

DOI: <https://doi.org/10.18359/rmed.3358>

Método microespectrofotométrico para la determinación de valores de referencia de la fosfomanosa isomerasa

Jhoan Samacá Martín^a ▪ Adis Ayala Fajardo^b ▪ Alfredo Uribe Ardila^c

Resumen: Los desórdenes congénitos de glicosilación son un conjunto de defectos genéticos de tipo multisistémico que afectan la función de la proteína. Se han descrito cerca de 75 enfermedades desde sus primeros estudios. En el presente estudio se desarrolló un método microespectrofotométrico para el diagnóstico de la enzima citosólica fosfomanosa isomerasa EC 5.3.1.8 (PMI), se analizaron 32 muestras de individuos con rango de edad de 0,6 a 27 años y se estableció el intervalo y el valor de referencia de actividad enzimática específica. Este estudio permitirá iniciar el diagnóstico de pacientes deficientes de la PMI de forma temprana y oportuna, lo cual la convierte en una posible enzima candidata para pruebas de tamizaje neonatal, ya que esta patología tiene un tratamiento fácil y de bajo costo, que consiste en la suplementación de manosa en forma oral. El diagnóstico clínico de este desorden metabólico beneficiará al paciente y a su familia al mejorar su calidad de vida, como también al sistema de salud colombiano.

Palabras clave: fosfomanosa isomerasa; defectos de glicosilación Ib; actividad enzimática, método microespectrofotométrico

Fecha de recepción: 7 de marzo de 2018 **Fecha de aprobación:** 9 de octubre de 2018

Cómo citar: Samacá Martín JA, Ayala Fajardo A, Uribe Ardila JA. Método microespectrofotométrico para la determinación de valores de referencia de la fosfomanosa isomerasa. *Revista Med.* 27(1):29-43. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rmed/article/view/3358>

-
- a Semillero de Investigación del grupo de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
 - b Directora de Grupo de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y Educación Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Correo electrónico: aayala@udistrital.edu.co
 - c Director de Centro de Investigaciones de Bioquímica (CIBI) en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes.

A Microspectrophotometric Method for the Determination of Reference Values of Phosphomannose Isomerase

Abstract: Congenital glycosylation disorders are a set of multi-systemic genetic defects affecting protein function. About 75 diseases have been described since early studies. This study developed a microspectrophotometric method for the diagnosis of the cytosolic enzyme phosphomannose isomerase (PMI) (EC 5.3.1.8), analyzed 32 samples of individuals ranging between 0.6 and 27 years old, and established the interval and reference value of specific enzyme activity. This study will allow early and timely diagnosis of PMI deficient patients, which makes this enzyme a potential candidate for neonatal screening tests since this pathology has an easy, low-cost treatment (oral administration of mannose supplements). Clinical diagnosis of this metabolic disorder will benefit the patient and his family by improving his quality of life, as well as the Colombian healthcare system.

Keywords: Phosphomannose isomerase; Ib glycosylation defects; enzymatic activity, microspectrophotometric method

Método microespectrofotométrico para determinar valores de referência da fosfomanose isomerase

Resumo: Os defeitos congênitos de glicosilação são um conjunto de defeitos genéticos de tipo multissistêmico que afetam a função da proteína. Foram descritas 75 doenças desde seus primeiros estudos. Neste estudo, foi desenvolvido um método microespectrofotométrico para diagnosticar a enzima citosólica fosfomanose isomerase EC 5.3.1.8 (PMI); foram analisadas 32 amostras de indivíduos entre 0,6 e 27 anos e estabelecidos o intervalo e o valor de referência de atividade enzimática específica. Este estudo permitirá iniciar o diagnóstico de pacientes deficientes da PMI de forma precoce e oportuna, o que a converte em uma possível enzima candidata para testes genéticos de rastreio pré-natal, já que essa patologia tem um tratamento fácil e de baixo custo, que consiste na suplementação de manose por via oral. O diagnóstico clínico desse defeito metabólico beneficiará o paciente e sua família ao melhorar a qualidade de vida e o sistema de saúde colombiano.

Palavras-chave: fosfomanose isomerase; defeitos de glicosilação Ib; atividade enzimática, método microespectrofotométrico

Introducción

El fenómeno de la glicosilación hace parte de los mecanismos de maduración postraduccionales de las proteínas, una secuencia metabólica donde participan gran variedad de agentes enzimáticos estratégicamente localizados en el lumen de retículo endoplásmico y complejo de Golgi, paso obligado de estas macromoléculas en los procesos de migración vesicular (1, 2).

Cerca de 500 genes están relacionados con los procesos de glicosilación y aproximadamente el 50% de nuestras proteínas se encuentran glicosiladas (3-5). Los azúcares unidos covalentemente a las proteínas son importantes para el control de calidad, la estructura, el plegamiento y la vida media, y hacen parte del sitio activo de estas o actúan como reguladores en la interacción glicoproteína ligando (4-6). Los azúcares son unidos mediante dos mecanismos: la O-glicosilación, que ocurre cuando los glicanos forman enlaces covalentes con el grupo hidroxilo de los residuos de serina, treonina o

hidroxilisina de las proteínas, y la N-glicosilación, que se da por la unión covalente de los glicanos a la proteína a través del átomo de nitrógeno del amino de la asparagina que presenta como sitio de glicosilación. El proceso de glicosilación se produce en varias etapas: síntesis de dolicol, síntesis del oligosacárido central o núcleo unido al dolicol, transferencia del oligosacárido estándar a la asparagina de la proteína naciente y procesamiento de la cadena N-glicano. Las dos primeras etapas se dan en el citosol y la última se realiza en el lumen del retículo endoplásmico y las cisternas del aparato de Golgi (ver figura 1) (2, 6, 7). Los glucoconjugados son importantes en el metabolismo de proteínas, ya que cumplen funciones de reconocimiento, adhesión, migración celular, resistencia a las proteasas, mecanismos de defensa y antigenicidad; de ahí que la deficiencia de enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos causen diversas enfermedades multisistémicas agrupadas en los defectos congénitos de glicosilación (CDG) (8, 9).

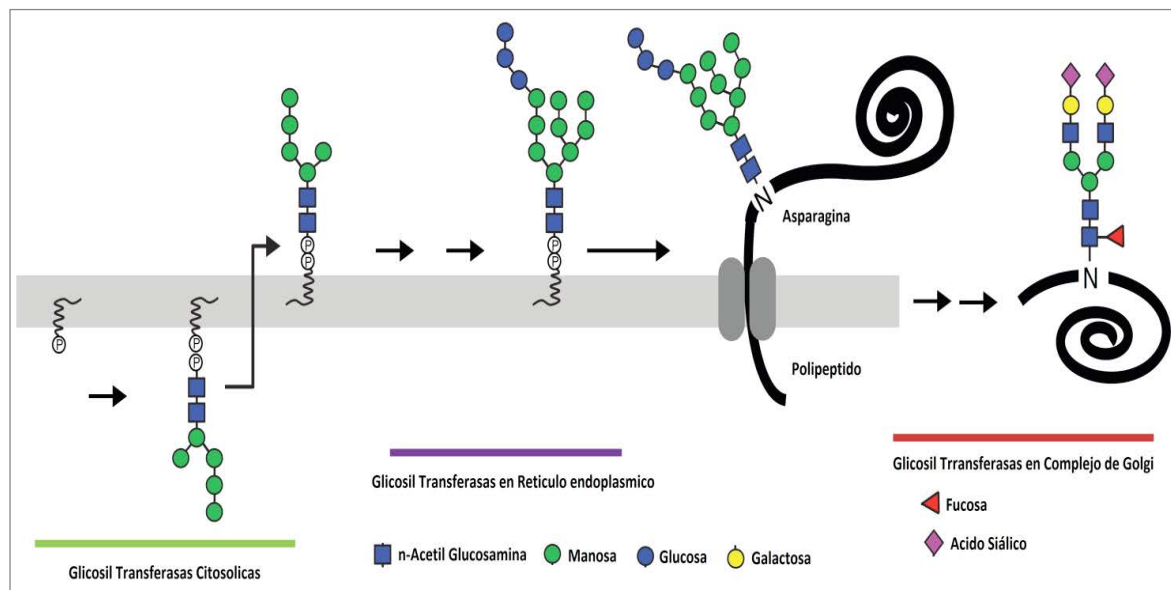


Figura 1. Mecanismo de N-glicosilación. Proceso general y monosacáridos implicados.

Fuente: elaboración propia, a partir de (10).

Dentro de la secuencia catalítica descrita anteriormente y como protagonista de los defectos de la glicosilación, se encuentra incluida la enzima citosólica fosfomanosa isomerasa humana (E. C. 5. 3. 1. 8), que cataliza la interconversión de fructosa-6-fosfato a manosa-6-fosfato, codificada por el gen MPI, que se localiza en el cromosoma 15 (q21.1) y transcribe una proteína de 440 aminoácidos con un único sitio activo que liga como cofactor un ion Zn^{2+} (11, 12). Se han descrito 18 mutaciones (OMIM # 602579) en el gen que afectan la actividad catalítica de la enzima y están relacionadas con cambios puntuales de aminoácidos o aparición de codones de parada prematuros; también, se han descrito deleciones e inserciones que alteran factores de transcripción relacionados con este gen (13-17). La deficiencia de la fosfomanosa isomerasa (PMI) se conoce como desorden de glicosilación tipo Ib (CDG-Ib), que es heredado de forma autosómica recesiva y se caracteriza por complicaciones clínicas en el hígado y el intestino, principalmente (18). Los primeros síntomas se manifiestan a los tres meses de vida, los niños presentan diarrea y vómito, con frecuencia acompañados de hepatomegalia debida a fibrosis hepática (19). En algunos casos se observa hipoalbuminemia, que en ocasiones conduce a un retraso en la curva ponderal de crecimiento (8). Los pacientes pueden cursar con hipoglucemia por hiperinsulinismo, coagulopatías (hemiplejía, accidente cerebral, trombo cardíaco y flebitis) por niveles anormalmente bajos de los factores de coagulación y anticoagulación. A nivel intestinal, se presenta enteropatía con pérdida proteica, atrofia de vellosidad yeyunal y cólica como enteropatía exudativa (8, 9, 17, 20).

El diagnóstico en la primera infancia es ideal, porque la deficiencia de fosfomanosa isomerasa es el único de los defectos de glicosilación con un tratamiento eficaz, que consiste en la administración de manosa oral; este producto es deficiente en la reacción catalizada por esta enzima (21). La manosa exógena suplementada es fosforilada a manosa-6-fosfato por medio de una hexocinasa a expensas de ATP, contrarrestando el defecto enzimático y normalizando la concentración de este compuesto que es uno de los sustratos principales

en la N-glicosilación de proteínas (9, 22). Es importante mencionar que se ha demostrado que la terapia con manosa mejora la condición general de los síntomas digestivos reportados en todos los pacientes (18, 23-25). La hipoglucemia y el vómito se estabilizan en pocas semanas, el estado general de los pacientes mejora rápido y la diarrea se normaliza después del primer año de tratamiento; sin embargo, en algunos casos, la hepatomegalia puede persistir (14, 24). También se ha sugerido que en caso de presentarse compromiso de enteropatía con pérdida proteica los pacientes pueden ser tratados con heparina (7500 UI/día) (26).

En Colombia, no se han realizado estudios enzimáticos para la identificación de pacientes con CDG Ib y en la actualidad no existen reportes de este desorden por parte del Ministerio de Salud y Protección Social. Por lo cual el propósito de este estudio fue desarrollar un método microespectrofotométrico para su diagnóstico.

Metodología

Las enzimas, los inhibidores de proteasas y los reactivos fueron obtenidos de SIGMA: PGI (P9544), G6PDH (G6378), leupeptina (L2884), antipaína (Sigma-10791), manosa-6-fosfato (M3655), HEPES (Sigma-H3375), DTT (10197777001), $MgCl_2$ (M8266) y $NADP^+$ (N0505); el KCl fue provisto por MERK (4936).

Para este estudio fueron analizadas 32 muestras de sangre completa en estado preprandial, 22 de niños (9 de género femenino y 11 masculino) y 10 de adultos (5 de género femenino y 5 masculino), con edades de 0,6 a 27 años. Las muestras fueron fenotípicamente normales y donadas mediante consentimiento informado.

Para el ensayo enzimático se recolectaron 5 ml de sangre venosa en tubos heparinizados. La separación leucocitaria se realizó por el método modificado de Shapira *et al.* (27) y los extractos celulares fueron almacenados a $-20^{\circ}C$ en 600 μL de agua ultrapura hasta su uso. Los leucocitos aislados fueron llevados a lisis bajo baño de hielo en un sonicador ultrasonic Cell Disruption W-220 y congelados a $-20^{\circ}C$ hasta su uso. Se cuantificó el contenido de

proteínas totales por el método de Folin-Lowry, modificado por Ayala (28), utilizando una curva de calibración de albumina sérica bovina (BSA) con valores de 25-200 mg/dL. La concentración de proteínas en los lisados fue ajustada a una concentración final de 40 µg/50 µL con buffer de lisis, el cual contenía 20 mM HEPES pH 7,1, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 10 µg/mL leupeptina y 10 µg/mL antipaína.

Estandarización de la actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa

Las 32 muestras fueron valoradas por triplicado en el equipo VariosKan Flash, que fue programado por medio del software SkanIt 2.4.5, con el cual realizó un método cinético y fotométrico de manera simultánea. Para la determinación de la actividad específica las enzimas auxiliares (PGI y G6PDH) fueron disueltas y cuantificadas por el método de ácido bicinónico (BCA). Para la medición de la actividad enzimática se modificó el método de de Van Schaftingen y Jaeken (29) de la siguiente manera: se llevaron a cabo dos ensayos en los que se probaron dos concentraciones de enzimas auxiliares y de sustrato. Para la medición de la velocidad del ensayo 1 y 2 se adicionó mediante inyector a cada pozo 50 µL del lisado ajustado a 40 µg de proteína en un volumen final de 300 µL; para el ensayo 1 se agregaron 200 µL de buffer de reacción que contenía 100 mM HEPES pH 7,1, 12 mM MgCl₂, 0,72 mM de NADP⁺, 0,72 U de PGI y 0,72 U de G6PDH; para el ensayo 2 se adicionaron los mismos componentes a las mismas concentraciones, excepto para las enzimas auxiliares (PGI y G6PDH) en las que se utilizó 1,2 U. La mezcla de reacción se mantuvo con hielo durante la dispensación y agitada a 300 rpm por 5 segundos. La reacción fue iniciada para el ensayo 1 y 2 por la adición de 50 µL de manosa-6-fosfato 6 mM y 36 mM, respectivamente. Para el blanco de reactivos se adicionaron todos los componentes excepto el sustrato, que fue reemplazado por 50 µL de buffer de lisis. La reacción se dejó estabilizar por siete minutos antes de iniciar la lectura. Las muestras se incubaron a 37°C y la actividad fue leída a 340 nm, y así se determinó el aumento de

la concentración de NADPH+H⁺ por cada minuto durante dos horas. Adicionalmente, se corrió una curva de calibración de NADPH+H⁺ con concentraciones de 0,075 mM, 0,15 mM y 0,3 mM.

Ensayo de actividad enzimática contra el tiempo

Para determinar el tiempo óptimo de lectura de la reacción de actividad enzimática se procesaron tres secuencias de análisis a partir de un lisado de leucocitos (varón, edad: 5 años) haciendo un registro espectral de 10 horas, bajo las condiciones del ensayo 2.

Ensayo de estabilidad del buffer de reacción

Se determinó la estabilidad de las enzimas dentro del buffer de reacción (sin NADP⁺) mediante dos ensayos de actividad enzimática; el primer día de preparada la mezcla de reacción y 58 días después, el NADP⁺ fue adicionado a la mezcla de reacción antes de iniciar el ensayo. Se tomaron las mismas concentraciones de proteína, buffer de reacción (enzimas auxiliares y cofactores) y de sustrato descrito en el ensayo 2. Para esto se analizaron cinco muestras por triplicado tomadas al azar (3 niñas con edades 2,1, 13,4 y 9,5 años, un niño de 0,6 años y una mujer de 27 años).

Cuantificación de la actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa

La actividad enzimática específica de la enzima fue calculada en nmol/h. mg de proteína y nmol/min. mg de proteína, mediante una reacción acoplada en la cual el sustrato manosa-6-P en presencia de fosfomanosa isomerasa y el ión Mg²⁺ es transformado a fructosa-6-P, que a su vez se isomeriza mediante la acción catalítica de la fosfogluco isomerasa en presencia de Mg²⁺ a glucosa-6-P; esta, al mismo tiempo, por la acción de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la coenzima NADP⁺, produce 6-fosfogluco-lactona más NADPH+H⁺ (figura 2).

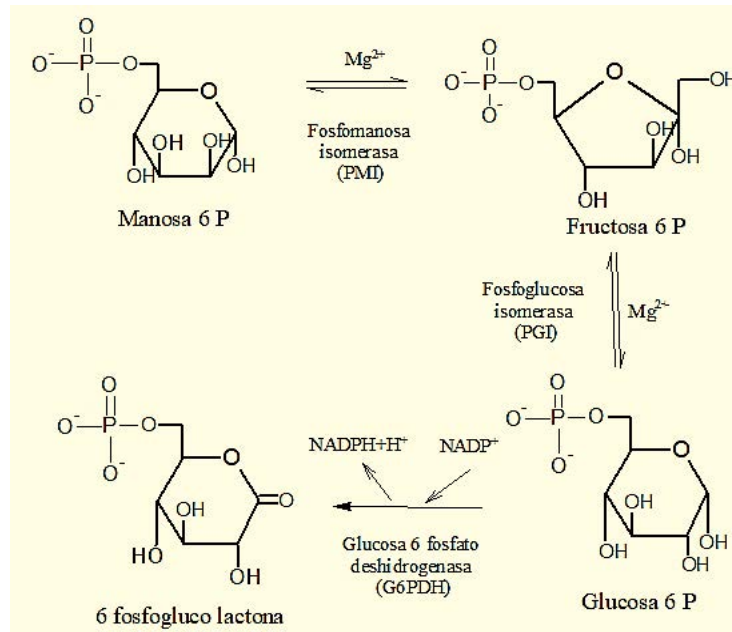


Figura 2. Reacción de acople llevada *in vitro* para la cuantificación de la actividad enzimática específica de la fosfomanosa isomerasa

Fuente: elaboración propia.

Análisis estadístico de la actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa

Para validar los resultados de actividad se utilizó el programa XLSTAT de Microsoft Excel, se hizo un análisis estadístico descriptivo en el que se estimó el coeficiente de variación, la desviación estándar, media, mediana, entre otros. Además, se determinaron los valores atípicos por medio de la prueba de Dixon, teniendo como criterio de significancia 1 SD. Se llevaron a cabo pruebas de distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov por género y edad, considerando que no es significativo cuando el p-valor es $> \alpha$ 0,05. Para determinar si la actividad enzimática estaba influenciada por la edad, el grupo control fue clasificado en tres grupos 0-4, 5-12 y 13-27 años, y se utilizó una prueba de Anova como test de normalidad, el Test de Breush-Pagan (heterocedasticidad) y de Durbin (independencia). Finalmente, se estableció un intervalo de actividad enzimática por medio del Test t de Student y se determinó el valor de referencia por medio de los fractiles 0,025 y 0,975, bajo un intervalo de confianza del 95 %.

Resultados

En los lisados de leucocitos se obtuvieron valores de proteínas en un rango de 89,7-342,8 mg/dl para las muestras n.º 28 y 13 de género femenino y masculino que tenían 22 y 8,2 años, respectivamente, al ser interpoladas en una curva de calibración de BSA que presentó una absortividad de 0,0041 L/mg.cm y valores de coeficiente de correlación de 0,9916 e intercepto de 0,0429.

Ensayo de actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa frente a dos concentraciones de sustrato y enzimas

Al comparar por triplicado la actividad enzimática de cinco muestras utilizando una concentración final de sustrato de 0,6 mM (man-6-P) con 0,6 U de las enzimas auxiliares con respecto a la actividad enzimática de estas mismas muestras y empleando una concentración final de sustrato 6 mM y de enzimas auxiliares de 1 U, se encontró para este último un aumento en la actividad enzimática específica del 43 al 68 %, bajo estas últimas condiciones (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la actividad enzimática (AEz) de la fosfomanosa isomerasa empleando dos concentraciones de PGI, G6PDH y del sustrato M6P

Ensayo 1: 0,6 U PGI y G6PDH; 0,6 mM Man-6-P						Ensayo 2 : 1 U PGI y G6PDH; 6 mM Man-6-P			*
N.º muestra	edad (años)	G	Ab	nmol/h. mg p.	nmol/min. mg p.	Ab	nmol/h. mg p.	nmol/min. mg p.	% AEz específica
3	12,3	M	0,054	190	3	0,171	600	10	68
4	11,8	F	0,232	813	14	0,446	1565	26	48
5	2,1	F	0,344	1207	20	0,827	2901	48	58
6	0,6	M	0,308	1081	18	0,689	2416	40	55
9	2,6	M	0,214	752	13	0,377	1323	22	43

* Porcentaje de aumento de la actividad enzimática entre los ensayos.

Fuente: elaboración propia.

Por lo anterior, el protocolo para la medición de la actividad enzimática en nuestro estudio consistió en 50 μ L del lisado ajustado previamente a 40 μ g de proteína con buffer de lisis, 200 μ L de buffer de reacción que contenía 100 mM HEPES pH 7,1, 11,9 mM MgCl₂, 0,72 mM de NADP⁺, y 1,2 U de las enzimas auxiliares fosfoglucoisomerasa (PGI), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 50 μ L de manosa-6-P 36 mM. Para este ensayo la actividad enzimática de la PMI mediante la reacción de acople (figura 2) presentó un rango de absorbancias de 0,135-0,868, una vez corregida la muestra contra su respectivo blanco, lo cual permitió calcular la actividad enzimática específica de la enzima en nmol/h. mg de proteína.

Curva de calibración de NADPH+H⁺

La curva de calibración de NADPH+H⁺ corregida por mínimos cuadrados obtuvo un coeficiente de extinción de 6,413 L/mmol.cm para esta coenzima, con un valor de intercepto de 0,0006 y una correlación de 0,999.

Ensayo de actividad enzimática contra el tiempo

El seguimiento de la actividad enzimática durante diez horas (ensayos n=3) permitió determinar que la aparición del producto es lineal hasta 3,3 horas ($r^2= 0,9868$) (figura 3B). Lo anterior sugiere que se pueden realizar lecturas en este intervalo, teniendo en cuenta que los valores de absorbancia se hallaron por arriba de 0,135 una vez corregida la muestra con su respectivo blanco. Por lo tanto, todas las muestras en nuestro ensayo fueron leídas a las dos horas. Se presentaron pequeñas variaciones de actividad a los 89 minutos y 234 minutos (figura 3A).

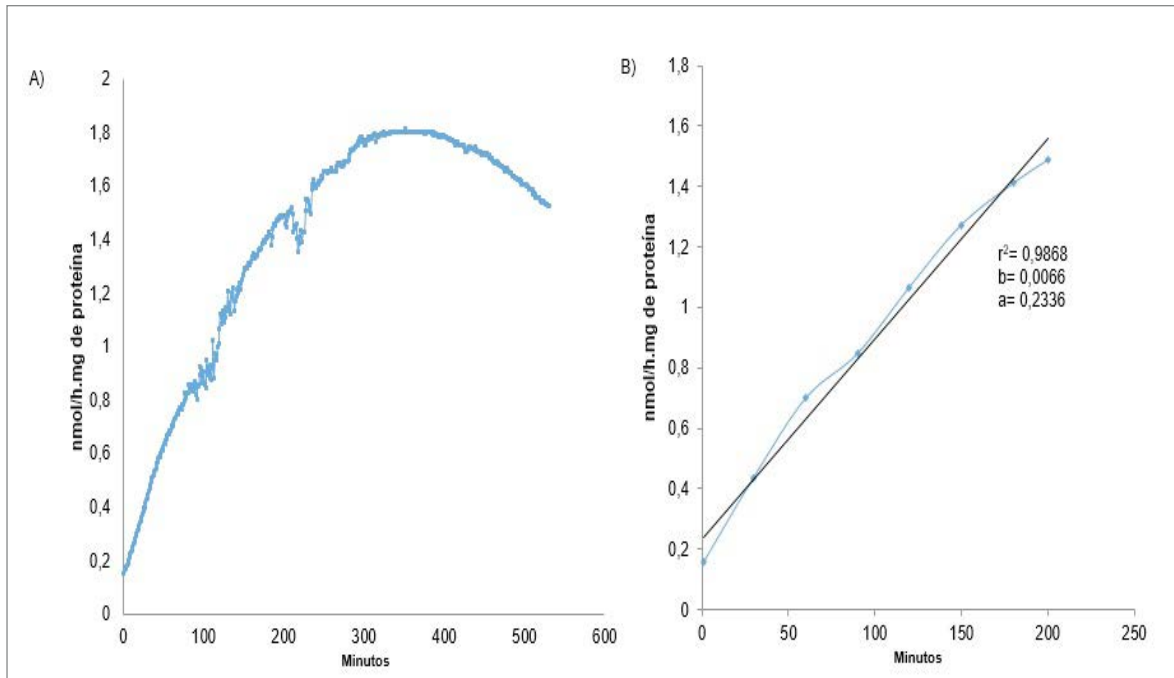


Figura 3. A. comportamiento de la actividad enzimática durante 10 horas, B. parte lineal de la actividad enzimática de la muestra (coeficiente de variabilidad inter-ensayo ($n=3$) $\leq 10\%$).

Fuente: elaboración propia.

Ensayo de estabilidad del buffer de reacción

El ensayo de estabilidad de las enzimas auxiliares en el buffer de reacción (conteniendo las enzimas PGI y G6PDH, MgCl₂ en HEPES 100 mM pH 7,1) mostró que solo había una disminución entre el 11 y el 27% en la actividad enzimática específica después de transcurridos 58 días en las cinco muestras analizadas (tabla 2).

Tabla 2. Estabilidad del buffer de reacción

Ensayo de actividad enzimática					
No	Ensayo día 1		Ensayo día 58		*
	nmol/h. mg prot.	nmol/min. mg prot.	nmol/h. mg prot.	nmol/min. mg prot.	% actividad enzimática específica
5	2901	48	2343	39	19
6	2416	40	1790	30	26
8	553	9	452	8	18
18	551	9	492	8	11
25	567	9	415	7	27

* Porcentaje de disminución de la actividad enzimática entre los ensayos.

Fuente: elaboración propia.

Análisis estadístico de la actividad enzimática específica encontrada para fosfomanosa isomerasa

Se determinaron tres valores atípicos, con actividades enzimáticas específicas de 2901, 2799 y 3045 nmol/h.mg de proteína, que pertenecían a dos controles de género femenino y uno de género masculino, con edades de 2,1 años, 20 años y 5 años, respectivamente (figura 4).

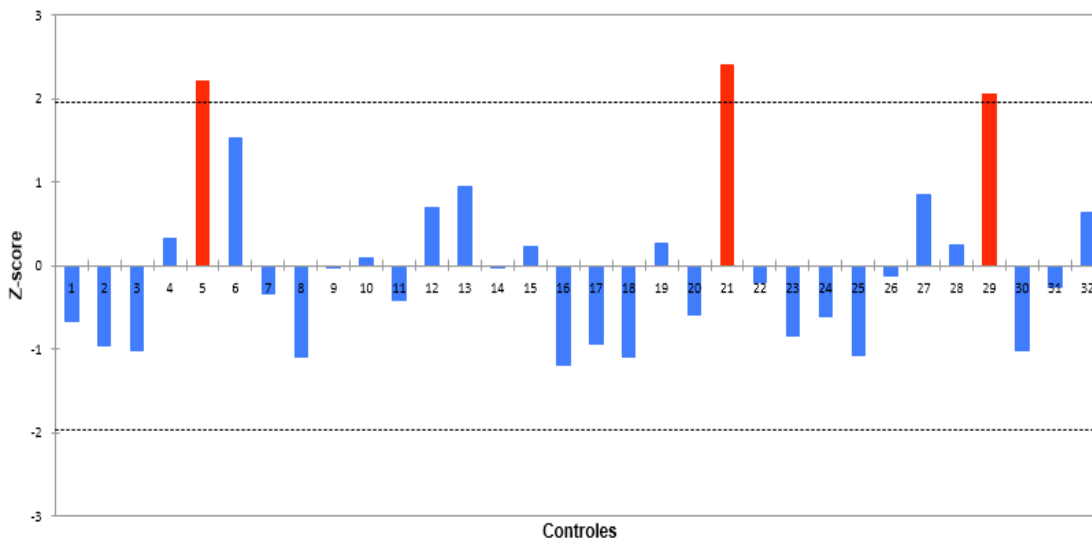


Figura 4. Distribución de valores de actividad enzimática y valores atípicos.

Nota: para establecer los valores que se encontraban fuera del rango del límite superior e inferior de actividad enzimática se utilizó el test de Dixon (barras de color rojo).

Fuente: elaboración propia.

Se observó una distribución normal para la población de controles, que se analizó al obtener un p-valor 0,649 bajo un nivel de significancia α 0,05, y un p-valor de 0,699 determinado por la densidad de kernel por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (tabla 3). La distribución de los datos de actividad enzimática permitió calcular una actividad media 1330 nmol/h. mg de proteína con una SD de \pm 714,5 nmol/h.mg de proteína y un coeficiente de variación de 0,53 (tabla 3).

Tabla 3. Análisis estadístico: muestra de controles sanos estudiados

Análisis descriptivo	nmol/h. mg de proteína	
Media	1330,26	
Error típico	126,30	
Mediana	1219,70	
Desviación estándar	714,44	
Varianza de la muestra	510420,16	
Coefficiente de variación	0,53	
Curtosis	0,30	
Coefficiente de asimetría	0,96	
Mínimo	473,31	
Máximo	3044,81	
Análisis de normalidad		
Test de normalidad	α	P-valor
Kolmogorov-Smirnov	0,05	0,699

Fuente: elaboración propia.

El análisis estadístico y descriptivo de cajas para la muestra estudiada (n=32) determinó que el 25% de los valores de actividad enzimática es ≥ 710 nmol/h. mg de proteína y el 75% de las muestras presentó valores de actividad ≤ 1618 nmol/h. mg de proteína. Asimismo, se halló una media de actividad enzimática de 1330 nmol/h. mg de proteína, y se encontraron dos valores atípicos de actividad enzimática de 3045 y 473 nmol/h. mg de proteína, que correspondían a controles de género masculino con edades de 2,3 y 5,3 años (figura 5A).

Se observó al comparar el subgrupo de género masculino (n= 18) con respecto al femenino (n= 14) una mayor actividad enzimática específica en relación con la media calculada 1426 y 1206 nmol/h. mg

de proteína, respectivamente. Además, se observaron dos valores atípicos de actividad enzimática para el género masculino 473, 3044 nmol/h. mg de proteína que correspondían cada uno a dos muestras de 2,3 y 5,3 años de edad. Para el género femenino se hallaron dos valores aberrantes en la actividad enzimática, 551 y 2901 nmol/h. mg de proteína, que correspondían a muestras de 2,1 y 9,5 años, respectivamente (figura 5B).

En los tres grupos analizados por edad se encontraron valores atípicos por medio del análisis de cajas y una actividad media de 1499 (0-4 años), 1246 (5-12 años) 1259 nmol/h. mg proteína (13-27 años) (figura 5C).

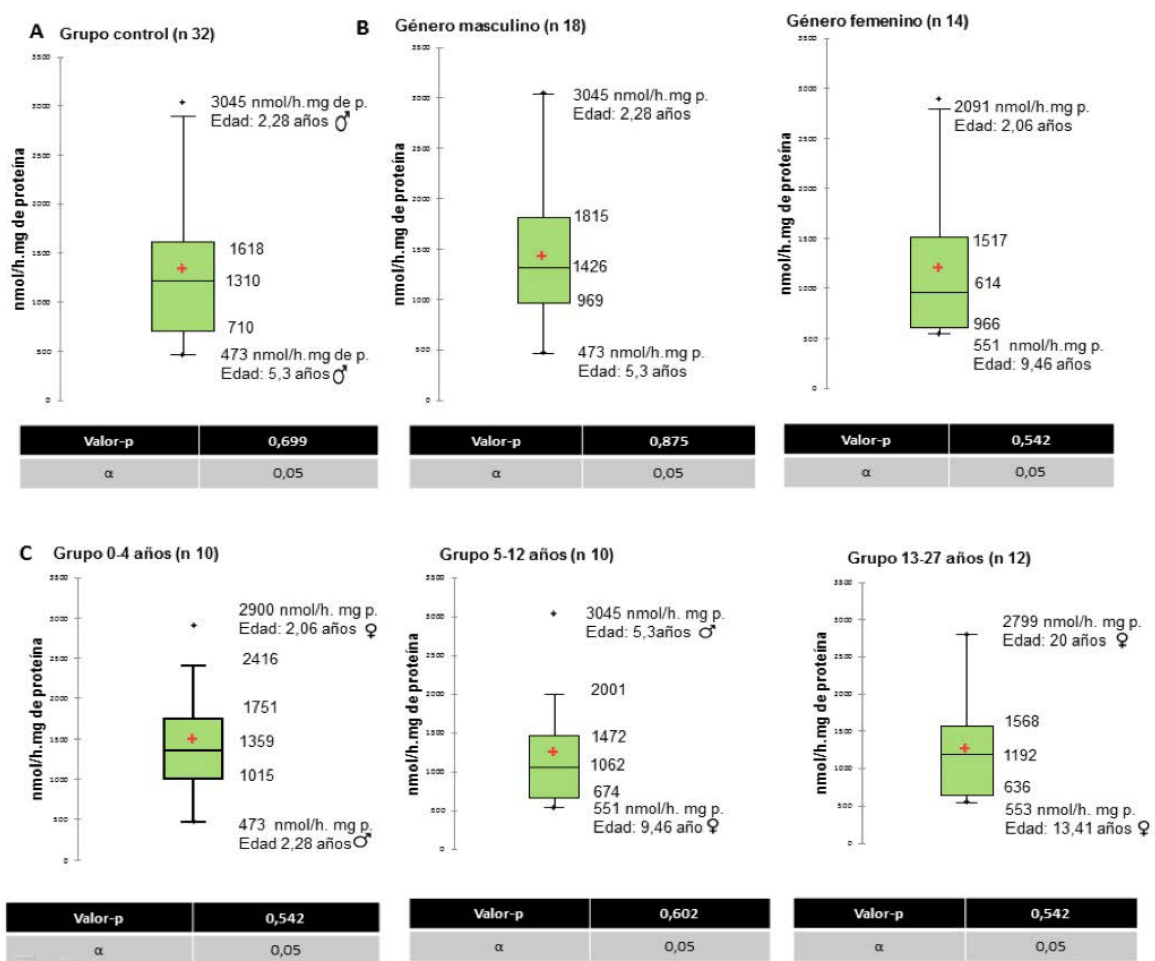


Figura 5. Análisis por diagrama de cajas: a. controles analizados (total); b. grupo control por género, c. grupo control clasificado en tres rangos de edad (0-4, 5-12, 13-27 años).

Fuente: elaboración propia.

Análisis estadístico de controles por género y edad

Se encontró que la actividad enzimática no está influenciada por el género, porque se presentó una distribución normal con relación a la media de actividad para ambos grupos, al aplicar las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el test bilateral. De igual forma el análisis de varianza entre los géneros mediante la prueba F de Fisher determinó que la actividad enzimática de la PMI no se encuentra influenciada por este (tabla 4).

Las actividades enzimáticas de los diferentes grupos de edad mostraron una distribución normal, y entre estos se observó, mediante análisis Anova, que no hay diferencias significativas (tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico por edad y género para la PMI

	Género				Edad					
	Femenino (n 14)		Masculino (n 18)		0-4 años (n 10)		5-12 años (n 10)		13-27 años (n 12)	
Test de normalidad	α	p-valor	α	p-valor	α	p-valor	α	p-valor	α	p-valor
Kolmogorov-Smirnov	0,05	0,542	0,05	0,875	0,05	0,817	0,05	0,602	0,05	0,908
Actividad media (nmol/h.mg de proteína)	1206,21		1426,66		1498		1247		1259	

Fuente: elaboración propia.

Finalmente, lo anterior se corroboró mediante tres análisis estadísticos que demostraron que la actividad enzimática no estaba afectada por la edad: Durbin-Watson halló un p-valor $< 0,001$, White determinó un p-valor de 0,558 y Breusch-Pagan encontró un p-valor 0,332, todos bajo un nivel de significancia $\alpha 0,05$.

Intervalo y valor de referencia de actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa

Se estableció un intervalo de actividad enzimática de 1073-1588 nmol/h. mg de proteína y un valor de referencia de 551-2416 nmol/h. mg de proteína bajo un nivel de confianza del 95 %.

Discusión

Estandarización del método para la determinación de la actividad enzimática

Los resultados de actividad enzimática en las muestras 3, 4, 5, 6 y 9, analizadas con las condiciones del ensayo 2, establecieron un mayor rango de absorbancia de 0,171-0,827, con lo que se obtuvo un intervalo de 600-2901 nmol/h. mg de proteína, en comparación con el ensayo 1 (al emplear como concentración final de sustrato 0,6 mM y de enzimas auxiliares 0,6 U), en este último se consiguió un menor rango de absorbancia (0,054-0,344), una vez corregidas las muestras contra su respectivo blanco; por lo tanto, se hallaron valores inferiores de producción de la coenzima NADPH+H⁺ y de actividad enzimática: 190-1207 nmol/h. mg de proteína. El aumento de actividad enzimática

específica del 43 al 68 % en las cinco muestras analizadas al azar bajo las condiciones del ensayo 2 permitió establecer que la concentración del sustrato para la determinación de la actividad enzimática debería realizarse a una concentración final 6 mM, es decir, bajo condiciones saturantes (10 X) y con un aumento de la concentración de las enzimas auxiliares PGI y G6PDH a 1 U de concentración final, respectivamente. Estos resultados concuerdan con Bisswanager (30), el cual ha descrito que la velocidad de una enzima es directamente proporcional al grado de saturación y que cuando se emplea 10 veces la concentración del sustrato con respecto al K_m se encuentra un 9% de sitios libres y 91% de saturación; también menciona que la reacción puede ser regulada en su velocidad al aumentar la concentración de las enzimas. Esto se observó al obtener un incremento en la aparición de $NADPH+H^+$ que se reflejó en mayores valores de absorbancia para las muestras analizadas (rango de absorbancia 0,135-0,868 para las 32 muestras). Por lo anterior, el método microespectrofotométrico se trabajó en condiciones saturantes de sustrato, ya que no se vio ningún tipo de inhibición por este para la enzima PMI.

Curva de calibración de $NADPH+H^+$

La pequeña diferencia del coeficiente de extinción del $NADPH+H^+$ para nuestro ensayo (6,41 L/mmol. cm) con relación al valor reportado 6,22 L/nmol. cm se explica gracias a que nuestro estándar fue disuelto en buffer HEPES 100 mM pH 7,1 y no en Tris-HCl 0,1 M pH 7,3-8,0 (31).

Ensayo de actividad enzimática contra el tiempo

Los resultados observados en las curvas de progreso de formación del producto contra el tiempo están relacionados con el comportamiento enzimático descrito por diferentes autores hablan de una región lineal y una no lineal, y que el tiempo óptimo de lectura abarca una franja de 3 horas 20 minutos.

Siguiendo entonces las condiciones experimentales descritas, se dejaron como punto de lectura estándar 120 minutos (2 horas), tiempo que describe la fracción lineal de la pendiente de progreso, recomendada para producir una señal directa

en la conversión de sustrato a producto. Gracias a esto se obtuvieron valores de absorbancia (≥ 0.135) en la determinación de la velocidad de la PMI que garantizan un menor porcentaje de error en la determinación de la actividad enzimática. Ligeras desviaciones de absorbancia pueden registrarse (minuto 89 y 234) por alteraciones de voltaje que ofrecen inestabilidad espectrofotométrica.

Después de los 300 min se observó una velocidad asintótica, que puede ser explicada por la saturación de los centros activos de la enzima con el sustrato; también se halló una disminución en la actividad después del minuto 400. Este comportamiento se puede presentar por influencias desestabilizantes en la estructura de la proteína, que pueden ser por causa de un decrecimiento del sustrato, disminución de la coenzima en su estado oxidado, inhibición de la actividad de la enzima o por cambios drásticos del pH generado por la producción de $NADPH+H^+$; esta última puede afectar la estructura terciaria de la enzima de una forma irreversible.

Otro factor que posiblemente afecta la actividad enzimática es el tipo de buffer; sin embargo, en el experimento la temperatura utilizada fue constante (37°C) y como sistema amortiguador se usó HEPES, que tiene una capacidad débil para complementar iones. Con lo anterior se logró que estos en la mezcla de reacción enzimática ($MgCl_2$) estuvieran a disposición como cofactor para la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y para la fosfomanosa isomerasa, aunque la última usa Zn^{++} como cofactor (30)

Ensayo de estabilidad del buffer de reacción

La causa de la disminución de la actividad enzimática después de los 58 días (tabla 3) se explica por procesos de óxido-reducción, que produce desestabilización de la estructura terciaria por cambios de pH de la PGI y G6PDH (30). No obstante, las enzimas mostraron un alto grado de estabilidad en comparación con otros estudios, los cuales sugieren que la PMI disminuye drásticamente su actividad y que los ensayos se deben realizar de forma inmediata, una vez resuspendidas las enzimas PGI y G6PDH en agua. La preservación de un 73% de actividad podría explicarse gracias a que estas no

fueron solubilizadas en agua, sino en buffer HEPES 100 mM pH 7,1 lo que permitió conservar su actividad por un tiempo más prolongado.

Análisis estadístico de la actividad enzimática específica de la fosfomanosa isomerasa en la muestra de controles estudiada

Las medidas de dispersión aplicadas a la población estudiada (SD y varianza) ofrecen una marcada desviación del valor medio de actividad enzimática encontrada. Esta es una circunstancia habitual en pequeños muestreos que no abarcan todos los grupos etarios, hallazgo que muestra una franca corrección a medida que se incluyan nuevos controles de la población en estudio.

Otro hallazgo relevante a esta primera aproximación a los valores de referencia para la fosfomanosa isomerasa se relaciona con los valores atípicos encontrados en términos de sobreexpresión de actividad, un fenómeno que puede ser explicado, primero, por los polimorfismos hallados en los genes de la enzima que pueden causar este comportamiento y, segundo, por el uso de sustratos artificiales, como se ha descrito anteriormente para la enfermedad de Niemann Pick A/B o en los ensayos *in vitro* para hexosaminidasas Totales (32, 33).

Finalmente, respecto a factores como edad o género, estos no mostraron una diferencia significativa, lo cual es consistente con otros análisis relacionados con enzimas de expresión leucocitaria realizados en nuestra población, donde el único grupo que mostró una discrepancia importante de actividad se encontraba en el periodo neonatal (\leq 3 semanas de vida), grupo etario no incluido en el presente estudio (34).

Intervalo y valor de referencia de actividad enzimática de la fosfomanosa isomerasa

Los resultados del valor de referencia encontrados en la presente investigación muestran un valor más bajo de actividad enzimática (9,2 nmol/min.

mg de proteína) con respecto al límite inferior y más alto (40,3 nmol/min. mg de proteína) con respecto al estudio realizado en Múnich por Niehues *et al.* (35), quienes reportaron un valor de referencia para la enzima PMI de 16,6-20,04 nmol/min. mg de proteína con una actividad media de 18,1 nmol/min. mg de proteína al analizar una muestra de leucocitos de 12 controles. Esta diferencia en la actividad enzimática específica con relación a otras investigaciones se puede explicar porque las unidades de enzima empleada en nuestro ensayo fueron iguales para las enzimas auxiliares (IU) y la incubación se realizó a 37°C, lo cual disminuye la energía de activación de las enzimas, y permite una mayor velocidad de reacción y, por tanto, aparición del producto, en comparación con lo empleado por (35), que utilizaron 100 mU para la PGI y 500 mU para la G6PDH, y llevaron a cabo la incubación del ensayo a temperatura ambiente.

Sin embargo, el comportamiento del ensayo está en concordancia con el valor de referencia (558-2416 nmol/h.mg de proteína) y con los valores hallados en el intervalo de confianza (1073-1588 nmol/h.mg de proteína) con respecto a los reportados por De Koning *et al.* (36) en Holanda: 860-1800 nmol/h. mg de proteína. Estos autores analizaron un grupo control de 15 individuos. En comparación con nuestro estudio, el valor de actividad del límite superior fue mucho más alto (2416 nmol/h. mg de proteína), porque se trabajó con concentraciones saturantes de sustrato, aproximadamente diez veces más para lograr una mayor velocidad de la enzima; por lo tanto, concentraciones altas de sustrato influyen la actividad de la enzima e incrementan su actividad (30). No obstante, es conveniente documentar al respecto que un valor mayor de actividad enzimática en la muestra de estudio también puede presentarse por aspectos relacionados con la población en seguimiento, un fenómeno que se ha reportado en otros ensayos que muestran que los valores de referencia no se solapan con los reportados por la literatura. Por ejemplo, se tienen los hallazgos respecto a la valoración de la enzima galactosa 1-fosfato uridil transferasa en una muestra de 162 niños lactantes, conseguidos por Ayala *et al.* (37) biotinidasa y α -amilasa en una muestra de 106 niños colombianos (38).

Otro aspecto para resaltar en la data enzimática obtenida es el valor de límite inferior (551 nmol/h. mg de proteína) que, en contraste con los estudios de (36), aparentemente no permitiría la detección de portadores, dado que en dicho estudio se informan actividades para PMI de 610 y 710 nmol/h. mg de proteína (madre/padre respectivamente y portadores). Esta situación se puede explicar en términos de las diferentes poblaciones en estudio y por el número mayor de muestras de origen pediátrico incluidas en el presente protocolo (50 % del total).

Sin embargo, centrados en la población afectada, el valor de actividad media encontrado (1330 nmol/h. mg de proteína) permite realizar el diagnóstico de la deficiencia de la fosfomanosa isomerasa, porque al ser contrastados con los valores de actividad de los pacientes con CDG-Ib (120-180 nmol/h. mg de proteína) publicados por (35) y (36) se encuentran actividades específicas inferiores a 9,02 %-13,53 %.

Finalmente, esta investigación constituye una de las primeras herramientas de laboratorio en la aproximación de los defectos de la glicosilación en Colombia, que facilitará el diagnóstico de forma temprana en pacientes deficientes de la PMI, lo cual permitirá cambiar el curso natural de la enfermedad y así evitar las serias complicaciones de individuos afectados, que no han recibido el beneficio de un dictamen correcto y oportuno. La anterior reflexión va unida, igualmente, al hecho de que siendo una microtécnica podrá ser aplicada como prueba neonatal, incluso dada la facilidad en el tratamiento y el bajo costo al poder suplementar bajo orientación médica manosa de forma oral, lo que sin duda mejora la calidad de vida de los pacientes y su entorno familiar (14, 18).

Agradecimientos

A los donantes voluntarios que participaron en este estudio, al Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por su apoyo financiero, y al Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de los Andes por toda su colaboración.

Referencias

- [1] Yang AC, Ng BG, Moore SA, Rush J, Waechter CJ, Raymond MK, *et al.* Congenital disorder of glycosylation due to DPM1 mutations presenting with dystroglycanopathy-type congenital muscular dystrophy. *Mol Genet Metab.* 2013;110(3):345-51.
- [2] Dutta D, Mandal C, Mandal C. Unusual glycosylation of proteins: beyond the universal sequon and other amino acids [Internet]. *Biochim. Biophys Acta Gen Subj.* 2017 dec.;1861(12):3096-3108. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen>
- [3] Taniguchi N. Integrative Glycobiology and Future Perspectives. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;2(453):199-200.
- [4] Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): It's all in it! *J Inherit Metab Dis.* (2003);26(2-3):99-118.
- [5] Abu Bakar N., Lefeber DJ, van Scherpenzeel, M. Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41: 499-513. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0144-9>
- [6] Murray RK, Rivera Munoz B. Harper. *Bioquímica ilustrada.* 28^{va} ed. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2009. p. 816.
- [7] Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002 abr.;12(4):43R-56R.
- [8] Leroy JG. Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O-as well as N-glycosylation defects. *Pediatr Res.* 2006;60(6):643-56.
- [9] Vilaseca MA, Artuch R, Briones P. Defectos congénitos de la glucosilación: últimos avances y experiencia española. *Med Clínica.* 2004;122(18):707-16.
- [10] Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21(5):576-582.
- [11] Schollen E, Dorland L, De Koning TJ, Van Diggelen OP, Huijman JG, Marquardt T, *et al.* Genomic organization of the human phosphomannose isomerase (MPI) gene and mutation analysis in patients with congenital disorders of glycosylation type Ib (CDG-Ib). *Hum Mutat.* 2000;16(3):247-52.
- [12] Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* 2011 agos.;34(4):849-52.
- [13] Institute of Medical Genetics in Cardiff. The Human Gene Mutation Database (HGMD) [Internet]. Cardiff University. 2017. Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- [14] De Lonlay P, Seta N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta.* 2009 srp.;1792(9):841-3.

- [15] Helander A, Jaeken J, Matthijs G, Eggertsen G. Asymptomatic phosphomannose isomerase deficiency (MPI-CDG) initially mistaken for excessive alcohol consumption. *Clin Chim Acta*. 2014 abr.;431:15-8.
- [16] Jaeken J, Lefeber D, Matthijs G. Clinical utility gene card for: Phosphomannose isomerase deficiency. *Eur J Hum Genet*. 2014 sept.;22(9).
- [17] Haeuptle MA, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum Mutat*. 2009;30(12):1628-41.
- [18] Marques-da-Silva D, Dos Reis Ferreira V, Monticelli M, Janeiro P, Videira P, Witters P, *et al*. Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. *J Inherit Metab Dis*. 2017 mar.;40(2):195-207.
- [19] Penel-Capelle D, Dobbelaere D, Jaeken J, Klein A, Cartigny M, Weill J. Congenital disorder of glycosylation Ib (CDG-Ib) without gastrointestinal symptoms. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(1):83-5.
- [20] De Lonlay P, Seta N. Trastornos congénitos de la glucosilación de las glucoproteínas séricas. *EMC Ped*. 2009;44(1):1-6.
- [21] Sharma V, Ichikawa M, Freeze HH. Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 oct. 17;453(2):220-8.
- [22] Sharma V, Ichikawa M, He P, Bravo Y, Dahl R, Ng BG, *et al*. Phosphomannose isomerase inhibitors improve N-glycosylation in selected phosphomannomutase-deficient fibroblasts. *J Biol Chem*. 2011 nov. 11;286(45):39431-8.
- [23] Harms H, Zimmer KP, Kurnik K, Bertele-Harms R, Weidinger S, Reiter K. Oral mannose therapy persistently corrects the severe clinical symptoms and biochemical abnormalities of phosphomannose isomerase deficiency. *Act Paediatr*. 2002;91(10):1065-72.
- [24] Mention K, Lacaille F, Valayannopoulos V, Romano S, Kuster A, Cretz M, *et al*. Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol Fonet Metab*. 2008 en.;93(1):40-3.
- [25] Mayatepek E, Kohlmüller D. Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr*. 1998 jul.;157(7):605-6.
- [26] Bendayan I, Casaldaliga J, Castello F, Miró L. Heparin therapy and reversal of protein-losing enteropathy in a case with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2000 may. -jun.;21(3):267-8.
- [27] Shapira E, Blitzer MG, Miller JB, Africk DK. *Biochemical Genetics. A laboratory manual*. Nueva York: Oxford University Press; 1989. p. 160.
- [28] Ayala A. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Folin-Lowry. *Guías de laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular*. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2009. p. 120.
- [29] Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett*. 1995 dic. 27;377(3):318-20.
- [30] Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspec. Sci*. 2014;1(1):41-55.
- [31] Passonneau JV, Lowry OH. *Enzymatic analysis: a practical guide*. Towana: Springer Science & Business Media; 1993. p. 403.
- [32] Van Diggelen O, Voznyi YV, Keulemans JL, Schoonderwoerd K, Ledvinova J, Mengel E, *et al*. A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann-Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(5):733-41.
- [33] Wendeler M, Sandhoff K. Hexosaminidase assays. *Glycoconj J*. 2009 nov.;26(8):945-52.
- [34] Uribe A, Giugliani R. Selective screening for lysosomal storage diseases with dried blood spots collected on filter paper in 4,700 high-risk colombian subjects. *JIMD Rep*. 2013;11:107-116.
- [35] Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, *et al*. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest*. 1998 abr.;101(7):1414-20.
- [36] De Koning T, Dorland L, Van Diggelen O, Boonman A, De Jong G, Van Noort W, *et al*. A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1998;245(1):38-42.
- [37] Ayala A, Uribe Ardila A, Mora JA, Zambrano PC. Valores de referencia de la Galactosa 1-fosfato en Glóbulos rojos, por Método Microflorométrico en 162 lactantes de 0-1 año y 50 niños controles mayores a un año de Bogotá. III Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. 2001 oct. 21-4. Cartagena (Colombia). DOI: 10.13140/RG.2.2.28674.79049.
- [38] Hidalgo O, Merino A, Ayala A. Valores de referencia de la enzima biotinidasa en una muestra de 102 niños de 0-11 años en una población colombiana. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2014. p. 95.