

## Estudio bioquímico de dos niños y una familia con enfermedad por almacenamiento de glucógeno

A. ALONSO, C. PASCUAL Y K. THIELMANN

*Dpto. Bioquímica Clínica, CNIC*

*Recibido en: Marzo 1971*

**RESUMEN.** Se ha determinado en material biopsico quirúrgico de hígado; el contenido de glucógeno, las actividades de la Glucosa-6-Fosfatasa (EC 3.1.3.9), Fosforilasa (EC 2.4.1.1.)  $\alpha$ -Glucosidasa lisosomal (Maltasa ácida), y se estudió la estructura del glucógeno por  $\beta$ -amiliosis y su espectro de absorción. Como control se obtuvieron valores de tres sujetos con hígados anatomopatológicamente normales. En uno de los pacientes se detectó una deficiencia de la Fosforilasa hepática (EC 2.4.1.1.), en el otro, clínicamente diagnosticado como enfermedad de Von Gierke, se halló una actividad normal de la glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9) y de las demás enzimas estudiadas. En una familia, en la cual dos de sus miembros han sido confirmados bioquímicamente como portadores de una deficiencia de la enzima Amilo-1, 6-glucosidasa (EC 3.2.1.9) se ha encontrado un aumento del glucógeno de los eritrocitos en seis casos más.

**ABSTRACT.** The activities of glucose 6 phosphatase (EC 3.1.3.9), phosphorylase (EC 2.4.1.1.), lysosomal  $\alpha$ -glucosidase (acid maltase), and the structure of glycogen by amilolysis and by its absorption spectrum, were determined in samples of liver obtained by surgical biopsy. As controls histologically normal liver samples from three subjects were used. A deficiency of hepatic phosphorylase was detected in one of the patients the other, clinically diagnosed as Von Gierke disease, a normal activity of glucose 6 phosphatase (EC 3.1.3.9) and of other enzymes studied was observed. In a family two of whose members had been biochemically confirmed as having a deficiency of amilo 1, 6-glucosidase (EC 3.2.1.9.) an increase of the erythrocyte glycogen was found in six more cases.

### INTRODUCCION

Bajo el concepto de Glucogenosis se agrupa un número determinado de enfermedades que producen un acúmulo anormal de glucógeno en los tejidos que afectan. Tienen en común el ser causadas por un defecto enzimático de la degradación del glucógeno, o por la formación de un glucógeno anormal no degradable por el equipo enzimático celular.

Estas enfermedades se clasifican en seis tipos, en relación al defecto enzimático que actúa como causa de la enfermedad, como podemos observar en la Tabla I (Cori 1957).

TABLA I  
ENFERMEDAD POR ALMACENAMIENTO DE GLUCOGENO  
*Clasificación según G. Cori*

Tipo	Defecto Enzimático	Estructura del glucógeno	Organos afectados
I	Glucosa 6-fosfatasa	Normal	Hígado y riñones
II	Maltasa ácida (Lis.)	Normal	Generalizada (miocardio)
III	Amilo-1, 6-glucosidasa (Desramificante)	Anormal: Cadenas externas cortas	Generalizada (Hígado, Corazón y Músculos)
IV	Amilo- (1,4-1,6) transglucosidasa (Ramificante)	Anormal: Escasas cadenas exteriores	Generalizada (Hígado, Corazón Músculos, Eritrocitos)
V	Fosforilasa Muscular	Normal	Músculos
VI	Fosforilasa Hepática	Normal	Hígado, Leucocitos

Clasificación de las Glucogenosis según G. T. Cori, 1957.

Debemos señalar que evidentemente estas enfermedades se transmiten con carácter autosómico recesivo (Schmid, 1964; Hers y col., 1964; Öckerman, 1965). En cuanto a su incidencia, solamente tenemos conocimiento de que en Suecia es de uno por 216,000 nacidos vivos (Öckerman, 1965)

En el presente trabajo presentamos los resultados de las investigaciones bioquímicas, realizadas en algunos casos de Glucogenosis, dirigidas a un diagnóstico diferencial que solamente puede realizarse en el laboratorio. Mediante estos ejemplos se quieren demostrar las posibilidades y los límites de un diagnóstico bioquímico en el laboratorio clínico-químico, hospitalario. Metodológicamente se realizaron

las siguientes investigaciones en el orden expuesto; Concentración tisular del glucógeno, Estructura del glucógeno, Actividades enzimáticas.

### MATERIALES Y METODOS

Se utilizó material biopsico quirúrgico de hígado, congelado inmediatamente en hielo seco y posteriormente conservado en Nitrógeno líquido, hasta su utilización. Las muestras se homogenizaron en solución de KCl 0.147 M mediante un homogenizador de Potter-Elvehjem, en un baño de hielo, obteniendo una concentración promedio de hígado de 37 mg/ml.

#### *Glucógeno.*

a) *Aislamiento y Concentración:* Se toma 1 ml del homogenizado al cual se le añaden 2 ml de solución de KOH 30% (P/V), y se calienta al baño de agua a 100°C durante 20 minutos, para realizar la hidrólisis alcalina del tejido. Se le añaden 3.5 ml de etanol (95-98%), para precipitar el glucógeno, se calienta un minuto, y se deja enfriar. Centrifugamos el glucógeno obtenido, lavamos dos veces con etanol y secamos al baño de agua a 100°C. Se realiza la hidrólisis del glucógeno obtenido utilizando 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y calentando al baño de agua a 100°C durante dos horas, se neutraliza el hidrolizado con 2 ml de NaOH 2N, se lleva el volumen con H<sub>2</sub>O a 10 ml y se determina la concentración de glucosa por el método de la Glucosa Oxidasa (EC 1.1.3.4.). Los resultados se expresan en gramos de glucógeno por 100 gramos de hígado. Esta determinación nos permite el afirmar o rechazar de que se trate de una glucogenosis.

b) *Estructura: I. Espectro de absorción del complejo yodado.* Se toma 1 mg del glucógeno, obtenido por el método anteriormente expuesto, y se disuelve en 3 ml de solución de Cl<sub>2</sub>Ca 5.55 M, se le añaden 0.1 ml de solución Lugol. Se realiza el espectro de absorción en un espectrofotómetro Unicam SP-700. El resultado se expresa en nm refiriéndose a la longitud de onda en la cual se observa el máximo de absorción de luz del complejo yodado.

II. *Degradación del glucógeno por  $\beta$  amilasa (EC 3.2.1.2).* Se toman de 2 a 4 mg de glucógeno, se disuelven en 2 ml de buffer Acetato 0.1 M, pH 5.0 y se le añaden 0.1 ml de solución de amilasa (EC 3. 2.1.2) cristalizada 0.1 mg/ml, se realiza la reacción durante 24 horas a 30°C en un saco de diálisis, dializando contra buffer Acetato pH 5.0, realizando cuatro cambios en 24 horas. Se toman muestras de 1 ml al tiempo 0 y 24 horas. Se realiza la hidrólisis de las muestras tomadas y se determina la concentración de glucosa, como fue expresado anteriormente. Los resultados se expresan en % de glucógeno degradado por la  $\beta$  amilasa (EC 3.2.1.2).

*Enzimas en hígado.*

Se realizó el estudio de las actividades enzimáticas en hígado según Illingworth B., et al., 1965.

*Glucosa-6-fosfatasa* (EC 3.1.3.9). La mezcla de reacción contiene (en concentraciones finales): Glucosa-6-fosfato 0.01 M, buffer Citrato pH 6.9 0.03 M y un equivalente de 5 a 20 mg de hígado, se incuba durante 30-60 minutos a 30°C en un volumen final de 1 ml. La reacción se detiene utilizando 1 volumen de ácido Tricloroacético 10% por cada alícuota tomada. Se determina el fósforo liberado.

La actividad se expresa en U.I. ( $\mu$  Mol/min, 30°C) en base al fósforo liberado.

*$\alpha$  Glucosidasa lisosomal*: (Maltasa ácida). La mezcla de reacción contiene Maltosa 0.02 M en buffer Acetato pH 4.5 0.02 M (concentraciones finales) y un equivalente de 5 a 10 mg de hígado. Se incuba a 37°C durante 1-5 horas en un volumen total de 0.3 ml. La reacción se detiene calentando a 100°C durante 2 minutos, se diluye a 2 ml con agua destilada. Se determina la concentración de glucosa por el método de la Glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). Se expresan los resultados en U.I. ( $\mu$  Mol/min, 37°C) en base a la Maltosa hidrolizada a glucosa.

*Fosforilasa* (EC 2.4.1.1). La mezcla de reacción contiene (en concentraciones finales); Glucógeno 10 mg/ml, Glucosa-1-fosfato 0.1 M pH 6.1, 5-Adenosin-monofosfato 0.001 M, KF, 0.5 M, en un volumen total de 1.8 ml. Se incuba a 37°C y se toman 0.2 ml en los tiempos 0, 10, 20, 30 minutos, deteniéndose la reacción con 0.2 ml de ácido Tricloroacético 10% (P/V). Los resultados se expresan en U.I. ( $\mu$  Mol min., 37°C) de fósforo liberado.

*Determinación de glucógeno eritrocítico*: Se utilizan glóbulos rojos lavados tres veces en solución NaCl 0.85% (P/V), se determina la concentración de hemoglobina en la muestra. Tomamos 2 ml de glóbulos y se le añaden 2 ml de ácido Tricloroacético al 20% (P/V), se revuelve y se deja 15 minutos. Centrifugar a 2000  $\times$  g durante 10 minutos. Se dialisa el sobrenadante obtenido durante 24 horas contra dos cambios de agua destilada. Se vierte el contenido del saco de dialisis en un tubo volumétrico de 5 ml y se completa el volumen con agua destilada. Se determina el glucógeno por el método de la Antrona. Los resultados se expresan en  $\mu$ g/g de hemoglobina (O'Brien, 1964).

*Reactivos*: Los Biorreactivos utilizados en estas investigaciones fueron productos de las siguientes casas:

British Drug Houses Ltd. (Glucosa-1-fosfato, 5'-Adenosin-monofosfato,  $\beta$ -Aamilasa, Peroxidasa), Koch-Light Ltd. (Glucosa-oxidasa), VEB Arzneimittelwerk Dresden, RDA (Glucosa-6-fosfato).

En el Caso A, en el cual se plantea clínicamente la posibilidad de una Glucogenosis del tipo III, IV o VI, se encuentra que presenta un marcado aumento de la concentración de glucógeno, de estructura normal. Los valores obtenidos para la Glucosa 6-fosfatasa (EC 3.1.3.9) y la  $\alpha$  glucocidasa lisosomal, están dentro del rango de los valores normales; la actividad para la Fosforilasa (EC 2.4.1.1.) en cambio se encuentra muy por debajo de los valores obtenidos para los controles normales, lo cual hace considerar a este paciente como portador de una Glucogenosis del tipo VI o Enfermedad de Hers, por déficit de Fosforilasa (EC 2.4.1.1.) hepática.

En el Caso B, el cual clínicamente fue diagnosticado como una Glucogenosis del tipo I, Enfermedad de Von Gierke, nos encontramos con un marcado aumento de la concentración de glucógeno de estructura normal. Las actividades para la Glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9), la  $\alpha$  glucocidasa lisosomal y la Fosforilasa (EC 2.4.1.1.) caen dentro del rango obtenido para los controles normales. Este Caso cae dentro del grupo de pacientes portadores de una Glucogenosis que hasta el momento actual no se les ha hallado justificación bioquímica (*Öckerman, 1965*).

También se estudió la concentración del Glucógeno eritrocítico en una familia en la cual dos de sus miembros han sido diagnosticados como portadores de una Glucogenosis del Tipo III, en un laboratorio fuera de nuestro país (Fig. 1). Llama la atención en el árbol genealógico, las concentraciones de glucógeno eritrocítico en los familiares investigados, solamente en uno de ellos se encuentran cifras dentro de los parámetros normales; en los cinco restantes la concentración de glucógeno eritrocítico es anormalmente elevada, pueden verse las diferencias entre hetero y homocigóticos. Este estudio apoya la tesis de la transmisión de este tipo de defecto enzimático con carácter autosómico recesivo, como ha sido planteado por varios autores (*Schmil y col., 1964*). Pueden compararse las concentraciones obtenidas para los heterocigóticos, que no padecen la enfermedad y los homocigóticos que sí la padecen.

## DISCUSION

Las investigaciones bioquímicas de pacientes con enfermedad por almacenamiento de glucógeno, con el fin de obtener un diagnóstico diferencial, se realizan dirigidas por el diagnóstico clínico. Este último decide en primer lugar el material biopsico a obtener para el estudio del paciente (hígado, músculo, miocardio, etc). No es absolutamente necesario obtener material biopsico; en las Glucogenosis del tipo III podemos demostrar el acúmulo de glucógeno eritrocítico, en las del tipo VI se ha reportado la disminución de la Fosforilasa en los leucocitos, así como también está reportado la disminución de la Glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.1.9), en la mucosa yeyunal, en los pacientes portadores de Glucogenosis del tipo I (*Öckerman, 1966*).

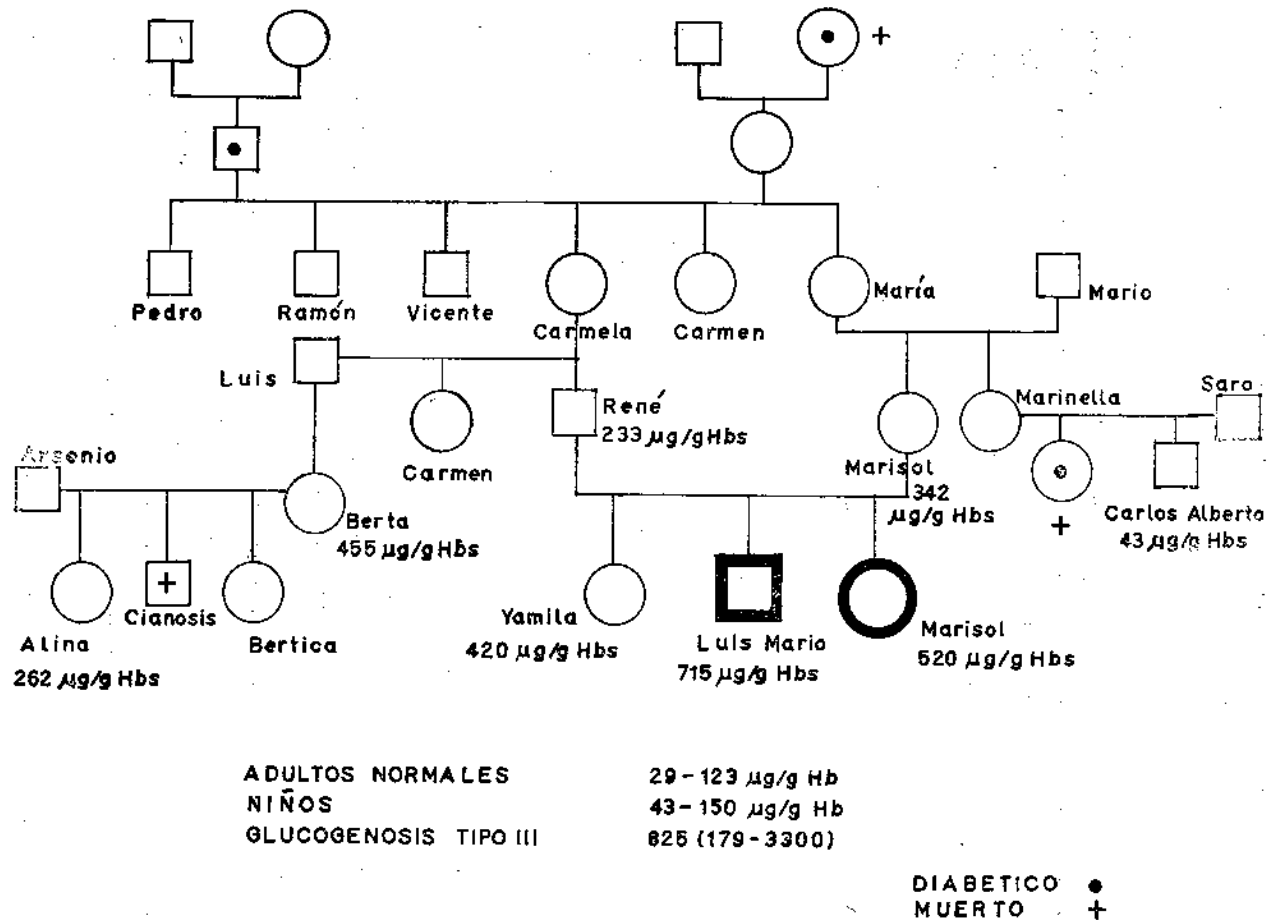


Fig. 1. Arbol geneológico de una familia en la cual dos de sus miembros han sido diagnosticados como portadores de una glucopenosis del tipo III (en trazo grueso).

Las dificultades de obtener el material biopsico limitan en cierto modo la investigación; esto obliga a investigar un buen número de parámetro en el material obtenido y a conservar parte del material, de ser posible, en Nitrógeno Líquido. Mucho más fácil es el obtener biopsias por punción, mediante la cual se pueden estudiar un buen grupo de parámetros con un riesgo mucho menor para el paciente (Lundquist y col. 1969). Otra limitación que surge en el estudio de estos casos es la obtención de verdaderos controles normales, ya que en el mejor de los casos, en relación al hígado, se obtienen de pacientes operados de úlcera péptica gastroduodenal. También hay que tener en cuenta las variaciones de las actividades enzimáticas del hígado en relación a la dieta y el estado nutricional fundamentalmente, así como otros factores que pudiesen afectar ésta (*Pérez y col. 1964; Camus y col. 1969*).

El promedio obtenido para la Fosforilasa (EC 2.4.1.1.) en nuestros controles normales, es del 28% de la actividad promedio reportada en la literatura. Están reportadas las variaciones de la actividad de esta enzima, en el hígado, en relación a la dieta. En investigaciones realizadas con ratas se ha observado que un dieta deficiente en vitamina B<sub>6</sub> provoca una disminución en la actividad de esta enzima de un 75% en relación a los controles normales. Valores elevados se han observado en dietas hiperglucídicas y normoproteicas, así como el disminuir el contenido proteico de la dieta, la actividad disminuye por debajo de los controles normales (*Pérez y col., 1964*). Existen, además, otros factores que pudiesen afectar la actividad de esta enzima (raza, sexo, clima, etc.). En nuestros controles normales, el promedio obtenido, se encuentra por encima de los promedios ofrecidos para los casos patológicos y por debajo de los promedios ofrecidos para los controles normales. Todo esto nos es muy sugestivo de realizar un estudio particular sobre la actividad de la Fosforilasa (EC 2.4.1.1.) hepática en nuestro medio.

Este trabajo muestra las posibilidades de tipo diagnóstico que pueden realizarse en un departamento de Bioquímica Clínica en un medio hospitalario, que centralice el estudio de todos los casos de Glucogenosis que se presenten en nuestro país, así como la necesidad de obtener cifras normales de las distintas actividades enzimáticas en hígado, músculo, leucocitos, eritrocitos y trombocitos, particularmente en nuestro medio. Por las implicaciones que ello tiene tanto para los medios diagnósticos como para la investigación de esta entidad y de estos tejidos. Es necesario el estudio de las variaciones de estos parámetros, en cuanto a la raza, edad, sexo, dieta, y demás factores que puedan intervenir en las variaciones en el individuo normal y patológico.

Queda demostrado también el significado que tiene el estudio de estos pacientes y de sus familiares, para poder detectar los portadores heterocigóticos, aspecto este

de especial importancia, tanto desde el punto de vista de la investigación, como de tratamiento específico.

## RECONOCIMIENTO

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los departamentos de Cirugía de los Hospitales Docentes: William Soler, Calixto García y Enrique Cabrera y al doctor R. Martín Jiménez, por haber hecho posible este trabajo.

- CAMUS J., VANDERMEERS-PIRET M. C., WODON C. CHRISTHOPE J. Activité de treize enzymes du metabolisme intermediaire, dans le foie du jeune rat qui récupère d'une manutritio protidique, *European J. Biochem.*, 11, 225, 1969.
- CORI G. T. Citado por Whelan M. P. Cameron (Eds.) Control of glycogen metabolism p. 306, Churchill Ltd., London, 1964.
- CORI G. T. Glycogen structure and enzymes deficiencies in glycogen storage disease. Harvey Lectures 952-53 p. 154, Academic Press, New York, 1954.
- H5RS H. C. LEOME R., LUFT R. Glycogen storage disease. *Advances in Metabolic Disorders*, 1, 1, 1964.
- HSIA D. Y., INOUE Y. Inborn errors of metabolism Part II p. 120, Year Book, Chicago, 1966.
- ILLINGWORTH B., WHELAN W. J., CAMERON M. P. (Eds.) Control of glycogen metabolism. Ciba Foundation Symposium p. 334, Churchill Ltd., London, 1964.
- ILLINGWORTH B., CORI G. T. Structure of glycogen and amylopectines. Normal and abnormal glycogens. *J. Biol. Chem.*, 199, 653, 1952.
- ILLINGWORTH B., BROWN D. H. The subcellular distribution of enzymes in type II glyco-genosis and the occurrence of an oligo-1, glucan gluco hidrolase in human tissues. *Biochem. Biophys. Acta*, 110, 124, 1965.
- LUNDQUIST A., ÖCKERMAN P. A., SCHERSTEN B. Fine needle aspiration biopsy of the liver in healthy adults. *Enzymol. Biol. Clin.*, 10, 8, 1969.
- O'BRIEN D. Laboratory manual of pediatrics. Micro and ultramicro biochemical techniques p. 144, Hoeber, New York, 1964.
- ÖCKERMAN P. A. Glycogen storage disease in Sweden. *Acta Paediat. Scand. Spp.*, 160, 1965.
- ÖCKERMAN P. A. A technique for enzymatic diagnosis of glycogen storage disease on very small tissues specimens. *Acta Paediat. Scand.* 57, 105, 1966.
- PÉREZ N., CLARK TORRI L., RA2AJILL5 E., NIEMEYER H. Regulation of rat liver enzymes by natural components of the diet. *J. Biol. Chem.*, 239, 2420, 1964.

SCHMID R., WHELAN W. J., CAMERON (Eds.) Control of glycogen metabolism. Ciba Foundation Symposium p. 305, Churchill Ltd, London, 1964.

STACEY M., BAKER S. A. Carbohydrates of living tissues p. 9-12, Van Nostrand, London, 1962.

STEINITZ K. Laboratory diagnosis of glycogen storage diseases. *Adv. Clin. Chem.*, 9, 238, 1967.

VAN HOOF F., HERS H. C. The subroups of type III glycogenosis. *European J. Biochim.*, 2, 263, 1967.