

# WORKSHOP ALEXION

Piridoxal-5'-fosfato (PLP) y su importancia en el diagnóstico de la hipofosfatasa.

Silvia Buendía Martínez. Laboratorio Bioquímica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid.

Con el patrocinio de:

**ALEXION**

XI CONGRESO NACIONAL  
DEL LABORATORIO CLÍNICO

15 al 17 NOVIEMBRE 2017

**LABCLIN**

*Málaga*

AEEM

AEFA

SEOCML

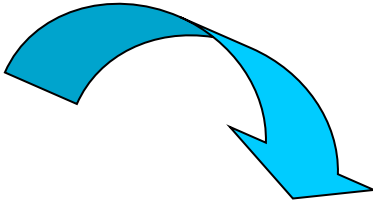
# Hipofosfatasa (HPP)

- Es el error innato del metabolismo caracterizado por una baja actividad de la fosfatasa alcalina sérica no específica de tejido (TNSALP o FANET)
- TNSALP está codificada por el gen ALPL (1p36.12; MIM171760)
- La presencia de variantes que afectan a la función de ALPL determinan el desarrollo de Hipofosfatasa (HPP), habiéndose descrito más de 330 mutaciones
- Espectro fenotípico muy variable

# Mecanismo de la enfermedad


## Sustratos de TNSALP:

- Pirofosfato inorgánico (PPI)
- Fosfoetanolamina (PEA)
- Piridoxal 5'-fosfato (PLP)



La actividad deficiente de TNSALP determina su acúmulo extracelular y el desarrollo de manifestaciones de la enfermedad

Alteraciones esqueléticas, alteraciones odontológicas, convulsiones, daño inflamatorio articular, etc.



# Algoritmo diagnóstico

## Causas de Hipofosfatemia

- Cirugía de revascularización coronaria
- Enfermedad celiaca
- Tratamiento con clofibrato
- Displasia cleidocraneal

**Tabla 5** Intervalos de referencia (U/l) de la actividad de la fosfatasa alcalina total

Ensayo	Abbott Architect <sup>24,25</sup>		Beckman Coulter <sup>26,27</sup>		Ortho Vitros <sup>26,28</sup>		Roche Cobas <sup>26,29</sup>		Siemens Vista <sup>26</sup>	
	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino
0-14 días		90-273		77-237		91-256		83-248		81,5-248,7
15 días-< 1 año		134-518		116-450		131-476		122-469		121,7-472,6
1-< 10 años		156-369		135-320		151-342		142-335		141,8-336,4
10-< 13 años		141-460		122-400		137-424		129-417		128,1-419,6
13-< 15 años	62-280	127-517	52-243	109-449	66-262	124-474	57-254	116-468	55,5-255,2	114,9-471,3
15-< 17 años	54-128	89-365	46-110	77-317	59-126	91-339	50-117	82-331	48,7-116,3	80,9-333,2
17-< 19 años	48-95	59-164	41-82	50-142	54-96	64-158	45-87	55-149	43,1-86,1	53,2-149,1

- Osteogenesis imperfecta, tipo II
- Anemia perniciosa y profunda
- Metales pesados radiactivos
- Inanición
- Deficiencia de vitamina C
- Intoxicación por vitamina D
- Enfermedad de Wilson
- Deficiencia de Zn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>

# Determinación de sustratos de TNSALP

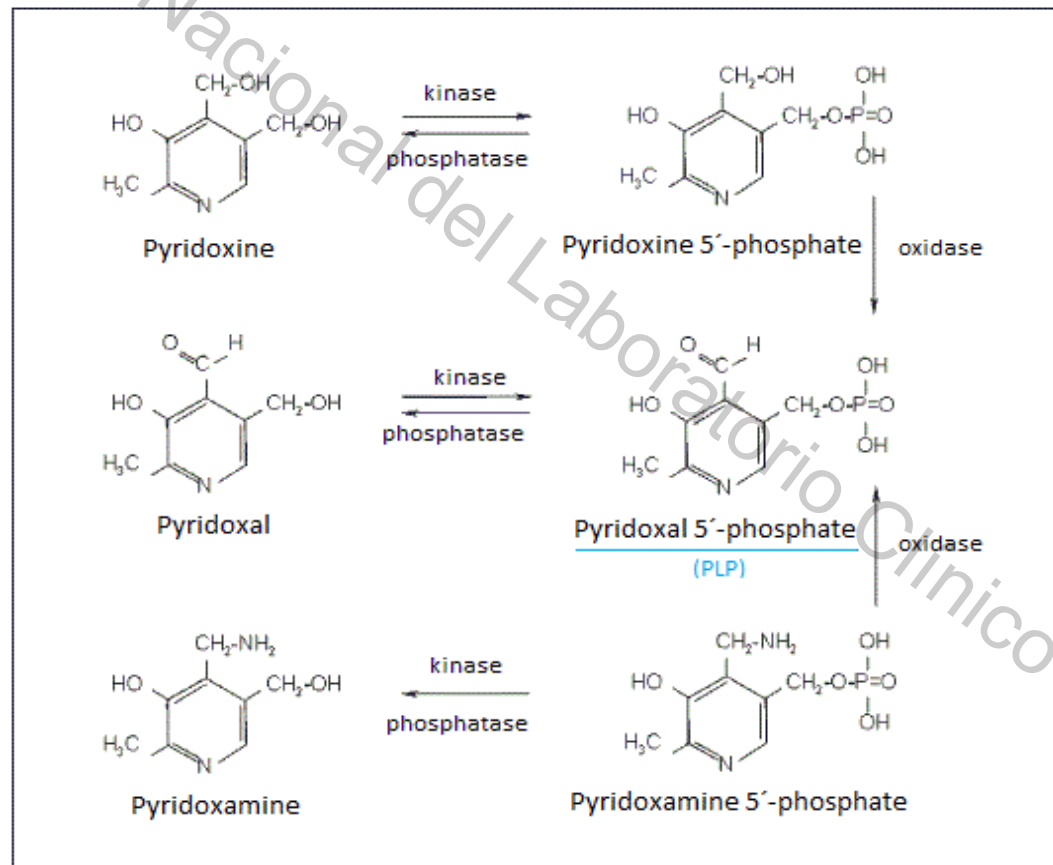
- Fosfoetanolamina (PEA):
  - Se determina por HPLC en orina de micción
  - Valores normales\*:
    - Niños: < 150  $\mu\text{mol/g}$  creatinina
    - Adultos: < 70  $\mu\text{mol/g}$  creatinina
  - Limitaciones:
    - Excreción condicionada por la edad, la dieta y ritmo circadiano
    - Se eleva en otras enfermedades del metabolismo óseo.
- Pirofosfato inorgánico (PPi):
  - Determinaciones sólo en laboratorios de investigación.

\*Reference Laboratory, S.A. [www.referencelaboratory.es](http://www.referencelaboratory.es)

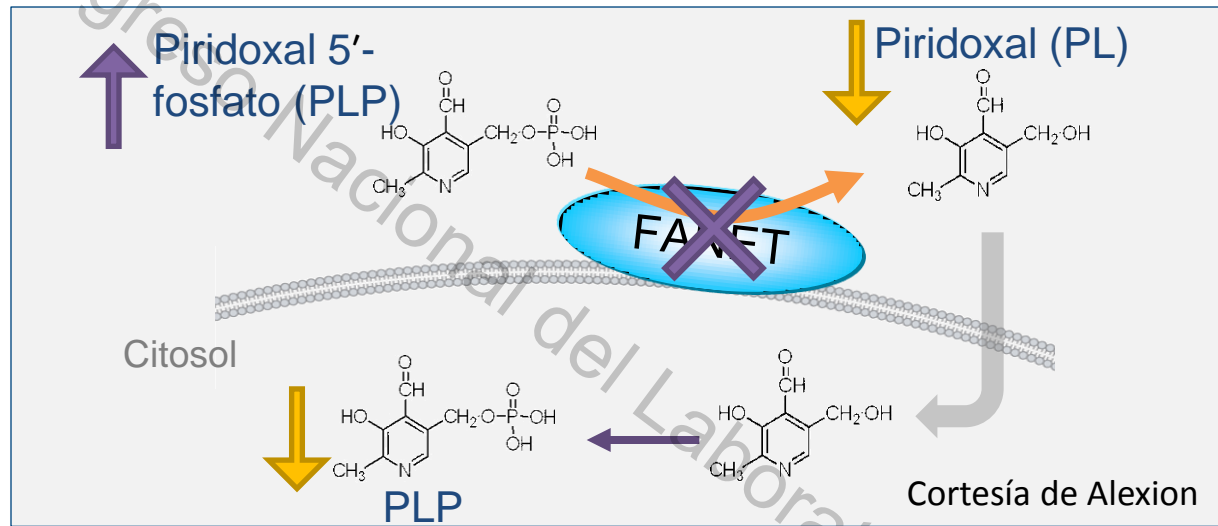
# Determinación de sustratos de TNSALP

## – Piridoxal- 5´ - Fosfato (PLP)

V  
i  
t  
a  
m  
i  
n  
a  
B  
6



# Piridoxal- 5´ - Fosfato (PLP)



- El PLP participa en la síntesis de neurotransmisores (p. ej., ácido gamma aminobutírico [GABA], dopamina, serotonina, etc.)
- En neonatos con HPP, puede haber crisis convulsivas que responden a vitamina B<sub>6</sub> que con frecuencia conducen a un desenlace mortal
- Un nivel sérico elevado de PLP es un marcador sensible y específico de HPP y su valor suele reflejar la gravedad de la enfermedad

# Piridoxal- 5´ - Fosfato (PLP)

- Método enzimático:

- Plasma EDTA

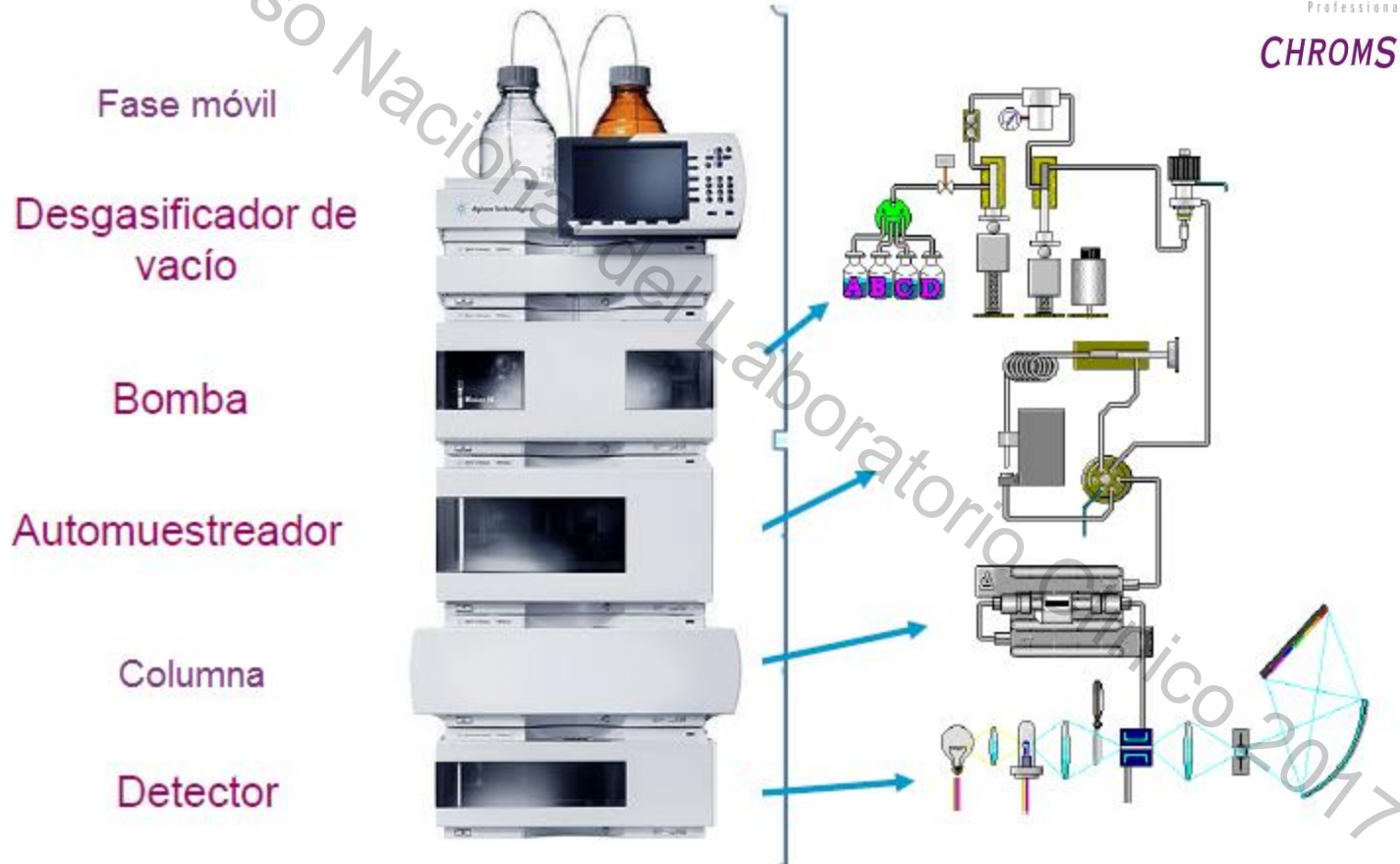
- Rango de normalidad: 23 – 172.5 nmol/L\*

- \* Reference Laboratory, S. A.

- Cromatografía líquida de alta resolución



# Determinación de PLP por HPLC



# Determinación de PLP por HPLC

## Muestra

Para el análisis se puede usar tanto sangre completa, conteniendo EDTA o heparina como inhibidores de la coagulación, como plasma o suero.

Las muestras deben mantenerse protegidas de la luz y refrigeradas durante su transporte. La vida de almacenamiento es de hasta un día en nevera (+2 a +8°C). Para periodos mayores de tiempo debe congelarse a -18°C.



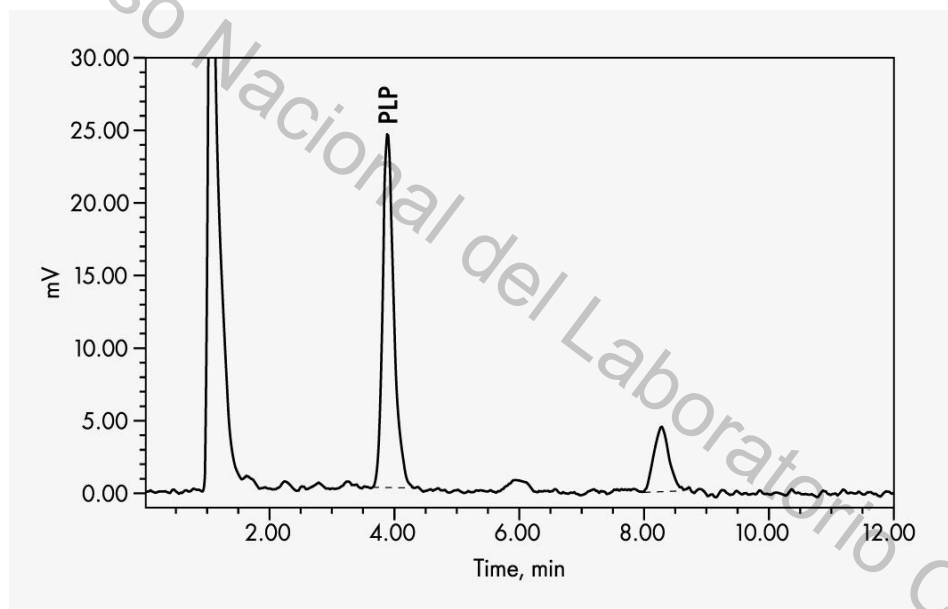
# Determinación de PLP por HPLC

- Pre-tratamiento de la muestra: 200  $\mu$ l, derivatización
- Parámetros del instrumento:
  - Automuestreador: volumen de inyección 50  $\mu$ l
  - Run time: < 8 minutos
  - Tasa de flujo: 1.0 ml/min
  - Temperatura de la columna: ambiente. 25°C aproximadamente
  - Detector de fluorescencia



# Interpretación de resultados

## Cromatograma



## Rangos de referencia

Para Vitamina B6 (PLP) en EDTA-plasma: 3.6 - 18  $\mu\text{g/l}$  (15-73 nmol/l)

Greiling H., Gressener A.M.: Lehrbuch d. Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Verlag Schattauer, 3. Aufl., S.458 (1995)

# Interpretación de resultados

- Un nivel sérico elevado de PLP es un marcador sensible y específico de HPP
- Su valor suele reflejar la gravedad de la enfermedad, sobretodo en pacientes pediátricos
- En adultos puede haber casos de HPP con niveles de PLP normales, en esos casos, merece la pena realizar el estudio genético
- Suplementos exógenos de Vitamina B6 en pacientes con epilepsia provocan valores elevados de PLP

# Conclusiones

1. La HPP es un trastorno metabólico hereditario, sistémico, progresivo y potencialmente mortal.
2. La baja actividad de la ALP puede detectarse con un análisis rutinario.
3. Rangos de referencia ajustados por sexo y edad de ALP
4. PLP marcador sensible y específico de Hipofosfatasa.
5. La magnitud del aumento de los niveles plasmáticos de PLP se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, sobretodo en pacientes pediátricos
6. Cuidado con pacientes que reciben suplementos de Vitamina B6

# Bibliografía

1. Greiling H., Gressner A.M: Lehrbuch d. Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Verlag Schattauer, 3. Ayflg., S. 458 (1995)
2. Martos-Moreno GA, et al. Hipofosfatasa: manifestaciones clínicas, recomendaciones diagnósticas y opciones terapéuticas. An Pediatr (Barc). 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2017.06.004>
3. M.P. Whyte Hipofosfatasa: etiología, nosología, patogénesis, diagnóstico y tratamiento. Nature Reviews. Abril 2016, volumen 12 nº 4
4. Vrinda Saraff, et al. A diagnostic algorithm for children with low alkaline phosphatase activities: lessons learned from laboratory screening for Hipophosphatasia. J Pediatr. 2016;172:181.e1
5. M.P. Whyte. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia Ann N Y Acad Sci, 1192 (2010), pp. 190-200
6. F.J. Caballero Mora, G.Á. Martos Moreno, E. García Esparza, J. Argente. Infantile hypophosphatasia. An Pediatr (Barc). Volume 76, Issue 6, June 2012, Pages 368-369. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.01.019>
7. M. Bravo Mata, I. del Río Pastoriza, J. Varela Iglesias, S. Lojo Rocamonde1, J.R. Alonso Fernández. Hipofosfatasa infantil. An Esp Pediatr 1997;46:399-402.
8. Riancho-Zarrabeitia L, et al, Clinical, biochemical and genetic spectrum of low alkaline phosphatase levels in adults, Eur J Intern Med (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.12.019>

Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2017

# Muchas Gracias