



NOTA TÉCNICA

Valores de referencia de la actividad enzimática alfa-glucosidasa ácida linfocitaria



Borja del Castillo Figueruelo*, Pilar Durán Parejo, Joaquín Bobillo Lobato y Luis Manuel Jiménez Jiménez

Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

Recibido el 8 de septiembre de 2014; aceptado el 28 de enero de 2016
Disponble en Internet el 28 de febrero de 2016

PALABRAS CLAVE

Valores de referencia;
Enfermedad de
Pompe;
Actividad
alfa-glucosidasa ácida
intralinfocitaria

Resumen

Introducción: La enfermedad de Pompe, también denominada déficit de maltasa ácida o glucogenosis tipo II, es un trastorno metabólico autosómico recesivo caracterizado por un acúmulo anormal de glucógeno lisosomal, causado por la deficiencia de la enzima α -glucosidasa ácida (GAA). Según la edad de inicio y el grado de afectación orgánica, la enfermedad de Pompe se suele subdividir en 2 tipos: neonatal (*infantile-onset*) y tardío (*late-onset*).

El diagnóstico clínico se confirma mediante la ausencia virtual (forma infantil) o marcada reducción (forma del adulto) de la actividad enzimática GAA en diferentes muestras biológicas.

Material y métodos: El objetivo de este trabajo consiste en establecer los valores de referencia para la actividad enzimática GAA intralinfocitaria que constituye el método *gold standard* para el diagnóstico de la enfermedad.

Resultados: Los resultados obtenidos en una población de sujetos control difieren de los publicados en otros trabajos, lo que refleja la importancia de establecer valores de referencia dentro de cada laboratorio.

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Reference values;
Pompe disease;
Intralymphocyte acid
alpha-glucosidase
activity

Reference values of intralymphocyte acid alpha-glucosidase activity

Abstract

Introduction: Pompe disease also called acid maltase deficiency or glycogenosis type II is an autosomal recessive metabolic disorder characterized by an abnormal accumulation of lysosomal glycogen caused by deficiency of the enzyme α -glucosidase (GAA). According to the age of onset and the extent of organ involvement, Pompe disease is usually divided into 2 subtypes: Neonatal (*infantile-onset*) and adult (*late-onset*).

The clinical diagnosis is confirmed by the virtual absence (infantile form) or markedly reduced (adult form) GAA enzyme activity in different biological samples.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bdelcastillof@gmail.com (B. del Castillo Figueruelo).

Material and methods: The aim of this work is to establish reference values for intralymphocyte alpha-glucosidase acid activity, which is the "gold standard" method for the diagnosis of Pompe disease.

Results: The results obtained in a population of control subjects are different from those published in other studies. This reflects the importance of establishing reference values within each laboratory.

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Pompe, sinónimo de deficiencia de maltasa ácida, es también conocida como glucogenosis de tipo II. Esta enfermedad, definida como un trastorno de almacenamiento lisosomal, constituye una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por una mutación en el gen que codifica para la enzima α -glucosidasa ácida (GAA) o maltasa ácida¹. Se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25)² y se han descrito hasta el momento 454 mutaciones diferentes (<http://www.pompecenter.nl>).

Gracias a esta enzima, el glucógeno acumulado en los lisosomas es degradado completamente a glucosa. El hecho de añadir «ácida» a su denominación hace referencia al entorno ácido existente en el interior del lisosoma, necesario para la actuación enzimática efectiva^{3,4}. En la enfermedad de Pompe, la deficiencia de la GAA bloquea este proceso catabólico y origina un incremento de los depósitos de glucógeno en los lisosomas. Estos adoptan formas inusualmente grandes y alargadas, llegando a ocupar una parte sustancial del contenido de la célula^{1,5,6}. La consecuente enfermedad celular se manifiesta, en las fibras musculares, mediante pérdida de la arquitectura subcelular y ocasionan finalmente una debilidad del músculo esquelético, responsable de gran parte de la sintomatología clínica^{1,6,7}. Estos síntomas incluyen, desde una enfermedad severa caracterizada por miocardiopatía hipertrófica⁸ o debilidad muscular marcada en la forma de presentación neonatal (letal durante los primeros 2 años de vida), hasta una miopatía progresiva⁹ con insuficiencia respiratoria en la forma de aparición adulta.

El objetivo de este trabajo consiste en establecer los valores de referencia para la actividad enzimática GAA intralinfocitaria, que constituye el «gold standard» para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe^{1,7}, en la población atendida por nuestro laboratorio.

Material y métodos

Para la determinación de estos valores utilizamos un grupo de 149 pacientes (92 hombres y 57 mujeres) con una edad media de 38,67 años (valor mínimo un año y valor máximo 72 años) cuyas muestras fueron enviadas al laboratorio del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla para diagnóstico de otras enfermedades, que resultaron estar ausentes, procedentes de diversos centros repartidos por todo el país.

Actividad enzimática intralinfocitaria

Se utilizaron muestras de 10 mL de sangre total extraídas con EDTA, enviadas al laboratorio refrigeradas a 4 °C, en un periodo no superior a las 24 h desde su extracción.

La determinación de la actividad enzimática requiere, en primer lugar, el aislamiento de los propios linfocitos y una fase posterior de sonicado. El aislamiento de los linfocitos se llevó a cabo a partir de 8 mL de la sangre total en tubos para la separación de células mononucleares sanguíneas (BD Vacutainer® CPT™) que poseen una solución de FICOLL™ Hypaque™. Esta metodología nos permite separar los linfocitos mediante gradiente de densidad tras centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 30 min a una temperatura de 4 °C. La realización de sucesivos lavados de la fracción diferenciada por el gradiente con una solución salina fisiológica nos permite obtener un pellet limpio que se conserva a -80 °C hasta la determinación analítica.

Los linfocitos aislados, resuspendidos en un volumen de 500 μ L de agua bidestilada, se sonicán mediante un sistema manual Branson Digital Sonifier durante 10 s a una amplitud de 20% y una temperatura máxima de 26 °C obteniéndose, de este modo, una suspensión del contenido enzimático intralinfocitario.

La actividad enzimática intralinfocitaria es dependiente tanto de la cantidad de linfocitos presentes en la muestra como de la concentración de la enzima existente en ellos. Los resultados se expresan en función de la cantidad de proteínas en el concentrado de linfocitos.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo según la metodología de Lukacs et al. modificada¹⁰, usando como sustrato de la reacción una solución de 4-metil-umbeliferil- α -D-glucopiranosido (4-MUG) 2,8 mM. Cada determinación se realizó por duplicado, interpolando los resultados en una curva de calibración construida a partir de diferentes concentraciones de 4-metilumbeliferona (4-MU), el producto fluorescente que se forma en la reacción. Esta curva nos permite establecer la relación entre la intensidad de fluorescencia y la actividad enzimática presente en las muestras.

Se utilizan microplacas de 96 pocillos de 400 μ L (Greiner Bio-One Fia-Plate, Black) dispensándose en cada uno de ellos 10 μ L de la solución de linfocitos sonicada y centrifugada. Para cada muestra analizamos la actividad enzimática GAA efectiva utilizando una solución del sustrato en *buffer* ácido (citrato-fosfato pH 4,3, 0,2 M). Previamente, y en cada uno de los pocillos, es añadida una solución de acarbosa 8 μ M cuya finalidad es inhibir específicamente la actividad

enzimática maltasa glucoamilasa (MGA) que pudiese existir en la muestra debido a la presencia de algún leucocito polimorfonuclear que hubiera permanecido tras el proceso de aislamiento de linfocitos¹¹. De este modo, la actividad α -glucosidasa medida es reflejo únicamente de la GAA efectiva.

El sustrato de la reacción (4-MUG) es añadido en los pocillos correspondientes y, tras un tiempo de incubación estipulado (2 h con agitación a 1.000 rpm y 37° C), se detiene la reacción mediante la adición de una solución *stop* consistente en un tampón carbonato-glicina 0,17M a pH 11,0.

La lectura de la microplaca se realiza en un espectrofluorímetro de microplacas de longitud de onda variable Beckman Coulter, modelo DTX880. La longitud de onda de medida fue de: excitación 355 nm y emisión de 460 nm. El tiempo de lectura fue de 800 ms.

Determinación de proteínas intralinfocitarias

Para calcular la concentración de proteínas existente en las muestras y así expresar la actividad enzimática en función de esta, utilizamos el método espectrofotométrico de Lowry et al.¹² en microplaca.

Cálculos

Al no existir actividad MGA en los linfocitos, la actividad enzimática será un reflejo de la actividad GAA total presente en ellos. Esta se calcula mediante interpolación de la fluorescencia de la muestra en la curva construida de 4MU. Como hemos indicado, la actividad enzimática intralinfocitaria depende de la concentración de linfocitos en la muestra y la expresión de la enzima en estas células, por lo que el resultado final ha de quedar expresado en función de la concentración de proteínas de la muestra, calculada también por interpolación en una curva de calibración construida con una solución de albúmina. De esta forma, el resultado final queda expresado en nmol/min/mg proteína. La concentración de proteínas en las diferentes muestras analizadas osciló entre 0,94 y 2,34 mg/mL, valores coincidentes con los esperados en soluciones de linfocitos en sujetos normales.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado mediante el programa de IBM SPSS Statistics versión 19.0.

Resultados

Los resultados de la actividad GAA efectiva en linfocitos expresados en nmol/min/mg de proteína se encuentran esquematizados en la [figura 1](#).

A partir de los datos de actividad enzimática, y con objeto de calcular el intervalo de normalidad, seguimos los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute, International Federation of Clinical Chemistry (CLSI/IFCC) que, para la mayoría de las magnitudes biológicas y, usando una población de al menos 120 pacientes¹³, recomienda usar

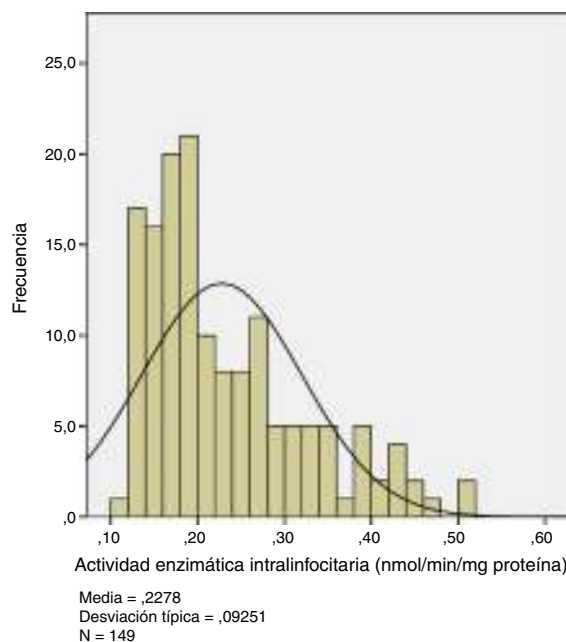


Figura 1 Histograma de valores de la actividad GAA efectiva en el grupo de estudio.

el intervalo de valores comprendido entre los percentiles 2,5 y 97,5.

Siguiendo estas recomendaciones, los valores de referencia calculados para nuestra población total, incluso separados por sexos, se expresan en la [tabla 1](#). En la [tabla 2](#) se muestran los valores separados por grupos de edad, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos tras la aplicación del test t de Student.

Discusión

Los resultados obtenidos nos permiten realizar una serie de observaciones entre las que cabe destacar el que nuestros valores difieren, sobre todo, en los límites superiores de normalidad de los publicados con anterioridad¹⁰, ya que la metodología empleada es ligeramente diferente, al utilizar acarbosa como inhibidor de la actividad MGA.

Además, no existen diferencias estadísticamente significativas entre sexos ni entre los diferentes grupos de edad estratificados, hecho coincidente con otras publicaciones^{13,14}.

Finalmente, y al tratarse de una metodología de corto desarrollo (2 h de incubación), es un método de gran interés para el estudio de esta actividad enzimática en los laboratorios especializados en el diagnóstico de enfermedades

Tabla 1 Valores de actividad GAA en el grupo total de sujetos analizados, separados por sexo

| Percentil | Total (n = 149) | Hombres | Mujeres |
|-----------|-----------------|---------|---------|
| 2,5 | 0,120 | 0,120 | 0,130 |
| 97,5 | 0,440 | 0,461 | 0,420 |

Valores expresados en nmol/min/mg proteína.

Tabla 2 Valores de actividad GAA en los sujetos analizados separados por grupos de edad

| Grupos de edad Percentil | 1-10 a. (n = 11) | 11-20 a. (n = 13) | 21-30 a. (n = 23) | 31-40 a. (n = 29) | 41-50 a. (n = 37) | 51-60 a. (n = 14) | >60 a. (n = 22) |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| 2,5 | 0,130 | 0,132 | 0,125 | 0,117 | 0,130 | 0,133 | 0,130 |
| 95,5 | 0,487 | 0,371 | 0,460 | 0,402 | 0,425 | 0,324 | 0,440 |

Valores expresados en nmol/min/mg proteína.

lisosomales en general, y de la enfermedad de Pompe en particular.

Todo ello nos permite concluir la importancia de obtener valores de referencia para cada uno de los parámetros a analizar en la población atendida en nuestro laboratorio. Los datos obtenidos de publicaciones nacionales o extranjeras pueden conducirnos a errores, sobre todo en los valores límites superiores e inferiores del intervalo de referencia, que pueden ser debidos a variaciones étnicas o de localización geográfica.

Bibliografía

- Hirschhorn R, Reuser AJJ. Glycogen storage disease type II. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3389–420.
- Weil D, van Cong N, Gross MS, Frezal J. Localization of the gene for human acid alpha-glucosidase (alpha-GLUa) on the 17q21 to 17qter by interspecific hybridization (author's transl). *Hum Genet*. 1979;52:249–57.
- Reuser AJ, Kroos M, Willemsen R, Swallow D, Tager JM, Galjaard H. Clinical diversity in glycogenosis type II. Biosynthesis and in situ localization of acid alpha-glucosidase in mutant fibroblasts. *J Clin Invest*. 1987;79:1689–99.
- Wisselaar HA, Kroos MA, Hermans MM, van Beeumen J, Reuser AJ. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J Biol Chem*. 1993;268:2223–31.
- Beratis NG, LaBadie GU, Hirschhorn K. Characterization of the molecular defect in infantile and adult acid alpha-glucosidase deficiency fibroblasts. *J Clin Invest*. 1978;62:1264–74.
- Fukuda T, Roberts A, Plotz PH, Raben N. Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Cur Neurol Neurosci Rep*. 2007;7:71–7.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006;8:267–88.
- Di Sant'agnese PA, Andersen DH, Mason HH. Glycogen storage disease of the heart II. Critical review of the literature. *Pediatrics*. 1950;6:607–24.
- Drost MR, Hesselink RP, Oomens CW, van der Vusse GJ. Effects of non-contractile inclusions on mechanical performance of skeletal muscle. *J Biomech*. 2005;38:1035–43.
- Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, et al. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes—possibility for newborn screening. *J Inher Metab Dis*. 2010;33:43–50.
- Jack RM, Gordon C, Scott C, Kishnani PS, Bali D. The use of acarbose inhibition in the measurement of acid alpha-glucosidase activity in blood lymphocytes for the diagnosis of Pompe disease. *Genet Med*. 2006;8:307–12.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.
- Horowitz GL. Estimating reference intervals. *Am J Clin Pathol*. 2010;133:175–7.
- Jack RM, Gordon C, Scott CR, Kishnani PS, Bali D. The use of acarbose inhibition in the measurement of acid alpha-glucosidase activity in blood lymphocytes for the diagnosis of Pompe disease. *Genet Med*. 2006;8:307–12.