



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

Disponible 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 acid 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 desorden 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

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2578018>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2578018>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)