

Presentación de casos

**DIAGNOSTICO CLINICO-BIOQUIMICO
DE LA ENFERMEDAD DE POMPE**

La enfermedad de Pompe es una de las glicogenosis o enfermedad de depósito de glucógeno, que se transmite con carácter autosómico recesivo y es producida por la deficiencia de la enzima maltasa ácida que degrada glucógeno en los lisosomas. Se distinguen tres tipos de enfermedad de Pompe: el tipo infantil que se caracteriza por la acumulación de glucógeno en hígado, músculo esquelético y cardíaco y células del sistema nervioso central; los pacientes fallecen usualmente antes de los dos años por falla cardiorrespiratoria; el fenotipo juvenil se presenta en niños o jóvenes, no siempre involucra el sistema nervioso central o el músculo cardíaco y los pacientes fallecen generalmente durante la segunda década de vida; el tipo adulto cursa con distrofia muscular, algunas veces asociada con deficiencia respiratoria por compromiso de los músculos diafragma e intercostales. El pronóstico depende del grado de la falla respiratoria, la cual es causa principal de la muerte en estos pacientes.

En este trabajo se informa el caso de un niño de seis meses de edad, afectado por cardiomegalia, retardo psicomotor e hipotonía. La confirmación bioquímica de la enfermedad se hizo determinando la actividad de la α 1,4-glucosidasa en leucocitos por dos métodos diferentes, usando como sustrato maltosa o el sustrato fluorescente 4-metil umbeliferil glucósido. La actividad de la maltasa ácida en leucocitos, usando maltosa como sustrato fue de 6,36 $\mu\text{mol glucosa}/\text{min}/\text{g}$, con un valor de referencia entre 16-63 $\mu\text{moles glucosa}/\text{min}/\text{g}$ de proteína. Con el sustrato fluorogénico, la actividad en el paciente fue de 34.48 nanomoles/h/mg, de proteína, para un valor de referencia entre 194 y 258. La actividad en leucocitos tanto del padre como de la madre corresponde a un 60 % del valor normal, hallado en personas en cuya familia no se sospecha dicha enfermedad.

INTRODUCCION

El glucógeno es la forma de almacenamiento de glucosa en el hombre, especialmente en hígado, músculo estriado, riñón, glóbulos rojos, intestino y otros tejidos.

La función fundamental del glucógeno muscular es servir como reserva energética mediante el suministro de unidades de hexosas disponibles para la glucólisis dentro del propio músculo, especialmente al realizar un esfuerzo. En cambio la función del glucógeno hepático es mantener los niveles de glucosa sanguínea, primordialmente entre comidas, para cubrir las necesidades del cerebro y los glóbulos rojos.

El glucógeno se degrada principalmente en el citoplasma de la célula por la acción de varias enzimas: la fosforilasa, la cual a su vez es activada por la fosforilasa cinasa; la desramificante, la fosfoglucomutasa y la glucosa-6- fosfatasa. El glucógeno que se acumula en los lisosomas es a su vez

degradado por la enzima maltasa ácida. La deficiencia de cualquiera de estas enzimas produce una enfermedad de depósito de glucógeno o glucogenosis; algunas deficiencias son de predominio hepático, otras son fundamentalmente musculares, y otras sistémicas, en cuanto comprometen prácticamente todo el organismo (1-5).

La enfermedad de Pompe o glucogenosis generalizada, es un desorden autosómico recesivo, producido por una deficiencia en la enzima lisosómica α 1,4-glucosidasa (maltasa ácida). Se caracteriza por el almacenamiento, exagerado de glucógeno en corazón, hígado y otros órganos. A pesar de que casi todas las células del organismo están comprometidas, el desorden se manifiesta principalmente en músculo, corazón y tejido nervioso (4, 6). Existen varias formas de la enfermedad (Tabla 1).

En la forma infantil los síntomas aparecen durante el primer mes de vida con retraso motor, dificultad respiratoria y falla cardíaca. En muchos casos la manifestación principal es la hipotonía; los niños no sostienen la cabeza y son incapaces de sentarse. La masa muscular es normal, frecuentemente presentan macroglosia y dificultad para tragar y respirar. La radiografía muestra cardiomegalia. Los hallazgos electrocardiográficos incluyen una desviación marcada del eje izquierdo, intervalos P-R cortos, ampliación del segmento QRS e inversión de la onda T (1, 5-7).

La electromiografía muestra un patrón miopático, con velocidades de conducción, sensoriales y motoras normales. El hígado se agranda progresivamente pero no presenta alteraciones funcionales. A diferencia de otras glucogenosis (tipos I y III), no presenta hipoglicemia o cetosis; el ácido láctico basal, el ácido úrico y los niveles de lípidos plasmáticos son normales. La degradación de glucógeno, después de la estimulación con epinefrina o glucagon, es normal. La mayoría de los pacientes que presentan cardiomegalia mueren durante el primer año de vida. Cuando el paciente no presenta cardiomegalia puede sobrevivir más tiempo, dependiendo del compromiso muscular y neurológico.

La segunda forma de esta enfermedad es la juvenil. Su curso es más lento que el de la forma infantil, presenta debilidad muscular e hipotonía sin compromiso cardíaco; algunos casos tienen compromiso respiratorio, hepatomegalia y ocasionalmente macroglosia. La muerte ordinariamente sobreviene a consecuencia de una falla respiratoria entre la segunda y la cuarta décadas de la vida.

La tercera forma de presentación, o variante adulta, se manifiesta entre la segunda y la cuarta décadas; está asociada con debilidad muscular, sin anomalías cardíacas. Cerca de 50% de los pacientes presenta compromiso de los músculos respiratorios.

Tanto en la forma infantil tardía como en la adulta, el primer síntoma es la dificultad para caminar y signos de distrofia muscular progresiva (5, 7-9).

La enfermedad de Pompe se puede diagnosticar prenatalmente en células cultivadas o sin cultivar, provenientes de amniocentesis, o de biopsia de vellosidades coriónicas

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de la enfermedad de Pompe.

Fenotipo	Características clínicas	Organo involucrado
Tipo infantil (Muerte antes de los 2 años)	Glucogenosis generalizada, retraso sicomotor cardiomegalia hepatomegalia	Hígado músculo esquelético y cardíaco
Tipo juvenil (Muerte en la segunda década de la vida)	La dificultad para caminar es usualmente el primer síntoma. Distrofia muscular progresiva	Algunas veces hay compromiso cardíaco o del SNC
Tipo adulto	Distrofia muscular Insuficiencia respiratoria	Músculo intercostal y diafragma.

durante las primeras semanas del embarazo. Las células cultivadas presentan el inconveniente de que el diagnóstico toma entre dos y tres semanas, por lo cual se prefiere el uso de células no cultivadas. En estas células es posible observar, mediante microscopía electrónica, los depósitos de glucógeno en los lisosomas (10, 11).

Presentación del caso

Paciente de sexo masculino, natural y procedente de Barranquilla, llevado a consulta de neuropediatría a los cuatro meses de edad, por presentar retraso del desarrollo psicomotor.

Antecedentes: producto de cuarto embarazo; padre de 32 años, madre de 31 años, no consanguíneos. El embarazo fue precedido de dos abortos espontáneos durante el primer trimestre; cursó con amenaza de aborto al segundo mes, tratado con caproato de hidroxiprogesterona (Proluton®). Parto vaginal, período neonatal sin complicaciones. Peso: 3.000; talla: 52 cm.

Al examen neurológico presentó retardo del desarrollo motor. Durante la consulta la madre refirió que desde el nacimiento, el paciente presentó fatiga fácil durante la alimentación. Al examen físico se encontró hipotonía severa generalizada con disminución de los reflejos de integración que deberían estar presentes a su edad. Hepatomegalia de aproximadamente 5 cm debajo del reborde costal con línea media axilar. Esplenomegalia.

La radiografía de tórax mostró cardiomegalia que comprometía principalmente las cavidades derechas y aumento en la vascularización (Figura 1). La radiografía de cráneo sugirió una craneoostenosis de las suturas y de las fontanelas, por lo cual se hizo escanograma simple de cráneo que se informó como normal, con buena definición de las sustancias blanca y gris, sin cambios inflamatorios o tumorales.

Los exámenes de ácido láctico, ácido úrico, colesterol y triglicéridos, que usualmente se encuentran aumentados en la glucogenosis tipo I (Von Gierke) y tipo III (enfermedad de Cori), fueron normales en nuestro paciente. Lo anterior, sumado

a la ausencia de hipoglicemia, indica que no se trata de glucogenosis tipos I, III o VI.

El paciente falleció a los seis meses de edad, por complicaciones cardiopulmonares.

Métodos de laboratorio: para determinar la actividad enzimática de la aglucosidasa se utilizaron dos métodos:

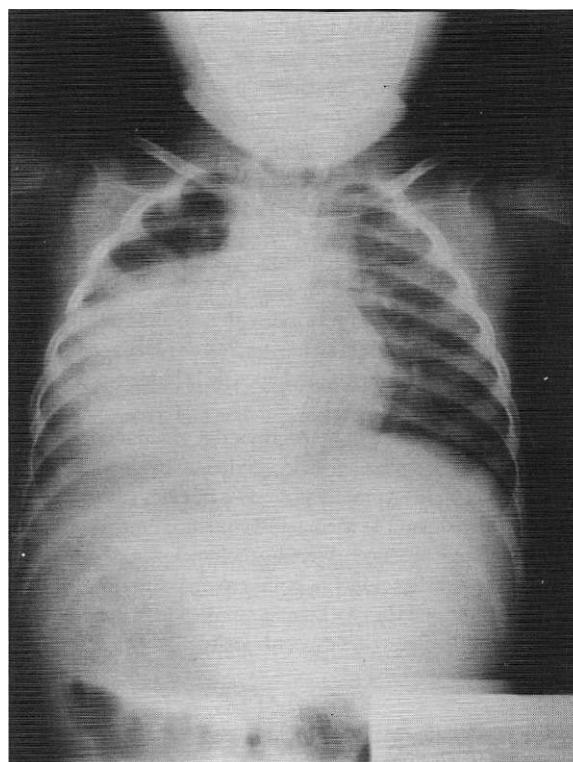


Figura 1. Radiografía del tórax del paciente a los seis meses de edad, en la cual se puede observar la cardiomegalia por acumulación de glucógeno en las células de miocardio.

Espectrofotométrico. El método utilizado es una modificación del descrito por Nitowsky Harold M. y col (6). La mezcla de reacción contiene 200 μ L de la solución de sustrato, maltosa 40 mM, disuelta en amortiguador de citrato-fosfato 0.05M, pH 4.0 y 50 μ L de un lisado de leucocitos. La proteína en el volumen final fue de 50 a 150 μ g. Al blanco de la prueba se adiciona solamente el lisado. Luego de una incubación por una hora a 37°C, se agrega a este tubo 200 μ L de la solución de sustrato, e inmediatamente los tubos son introducidos en un baño de agua hirviendo durante un minuto, para detener la reacción enzimática. La proteína desnaturalizada se centrifuga durante diez minutos a 3000 rpm y se toma una alícuota del sobrenadante para cuantificar glucosa por el método de la glucosa oxidasa. La actividad específica de la enzima α glucosidasa se expresa como μ mol de glucosa liberada/min/g de proteína.

Fluorométrico: se realizó mediante el método publicado por Shapira y col (12). La mezcla de reacción contiene 0.1 mL de lisado de leucocitos y 0.1 mL de la solución de sustrato, 4-MU α D-glucopiranosido 6mM, disuelto en un amortiguador de fosfato-citrato 0.2 M, pH 4.4 y 10% de metoxietanol. El contenido de proteína en el volumen final de reacción fue de aproximadamente 0.02 mg. Luego de una incubación a 37°C, por 30 minutos, se agrega 1.30 mL del amortiguador de glicina-carbonato 0.17M, pH 9.8, para detener la reacción. El tubo blanco se incubó sólo con la solución de sustrato; luego se adiciona el amortiguador de glicina-carbonato y por último el tejido lisado. La fluorescencia se lee utilizando un filtro de excitación a 360 nm y un filtro de emisión a 415 nm. La actividad específica de la enzima α glucosidasa se expresa como μ mol de 4-metilumbeliferil liberado/h/mg de proteína.

Cuantificación del glucógeno: el glucógeno se aísla homogenizando una cuarta parte del tejido disponible, en solución salina. El sobrenadante se trata con ácido tricloroacético al 10% P/V, se centrifuga y el sobrenadante se trata con etanol absoluto en frío, durante 12 horas. Se deja secar la muestra por evaporación y se redisuelve en agua destilada.

La determinación de la concentración de glucógeno se hace mediante la reacción de los productos de la hidrólisis ácida del glucógeno con la antrona (13).

Determinación de la estructura del glucógeno: se hace tratando el glucógeno, aislado mediante el procedimiento anterior, con yodo en presencia de sales de calcio de acuerdo al método de Krisman (14). Mediante dicha reacción, los polímeros de carbohidratos producen diferentes coloraciones, dependiendo del grado de ramificación. Los polímeros más lineales absorben a longitudes de onda larga y los más ramificados a longitudes de onda más corta dentro del espectro visible.

RESULTADOS

La actividad residual de la enzima α glucosidasa en leucocitos estuvo cerca de 17% de la media de los normales, usando un método, y de 15% usando otro método, lo cual indica claramente una deficiencia de dicha enzima (Tabla 2). A finales de 1973 aparecieron informes de pacientes con la

Tabla 2. Resultados de la determinación de la actividad de α glucosidasa en leucocitos usando los métodos fluorométrico y espectrofotométrico.

Individuos Analizados	Actividad	
	μ mol/h/mg/prot. Método Fluorométrico	nmol/h/mg/prot. Método Espectrofotométrico
Padre	34,48	6,36
Madre	137,93	18,46
Hermana	105,26	18,62
Rango de referencia	134,48	18,50
	194-258	16-63,2

Tabla 3. Resultados de exámenes de laboratorio practicados en el paciente, útiles para determinar el tipo de glicogenosis.

Determinación	Resultado	Valor referencia
Acido úrico mg/dL	2,13	3,4-70
Colesterol	184	>250
Triglicéridos	139	Hasta 170
Carnitina	43,2	37-132 μ M
Glicógeno hepático	3,8 g%	Hasta 5%
Corazón	3,16 g%	0,1-1

forma adulta de la enfermedad con actividad residual de la enzima entre 5 y 20% de los controles. Esto llevó a pensar que la deficiencia total era responsable de la forma infantil aguda y que las deficiencias parciales eran propias de las variantes de tipo adulto. Los hallazgos posteriores han mostrado que la severidad de la enfermedad no está siempre asociada con la cantidad residual de la enzima (8).

La determinación cuantitativa de glucógeno indicó que éste se encontraba francamente aumentado en el miocardio en tanto que en hígado estaba dentro de lo normal (Tabla 3). La estructura del glucógeno era normal todo lo cual coincidía con una glicogenosis tipo Pompe.

Al análisis histológico del miocardio se encontró aumento del diámetro de las células, los núcleos claros y rechazados hacia la periferia porque el citoplasma estaba ocupado por una gran vacuola clara (Figura 2). En la Figura 3 se presentan los hallazgos histológicos en tejidos normales mostrando fibras eosinófilas con núcleo central picnótico, que se disponen en empalizadas o grupos, es visible el borde citoplasmático en algunas de estas células. Con la tinción para grasas el material citoplasmático fue negativo. Con tinciones para polisacáridos (glucógeno) dio una tonalidad magenta no muy intensa como sería de esperarse, pues el glucógeno es muy soluble en agua y por lo tanto un defecto en la fijación rápida destruye

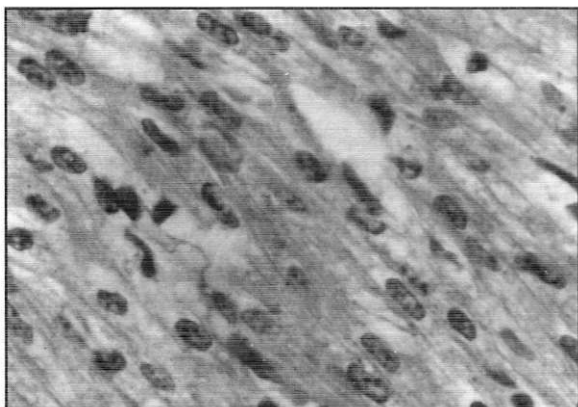


Figura 2. Células miocárdicas del paciente en las cuales se puede apreciar núcleos claros, rechazados a la periferia y el citoplasma ocupado por una gran vacuola clara.

fácilmente este material (Figura 4). La presencia de vacuolas en los músculos de pacientes con glicogenosis tipo II, ha sido informada previamente por Danon y cols (9).

En el tejido hepático no se observó distorsión de la citoarquitectura, fibrosis, ni necrosis del parénquima; los hepatocitos mostraron discreto aumento de su tamaño; el citoplasma estaba reemplazado por un material espumoso o finamente granular, que rechazaba el núcleo hacia la periferia de la célula. La histoquímica especial demostró que el citoplasma contenía abundante material PAS positivo, indicando almacenamiento anormal de glucógeno.

CONCLUSIONES

Los hallazgos enzimáticos en los leucocitos del paciente mostraron una actividad deficiente de la enzima aglucosidasa,

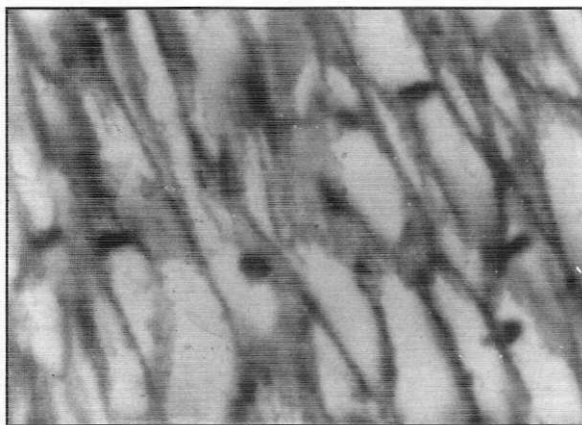


Figura 4. Miocardio coloreado con PAS, nótese la coloración magenta propia de los carbohidratos, la falta de una mayor intensidad se atribuye a problemas de fijación en el tejido (ver texto).

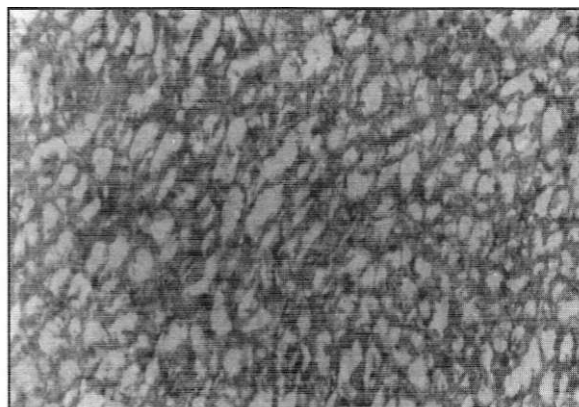


Figura 3. Miocardio normal en el cual puede observarse fibras ensifélicas con núcleo central pictónico dispuestas en empalizadas o grupos.

aun cuando no tan bajos como sería de esperarse, pues los valores enzimáticos encontrados en los pacientes que presentan algún error innato del metabolismo diferente a la enfermedad de Pompe, son generalmente cercanos a cero, excepto en algunas variedades de tipo adulto. Sin embargo, Bashan y col, en un estudio reciente en niños, encontraron valores de maltasa ácida entre 0 y 18% en biopsia de músculo y valores ente 0 y 100% en leucocitos (15); nuestros estudios confirman los hallazgos de éstos y otros investigadores los cuales sugieren que estas determinaciones se deben realizar en biopsia o tejido de necropsia de músculo, corazón o fibroblastos (8, 15, 16) y no en leucocitos. Infortunadamente, la muerte intempestiva del paciente y otras razones, nos impidieron disponer de esos tejidos, por lo cual no se pudieron usar para el análisis enzimático.

La prevalencia mundial de la enfermedad de Pompe se ha calculado en 1:175.000, en tanto que la tipo II (Von Gierke), se ha calculado 1:100.000. La enfermedad de Pompe se considera rara en Japón, Noruega, Suecia y Alemania, pero se ha encontrado como la más prevalente en Taiwan, siendo más frecuente en esta población que la enfermedad de Von Gierke, tipo I (11), que en términos generales se tiene como la más frecuente de las glucogenosis (5). En nuestro país no existen datos al respecto.

El diagnóstico prenatal de glucogenosis de tipo II se ha hecho usando amniocitos cultivados del segundo trimestre de embarazo y en los últimos años, las vellosidades coriónicas. Sin embargo, recientemente han aparecido varios informes cuestionando el uso de vellosidades coriónicas, por las secuelas que puede acarrear para el feto.

El diagnóstico de los errores innatos del metabolismo se hace mediante la determinación enzimática, para lo cual es necesario disponer de tejidos de biopsia o de necropsia, de músculo o piel congelados a -70°C o a -175°C , cuando no se ha llegado al diagnóstico definitivo en vida del paciente. El

diagnóstico prenatal se hace comparando el DNA de las vellosidades coriónicas o las células de líquido amniótico con el DNA del caso índice, por lo cual es indispensable disponer de células mantenidas en la forma ya indicada. Las familias son generalmente reuentes a permitir la toma de tejido de biopsia o aun de necropsia, por lo cual es conveniente que se les explique que éste es un requisito indispensable para llegar al diagnóstico definitivo del paciente y para un posible diagnóstico prenatal en futuros embarazos.

SUMMARY

Pompe's disease is one of the glycogenosis or glycogen storage diseases caused by deficiency of acid maltase which is the enzyme that hydrolyses glycogen within the lysosomes. There are three types of Pompe's disease: 1) The infantile type in which glycogen accumulates in liver, muscle including heart, and central nervous system; patients usually die before two years of age. 2) The juvenile type is seen in children and progresses much more slowly than the infantile form. Organ involvement (other than muscle weakness) is variable. Patients die during the second decade of life. 3) The adult type is marked clinically by muscular weakness mimicking other chronic myopathies. In this paper, the case of a six-month old boy who presented with hypotonia and cardiomegaly, in whom the diagnosis of Pompe's disease was made based upon the measurement of glucosidase in leucocytes by two techniques, is reported. The two techniques are minutely discussed as well as the clinical and biochemical characteristics of this disease.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó para su realización con la ayuda financiera de Colciencias y la Universidad de los Andes. Los autores agradecen la colaboración en la parte de secretaría de Ruth Estella Martínez.

Luis Barrera
Cecilia Algarín
Fernando Rodríguez
Martha Bermúdez
Helena Sandoval
María Isabel Donado

REFERENCIAS

1. **Donado ML** Estudios Bioquímicos de la enfermedad del Metabolismo del Glucógeno en Colombia. Tesis de Magister. Universidad de los Andes. 1988: 33-37.
2. **Hers HG.** Glucosidase Deficiency in Generalized Glycogen-Storage Disease (Pompe's Disease). *Biochem J* 1963; **86**: 11-16.
3. **Lejeune N, Thines SD, Hers HG.** Tissue Fractionation Studies. Intracellular Distribution and Properties of α -glucosidases in Rat. *Liver Biochem J* 1963; **86**: 16-21.
4. **Illingworth BB, Zellweger H.** Glucosidase Activity in Leukocytes from the Family of two brothers Who Lack this Enzyme in Muscle. *Biochem J* 1966; **106**: 16C-18C.
5. **Hers HG, Van Hoof F, De Barys T.** Glycogen Storage Diseases In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. The Metabolic Basis of Inherited disease I. New York, McGraw-Hill 1989; 425-432.
6. **Nitowsky HM, Grunfeld A.** Lysosomal α -glucosidase in type II glycogenosis; activity in leukocytes and cell cultures in relation to genotype. *J Lab Clin Med* 1967; **69**: 472-484.
7. **Angelini C, Engel AG.** Comparative Study of Acid Maltase Deficiency. *Arch Neur* 1972; **26**: 344-347.
8. **Beratis NG, LaBadie GU, Hirschhorn K.** Characterization of the Molecular Defect in Infantile and Adult Acid α -glucosidase Deficiency Fibroblasts. *J Clin Inv* 1978; **62**: 1264-1274.
9. **Danon MJ, OH SJ, DiMauro S.** Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neur* 1981; **31**: 51-57.
10. **Besançon AM, Castelnau L, Nicolesco H, Dumezyves PL.** Prenatal diagnosis of glycogenosis type II (Pompe's disease) using chorionic villi biopsy. *Clin Gen* 1985; **27**: 579-582.
11. **Lin CY, Hwang B, KJ Hsiao, Jin YR.** Pompe's Disease in Chinese and Prenatal Diagnosis by Determination of α -glucosidase Activity. *J Inh Metab Dis* 1987; **10**: 11-17.
12. **Shapira E, Miriam GB, James BM, Africk DK.** A Laboratory Manual. *Biochem Gen* 1989: 26.
13. **Plummer DT.** Reacción de la Antrona. Bioquímica práctica. McGraw-Hill Latinoamericana S.A. 1981; **165**-166.
14. **Krisman C.** A Method for the colorimetric estimation of glycogen with Iodine. *Ann Biochem* 1962; **4**: 17-23.
15. **Bashan N, Potashnik R, Barash V, Gutman A, Moses W.** Glycogen Storage Disease Type II in Israel. *Israel J Med Sci* 1988; **24**: 4-5.
16. **Koster JF, Slee RG, Hülsmann WC.** The use of Leukocytes as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's Disease). *Clin Chim Acta* 1974; **51**: 319-326.
17. **Taniguchi N, Kato E, Yoshida H, Iwaki S, Ohki T, Koizumi S.** Alpha-Glucosidase Activity in Human Leucocytes: Choice of Lymphocytes for the Diagnosis of Pompe's Disease and the Carrier State. *Clin Chim Acta* 1978; **89**: 293-299.

Dr. Luis Alejandro Barrera: Ph.D. Director Centro de Investigaciones en Bioquímica. Universidad de los Andes; Dra. Cecilia Algarín: Neuróloga Pediatra. Barranquilla; Dr. Fernando Rodríguez: Bioquímico. Centro de Investigaciones en Bioquímica. Universidad de los Andes; Dra. Martha Bermúdez: Bióloga, Centro de Investigaciones, Universidad de los Andes; Dra. Helena Sandoval: Médico Patólogo, Hospital Infantil Lorencita Villegas de Santos; María Isabel Donado: Magister en Bioquímica. Centro de Investigaciones en Bioquímica, Universidad de los Andes. Santafé de Bogotá.

Solicitud de separatas al Dr. Barrera.