empieza a funcionar su tiroides, no pueden compensar la falta de T4 y T3 de procedencia materna, ya que el tiroides fetal tampoco dispone de yodo. Tampoco hay protección por parte de la T4 materna, que es muy baja por el mismo motivo. Como consecuencia, los tejidos fetales, incluido el cerebro, son muy deficientes en T4 y T3 durante fases muy importantes de neurogénesis cerebral. Esto explicaría la gravedad de las lesiones encontradas en los cretinos neurológicos de zonas de bocio endémico y el hecho de que ya sean irreversibles cuando éstos nacen.

El conjunto de estos hallazgos sugiere fuertemente que, de manera contraria a lo que se afirmaba, el cerebro ya necesita de las hormonas tiroideas para su desarrollo armónico in utero. Muestran asimismo un importante papel de la T4 materna a lo largo de toda la gestación. Queda, sin embargo, por identificar qué procesos de desarrollo del sistema nervioso central son los regulados directamente por hormonas tiroideas.

Aunque aun no conocemos bien los mecanismos moleculares por los que las hormonas tiroideas regulan el desarrollo normal del cerebro, sí sabemos lo que hay que hacer para evitar la deficiencia mental y lesiones neurológicas debidas a hipotiroidismo congénito, hipotiroxinemia materna y deficiencia de yodo. En el primer caso hay que detectar el problema mediante programas de detección precoz de hipotiroidismo congénito e instaurar inmediatamente el tratamiento con T4. En el segundo caso, hay que identificar a las embarazadas con niveles bajos de T4 e instaurar el tratamiento adecuado para que estas tengan los niveles de T4 que corresponden a cada fase del embarazo. En el tercer caso hay que erradicar la deficiencia de yodo de la población. No hay, a fines del siglo XX, escusa científica, moral o económica alguna para que se sigan produciendo deficiencias por hipotiroidismo o deficiencia de yodo.

Referencias:

- 1) Obregón MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: Comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology* 102: 2145-2153, (1978).
- 2) Obregón MJ, Mallol J, Pastor RM, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 114: 305-307, (1984).
- 3) Morreale de Escobar G, Pastor RM, Obregón MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues. *Endocrinology* 117: 1890-1901, (1985).
- 4) Escobar del Rey F, Pastor RM, Mallol J, Morreale de Escobar G. Effects of maternal iodine deficiency on the L-Thyroxine and 3,5,3'-Triiodo-L-Thyroxine contents of rat embryonic tissues before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 118: 1259-1265, (1986).
- 5) Escobar del Rey F, Pastor RM, Mallol J, Morreale de Escobar G. Effects of maternal iodine deficiency on thyroid hormone economy of lactating dams and pups: Maintenance of normal cerebral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine concentrations in pups during major phases of brain development. *Endocrinology* 121: 803-811, (1987).
- 6) Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Escobar del Rey F. Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology* 122: 1521-1531, (1988).

- 7) Ruiz de Oña C, Obregón MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Development changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effects of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormones. *Ped. Res.* 24: 588-594, (1988).
- 8) Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Escobar del Rey F. Comparison of maternal to fetal transfer of 3,5,3'-triiodothyronine versus thyroxine in rats, as assessed from 3,5,3'-triiodothyronine levels in fetal tissues. *Acta Endocrinologica* 120: 20-30, (1989).
- 9) Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Hernández A, Calvo RM, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones and 5' deiodinase in rat brown adipose tissue during fetal life. *Am. J. Physiol.* 257: (Endocrinol. Metab. 20) E625-E631, (1989).
- 10) Morreale de Escobar G, Calvo RM, Obregón MJ, Escobar del Rey F. Contribution of maternal thyroxine to fetal thyroxine pools in normal rats near term. *Endocrinology* 126: (5) 2765-2767, (1990) *Endocrinology* 126: 2765-2767, (1990).
- 11) Calvo RM, Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. J. Congenital hypothyroidism, as studied in rats: Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *Clin. Invest.* 86: 889-899, (1990).
- 12) Ruiz de Oña C, Morreale de Escobar G, Calvo RM, Escobar del Rey F, Obregón MJ. Thyroid hormone and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation. Effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* 128: 422-432, (1991).
- 13) Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Calvo RM, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: Responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology*, 129: 2663-2673, (1991).
- 14) Vulmsa T, Gons MH, de Vijlder J. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *New Engl. J. Med.* 321: 13-16, (1989).

6.3. IMPORTANCIA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN
EL DESARROLLO DE LA MICROESTRUCTURA DE LA
CORTEZA CEREBRAL

Antonio RUIZ MARCOS
Unidad de Neuroanatomía
Instituto Cajal
CSIC
Madrid

Es un hecho ampliamente conocido que las hormonas tiroideas son necesarias para un correcto desarrollo del Sistema Nervioso Central. Eayrs fué uno de los primeros en plantearse la cuestión de cómo un déficit de esta hormona, provocado en época neonatal, pudiera afectar el normal desarrollo de la Corteza Cerebral, encontrando que, esta situación patológica producía un déficit en el número total de conexiones sinápticas y arborizaciones dendríticas, de las neuronas que constituyen esta región del cerebro (5,6).

Aunque todavía no está plenamente demostrado, hay muchos datos que indican que la inteligencia radica en la Corteza Cerebral. Dado que la falta de tiroxina durante el desarrollo afecta de manera notable la capacidad intelectual del individuo, no es absurdo pensar que esta carencia no sólo afecta a las neuronas corticales produciendo en ellas un déficit en ramificaciones dendríticas, sino a la estructura global de la Corteza Cerebral.

Sin embargo, la extraordinaria complejidad de la Corteza Cerebral, un Sistema formado por, se estima, $2,6 \times 10^9$ neuronas conectadas entre sí por miles o incluso millones, hace que al observar el neuropilo cortical de un animal que ha crecido en condiciones normales y de uno hipotiroideo, no se observe diferencia aparente alguna. Es más, una simple visión microscópica de este neuropilo, como el que se muestra en la parte de abajo de la Fig. 1, nos puede hacer pensar que su distribución es al azar, no obedeciendo a estructura determinada alguna, lo cual ciertamente es absurdo ya que, dada la armonía que los seres vivos muestran en su capacidad de tomar decisiones, nos debe hacer pensar que la estructura de la Corteza Cerebral y su desarrollo obedecen a un orden prefijado. Pero si ese orden existe debe haber una forma de definirlo y, dado que hasta el momento presente, la herramienta más potente que posee un científico para definir un orden son las matemáticas, debe haber una forma de encontrar una serie de ecuaciones que definan ese orden. Ese conjunto de ecuaciones con el que podríamos definir la estructura de la Corteza Cerebral y/o su desarrollo es lo que constituiría lo que se conoce como Modelo Matemático del desarrollo de la Corteza Cerebral.

Dada la extraordinaria complejidad antes mencionada de la Corteza Cerebral, sería ingenuo pensar que hoy estemos en disposición de poder conocer ese Modelo, pudiendo incluso afirmarse que es impensable el que esta estructura pueda ser descrita con un solo Modelo.

Pero la Corteza Cerebral, como la mayoría de los sistemas, está formada por subsistemas más simples, como el constituido por las neuronas piramidales (Fig. 1), que poseen una dendrita principal, o tallo apical que transcurre perpendicular a la superficie del cerebro, siendo todos ellos, paralelos entre sí.

A lo largo de estos tallos pueden apreciarse claramente la existencia de unas protuberancias (ver recuadro Fig. 1a) que, aunque fueron vistos por primera vez por Golgi (Purpura, comunicación personal), fueron considerados por este autor como meros artefactos de la tinción, siendo Cajal (3) el primero en considerar su importancia como elementos constitutivos de la neurona, definiéndolos como "espinas dendríticas". La genialidad de Cajal consistió en atribuirles una significación funcional esencial para el comportamiento de la neurona, algo que habría que esperar algo más de medio siglo y que las técnicas de estudio avanzaran, para poder ser confirmado. En 1959, Gray (8) haciendo uso de las técnicas de microscopía electrónica demostró que las espinas dendríticas era el sitio donde conectaban con las dendritas los axones aferentes a las neuronas. Posteriormente Colonnier (4), Peters (13) y Valverde (25) confirmaron que en esas espinas hacían conexión el 80% de las fibras aferentes específicas talamo-corticales, dato este último que acabó de confirmar la extraordinaria importancia funcional que para las neuronas tenían las espinas, como postuló Cajal hacia ya casi un siglo.

Una inspección simple del recuadro en la fotografía 1 nos hace pensar que las espinas dendríticas se distribuyen a lo largo de los tallos apicales sin orden alguno, lo cual, teniendo en cuenta su extraordinaria importancia para el correcto funcionamiento de la Corteza Cerebral parecía absurdo.



Fig. 1.- Neurona piramidal del area visual de la Corteza Cerebral de una rata de 30 días de edad, mostrando el paralelismo de sus tallos apicales. En el recuadro mostrado arriba a la derecha pueden apreciarse las espinas dendríticas distribuidas a lo largo del tallo apical. Pueden apreciarse las espinas dendríticas distribuidas a lo largo de un tallo apical. Método de Golgi rápido. Fotografía principal realizada en un fotomicroscopio con 100 aumentos en el original. Recuadro (a) tomada con 800 aumentos.

Por otra parte, hay que pensar que el hecho de que la correcta función de la Corteza Cerebral no se basa en el orden, más o menos exacto, con el que una serie de elementos estén distribuidos a lo largo de una sola neurona, sino en el orden con que se presentan en todo el conjunto de las mismas encargadas de realizar una función concreta.

Haciendo uso de esta idea se pensó que, si bien a lo largo de un sólo tallo apical no era posible encontrar el orden según el cual estaban distribuidas las neuronas, ello sí sería posible si se tenía en cuenta el valor medio que esta distribución tendría a lo largo de un conjunto suficientemente grande de tallos apicales. Teniendo esta idea presente y con el objetivo de averiguar si las espinas dendríticas se distribuían al azar a lo largo de los tallos apicales o si, por el contrario, esta distribución se realizaba de acuerdo a un cierto orden, se contaron el número de espinas que había en cada segmento de 50 μ . de longitud del tallo apical, medidos a partir del soma neuronal, en un total de 30 tallos apicales de neuronas piramidales de la capa V del área visual primaria de la corteza Cerebral de ratones de 40 días de edad, calculándose el valor medio de los valores obtenidos para cada segmento. Al colocar estos valores frente a la distancia al soma neuronal, se obtuvo una gráfica como la mostrada en la figura 2. Independientemente de cual pudiera ser el significado de una distribución de esta naturaleza el hecho importante encontrado es que, contrariamente a lo que se puede pensar, después de una simple inspección de la fotografía 1, las espinas dendríticas no se distribuyen al azar a lo largo de los tallos apicales de las neuronas piramidales de la Corteza Cerebral, sino de acuerdo con una cierta distribución, cuyo significado sería estudiado más adelante.

Había que demostrar que este tipo de distribución no era casual, para lo que había que encontrar cual era en animales de la misma especie (ratones en nuestro estudio) y de diferentes edades. Las distribuciones obtenidas, correspondientes a neuronas de ratones de edades comprendidas entre los 10 y los 80 días de edad, se demostró que eran del mismo tipo que la encontrada para animales de 40 días, con lo que, una vez formuladas las correspondientes hipótesis de trabajo pudo ser descrito el Modelo Matemático que describía de manera coherente las propiedades de esta distribución y las leyes que regían su desarrollo (23, 26).

Independientemente de la forma que pudieran tener estas ecuaciones, el hecho es que quedó demostrado que servían para describir la forma con que las espinas dendríticas se distribuían a lo largo de los tallos apicales de las neuronas piramidales de la Corteza Cerebral no sólo de ratones, sino de ratas, hamster, gato, mono (26) e incluso en el hombre (10) y no sólo a lo largo de los tallos apicales, sino también a lo largo de las dendritas basales de estas neuronas (26).

Este carácter de universalidad del Modelo Matemático hace posible que sus ecuaciones puedan ser tomadas como patrón de la distribución que las espinas dendríticas deben tener a lo largo de dendritas de las neuronas piramidales de animales normales. Conocido este patrón en forma matemática y las leyes que rigen su evolución, se pudo extrapolar y predecir cual sería la distribución de espinas en animales de edades aún no estudiadas, comprobándose posteriormente que la distribución predicha por el ordenador coincidía con la que se midió posteriormente (26).

Aunque este tipo de aplicación predictiva tiene ciertamente un valor de tipo práctico, posiblemente lo más interesante de encontrar un Modelo Matemático como el mencionado anteriormente, consiste en el hecho de que, una vez descrito y probado como válido, puede ser utilizado para estudiar cómo distintas situaciones experimentales o patológicas afectan el desarrollo de la conectividad sináptica de las neuronas piramidales de la Corteza Cerebral.

Así, por ejemplo, aunque era ya sobradamente conocido que el hipotiroidismo neonatal producía un deterioro en el desarrollo de la Corteza Cerebral (5,6,7) no se conocían las pautas según las cuales se producía este deterioro, ni la forma y zonas de la Corteza en que éste se manifestaba.

Haciendo uso del Modelo Matemático, ya definido y programado como útil de trabajo, fue posible definir cómo el hipotiroidismo inducido en rata mediante tiroidectomía quirúrgica en época neonatal producía, no sólo un descenso en el número total de espinas dendríticas existentes a lo largo de los tallos apicales de las neuronas piramidales, sino una distorsión importante de la distribución de las mismas (19) y cómo distintas terapias de sustitución con tiroxina, podrían hacer reversible este tipo de distorsión, pudiendo encontrarse las condiciones idóneas para que esta vuelta a la normalidad fuera

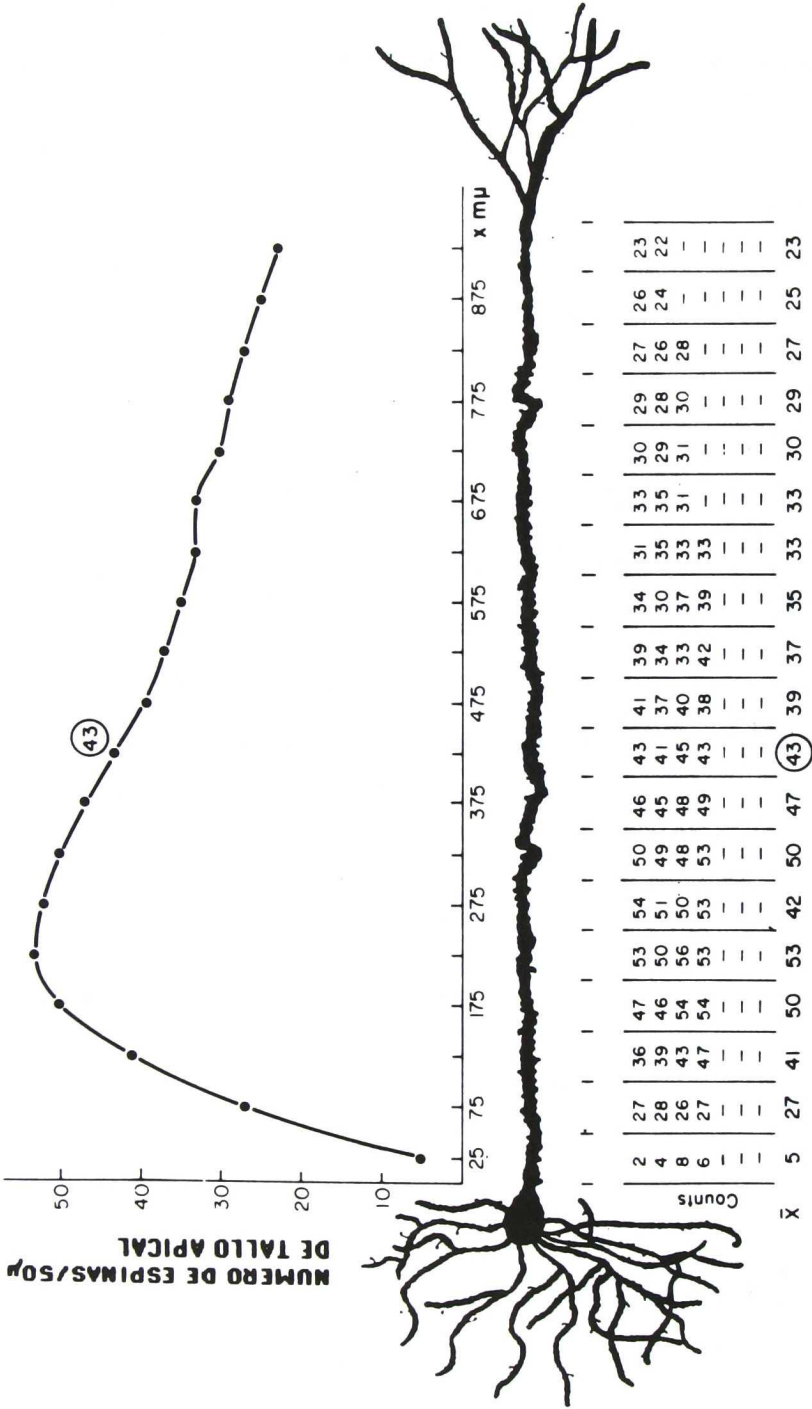


Fig. 2.- Forma de obtener la distribución de espinas dendríticas a lo largo de los tallos apicales de un grupo de neuronas piramidales. (Para detalles ver texto).

total (22).

También y por primera vez, la aplicación de este Modelo puso de manifiesto que, contrariamente a lo que se creía el hipotiroidismo, cuando se presentaba a edad adulta no sólo producía, como se creía, cambios meramente metabólicos (7), sino también morfológicos (21), estableciéndose las condiciones de reversibilidad de las mismas. Al realizar el estudio de cómo el hipotiroidismo neonatal pudiera influir en el deterioro de distintas áreas corticales se encontró, como primer resultado, que el descenso en el número de espinas producido por esta situación patológica era menor en el área visual que en el área auditiva de la Corteza Cerebral, un resultado contrario al que se esperaba obtener ya que, mientras habían sido descritos defectos audigénicos producidos por el cretinismo endémico, no habían sido descritos efectos visuales. Sin embargo, al profundizar el estudio, se encontró que, si bien el hipotiroidismo neonatal afectaba menos el desarrollo del número total de espinas en el área auditiva que en la visual, producía una mayor distorsión en la distribución de espinas a lo largo de los tallos apicales de neuronas pertenecientes al área auditiva que en las pertenecientes al área visual (19), un resultado que induce a pensar que, para el correcto funcionamiento, del cerebro, más importante que el número de conexiones sinápticas presentes, puede ser la forma cómo se distribuyen éstas.

Contrariamente a lo que se entiende por Modelo Matemático, un Algoritmo Matemático no es más que un conjunto de instrucciones que, realizadas en cierto orden nos sirve para solucionar un problema concreto. Para confeccionar un Algoritmo Matemático no es necesaria la formulación de hipótesis de trabajo y, consecuentemente con ello, los algoritmos no suelen dar información sobre la forma cómo funciona el sistema que se estudia, lo cual no debe ser interpretado en el sentido de que los Modelos son siempre más importantes que los Algoritmos para realizar un estudio concreto de un Sistema Biológico.

Concretamente, si se desea, por ejemplo, realizar el estudio de cómo una situación patológica afecta el desarrollo de las arborizaciones dendríticas de una neurona, y teniendo en cuenta lo ya mencionado, sobre el hecho de que para su funcionamiento correcto, el Sistema Nervioso debe tener en cuenta, no lo que le ocurre a una sola neurona sino a un conjunto de ellas, para realizar el estudio antes indicado, habrá que diseñar un algoritmo que permita estudiar cómo esta situación afecta no sólo a la arborización dendrítica de una neurona, sino a la de un conjunto de ellas, estudio que debe logicamente pasar por encontrar la "neurona media" correspondiente a este conjunto.

Este problema fue solucionado en nuestro laboratorio de la forma que a continuación se describe.

Los valores de cada una de las coordenadas X, Y, Z (Fig. 3) de los puntos más significativos (puntos iniciales, de inflexión, de bifurcación y terminales) de una arborización dendrítica, son almacenados en la memoria permanente de disco de un ordenador. Cada terna de valores va seguida de un código que indica a la máquina si el punto es inicial, de bifurcación, etc. De esta forma la estructura completa de una arborización dendrítica queda almacenada en el ordenador como una serie de valores de coordenadas X, Y, Z seguidas de un código, como la mostrada en la Fig. 4. Ahora bien, si esta lista de valores representa para el ordenador la estructura dendrítica de una neurona, debe ser posible realizar un programa, de acuerdo con el cual, la máquina haciendo uso de esa lista de valores, sea capaz de reproducir la estructura dendrítica. En la Fig. 5 se muestra la microfotografía realizada al microscopio de una neurona (arriba a la izquierda) y las sucesivas reconstrucciones, que de esta neurona se realizaron con el ordenador: Arriba a la derecha en su posición original, abajo a la izquierda, girada 90° alrededor del eje Y, o vista en planta y abajo a la derecha girada 90° alrededor del eje Z, o vista de perfil. Algo que la máquina puede hacer, de acuerdo con un programa, ya que tiene la información espacial de toda la estructura dendrítica.

Una vez que se ha comprobado que el ordenador es capaz de "entender" una estructura dendrítica se diseñó un algoritmo (14, 15, 16), de acuerdo con el cual el ordenador crea una cuadrícula vertical en su memoria, proyecta sobre la misma la arborización dendrítica de una neurona particular y "mide" la longitud total de dentrita que hay dentro de cada cuadro individual de la cuadrícula (ver Fig. 6). De esta forma se ha conseguido convertir la estructura dendrítica de una neurona en una matriz numérica. Evidentemente lo realizado con una neurona puede ser realizado con un número

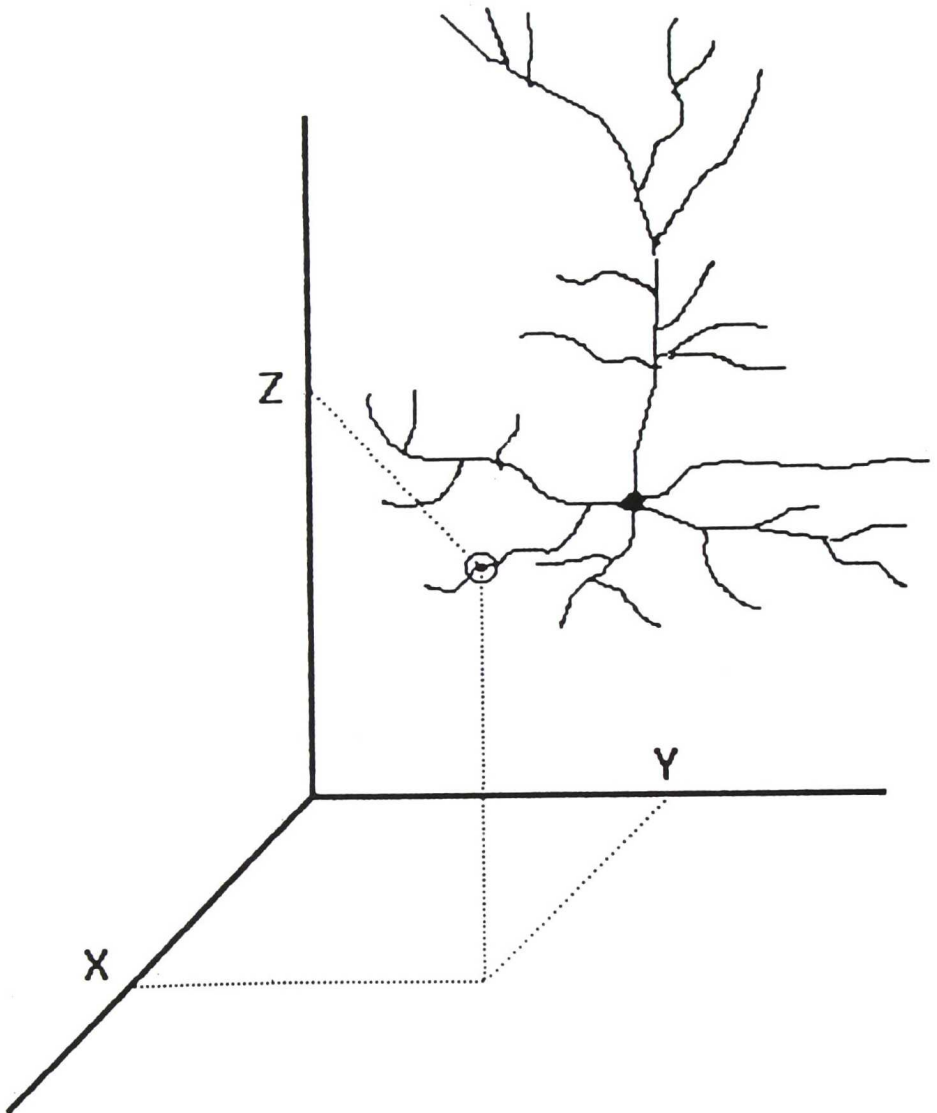
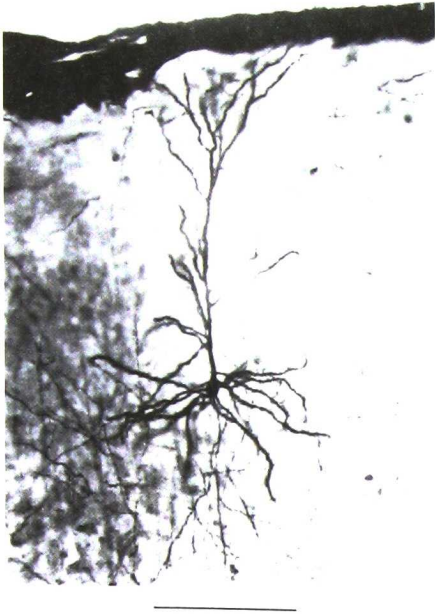
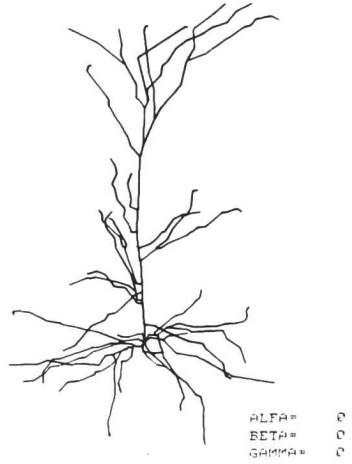


Fig. 3.- Esquema de una neurona piramidal señalando su posición en el espacio respecto a un sistema de coordenadas X Y Z.



N E U . E S P ESCALA= - + 200.

N E U . E S P ESCALA= - + 350.



N E U . E S P ESCALA= - + 350.

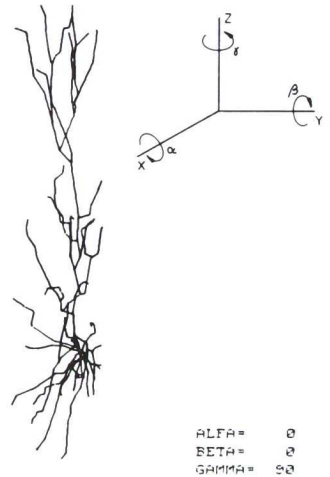
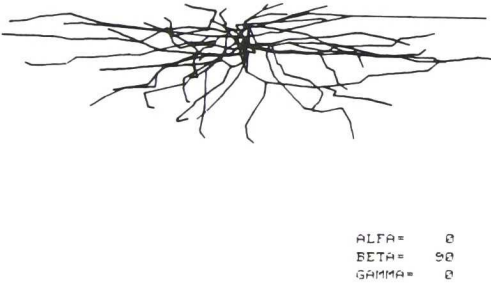


Fig. 5.- Se muestra, en el ángulo superior izquierdo la fotografía de la neurona cuya lista de valores de coordenadas se muestra en la figura 4. La reproducción de la neurona realizada por el ordenador queda mostrada: En posición normal en el ángulo superior derecho, vista en planta en el ángulo inferior izquierdo y vista de perfil en el inferior derecho.

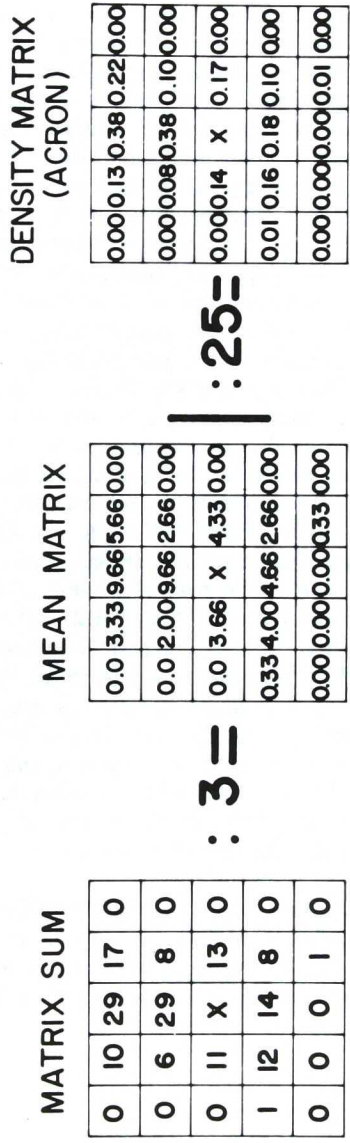
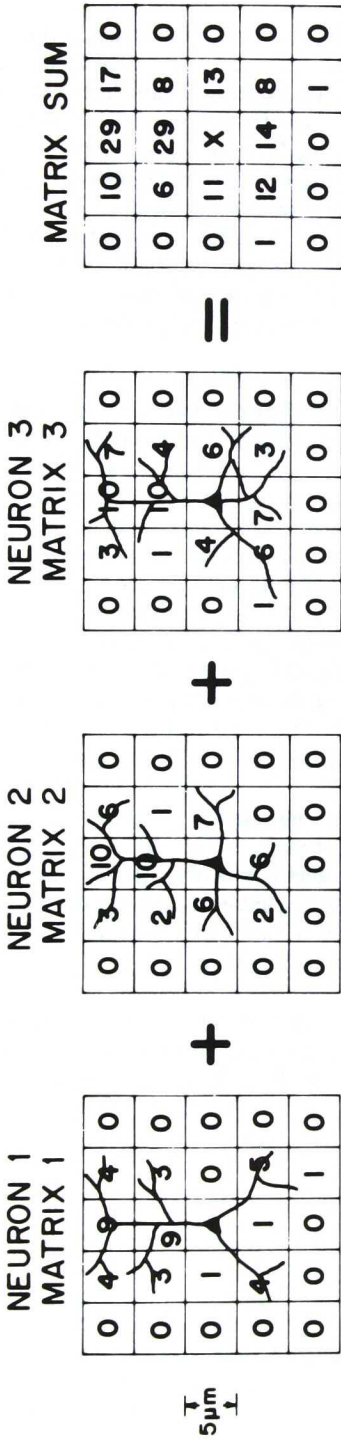


Fig. 6.- Proceso de cálculo de la matriz de densidades dendríticas medias correspondiente a una muestra de neuronas. (Para detalles ver texto).

indeterminado de ellas.

El ordenador, a continuación, de acuerdo con las instrucciones del programa realizado con esta finalidad, suma las matrices numéricas correspondientes a las neuronas cuyas estructuras se desea promediar. La matriz suma así obtenida se normaliza dividiendo los números obtenidos en cada una de las cuadrículas primero entre el número de sumandos que han intervenido en el proceso y posteriormente entre el área en micras cuadradas de cada cuadrícula. De esta forma se obtiene como resultado final una matriz denominada ACRON (de Averaged Computed neuRON, 24), que define la densidad media correspondiente al grupo de arborizaciones dendríticas promediadas.

Una vez programado este algoritmo, si se desea averiguar, por ejemplo, cómo una situación patológica concreta, como es el hipotiroidismo, afecta el desarrollo de la arborización dendrítica de una población neuronal se puede proceder a encontrar el "ACRON" correspondiente a una muestra de neuronas pertenecientes a un grupo de animales control y el correspondiente a una muestra de neuronas pertenecientes a un grupo de animales hipotiroideos.

Las dos matrices de densidades obtenidas pueden ser comparadas haciendo uso del análisis de varianza, dando una instrucción adicional al ordenador para que imprima una marca en aquellas cuadrículas cuya diferencia de valores medios sea significativa. La figura 7 muestra los resultados obtenidos al comparar las matrices de densidades medias correspondientes a dos muestras de neuronas pertenecientes a dos grupos de animales de 80 días de edad, uno de ellos control y otro formado por animales a los que se les había extirpado el tiroides quirúrgicamente cuando tenían 10 días de edad. Como puede apreciarse por el esquema superpuesto con las cruces colocadas por el ordenador, el hipotiroidismo neonatal tan sólo afecta significativamente el desarrollo del penacho apical de las neuronas piramidales (9,17) y no el total de la neurona como se creía (12), resultado que coincidió con el obtenido al realizar el estudio del efecto del hipotiroidismo en la distribución de espinas dendríticas a lo largo de los tallos apicales de neuronas piramidales (22) y que posteriormente fueron confirmados por estudios paralelos realizados sobre el efecto que el hipotiroidismo tenía sobre los perfiles de axones mielínicos y microtúbulos (1,2), así como por el estudio realizado haciendo uso de técnicas de análisis multivariante, que permitieron estudiar el efecto del hipotiroidismo neonatal en un total de 10 variables neuronales simultáneamente (9,10).

Es posible que este tipo de estudios, como los descritos en este capítulo, podrían haber sido realizados utilizando otras técnicas que no incluyeran el uso de Modelos o Algoritmos Matemáticos pero, teniendo en cuenta, como se dijo al comienzo, que las Matemáticas es hoy día, el instrumento más potente que posee el hombre para definir un orden, parece lógico pensar que, para poder estudiar la estructura y leyes de desarrollo de las mismas en un Sistema Biológico, cada vez será más necesario acudir al tipo de estudios como los descritos en el presente capítulo.

AGRADECIMIENTO.- Deseo expresar mi agradecimiento a C. Gabriel Alvarez por su asistencia técnica y a M.E. Fernandez de Molina por su ayuda con la escritura a máquina. Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a la ayuda económica concedida al Dr. Ruiz Marcos por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica. PM89-0012.

BIBLIOGRAFIA

1. Berbel P. J., F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar y A. Ruiz Marcos. Effect of neonatal hypothyroidism on the microtubule density and arrangement in apical dendrites of pyramidal cells of the rat visual cortex. *Neurosc. Lett.* (1986) S-26.
2. Berbel P. J., F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar y A. Ruiz Marcos. Differential effect of neonatal hypothyroidism on myelinated profiles in different layers of the cerebral cortex of the rat. *Trab. del Inst. Cajal. Vol.LXXV: 37* (1984).
- 3.- Cajal S. R. La fine structure des centres nerveux. The Croonian lecture. *Proc. royal Soc. (London)* 55 (1894) 443-448.
4. Colonnier M. Synaptic patterns of different cell types in the different laminae of the cat visual cortex: an electron microscopic study. *Brain Res.* 9 (1968) 268-287.
5. Eayrs T. J. Thyroid hypofunction and the development of the central nervous system. *Nature (London)* 172 (1953) 403-405.
6. Eayrs T. J. Influence of the thyroid in the central nervous system. *Br. Med. Bull.* 16 (1969) 122-127.
7. Ford D. H. y E. Cramer. Developing nervous system in relation to thyroid hormones, in: "Thyroid Hormones and Brain Development", G.D. Grave, ed., Raven Press, New York (1977).
8. Gray E. G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. An electron microscopic study. *J. Anat.* 93 (1959) 420-433.
9. Ipiña S. L. y A. Ruiz Marcos. Dendritic structure alterations induced by hypothyroidism in pyramidal neurons of the rat visual cortex. *Dev. Brain Res.* 29 (1986) 61-67.
10. Ipiña S.L., A. Ruiz-Marcos, F. Escobar del rey and G. Morreale de Escobar. Pyramidal cortical cell morphology studied by multivariate analysis: Effects of neonatal thyroidectomy, ageing and thyroxine-substitution therapy. *Dev. Brain Res.* 37 (1987) 219-229.
11. Marin Padilla M. Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man. *J. Comp. Neurol.* 131 (1967) 475-489.
12. Mistkevich M. S. y G.N. Moskovkin. Some effects of thyroid hormone on the development of the cerebral nervous system on early ontogenesis, in: "Hormones and Development", M. Hamburg and B.J. Barrington, ed., Appleton-Century-Crofts, New York (1971).
13. Peters A. The visual cortex of the rat, in A. Peters and E.G. John, ed. *Cerebral Cortex. Vol. 3, The Visual Cortex*, Plenum, New York, (1985) 19-74.
14. Ruiz Marcos A.. Mathematical models of cortical structures and their application to the study of pathological situations, in: "Ramón y Cajal´s Contribution to the Neurosciences", S. Grisolia, C. Guerri, F. Samson, S. Norton and F. Reinoso-Suarez, ed., Elsevier Science Publ., Amsterdam, New York, London (1983).
15. Ruiz Marcos A. Modelos Matemáticos de Sistemas Neuronales. *Invest. y Ciencia* (Junio, 1984).

16. Ruiz Marcos A.. Mathematical Models and algorithms used to study the effect of some pathological conditions such as hypothyroidism or iodine deficiency on the development of the cerebral cortex, in: "Iodine Nutrition Thyroxine and Brain Development", N. Kochupillai, M.G. Karmarkar and V. Ramalingaswami, ed., Tata McGraw-Hill, New Delhi (1986).
17. Ruiz Marcos A. y S.L. Ipiña. Hypothyroidism affects preferentially the dendritic densities on the more superficial region of pyramidal neurons of the rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* 28 (1986) 259-262.
18. Ruiz Marcos A. y J. Sala. Effect of restraining of movement in the developmnet of pyramidal cells of the motor, somesthetic and visual areas of the cortex and late recovery of this effect. *Neurosc. Letters.* 425 (1982) 10-S.
19. Ruiz Marcos A., J. Salas, F. Sanchez-Toscano, F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar. Effects of neonatal and adult onset hypothyroidism on pyramidal cells of the rat auditory cortex. *Dev. Brain Res.* 9 (1983) 205-213.
20. Ruiz Marcos A., F. Sanchez-Toscano, F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar. Severe hypothyroidism and the maturation of the rat cerebral cortex. *Brain res.* 162 (1979) 315-329.
21. Ruiz Marcos A., F. Sanchez-Toscano, F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar. Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res.* 185 (1980) 91-102.
22. Ruiz Marcos A., F. Sanchez-Toscano, M.J. Obregón, F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar. Thyroxine treatment and recovery of hypothyroidism-induced pyramidal cell damage. *Brain Res.* 239 (1982) 559-574.
23. Ruiz Marcos A. y F. Valverde. The temporal evolution of the distribution of dendritic spines in the rat visual cortex of normal and dark raised mice. *Exp. Brain Res.* 8 (1969) 284-294.
24. Ruiz Marcos A. y F. Valverde. Dynamic architecture of the visual cortex. *Brain Res.* 19 (1970) 25-39.
25. Valverde F. Structural changes in the area striata of the mouse after enucleation. *Exp. Brain Res.* 5 (1968) 274-292.
26. Valverde F. y A. Ruiz-Marcos. Dendritic spines in the visual cortex of the mouse: introduction to a mathematical model. *Exp. Brain Res.* 8 (1969) 268-283.

6.4. DEFICIENCIA DE IODO Y SU REPERCUSION EN EL
CRECIMIENTO Y DESARROLLO MENTAL DE LOS
NIÑOS Y ADOLESCENTES

Rafael TOJO y otros
Dpto. de Pediatría
Unidad de Investigación en Nutrición y
Desarrollo Humano de Galicia
Universidad de Santiago de Compostela

Los trastornos por deficiencia de Iodo (DDI) son aún un importante problema de salud pública en muchas áreas del mundo. Del amplio espectro de anomalías que produce, la más común es el bocio endémico. Aunque la causa principal de bocio es la insuficiente ingesta de iodo, en algunas áreas bociosas la presencia de compuestos naturales orgánicos, inorgánicos o alimentos como los del género Brassica pueden tener un papel complementario en la perpetuación de la epidemia. Este es el caso de las áreas de bocio endémico de Galicia, en las que a la deficiencia de iodo se suma el consumo elevado de coles, nabos, grelos, alimentos bociógenos (1). Pero la consecuencia más importante de la deficiencia de iodo es su efecto negativo sobre el desarrollo y la función del sistema nervioso, como queda de manifiesto en que una parte importante de esas poblaciones tienen afectada su capacidad motórica e intelectual (2).

En el año 1980-82 estudiamos en ocho áreas de bocio endémico de Galicia un total de 3872 niños y adolescentes comprendidos entre 4 y 18 años, demostrándose una prevalencia de bocio del 79.3%, una eliminación media urinaria de 15.9 μ g/l, un 35% con talla inferior al percentil 25, un 38.1% con un peso inferior a dicho percentil y un 29% con cociente de inteligencia global inferior a 80 con el test de Wechsler (WPPSI de 4 a 6, WISC de 6 a 14 y WAIS de 14 a 18 años), y un 30% con deficiencia de coordinación con el test de Ozeretsky (1). Gráfico 1 y 2.

En 1990, estudiamos nuevamente en una de las áreas de bocio revisadas en 1980-82 (Santiso) a 242 niños y niñas entre 4 y 14 años y en 1992 a 285 niños control de la misma edad, pero de un área exenta de bocio (Santiago de Compostela) para valorar las diferencias en prevalencia de bocio, en niveles de ioduria y crecimiento. Así mismo, para comparar la evolución en 10 años de estos parámetros en una misma área bociosa, después que en 1984 y a tenor del estudio realizado en 1980-82, la Xunta de Galicia estableciese por Decreto por primera vez en España la prevención del bocio endémico mediante la sal iodada (Diario Oficial de Galicia Decreto 179/27, Diciembre 1984).

El estudio demuestra varios hechos de interés, uno el descenso de la prevalencia del bocio en Santiso después de la implantación de la sal iodada (78.9% vs 67.6%), y la existencia de un 6.3% de niños del área control con bocio grado I. Gráfico 3. Dos, el aumento de la eliminación urinaria de iodo en el área endémica que pasó de una media de 18.0 a 62.5 $\mu\text{g/l}$, aunque significativamente más baja que la del área control (104.1 $\mu\text{g/l}$). Tabla I, gráfico 4. Tres, la aceleración del crecimiento en el área de bocio, ya que el porcentaje de niños con percentil de talla inferior a 10 disminuye del 17.7% al 11.7, mientras que el superior al percentil 90 asciende del 6.0% al 14.6%, sin embargo significativamente inferiores a los del grupo control. Tabla II.

Todos estos hallazgos confirman el beneficio de la sal iodada en la erradicación de la deficiencia de iodo y en consecuencia de sus efectos negativos sobre función, desarrollo mental y crecimiento humano. También que debemos mejorar nuestras estrategias de prevención para hacer posible que el bocio endémico no exista en el siglo XXI. Sin embargo, la situación actual de la endemia en España y la falta de un plan oficial de prevención (3) no nos hace ser optimistas, aunque la Declaración de los Derechos del Niño (ONU, 1990), las Recomendaciones para Europa de la OMS-UNICEF-ICCIDD-ETA-CEC (Bruselas, 1992) y el Documento Consenso Español para la Prevención y Control de la Deficiencia de Iodo (Bilbao, 1992) nos da un rayo de esperanza.

1. Tojo R, Fraga JM, Escobar del Rey F, Rodríguez Martínez A, Vazquez E, Esquete C. Estudio del bocio endémico en Galicia. Repercusión sobre el crecimiento y desarrollo. *Endocrinología* 1987, 34 (supl. 2): 48-52.

2. Bleichrodt N, Escobar del Rey F, Morreda de Escobar G, García I, Rubio C. Iodine deficiency implications for mental and psychomotor development in children. In: GR Delong, J Robin, P Condliffe, eds. *Iodine and the brain*. New York, Plenum Press 1989, 269-387.

3. Escobar del Rey F, Moneale Eticobar G. Iodine deficiency in Spain: A continuing concern. *Endocrinología* 1992, 39: 171-175.

**GRADOS DE BOCIO Y COCIENTE INTELECTUAL GLOBAL
TEST DE WECHSLER (WPPSI, WISC)**

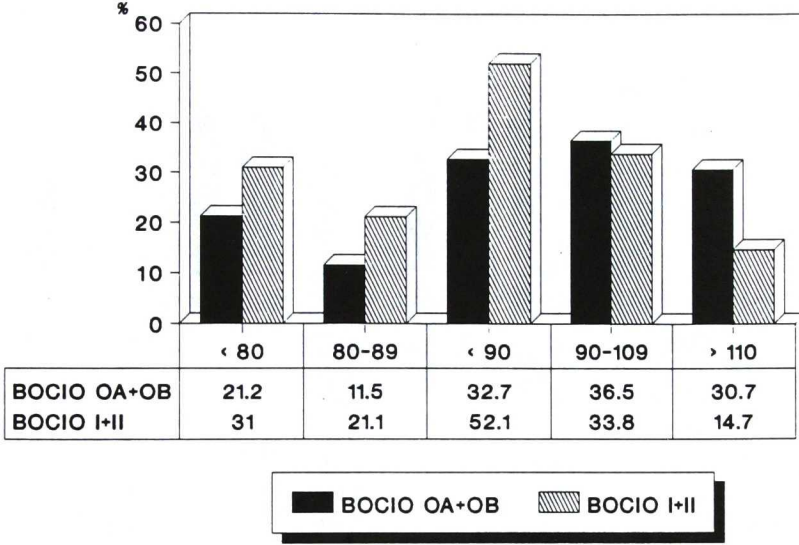


Gráfico 1

**GRADOS DE BOCIO Y VALORACION MEDIA DEL TEST DE WECHSLER
(WPPSI, WISC)**

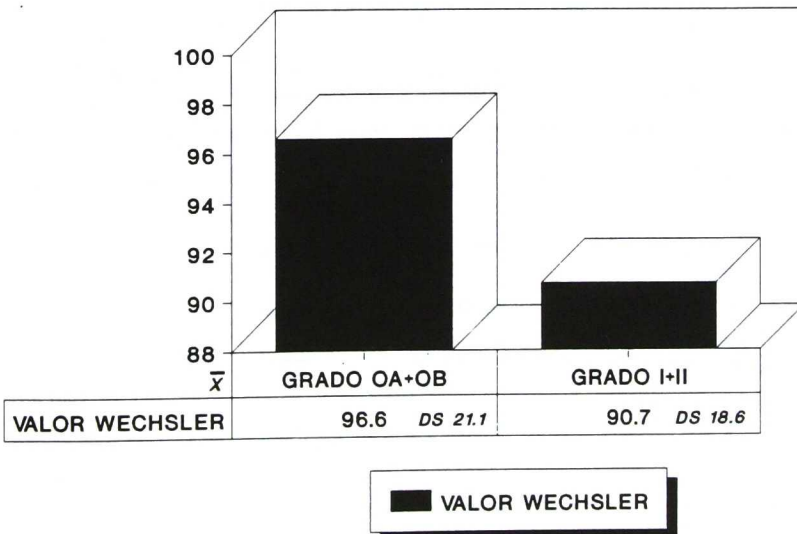


Gráfico 2

**DIFERENCIAS EN EL PORCENTAJE DE GRADOS DE BOCIO EN GALICIA
ENTRE LOS NIÑOS DE SANTISO (Área de Bocio Endémico) EN 1982 Y 1990 Y SANTIAGO
(Controles) EN 1992**

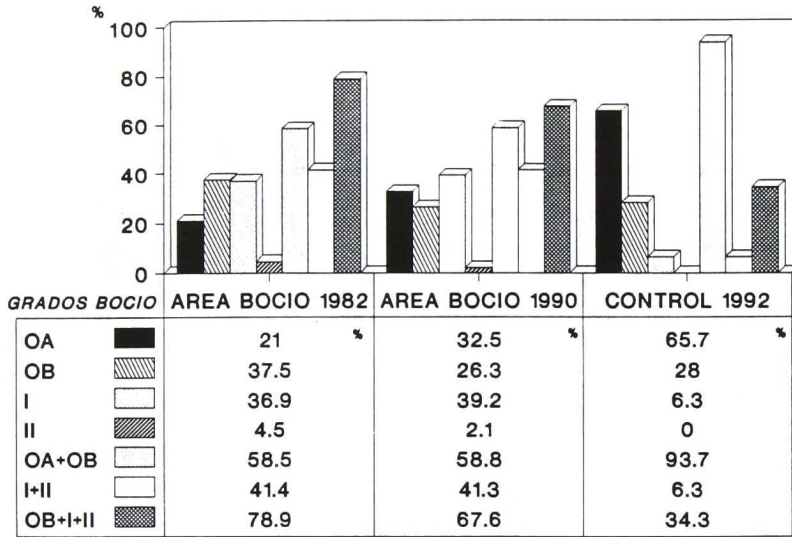


Gráfico 3

**NIVELES DE IODURIA EN LOS NIÑOS DE GALICIA
EN SANTISO (Área de Bocio Endémico) EN 1982 Y 1990 Y EN SANTIAGO (Controles)
EN 1992**

IODURIA ($\mu\text{g/l}$)	SANTISO 1982	SANTISO 1990	SANTIAGO DE COMPOSTELA 1992
MEDIA	18.0 \pm 13.1	62.5 \pm 47.4	104.1 \pm 49.8
% < 25	78.1	17.2	0.5
% < 50	92.3	55.0	13.3
% < 75	99.7	73.6	33.7
% < 100	100.0	86.0	57.2
% > 100	0.0	14.0	42.8

Tabla 1

DIFERENCIAS EN EL PORCENTAJE DE IODURIA EN GALICIA
ENTRE LOS NIÑOS DE SANTISO (*Area de Bocio Endémico*) EN 1982 Y 1990 Y
LOS DE SANTIAGO (*Control*) EN 1992

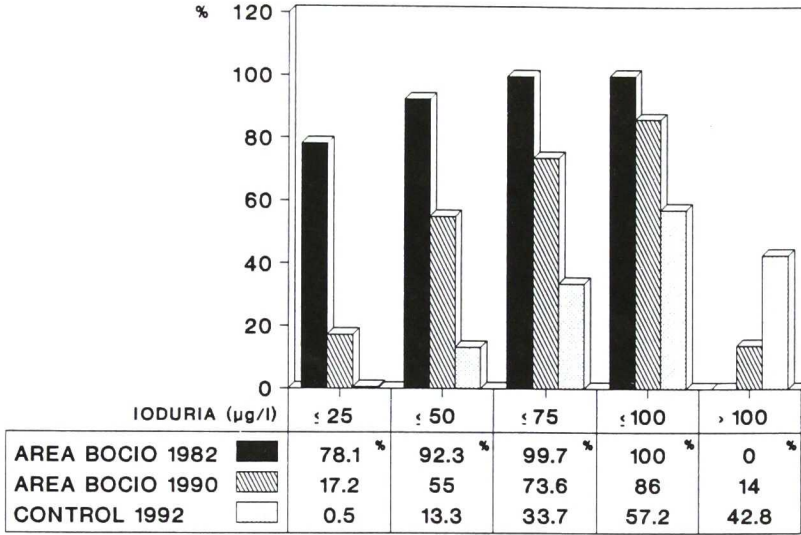


Gráfico 4

PORCENTAJE DE NIÑOS DE SANTISO (*Area de Bocio Endémico*) EN 1982 Y 1990
Y DE SANTIAGO (*Controles*) EN 1992
CON PERCENTILES DE TALLA INFERIORES AL 10 Y SUPERIORES AL 90
(*Comparación con las Gráficas de Galicia*)

PERCENTIL	NIÑOS			NIÑAS		
	SANTISO		SANTIAGO	SANTISO		SANTIAGO
	1982	1990	1992	1982	1990	1992
< 3	7.0	2.9	0.0	7.2	2.0	0.5
< 10	17.7	11.7	2.1	20.0	8.4	4.4
> 90	6.0	14.6	31.9	6.7	17.8	22.6
> 97	1.4	5.8	11.5	2.3	3.3	5.4

Tabla II

Los Estados Miembros deben tomar medidas apropiadas para la prevención de deficiencias y discapacidades y para asegurar la divulgación de los conocimientos y la tecnología pertinentes.

Naciones Unidas: Programa de acción mundial para las personas con discapacidad (Párrafo 95).

