

## Determinación de enzimas lisosomales en leucocitos humanos

P. LÓPEZ SAURA Y E. RUBIO

*Dpto. de Bioquímica  
Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
La Habana, Cuba*

*Recibido: 29 de noviembre de 1975*

*Recibido: 8 de noviembre de 1976*

**ABSTRACT.** Ten acid hydrolases from human leukocytes were studied. Values of Km, optimal pH and activity per mg of protein are presented for total homogenates. The first enzymatic diagnosis of a case of G<sub>M2</sub> Gangliosidosis in Cuba is also presented, as well as the evidence for the heterozygote character of the patient's parents. The importance of having acquired this methodology for the diagnosis of lysosomal diseases in our country is discussed.

**RESUMEN.** Se estudiaron diez hidrolasas ácidas de leucocitos humanos, presentándose los valores de Km, pH óptimo y actividad por mg de proteínas en homogeneizados totales. Se presenta el diagnóstico enzimático de un caso de G<sub>M2</sub> Gangliosidosis, el primero en Cuba, así como la detección del carácter heterocigótico de los padres del enfermo. Se discute la importancia de la nueva metodología adquirida para el diagnóstico de las enfermedades por deficiencia de enzimas lisosomales.

### INTRODUCCION

Desde que Hers, (1963) descubrió que la glucogenosis tipo II era debida a una deficiencia congénita de alfa-glucosidasa, demostrándose posteriormente la localización lisosomal de esta enzima (Lejeune y cols., 1963), y que el propio Hers definiera el concepto de Enfermedad Lisosomal (Hers y van Hoof, 1969) han sido descritas varias deficiencias de hidrolasas ácidas lisosomales que abarcan la mayoría de las lipidosis y mucopolisacaridosis (para revisiones ver O'Brady, 1973 y Neufeld, 1974).

El interés en estas patologías ha pasado del puramente académico siendo posible tomar medidas para su control, entre las que se encuentran el

diagnóstico pre-natal, la detección de heterocigotes y el consejo genético pre-concepcionales.

Los leucocitos constituyen un material biopsico, de relativamente fácil obtención, apropiado para el diagnóstico de estas enfermedades ya que la deficiencia enzimática es generalizada en todos los casos. En efecto, las determinaciones enzimáticas en homogeneizados totales de leucocitos son utilizadas ampliamente en el diagnóstico de certeza de las enfermedades lisosomales (*Percy y O'Brady, 1968; Liem y Hooghwinkel, 1975; Goto y cols., 1974; Galjaard y cols., 1974 y Klibansky y cols., 1974*).

En nuestro país, sin embargo, no existía esa posibilidad, habiendo numerosos casos que han quedado sólo en el diagnóstico clínico presuntivo.

En este trabajo se describen las condiciones óptimas de determinación, en leucocitos, de varias hidrolasas ácidas, así como el diagnóstico de un caso de Enfermedad de Tay-Sachs, primero que se realiza en Cuba.

## MATERIALES Y METODOS

*Obtención de leucocitos.* Los leucocitos fueron obtenidos de sangre heparinizada de donantes voluntarios según el método de Boyle y Seegmiller, (1971). La sangre se mezcló con medio volumen de Dextran (peso molecular 250 000) al 6% p/v en NaCl al 0.9% como agente aglutinante de los eritrocitos. Después que éstos sedimentaron se separó el sobrenadante de plasma con leucocitos y se centrifugó a 1000 rpm 10 minutos, obteniéndose un sedimento de leucocitos ligeramente contaminado con glóbulos rojos. Esta contaminación fue eliminada con shocks osmóticos y lavados con NaCl al 0.9%. El sedimento final de leucocitos se resuspendió en Tritón X-100 al 0.1% v/v.

*Determinaciones enzimáticas.* Para la arilsulfatasa A se incubó 20 microlitros de preparación enzimática con p-nitrocatecol sulfato (Sigma) 12.5 mM, tampón acetato 0.45 M, pH 4.8, pirofosfato de sodio 0.4 M y NaCl 0.85 M en un volumen total de incubación de 100 microlitros. La reacción se detuvo con 0.5 ml de ácido fosfotúngstico al 2% en HCl 0.1 N y después de centrifugar se midió la cantidad de p-nitrocatecol liberado en 0.5 ml del sobrenadante al mezclarlos con 0.8 ml de reactivo alcalino de quinol producto de mezclar 1 ml de quinol al 4% en HCl 0.1 N con 20 ml de NaOH al 5% en sulfito de sodio al 5%. La absorbancia se leyó a 510 nm.

La alfa-L-fucosidasa y la N-acetil-alfa-glucosaminidasa se midieron usando los p-nitrofenil derivados 1.7 mM con tampón citrato-fosfato 0.025 M pH 5 y 50 micro-1 de la suspensión de leucocitos, en un volumen final de 160 micro-1. Las demás glicosidasas se determinaron usando los 4-metilumbeliferil derivados como sustratos, tampón citrato-fosfato 0.025 M al pH óptimo de cada enzima (Tabla I) y 10 micro-1 de la suspensión de leucocitos, en un volumen final de 110 micro-1. Las concentraciones de los sustratos fueron: 1.67 mM para la alfa-glucosidasa, 2.1 mM para la alfa-manosidasa, 8.3 mM para la alfa-galactosidasa, 0.67 mM para la N-acetil-beta-glucosaminidasa, 4.8 mM para la beta-galactosidasa, 1.25mM para la beta-glucuronidasa y 4.5 mM para la beta-glucosidasa. En todos estos casos se usó tampón glicina 0.4 M - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25 M pH 10.7 para detener las reacciones y se midió la cantidad de p-nitrofenol liberado por su absorbancia a 400 nm o de metilumbeliferona por su fluorescencia a 450 nm con una longitud de onda de excitación de 365 nm. En todos los casos se usaron blancos apropiados incubando la muestra y el sustrato independientemente.

Las determinaciones de proteínas se hicieron por el método de Lowry y cols., (1951).

*Inactivación térmica de la N-acetil-beta-glucosaminidasa.* Se preincubó la preparación de leucocitos con el tampón citrato-fosfato pH 4 durante 20 minutos a 55°C en un tubo cerrado herméticamente para evitar la evaporación. Tiempos mayores de preincubación no produjeron ninguna inactivación adicional. Después de enfriarse se añadió el sustrato y se incubó a 37°C para la determinación de la actividad residual, que se comparó con la total, medida en un tubo control que se mantuvo todo el tiempo de preincubación en frío.

## RESULTADOS

*Características cinéticas de las enzimas.* En la Tabla I pueden observarse los valores de pH óptimos, Km y de actividades totales encontradas en las suspensiones de leucocitos humanos.

Los pH óptimos fueron todos ácidos como era de esperar. Cuando se hizo la curva pH de la arilsufatasa en ausencia de pirofosfato se obtuvo un segundo pico en 5.6, correspondiente a la isoenzima B. Los valores de Km fueron obtenidos con "ploteos" de Lineweaver-Burke. El estudio para la

N-acetil-alfa-glucosaminidasa no fue terminado por razones de disponibilidad de sustrato. La alfa-manosidasa presentó una inhibición por exceso de sustrato a partir de 4 mM.

TABLA I  
*Actividad, Km y pH óptimos de enzimas lisosomales  
en leucocitos humanos*

Enzima	pH óptimo	Km (mM)	Actividad *	n
arilsulfatasa A	4.8	3.2	1.78 (0.55)	12
alfa-L-fucosidasa	5.0	0.19	0.291 (0.073)	11
N-acetil-alfa-glucosaminidasa	5.0	—	0.102 (0.02)	4
alfa-galactosidasa	4.5	2.3	0.598 (0.16)	4
alfa-manosidasa	3.5	0.90	2.94 (1.22)	7
alfa-glucosidasa	5.5	0.83	1.01 (0.36)	11
N-acetil-beta-glucosaminidasa **	4.0	1.14	20.3 (8.8)	18
beta-galactosidasa	3.5	0.44	3.87 (2.2)	16
beta-glucosidasa	4.5	4.0	0.092 (0.037)	11
beta-glucuronidasa	4.5	1.25	1.36 (0.67)	20

\* nanomoles de sustrato hidrolizados por minuto y por mg de proteínas.

\*\* la proporción de isoenzima A fue de 79.5% con una DS = 5.5%.

n: número de muestras analizadas.

Las cifras entre paréntesis son las desviaciones standard.

En las Figs. 1 - 9 se muestra la linealidad obtenida tanto al aumentar la concentración de enzima como en el tiempo para todas las enzimas en que se hizo el estudio. Por otra parte, los gráficos demuestran la equivalencia de las variaciones en ambos parámetros en el rango estudiado. Para la arilsulfatasa A, la precisión fue menor que para el resto de las enzimas.

*Diagnóstico de un caso de enfermedad de Tay-Sachs.* En la Tabla II se presentan las actividades de beta-hexosaminidasa total y de las isoenzimas A y B en preparaciones de leucocitos de un paciente del Hospital Pediátrico Dr. Angel Arturo Aballí que presentaba el cuadro clínico de una enfermedad de Tay-Sachs, de los padres del enfermo (heterocigotes obligados) y una preparación control que se procesó paralelamente. La actividad total fue normal tanto en el enfermo como en los padres. Sin embargo, la actividad de hexosaminidasa de los leucocitos del enfermo fue estable en un 89% a la preincubación a 55°C durante 20 minutos, que en el control inactivó a más del 70% de la actividad enzimática. La deficiencia de actividad termolábil (hexosaminidasa A) que presentó el enfermo confirma el diagnóstico de una G<sub>M2</sub> Gangliosidosis variante B (de Tay-Sachs). Las actividades en los leucocitos de los padres tuvieron un comportamiento intermedio.

Las otras enzimas lisosomales que se determinaron mostraron actividades normales en los tres individuos.

TABLA II

*Diagnóstico enzimático de un caso de Enfermedad de Tay Sachs*

Enzima	Enfermo	Padre	Madre	Control
N-Acetil-beta-glucosaminidasa				
total	28.6	31.4	24.0	30.8
B *	24.8	16.6	13.6	9.0
A **	3.8	15.3	10.4	21.8
beta-galactosidasa	5.25	6.03	5.2	5.34
beta-glucuronidasa	0.797	1.28	1.05	1.05
beta-glucosidasa	0.0612	0.0746	0.085	0.0786

Todas las actividades están expresadas como nanomoles de sustrato hidrolizados por minuto y por mg de proteínas.

\* actividad medida después de preincubar la muestra a 55°C pH 4 durante 20 minutos.

\*\* Total — B.

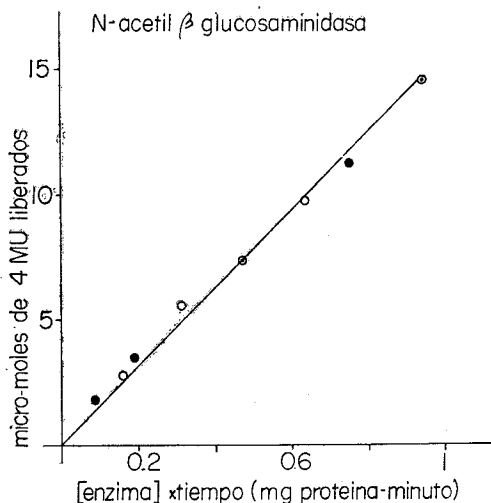


Fig. 1. Relación entre la actividad de N-acetil-beta-glucosaminidasa y la concentración de suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. En abscisas está el producto de la cantidad de proteínas de leucocitos (en mg) presentes en el tubo de incubación por el tiempo que duró la misma (en minutos).

- puntos incubados al mismo tiempo con distintas concentraciones de leucocitos (desde 6.3 hasta 62.9 micro-g de proteínas). O puntos donde se incubó la misma cantidad de leucocitos durante distintos tiempos (de 5 hasta 30 minutos).

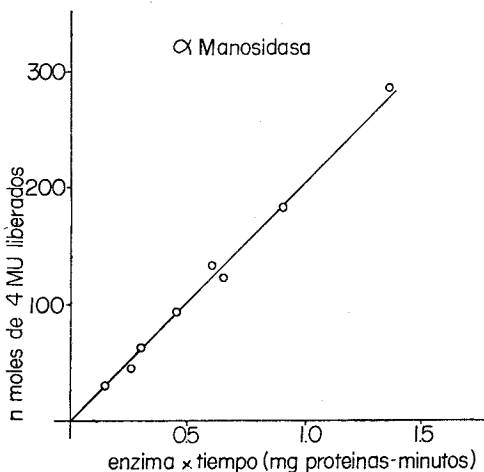


Fig. 2. Relación entre la actividad de alfa-manosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. La señalización es la misma que en la Fig. 1. El tiempo varió entre 10 y 45 minutos y la cantidad de leucocitos entre 5 y 30 micro-g de proteínas.

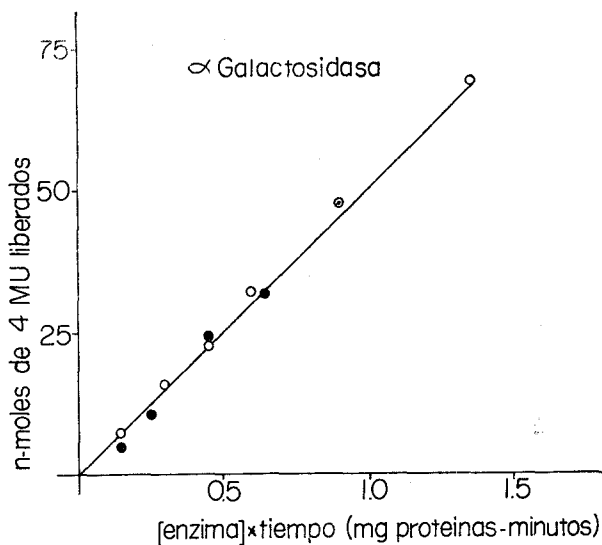


Fig. 3. Relación entre la actividad de alfa-galactosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. La señalización es igual que en la Fig. 1. El tiempo varió de 5 a 45 minutos y la concentración de leucocitos de 5 a 30 micro-g de proteínas.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los valores de las distintas actividades enzimáticas encontrados por nosotros son, en general, similares a los reportados por otros autores (*Liem y Hooghwinkel, 1975; Goto y cols., 1974; Galjaard y cols., 1974; Beratis y cols., 1974; France y Downey, 1974; Klibansky y cols., 1974 y Percy y O'Brady, 1968*).

La variabilidad relativamente grande obtenida en casi todas las actividades también es similar a la encontrada en la literatura. Es explicable si se tiene en cuenta que los grupos de individuos no fueron seleccionados. No se ha estudiado la variación de la actividad de las enzimas lisosomales en leucocitos en distintas condiciones como edad, sexo, dieta, etc., factores que pudieran influir en este caso.

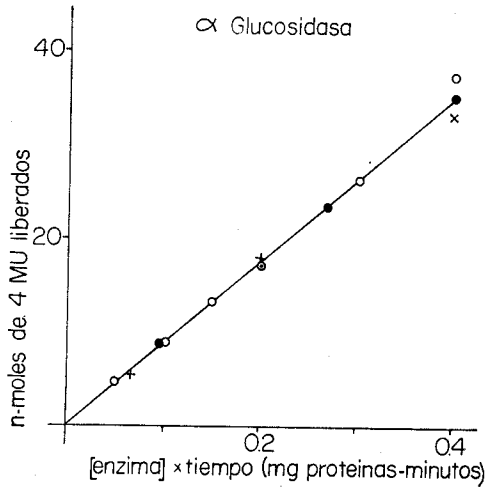


Fig. 4. Relación entre la actividad de alfa-glucosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo varió de 5 a 120 minutos y la cantidad de leucocitos de 11 a 66 micro-g de proteínas.

Las concentraciones de sustrato empleadas no son las óptimas (excepto para la alfa-manosidasa donde hubo una inhibición por exceso de sustrato) pero el alto costo de estos reactivos nos limita en ese sentido.

Sin embargo las condiciones de determinación establecidas parecen ser apropiadas para el diagnóstico. En efecto, es evidente el diagnóstico de  $G_{M2}$  Gangliosidosis en el caso presentado. Hubo deficiencia marcada de hexosaminidasa A y valores normales de las otras actividades estudiadas. Los heterocigotes también fueron puestos en evidencia. Este diagnóstico fue confirmado con electroforesis en gel de acetato de celulosa mostrándose ausencia de la banda correspondiente a la isoenzima A (resultado no publicado). Resulta interesante que éste, nuestro primer diagnóstico de una  $G_{M2}$  Gangliosidosis haya sido una variante de Tay-Sachs, y no de Sandhoff, a pesar de no tener ascendencia judía. El caso, integralmente, será objeto de otra publicación.

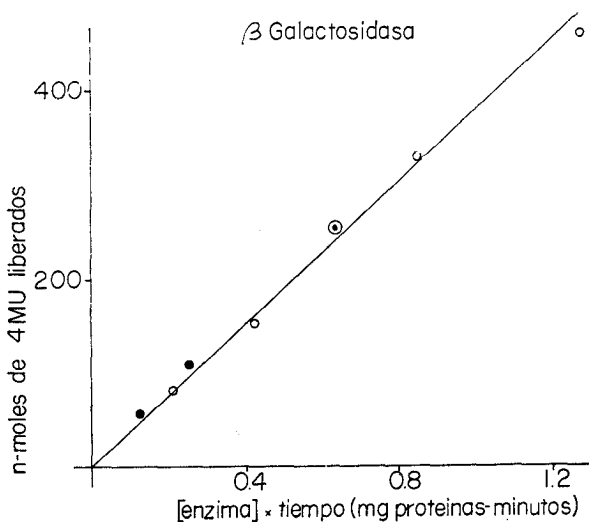


Fig. 5. Relación entre la actividad de beta-galactosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo varió entre 5 y 30 minutos y la cantidad de leucocitos de 8.5 a 70.8 micro-g de proteínas.

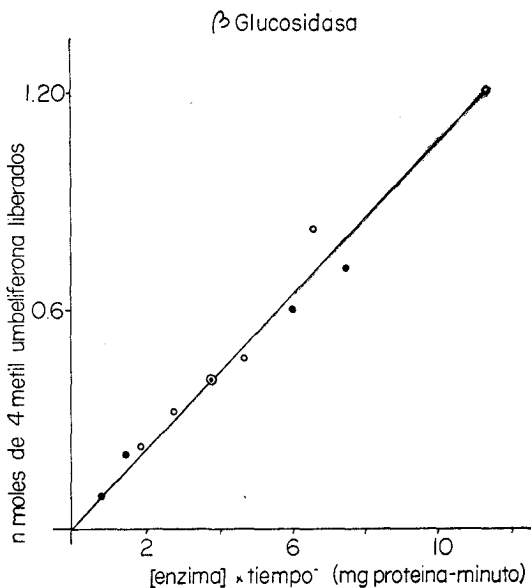


Fig. 6. Relación entre la actividad de beta-glucosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo de incubación varió entre una y seis horas y la cantidad de leucocitos de 6.3 a 62.9 micro-g de proteínas.

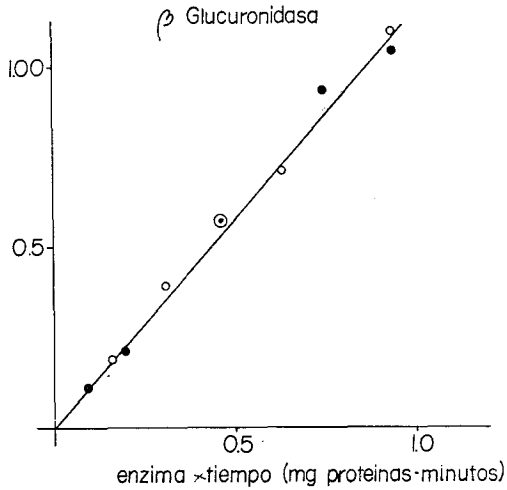


Fig. 7. Relación entre la actividad de beta-glucuronidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo de incubación varió entre 5 y 30 minutos y la cantidad de leucocitos entre 6.3 y 62.9 micro-g de proteínas.

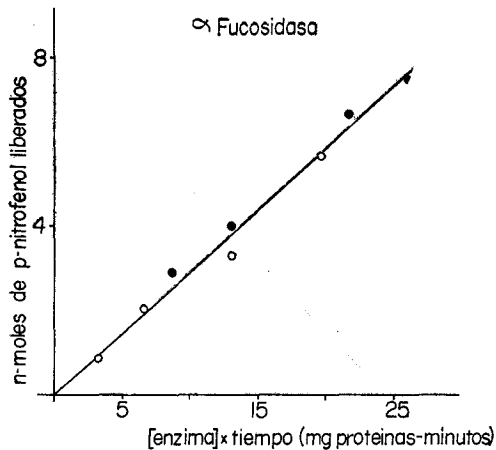


Fig. 8. Relación entre la actividad de alfa-L-fucosidasa y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo de incubación varió entre una y seis horas y la cantidad de leucocitos entre 36 y 108 micro-g de proteínas.

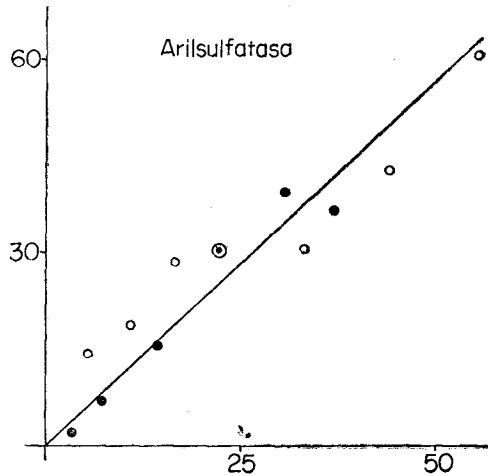


Fig. 9. Relación entre la actividad de arilsulfatasa A y la concentración de la suspensión de leucocitos y el tiempo de incubación. Los símbolos son los mismos que en la Fig. 1. El tiempo de incubación varió de 15 a 150 minutos y la cantidad de leucocitos de 61 a 610 micro-g de proteínas.

Con este trabajo se abre una nueva perspectiva en nuestro país para el diagnóstico de las deficiencias congénitas de enzimas lisosomales, para las que anteriormente sólo era posible el diagnóstico clínico-patológico. Por otra parte la detección de heterocigotes permite el consejo genético pre-concepcional, de extraordinaria utilidad para las familias afectadas.

#### REFERENCIAS

- BERATIS N. G., FLEISCHER L. D., DANESINO C. AND HIRSCHHORN K. Arylsulfatase A Deficiency in Bone Marrow Fibroblasts of two Different Forms of Metachromatic Leukodystrophy. *J. Lab. Clin. Med.* 84, 49, 1974.
- BOYLE J. A. AND SEEGMILLER J. E. Preparation and Processing of Small Samples of Human Material. In *Methods in Enzymology*. Vol. XXII pp. 149-167, Jakoby eds. Acad. Press, Londres, 1971.
- FRANCE J. T. AND DOWNEY J. A. A study of Arylsulfatase Activity in Children Born of Pregnancies Affected with Placental Sulfatase Deficiency. *Biochemical Med.*, 10, 167, 1974.

- GALJAARD H., NIERMEIJER M. F., HAHNEMANN N., MOHR J. AND SORENSEN S. A. An example of rapid prenatal diagnosis of Fabry's disease using microtechniques. *Clin. Genetics*, 5, 368, 1974.
- GOTO I., TABIRA T., NAWA A., KUROKAWA T. AND KUROIWA Y. Biochemical and Genetic Studies in Two Families with fabry disease. *Arch. Neurol.*, 31, 45, 1974.
- HERS H. G. Alfa-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem. J.*, 86, 11, 1963.
- HERS H. G. AND VAN HOOF F. Genetic abnormalities of lysosomes in *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol. 2. Capítulo 2, Dingle y Fell eds. North Holland Pub. Co. Amsterdam, 1969.
- KLIBANSKY CH., HOFFMAN J., ZAIZOV R. AND MATOTH Y. Gaucher's disease, chronic adult type: A comparative study of glucocerebroside and methylumbelliferyl-glucopyranoside cleaving potency in leukocytes. *Biomedicine*, 20, 24, 1974.
- LEJEUNE N., THINES-SEMPOUX D. AND HERS H. G. Tissue fractionation studies 16. Intracellular distribution and properties of alfa-glucosidase in rat liver. *Biochem. J.*, 86, 16, 1963.
- LIEM K. O. AND HOOGHWINKEL G. J. M. The use of alfa-L-iduronidase activity determinations in leukocytes for the detection of hurler and scheie syndromes. *Clin. Chim. Acta.*, 60, 259, 1975.
- LOWRY D. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurements with the polin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- NEUFELD E. Biochemical basis of mucopolysaccharidoses and mucolipidoses in *Progress in Medical Genetics*, Vol. X, A. G. Steinberg, and A. G. Bearn. editors. Grune and Stratton, Inc. 81-101, 1974.
- O'BRADY R. Inborn errors of lipid metabolism in *Advances in enzymology*. Vol. 38, 235-292, Meister, eds. Interscience, Londres 1973.
- PERCY A. K. AND O'BRADY R. Metachromatic leukodystrophy: Diagnosis with samples of venous blood. *Science*. 161, 594, 1968.