

Detección del ácido urocánico en sudor mediante el empleo de la cromatografía en capa delgada.

Detection of urocanic acid in sweat by thin film chromatography.

Jiovanna Contreras Roura,^I Elsa Alonso Jiménez,^{II} Ondina Escalona,^{III} Daniel Quintana.^{IV}

Resumen

La Histidinemia es una enfermedad metabólica hereditaria, autosómica recesiva, caracterizada por una deficiencia de la enzima histidasa que ocasiona un aumento de la concentración de histidina en sangre, orina y en líquido cefalorraquídeo; aumento de la concentración de sus metabolitos en orina y deficiencia del ácido urocánico en sudor y stratum corneum epidermidis. Se describe una técnica por cromatografía en capa delgada para la detección y cuantificación, por densitometría, del ácido urocánico en muestras de sudor, con vistas a su empleo en el diagnóstico de la Histidinemia y otras alteraciones en el metabolismo de la histidina. Se empleó como fase estacionaria una placa de celulosa y como fase móvil una mezcla de acetona/ácido acético glacial/agua destilada. El factor de retención obtenido para el ácido urocánico fue de 0,75. La cuantificación de las muestras se realizó en un rango de concentración de $5,43 \cdot 10^{-5}$ a $28,96 \cdot 10^{-5}$ mol/L, el mismo fue lineal con un coeficiente de determinación de 0,9986. El límite de cuantificación fue de $5,43 \cdot 10^{-5}$ mol/L. La técnica se empleó en el análisis de muestras de sudor de niños sanos y niños con trastorno del lenguaje de causa desconocida y que presentaron niveles elevados de histidina en suero. Se obtuvieron niveles más bajos del ácido urocánico en el segundo grupo de infantes.

Palabras clave: Ácido urocánico, sudor, cromatografía en capa delgada, histidinemia.

Abstract

Histidinemia is a hereditary autosomal recessive metabolic disorder, characterized by histidine deficiency that causes increased levels of histidine in blood, urine and cerebrospinal fluid; increased levels of its metabolites in urine and decreased levels of the metabolite urocanic acid in sweat and horny layer of epidermis. A thin layer chromatography technique for the detection and densitometry quantification of urocanic acid in sweat samples is described, intended for the diagnosis of histidinemia and other anomalies in the histidine metabolism. The stationary phase was a cellulose plate and the mobile phase consisted in an acetone/glacial acetic acid /distilled water mix. The retention factor obtained for urocanic acid was equal to 0,75. Sample quantification was carried out for an urocanic acid concentration value range varying from $5,43 \cdot 10^{-5}$ to $28,96 \cdot 10^{-5}$ mol/L, showing a linear behaviour and a determination coefficient equal to 0,9986, as well as a quantification limit equal to $5,43 \cdot 10^{-5}$ mol/L. This technique was employed for the analysis of sweat samples in healthy children and children with unknown-cause speech defects and higher concentration of histidine in serum. Lower concentration values for urocanic acid were obtained in the latter group of children.

Keywords: Urocanic acid, sweat, thin layer chromatography, histidinemia.

^I Máster en Ciencias en Farmacología Experimental. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: jcontreras@cngen.sld.cu

^{II} Técnico en Medios Diagnósticos e Investigaciones Médicas. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{III} Licenciada en Bioquímica. Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez". La Habana. Cuba.

^{IV} Doctor en Medicina. Especialista de Primer Grado en Genética Clínica. Profesor Instructor. Centro Provincial de Genética Médica de Mayabeque. Cuba.

Introducción

La Histidinemia es una enfermedad metabólica hereditaria, autosómica recesiva, que fue descrita por primera vez por Ghadimi en 1961. Es el desorden primario del metabolismo de la histidina y se caracteriza por una deficiencia de la enzima histidasa, que resulta en el bloqueo de la conversión de histidina a ácido urocánico. Desde el punto de vista bioquímico, esto ocasiona un aumento de la concentración de histidina en sangre, orina y en líquido cefalorraquídeo, aumento de la concentración de sus metabolitos en orina e incapacidad de convertir la histidina en ácido urocánico. Esta alteración se traduce en ausencia del ácido urocánico en sudor y en *stratum corneum epidermidis*.¹⁻⁷ La deficiencia del ácido urocánico puede afectar sus funciones para la epidermis: como protector solar natural y como inmunoregulador de los rayos ultravioleta.⁷⁻⁸

El cuadro clínico de los pacientes con este déficit enzimático, es muy variable. Algunos presentan retraso del crecimiento, retraso mental y un defecto del habla, mientras que en otros no hay manifestaciones clínicas.⁹⁻¹⁰

Dentro de las pruebas metabólicas en orina que se emplean en el pesquiasaje de la Histidinemia se encuentra la prueba del cloruro férrico. La misma permite detectar una excreción elevada de diferentes compuestos imidazoles,^{9,10} que son marcadores de diferentes trastornos metabólicos, por ejemplo, para la Fenilcetonuria el ácido fenilpirúvico, para la Histidinemia el ácido imidazolpirúvico, el ácido imidazolacético y el ácido imidazolpropiónico y para la Tirosinemia el ácido p-hidroxifenil láctico. Para la detección y/o cuantificación de los niveles de histidina en suero y en orina se puede emplear métodos cromatográficos como la cromatografía en capa delgada y la cromatografía líquida de alta resolución. También se reporta el uso del sistema ultra micro analítico (SUMA) para la cuantificación de histidina en suero.¹²

El diagnóstico de la enfermedad requiere de la aplicación de pruebas basadas en la cuantificación de L-Histidina en sangre. La confirmación del diagnóstico puede realizarse por dos vías: determinando la ausencia del ácido urocánico en muestras de sudor^{7-9, 13-17} y mediante la determinación de la actividad enzimática de la histidasa en *stratum corneum epidermidis*.¹⁰⁻¹⁷

En el siguiente trabajo se describe una técnica rápida y sencilla por cromatografía en capa delgada para la detección y/o cuantificación por densitometría del ácido urocánico en muestras de sudor, con vistas a apoyar el diagnóstico de la Histidinemia y para la

detección de otras alteraciones en el metabolismo de la histidina, fundamentalmente, en niños que presentan trastorno del lenguaje de causa desconocida y niveles elevados de histidina en suero.

Métodos

El diseño experimental del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Centro Nacional de Genética Médica.

Muestra del estudio:

Para la obtención de las muestras de sudor en niños se solicitó y se obtuvo el consentimiento informado de los padres, después que los mismos fueron debidamente informados sobre el estudio, dando cumplimiento a lo que establece la Declaración de Helsinki del 2008.¹⁸ La muestra estuvo conformada por 9 niños de edad pre-escolar dividida en 2 grupos: Grupo A o casos (n = 4, niños con trastorno del lenguaje de causa desconocida y que presentan niveles elevados de histidina en suero) y el Grupo B o controles (n = 5, niños sin trastorno del lenguaje y con niveles normales de histidina en suero, < 3,45 mg/dL).

Obtención de las muestras de sudor:

Las muestras de sudor se colectaron por personal paramédico entrenado y experimentado, en tiras de papel de filtro (3 x 3 cm) colocadas en la zona media de la región anterior del antebrazo. Se empleó la Iontoforesis con estimulación con pilocarpina propuesto por Shwachman,¹⁹⁻²¹ donde el ácido urocánico es liberado de la epidermis y aparece en el sudor colectado. Posteriormente, el mismo se extrae del papel de filtro con agua destilada en función de la cantidad de sudor recolectado.

Reactivos:

Los reactivos empleados en este trabajo fueron suministrados por diferentes firmas comerciales: el ácido urocánico de SIGMA. La acetona, el ácido acético glacial y el ácido sulfanílico, de Merck. El nitrito de sodio de BDH. El carbonato de sodio anhidro de Fluka. El agua destilada y desionizada fue obtenida en el Centro Nacional de Genética Médica.

Preparación de la curva de calibración de ácido urocánico en agua destilada:

A partir de una solución madre de ácido urocánico a concentración de 362×10^{-5} mol/L se prepararon los puntos de la curva a concentración final de: $5,43 \times 10^{-5}$; $7,24 \times 10^{-5}$; $9,41 \times 10^{-5}$; $21,72 \times 10^{-5}$ y $28,96 \times 10^{-5}$ mol/L.

Condiciones cromatográficas:

A partir de la técnica cromatográfica, propuesta por Humbel R en 1970,¹¹ se realizaron algunas modificaciones en la misma. Se empleó como fase estacionaria placas de celulosa 20 x 10 cm (Merck) y como fase móvil una mezcla de acetona/ácido acético glacial/agua destilada (60:10:30, v/v/v). El volumen de aplicación (muestras y patrones) fue de 20 µL y la distancia de corrida de la fase móvil fue de 8 cm. Después de secar la placa a temperatura ambiente, se preparó inmediatamente el revelador (Reactivo de Pauly's)¹¹ y se atomizó sobre la placa, lo que permitió que el ácido urocánico apareciera como una mancha de color rojo o rojo-naranja.

Cuantificación de las muestras de sudor:

Se empleó un Densitómetro CS-9301 PC (Shimadzu, Japón) para la cuantificación del ácido urocánico en muestras de sudor. El escáner de la placa se realizó

de forma automática a una longitud de onda de 262 nm y un tamaño de haz de luz de 151 x 10 mm. Se analizaron 12 carriles con una distancia entre cada uno de 10 mm.

Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la cuantificación del ácido urocánico en sudor para los dos grupos estudiados se empleó el programa Statistica v 7.0.

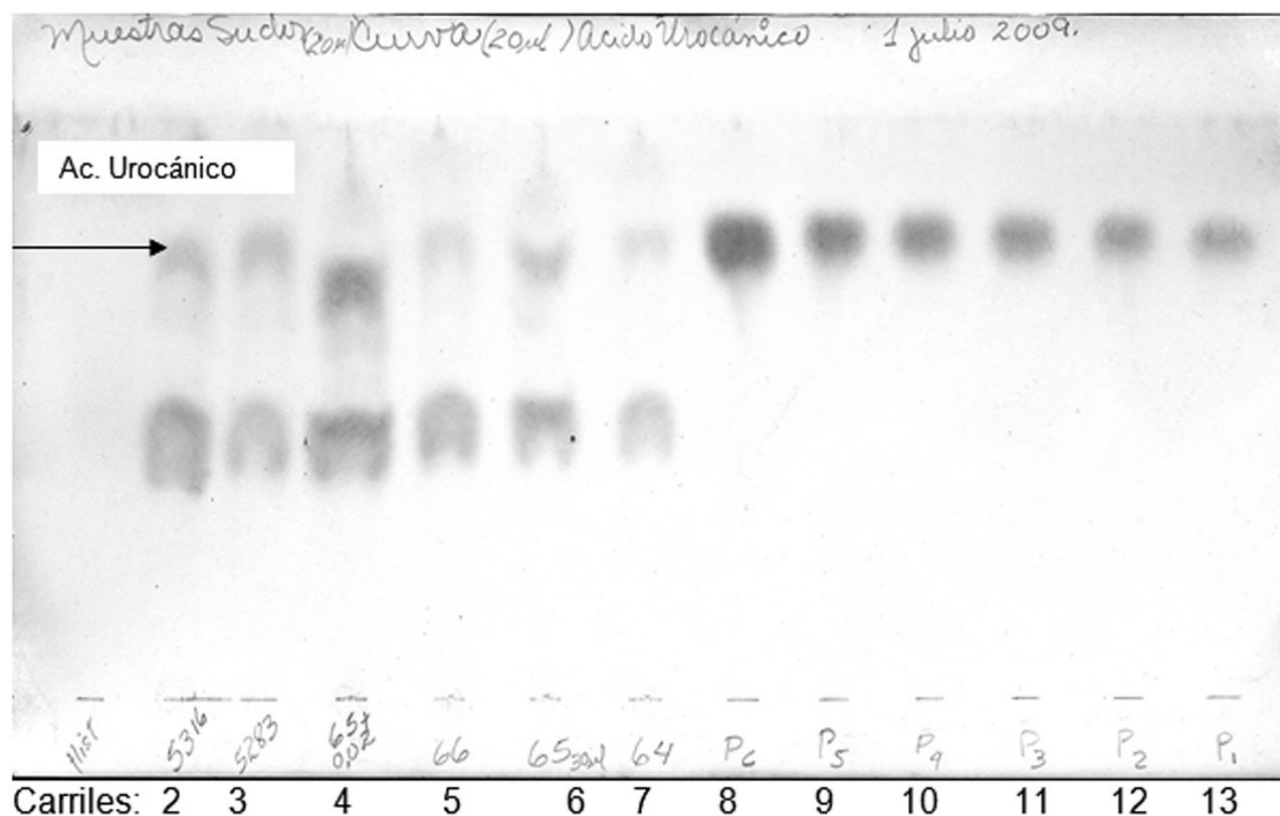
Resultados

En la figura 1 se muestra una placa cromatográfica correspondiente a la técnica. En la misma se observan las manchas correspondientes al ácido urocánico obtenidas en el análisis de los patrones de la curva de calibración, así como en algunas muestras de sudor. El factor de retención (Rf) para el ácido urocánico fue de 0,75.

Figura 1. Cromatografía en capa delgada del ácido urocánico.

Carriles 2-7: muestras de sudor de niños.

Carriles 8-13: patrones correspondientes a la curva de calibración del ácido urocánico en agua.



Fuente: Datos del Laboratorio de Gnética Bioquímica del CNGM

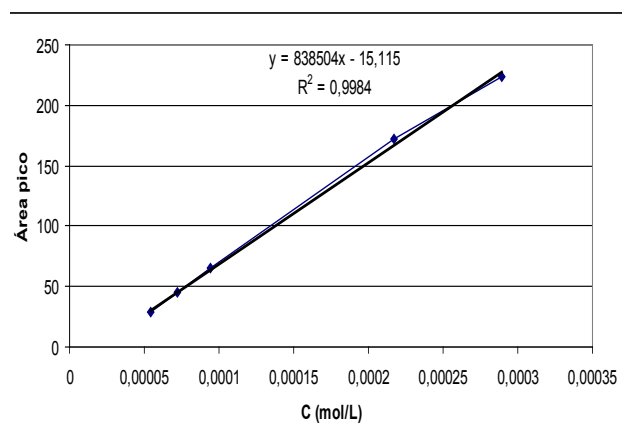
En la tabla 1 y figura 2 se reportan los resultados obtenidos para la curva de calibración del ácido urocánico, que fue lineal en el rango de concentración analizado ($5,43 \cdot 10^{-5}$ - $28,96 \cdot 10^{-5}$ mol/L) con un coeficiente de correlación y determinación de 0,9968 y 0,9984, respectivamente. El límite de cuantificación fue de $5,43 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Tabla 1. Áreas del pico correspondiente a la mancha del ácido urocánico obtenidas para los puntos de la curva de calibración por densitometría.

Punto	Concentración de ácido urocánico (mol/L)	Área pico
1	$5,43 \cdot 10^{-5}$	28,55
2	$7,24 \cdot 10^{-5}$	44,83
3	$9,41 \cdot 10^{-5}$	64,91
4	$21,72 \cdot 10^{-5}$	172,33
5	$28,96 \cdot 10^{-5}$	223,9

Fuente: Datos del Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM.

Figura 2. Curva de calibración del ácido urocánico en agua.



Fuente: Datos del Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM

La tabla 2 muestra los niveles de ácido urocánico obtenidos por densitometría para las muestras de sudor analizadas. En los niños con trastorno del lenguaje de causa desconocida y con niveles elevados de histidina en suero se obtuvieron niveles más bajos del ácido urocánico en relación a los niños sanos. En la tabla 3 se reportan los resultados obtenidos en la prueba *t Student* para ambos grupos, donde se puede observar que hubo diferencias significativas para los niveles de ácido urocánico ($p = 0,000267$).

Tabla 2. Resultados obtenidos en la cuantificación del ácido urocánico en las muestras de sudor por densitometría.

Grupo	Muestra	C (mol/L)
A	1	$10,79 \cdot 10^{-5}$
	2	$7,89 \cdot 10^{-5}$
	3	$< 5,43 \cdot 10^{-5}$
	4	$6,52 \cdot 10^{-5}$
B	1	$17,38 \cdot 10^{-5}$
	2	$> 28,96 \cdot 10^{-5}$
	3	$> 28,96 \cdot 10^{-5}$
	4	$> 28,96 \cdot 10^{-5}$
	5	$> 28,96 \cdot 10^{-5}$

A: Niños con niveles elevados de histidina y con trastorno del lenguaje.

B: Niños sanos (Lab. Clínico Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez).

Fuente: Datos del Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM.

Tabla 3. Análisis estadístico de la cuantificación de los niveles del ácido urocánico para los grupos.

Parámetro	Grupos	
	A	B
N	4	5
Media	$7,7 \cdot 10^{-5}$	$26,6 \cdot 10^{-5}$
Desviación estándar	2,3	5,2
p	0,000267	

Fuente: Datos del Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM.

Discusión

Debido a los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de sudor correspondiente a los grupos de casos y controles estudiados, proponemos el empleo de la técnica por cromatografía en capa delgada para el análisis del ácido urocánico en muestras de sudor. Las principales ventajas del método radican en que el proceso de obtención y recolección de las muestras de sudor es fácil e inocuo para el paciente; y la realización de la técnica es rápida y sencilla. Por lo tanto, se puede emplear en el diagnóstico confirmatorio de la Histidinemia, así como de otras alteraciones en el metabolismo de la histidina en niños cubanos.

La determinación de ácido urocánico en muestras de sudor mediante la técnica descrita permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre los casos y el grupo control, que resultan relevantes desde el punto de vista biológico. Razonablemente, se considera que no es necesario cuantificar los

niveles del ácido urocánico en sudor para realizar el diagnóstico confirmatorio diferencial de la Histidinemia. La diferencia entre la Histidinemia Clásica y la Histidinemia Atípica radica en la ausencia y presencia del ácido urocánico, respectivamente.^{3, 7, 14, 15}

En los países desarrollados se emplea la determinación de la actividad de la histidasa en piel^{2,5,8,14} para realizar

el diagnóstico confirmatorio de la Histidinemia. La técnica enzimática es más específica que la cromatográfica; sin embargo, la misma presenta desventajas debido a que el proceso de obtención de la muestra (biopsia en piel) es más invasivo, particularmente si se realiza en niños, y el costo de la técnica es mucho mayor en relación al método cromatográfico propuesto.

Referencias bibliográficas

1. Federación Española de Asociaciones de Enfermedades raras (FEDER), URL disponible en: <http://enfermedades-raras.org/es/default.htm>.
2. K Virmani, K Widhalm. Histidinemia: a biochemical variant or a disease? *Journal of the American College of Nutrition*. 1993;12(2):115.
3. Levy HL. Disorders of histidine metabolism. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. Valle D eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 8th ed. New York, McGraw-Hill. p.1807; 2001.
4. Philip K Bondon, Leon E Resemberg. *Enfermedades del metabolismo*, Tomo I, Genética y Metabolismo. Salvat editorial, Barcelona, España, 1979.
5. La Du BN, Howell RR, Jacoby GA, Seegmiller JE, Zannoni VG. The enzymatic defect in histidinemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;7:398-402.
6. Khanna R, Chang TM. Characterisation of L-histidine ammonia-lyase immobilized by microencapsulation in artificial cells: preparation, kinetics, stability and in vitro depletion of histidine. *Int J Artif Organs*. 1990;13:189-195.
7. Scriver, Beaudet, Valle, Sly Childs, Kinzler, Vogelstein. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed, volume II, Chapters 77-133, p.1665-3368; 2001.
8. Taylor RG, Levy HL, McInnes RR. Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. *Mol Biol Med*. Feb,1991;8 (1):101-16.
9. Ramos Boluda E, Pascual Marcos M J. Tratamiento dietético de las enfermedades metabólicas. *Inf Ter Sist Nac*. 2005 ;29(4):81-95.
10. Hans Galjaard. Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal analysis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Chapter II Diagnosis of genetic metabolic diseases. p. 406-407; 1980.
11. Humbel R. Thin-layer chromatography of urinary imidazoles. *Clinical chemistry*. 1970 ;16(1):58-60.
12. Contreras J, Hernández O, Alonso E, Robaina Z y Gutiérrez E. Validación de un micro método fluorimétrico para la cuantificación de L-Histidina en sangre periférica. *Rev Cubana Genet Comunit*. 2008;2 (2):37-45.
13. George H. Thomas and R. Rodney Howell. Selected Screening Tests for Genetic Metabolic Diseases, Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, Chapter 12 Histidinemia: Histidine and Urocanic Acid Procedures. p. 62-66;1973.
14. Yokoya S, Tokuhira E, Suwa S, Maesaka H. Measurement of the skin urocanic acid content in normal and histidinemic infants. *Eur J Pediatr*. 1983;140(4):330-332.
15. La Du BN: Histidinemia, in Stanburg J B, Wyngaarden J B, Frederickson DS (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 4th ed. New York, Mc Graw-Hill. p.317; 1978.
16. Wilcken B, Brown DA: Histidinemia: Evaluation of an Improved Method for confirmation and the implications of the diagnosis. *Aust Paediatr J*. 1975 ;11:126.
17. Matsuda I, Nagata N, Endo F: Blood histidine levels during course of histidinaemia. *Lancet*. 1982, 1:162.
18. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2000 Dec 20;284(23):3043-5.
19. Brusilow W, Ikai K. Urocanic acid in sweat: An artefact of elution from the epidermis. *Science*, June 14. 1968;160(3833):1257-1258.
20. Richard C. Boucher. Fibrosis Quística. En *Harrison Principios de Medicina Interna* 13 ed. Nueva York: Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. p.1373; 1994.
21. Thomas F. Boat. Fibrosis Quística. En *Nelson. Tratado de Pediatría* 15 ed. Nueva York: Edit. Interamericana. Mac Graw-Hill. p.1554-959; 1997.