

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LISOSOMAL BETA-GALACTOSIDASA
EN MUESTRAS DE FIBROBLASTOS LISADOS DISPUESTOS SOBRE PAPEL FILTRO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en
Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular por:

KATERINA ANGELICA BETTA MORALES

Director de Tesis: Dr. Miguel Arredondo Olgún

Santiago-CHILE

Marzo, 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

KATERINA ANGELICA BETTA MORALES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Miguel Arredondo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Cecilia Rojas

Dr. Mauricio Baez

Dra. María A. Valenzuela

La presente Tesis de Maister ha sido desarrollada en el Laboratorio de Genética y Enfermedades Metabólicas en conjunto con el Laboratorio de Micronutrientes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos –INTA- de la Universidad de Chile.

Con formato: Fuente: 11 pto, Sin Negrita, Cursiva

Con formato: Justificado

Con formato: Fuente: 11 pto, Sin Negrita, Cursiva

Con formato: Fuente: 11 pto, Sin Negrita, Cursiva



Con formato: Centrado



INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	8
Objetivo General.	8
Objetivos Específicos.	8
METODOLOGIA	9
Obtención y mantenimiento de fibroblastos.	9
Obtención de fibroblastos.	9
Mantenimiento y cultivo celular.	9
Tripsinización.	9
Descongelamiento de células para ensayo enzimático.	10
Lisis Celular.	11
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa en fibroblastos lisados.	12
Cuantificación de proteínas del lisado de fibroblastos.	12
Determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa.	14
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.	16
Disposición de lisados de fibroblastos en papel filtro.	16
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos en papel filtro.	16
Análisis estadístico de resultados	17
RESULTADOS	18
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa por análisis directo en lisados de fibroblastos.	18
Evaluación del método y tiempo óptimo de lisis de celular.	18
Generación de la curva de calibración de 4-metilumbeliferil (4-MU) para la determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa.	19
Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry.	20

Determinación de las condiciones óptimas de ensayo enzimático.	22
Evaluación del ensayo enzimático para la determinación de la enzima beta-galactosidasa.	23
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa en lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro.	24
Establecimiento de las condiciones del ensayo.	24
Evaluación de la fluorescencia emitida en función del tiempo de incubación en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.	27
Evaluación del ensayo enzimático en lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro.	28
Evaluación del efecto de la concentración del extracto enzimático en la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en papel filtro.	32
Cálculo de la actividad enzimática de beta-galactosidasa para ensayo de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.	33
Evaluación de la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenaje en la actividad de beta-galactosidasa en muestras de lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro.	34
Influencia del tiempo y temperatura de almacenaje de los lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro en la actividad de beta-galactosidasa.	34
Influencia de los ciclos de re-almacenaje de los lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro en la actividad de beta-galactosidasa.	37
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	47

RESUMEN

En los Errores Innatos del Metabolismo (EIM), los cultivos de fibroblastos (FB) a partir de biopsia de piel, han sido desarrollados con el objetivo de obtener material para la determinación de enzimas deficientes en este tipo de patologías y establecer un diagnóstico definitivo. Este tipo de diagnóstico es realizado en laboratorios especializados, debido a la complejidad en el manejo y mantenimiento de los cultivos de FB. El envío de muestras de FB a estos centros debe ser realizado en condiciones que garanticen la viabilidad de las células durante el trayecto, con el objetivo de evitar un retraso en el diagnóstico, lo que podría ocasionar daño neurológico irreversible o la muerte de estos pacientes. Entre los EIM, el grupo de Enfermedades de Depósito Lisosomal (EDL) han sido ampliamente diagnosticadas mediante análisis enzimático sobre muestras de FB. La detección de enzimas lisosomales deficientes en muestras de FB permite confirmar el diagnóstico en este tipo de patologías. El uso de gotas de sangre seca (GSS) en papel filtro ha permitido el desarrollo de Programas de Pesquisa Neonatal para diversos EIM, ya que se ha demostrado ampliamente la estabilidad de metabolitos y enzimas en GSS en papel filtro. Además, la toma de muestra, el transporte y almacenamiento de muestras en este tipo de soporte se ven facilitados.

El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad de la actividad específica de beta-galactosidasa, enzima lisosomal deficiente en la Gangliosidosis GM1, un tipo de EDL, en muestras de lisados de FB obtenidos a partir de la línea celular 3T3-L1 y dispuestos en papel filtro. Las muestras fueron sometidas a distintas condiciones de tiempo y temperatura de almacenaje para la evaluación de la actividad enzimática.

Las muestras mantenidas a 4°C mostraron estabilidad de la actividad enzimática de beta-galactosidasa hasta al menos los 28 días de almacenaje. Las muestras re-almacenadas a 4°C y -70°C presentaron una mayor estabilidad de la actividad de beta-galactosidasa, en comparación con otras temperaturas de re-almacenaje estudiadas.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYME BETA-GALACTOSIDASE IN A LYSATE OF FIBROBLASTS COLLECTED ON FILTER PAPER

In Inborn Errors of Metabolism (IEM), fibroblasts (FB) cultures from skin biopsy have been developed in order to obtain material for the determination of deficient enzymes in this type of pathologies and to establish a definitive diagnosis. This type of diagnosis is performed in specialized laboratories, due to the complexity of sample handling and FB culture maintenance. Shipment of FB samples to these centers must be carried out under conditions that guarantee the viability of the cells during the journey, in order to avoid a delay in diagnosis, which may cause irreversible neurological damage or death of these patients. Among the IEM, the Lysosomal Storage Diseases (LSD) group, has been widely diagnosed by enzymatic analysis of FB samples. The detection of deficient lysosomal enzymes in FB samples allows us to confirm the diagnosis in this type of pathology. The use of dried blood spots (DBS) on filter paper has allowed the development of Neonatal Screening Programs for various IEM, because the stability of metabolites and enzymes in DBS on filter paper has been widely demonstrated. Furthermore, sample collection, transport and storage of samples in this type of support are facilitated.

The aim of this study was to evaluate the stability of the beta-galactosidase, a lysosomal enzyme that is deficient in GM1 gangliosidosis, a type of EDL, in fibroblasts lysates obtained from the 3T3-L1 cell line and collected on filter paper. Samples were studied under different conditions of time and temperature of storage for the enzymatic activity assessment.

Samples kept at 4°C maintained the stability of enzyme activity for at least 28 days of storage. Samples stored at 4°C and -70°C showed increased stability when are re-stored in these temperatures.

INTRODUCCION

El papel filtro, específicamente el papel *Whatman 903*[®], ha sido empleado desde la década de 1960 como soporte de muestras biológicas. El Dr. Robert Guthrie lo utilizó para determinar la concentración del aminoácido fenilalanina en la detección de Fenilquetonuria sobre gotas de sangre seca dispuestas en el papel filtro, obtenidas desde el talón de los recién nacidos ⁽¹⁾. Esta nueva forma de recolección de sangre permitió que se desarrollaran los Programas de Pesquisa Neonatal para diversos Errores Innatos del Metabolismo (EIM) en los recién nacidos ⁽²⁾. El papel filtro ha sido el componente central de esta importante iniciativa de salud pública durante casi 40 años. Más recientemente, las muestras de sangre dispuestas sobre papel filtro han jugado un importante papel en los esfuerzos de vigilancia de enfermedades en varios países en desarrollo y han facilitado investigaciones en el área de la salud en todo el mundo ⁽³⁻⁵⁾.

El papel está hecho de algodón de alta pureza y es fabricado para asegurar la exactitud y reproducibilidad en la absorción de las muestras de sangre, de acuerdo con las especificaciones establecidas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) ⁽⁶⁾. El método de recogida de gotas de sangre sobre papel filtro ha alcanzado el mismo nivel de precisión y reproducibilidad que los métodos estándar de recogida de sangre, tales como tubos de toma de muestra y capilares ⁽²⁾. Las principales ventajas, en comparación a la toma convencional, es que la utilización de papel filtro como soporte de muestras biológicas favorece la toma de muestra haciéndola más sencilla, el transporte se ve facilitado por no requerir de cadena de frío u otros sistemas y en general, permite su almacenamiento por periodos prolongados sin alterar su composición ⁽²⁾. Se ha descrito que la matriz del papel filtro estabiliza la mayoría de los analitos en muestras de sangre seca; sin embargo, la tasa de degradación de la muestra varía según el analito a medir. Por ejemplo, anticuerpos contra el virus Epstein-Barr son estables en gotas de sangre depositadas sobre papel filtro almacenadas a temperatura ambiente durante al menos ocho semanas ⁽⁷⁾. Sin embargo, las muestras comienzan a

deteriorarse después de una semana de almacenamiento a 37°C. Por el contrario, las concentraciones de proteína C-reactiva disminuyen significativamente en gotas de sangre dispuestas en papel filtro después de tres días a 37°C; pero son estables durante al menos dos semanas a temperatura ambiente (20-23°C) ⁽⁸⁾. Aunque la refrigeración o la congelación de muestras inmediatamente después de su secado, es siempre aconsejable para reducir al mínimo las posibilidades de degradación, la estabilidad de la mayoría de los analitos en muestras de sangre seca proporciona importantes ventajas, ampliando el tiempo almacenaje de muestras dispuestas en este tipo de soporte.

Los EIM o Errores Innatos del Metabolismo se definen como trastornos bioquímicos determinados genéticamente en la estructura y/o función de las moléculas proteicas. El diagnóstico preciso de los EIM en edades tempranas de la vida es esencial para el éxito de los tratamientos (en los casos que sean susceptibles de éstos); además, de ser un requisito previo para un asesoramiento genético óptimo ⁽⁹⁾. Estas enfermedades, aunque tienen una baja incidencia (1/15.000) ⁽¹⁰⁾, son muy importantes desde el punto de vista de su magnitud como problema de salud, ya que constituyen una causa de muerte prematura, severos trastornos neurológicos y retraso mental ⁽¹¹⁾.

Dentro de los EIM, se encuentran los trastornos genéticos determinados en el lisosoma, lo cual da lugar a las Enfermedades de Depósito Lisosomal (EDL). Estas corresponden a trastornos hereditarios que se producen por la incapacidad de degradar las macromoléculas debido a un defecto funcional específico. Esta disfunción provoca la acumulación de macromoléculas en el lisosoma y es la causa de la enfermedad ⁽¹²⁾. Los lisosomas fueron descubiertos por De Duve y cols. ⁽¹³⁾, pero la relación que existe entre los lisosomas y las enfermedades de almacenamiento fue establecida por Hers ⁽¹⁴⁾, cuando demostró que el déficit de la enzima maltasa ácida (alfa-glucosidasa) provocaba la acumulación de glucógeno en el interior de los lisosomas, en los pacientes que padecían la enfermedad de Pompe (Glucogenosis Tipo II). Hasta el presente, se han descrito alrededor de 40 tipos de enfermedades por almacenamiento lisosomal y si se consideran los

diferentes subtipos y variantes, alcanzan hasta 50 ⁽¹⁵⁾. En la mayoría de los casos, la causa de éstas enfermedades es la deficiencia de una hidrolasa lisosomal (o de una subunidad de la enzima) implicada en la degradación de macromoléculas, aunque también puede ser por la deficiencia de una proteína activadora de la enzima ⁽¹⁶⁾ o de un transportador de la membrana lisosomal encargada de facilitar la salida de pequeñas moléculas hacia el exterior del organelo ⁽¹⁷⁾. Según el nombre bioquímico del sustrato que se acumula en los lisosomas, las EDL se clasifican en: Esfingolipidosis, Mucopolisacaridosis, Oligosacaridosis y Mucopolisacaridosis ⁽¹⁸⁾.

El diagnóstico definitivo de las Enfermedades de Depósito Lisosomal se basa principalmente en la demostración del déficit enzimático específico en cultivos de fibroblastos de piel ⁽¹⁹⁾. La razón de esto es que algunas de las enzimas deficientes en las EDL se expresan en fibroblastos y no en otros tipos de células más fáciles de obtener, como linfocitos ⁽²⁰⁾. La mayoría de los diagnósticos se establecen al determinar el defecto enzimático primario con la única excepción de las Mucopolisacaridosis II y III, en las cuales se evalúa el efecto secundario resultante en la elevación de varias hidrolasas ácidas en el suero del paciente o la deficiencia conjunta de esas enzimas en fibroblastos cutáneos cultivados ⁽¹²⁾.

Las Esfingolipidosis son un subgrupo de EDL, que se caracterizan por síntomas derivados del progresivo acúmulo de sustancias en los órganos afectados, que pueden o no comprometer el sistema nervioso central. Las Gangliosidosis, pertenecientes al grupo de las Esfingolipidosis, se producen por una deficiencia enzimática en el metabolismo de los gangliósidos, favoreciendo su depósito a nivel neuronal. En la Gangliosidosis tipo GM1, se produce una acumulación de mono-sialogangliósido que constituye aproximadamente un 20% de los gangliósidos del cerebro normal, elevándose de un 80 a 90% en los pacientes con esta enfermedad ⁽²¹⁾. Esta patología es generada por el déficit de la enzima lisosomal beta-galactosidasa, la cual hidroliza el residuo terminal beta-galactósido desde el gangliósido GM1. La deficiencia de esta enzima genera una acumulación masiva del

gangliósido GM1 en el lisosoma (Figura 1). La incidencia de la Gangliosidosis tipo GM1 ha sido estimada en 1 en 100.000 – 200.000 nacidos vivos ⁽²²⁾. Existen tres tipos de Gangliosidosis tipo GM1 y la severidad de cada tipo está inversamente relacionada con la actividad residual de la enzima beta-galactosidasa ⁽²³⁾.

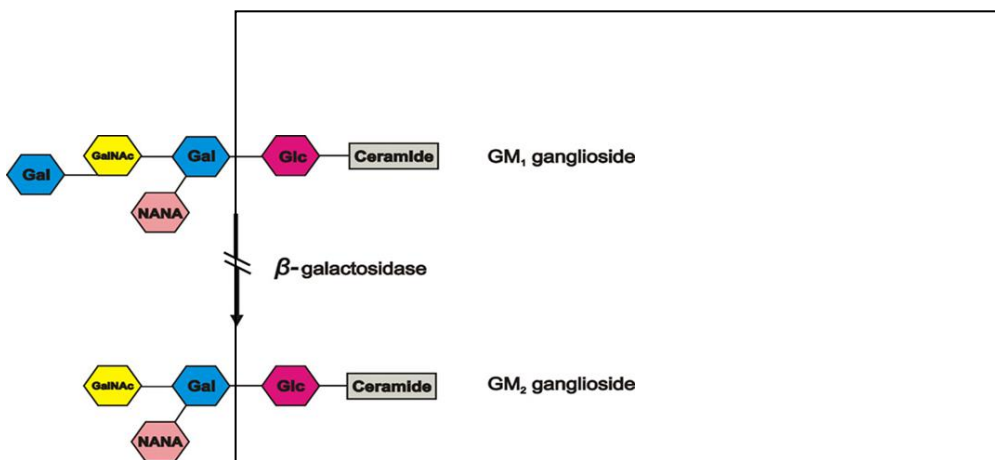


Figura 1. Esquema del defecto bioquímico en la Gangliosidosis tipo GM1.
Brunetti-Pierrri, N., 2008.

Varios estudios revelan que en pacientes con diagnóstico de Gangliosidosis tipo GM1, el precursor de 85 kDa de la enzima beta-galactosidasa no es procesado a su forma madura de 64 kDa, impidiendo su tránsito y/o ingreso al interior del lisosoma, con su consecuente inactividad ⁽²⁴⁾. El gen de la enzima beta-galactosidasa (gen *GLB1*) se ubica en el brazo corto del cromosoma 3 y contiene 16 exones. Se ha reportado un total de 102 mutaciones en el gen *GLB1*. Las mutaciones reportadas se resumen en la figura 2. Existe una amplia heterogeneidad molecular en la Gangliosidosis tipo GM1, impidiendo una

correlación clara del genotipo/fenotipo. De las 102 mutaciones reportadas, 78 son sustitutivas, 10 son mutaciones de empalme, 7 son inserciones y 7 son deleciones ⁽²²⁾.

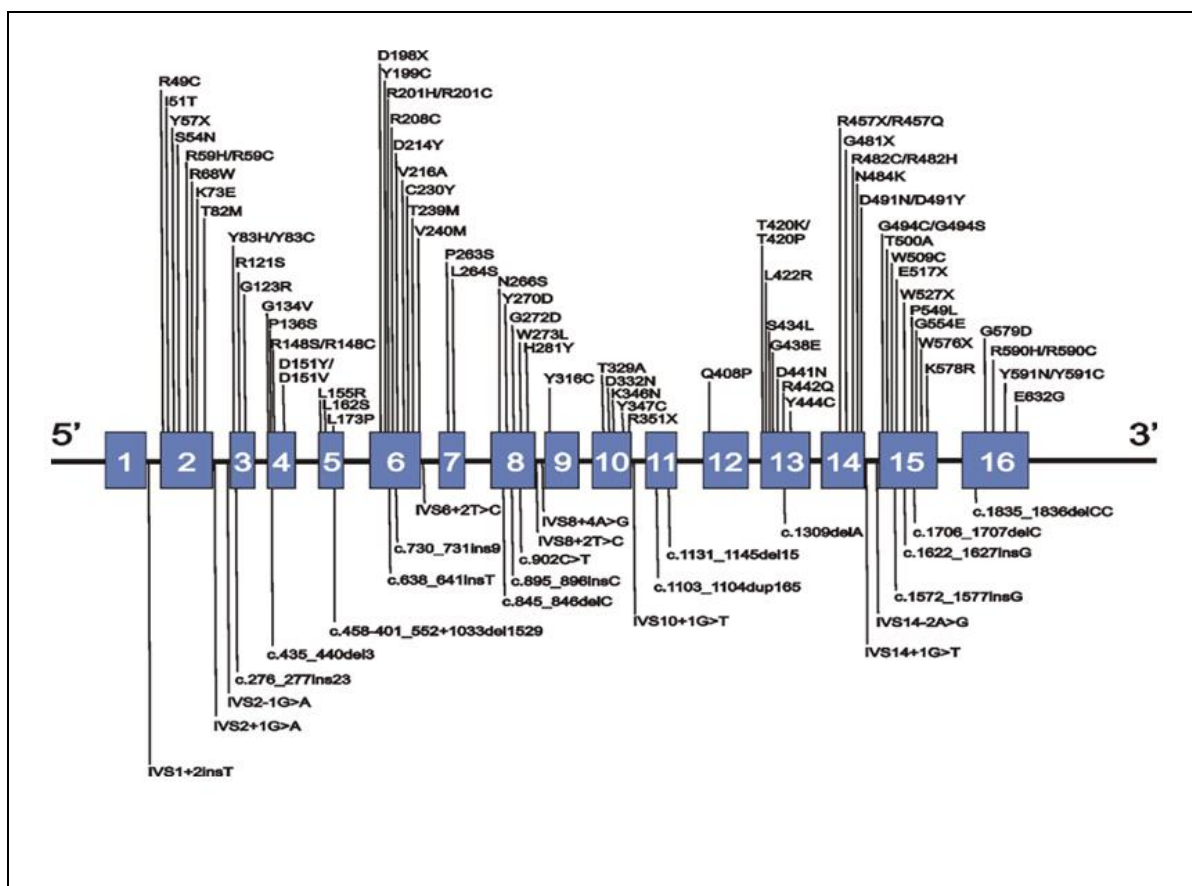


Figura 2. Resumen de las mutaciones reportadas para el gen GBL1 de la enzima beta-galactosidasa Brunetti-Pierri, 2008.

En cuanto al diagnóstico bioquímico de esta patología, la detección de la actividad de la enzima beta-galactosidasa confirma o descarta el diagnóstico de una Gangliosidosis tipo GM1 en cultivos de fibroblastos obtenidos a partir de biopsia de piel.

El cultivo de tejidos ha sido introducido desde principios del siglo XX como método para el estudio del funcionamiento de células animales ⁽²⁵⁾. Actualmente, se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas ⁽²⁶⁾. Entre los variados usos de cultivos de fibroblastos obtenidos a partir de biopsia de piel, el más frecuente es la confirmación de diagnósticos clínicos ⁽²⁷⁾. El material obtenido a partir de biopsia de piel puede ser utilizado en varios procedimientos de investigación, tales como; estudios ultraestructurales, inmunofluorescencia, histoquímicos, enzimáticos, microbiológicos, genéticos y de biología molecular, entre otros.

En países industrializados, el diagnóstico de EIM mediante análisis enzimático en fibroblastos se realiza en laboratorios de alta tecnología y complejidad. Las razones por la cual su utilización es limitada, se deben a que tanto la toma de muestra, biopsia de piel, como la propagación del cultivo de fibroblastos, requieren de una infraestructura sofisticada. Junto a esto, se debe agregar otros problemas relacionados con el envío de estas muestras biológicas a estos centros, tales como: 1) cantidad de células a derivar; 2) características del transporte con frascos de cultivo completamente llenos de medio de cultivo y herméticamente cerrados para evitar que las células se deshidraten y mueran; 3) tiempos de tránsito; 4) problemas aduaneros locales para el ingreso de muestras biológicas; 5) riesgo de rompimiento mecánico de los frascos de cultivo durante el transporte; 6) contaminación de los cultivos y 7) costos asociados a todo lo anterior ⁽²⁸⁾. Cada una de estas limitantes conllevarían a que las posibilidades de realizar un diagnóstico oportuno se retrase o no se pueda realizar, con las consecuencias nocivas ya descritas en la literatura, que ocasionan un diagnóstico tardío como son el daño neurológico irreversible o la muerte de estos pacientes ⁽²¹⁾.

Las dificultades descritas en el transporte de cultivos de fibroblastos para confirmación diagnóstica de EIM, y la alta probabilidad de que las muestras no lleguen a su destino en condiciones adecuadas para su análisis ⁽²⁸⁾, causarían un retraso en el

diagnóstico e incrementarían el costo del examen. Debido a esto, y considerando las ventajas que ha mostrado el uso del papel filtro como soporte de muestras biológicas, el objetivo de este estudio es evaluar la estabilidad de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro, para su uso en el diagnóstico confirmatorio de la Gangliosidosis tipo GM1, estableciendo criterios técnicos para ampliar la utilización de este tipo de soporte en muestras de fibroblastos para el estudio de otras enzimas lisosomales, lo que permitiría a los pacientes con algún EIM, más específicamente una EDL, un mayor acceso al diagnóstico confirmatorio.

HIPOTESIS

La disposición de fibroblastos lisados sobre papel filtro permite la determinación de la actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa, para su uso en el ensayo diagnóstico de la Gangliosidosis tipo GM1, al mantener su actividad enzimática frente a distintas condiciones de temperatura y tiempo de almacenaje.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la estabilidad de la actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro, bajo distintas condiciones de tiempo y temperatura de almacenaje.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la actividad enzimática de beta-galactosidasa en lisados de una línea de fibroblastos.
2. Determinar la actividad enzimática beta-galactosidasa en lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro.

3. Evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenaje sobre la actividad de beta-galactosidasa en muestras de lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro.

METODOLOGIA

I. OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE FIBROBLASTOS.

I.1.- Obtención de fibroblastos.

Los fibroblastos fueron obtenidos a partir del cultivo de la línea celular 3T3-L1 (ATCC, Código CL-173). La totalidad de los procedimientos involucrados en el manejo de células se realizó bajo campana de flujo laminar, utilizando material estéril y mechero para evitar contaminación. A partir de los cultivos celulares se obtuvo un total de 50 viales, cada uno conteniendo entre 3 y 5×10^6 células, suficientes para 15 determinaciones directas de actividad de beta-galactosidasa del lisado de fibroblastos.

I.2.-Mantenimiento y cultivo celular.

Las células fueron cultivadas y mantenidas según las indicaciones del proveedor, en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, penicilina 1000 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, piruvato de sodio 110 mg/L, bicarbonato de sodio 3,7 g/L y ácido 2-O-a-D-glucopiranosil-L ascórbico 0,5 mM, a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂. Las células fueron sembradas en botellas de 25 mL, a una densidad de $0,8 \times 10^5$ células/mL de medio de cultivo DMEM.

I.3.-Tripsinización.

Una vez alcanzado el 80% de confluencia (aproximadamente), las células fueron despegadas de la botella con una solución de tripsina al 0,25%. El procedimiento utilizado fue el siguiente: en un baño de incubación, el medio de cultivo (DMEM), solución de lavado (PBS 1X) y tripsina 0,25% fueron llevados a 37°C. Luego, se eliminó el medio de cultivo de las células a procesar con pipeta Pasteur plástica esterilizada. Se lavó 2 veces con una solución de PBS 1X para eliminar la totalidad del medio DMEM. Se añadió 3 mL de tripsina al 0,25% a cada botella y se dejó 3 minutos en incubación a 37°C. Una vez cumplido el tiempo, se retiró la suspensión celular de la botella y se transfirió a un tubo cónico estéril conteniendo 3 mL de medio DMEM. La suspensión celular se sometió a centrifugación a 226 x g por 5 minutos a 20°C y se eliminó el sobrenadante.

Según el propósito de este procedimiento se continuó de la siguiente manera:

I.3.1.- Propagación celular:

- a. Para la propagación de los fibroblastos, el sedimento celular obtenido se lavó dos veces con solución de PBS 1X y luego se resuspendió en 1 mL de medio DMEM. Luego, 0,5 mL de la suspensión celular fueron transferidos a una nueva botella de cultivo conteniendo 5 mL de medio DMEM.
- b. Cada nueva botella fue incubada a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂, hasta obtener un 80% de confluencia celular antes de repetir el proceso.

I.3.2.- Almacenamiento:

- a. Para almacenar las células, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 1 mL de suero fetal de bovino al 10% y se adicionó 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).
- b. La mezcla se transfirió a un crio-tubo el cual se almacenó a -70°C hasta su uso.

I.4.- Descongelamiento de células para ensayo enzimático.

Para la realización de los ensayos enzimáticos, el descongelamiento de células se llevó a cabo de la siguiente forma:

- a) Se preparó, en campana, un tubo cónico con 6 mL de medio de cultivo para cada vial o crio-tubo a descongelar.
- b) Se retiraron los crio-tubos almacenados a -70°C y se sometieron a una descongelación rápida (1 minuto) en baño de incubación a 37°C , con movimiento manual constante.
- c) Una vez descongeladas las células, se transfirieron al tubo con medio DMEM previamente preparado.
- d) La mezcla se centrifugó a $226 \times g$ por 5 minutos a 20°C .
- e) Se eliminó el sobrenadante y con la ayuda de una pipeta se retiró el medio restante.
- f) Las células sedimentadas fueron resuspendidas en $200 \mu\text{L}$ de suero fisiológico para preparar el extracto celular.

II. LISIS CELULAR.

Para la liberación de la enzima desde los lisosomas de los fibroblastos, el rompimiento de las membranas celulares se realizó mediante sonicación. Este procedimiento consiste en la aplicación de vibraciones ultrasónicas a una suspensión celular generando una agitación intensa que destruye las membranas celulares y que, dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir estructuras subcelulares ⁽²⁹⁾.

El método descrito para lisar los fibroblastos ⁽³⁰⁾, como paso previo a la determinación de enzimas lisosomales, se lleva a cabo mediante una sonicación directa, que transmite ondas de ultrasonido a través de un filamento o vástago que se introduce en la suspensión celular. En el presente estudio, se validó un método de lisis celular

alternativo utilizando un sonicador de “baño” para la destrucción de las membranas celulares. Para su validación, se sometió un extracto celular a lisis por ambos métodos. El método de referencia se llevó a cabo utilizando el sonicador de ultrasonido Sonifier 450 (Branson Ultrasonics), utilizando 2 ciclos de 25 segundos, con un intervalo de 30 segundos y una potencia de 45 Watts, tal como lo describe el método. Como método alternativo de lisis celular en estudio, el procedimiento se llevó a cabo utilizando el baño Ultrasónico Elmasonic S10 (Elma), en el cual las ondas se transmiten a través de un líquido al extracto celular sumergido en un recipiente. Para este último método, dado que fue sometido a evaluación, se estudiaron distintos ciclos de lisis, cada uno de 1 minuto, con un intervalo de 30 segundos y una potencia de 30 Watts.

Para la evaluación del método de sonicación, se determinó la actividad de la enzima beta-galactosidasa mediante el método de Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾ en los extractos enzimáticos obtenidos. Los valores de las actividades enzimáticas fueron sometidos a análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias estadísticas entre las actividades obtenidas.

III.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA EN FIBROBLASTOS LISADOS.

III.1.- Cuantificación de proteínas del lisado de fibroblastos.

La determinación de la cantidad de proteínas presentes en el lisado de fibroblastos se llevó a cabo mediante el método de Lowry y cols. ⁽³¹⁾. Este es un método colorimétrico que incluye dos reacciones: 1) los iones Cu^{++} (aportados por el reactivo de cobre), en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{++} -proteína poseen un color azul claro y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo

los residuos de tirosina y 2) el reactivo de Folin-Ciocalteu es reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando al cobre como catalizador (Figura 3). El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, que es directamente proporcional a la concentración de proteínas presente en el extracto ⁽³¹⁾.

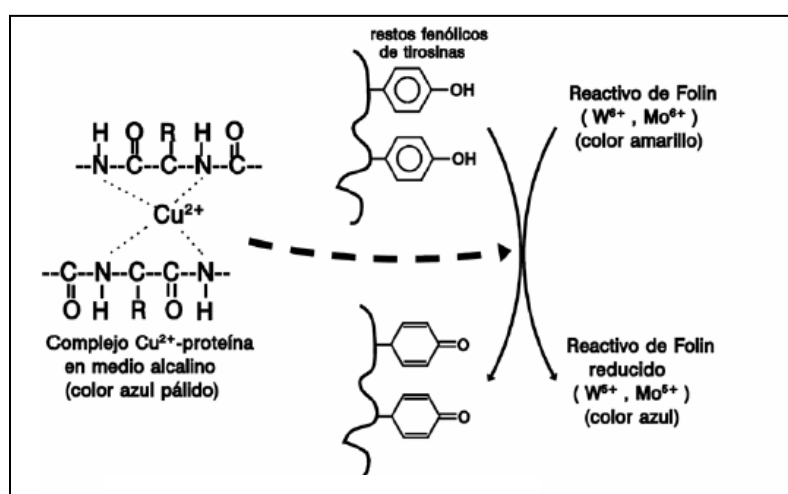


Figura 3. Fundamento del método de Lowry y cols. (1951).

La técnica se llevó a cabo de la siguiente forma:

- i. El ensayo fue realizado a temperatura ambiente y en tubos de vidrio. Cada lisado de fibroblastos fue ensayado en duplicado, más un blanco de reacción.
- ii. El lisado de fibroblastos se diluyó tomando 25 μL de éste y llevándolo a 0,5 mL con agua destilada.
- iii. Se adicionó 1,5 mL de reactivo alcalino de cobre preparado al momento del ensayo. Este reactivo contenía carbonato de sodio al 2%, sulfato de cobre al 1% y tartrato de Na-K al 2%, en una proporción: 1:0,1:0,1 respectivamente.
- iv. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- v. Se adicionó 150 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada en una proporción 1:4.
- vi. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- vii. La absorbancia fue medida en Espectrofotómetro Spectronic 401 (Milton Roy) a una longitud de onda de 750 nm.
- viii. El cálculo de la concentración de proteínas del lisado de fibroblastos se realizó mediante la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración de proteínas generada con albúmina de bovino a una concentración de 0,94 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

III.2.- Determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa.

La determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en extractos de fibroblastos lisados se llevó a cabo mediante el método descrito por Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾. Este es un método fluorométrico, el cual se basa en la utilización del sustrato sintético 4-metilumbeliferil-B-D-galactopiranosido disuelto en tampón citrato-fosfato 0,1 M a pH 4,0. Luego de 60 minutos de incubación en baño termo-regulado a 37°C, la reacción se detuvo con tampón glicina-NaOH 0,8 M a pH 10,3. Para cada análisis, se utilizó 10 μL del extracto enzimático diluido en una proporción 1:4 con suero fisiológico. Los extractos enzimáticos fueron mantenidos y manejados en hielo hasta el inicio de la incubación.

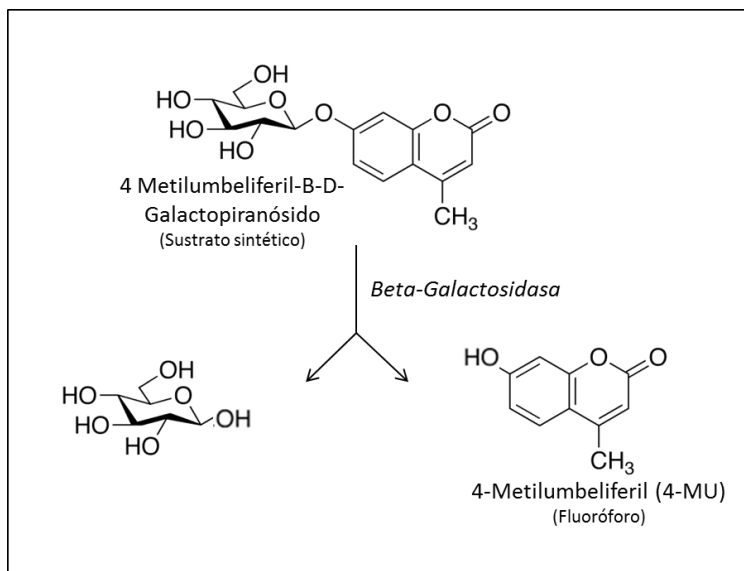


Figura 4. Esquema de la reacción bioquímica de la enzima beta-galactosidasa *in vitro*.

La fluorescencia, emitida por el 4-Metilumbeliferil (4-MU) liberado por la acción de la enzima beta-galactosidasa (Figura 4), fue medida en fluorómetro Spectramax M2 (Molecular Devices), utilizando el programa SoftMaxPro 4,6 (Excitación: 365 nm y Emisión: 450 nm).

La técnica utilizada para la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en muestras de lisados de fibroblastos se detalla a continuación:

- i. Se diluyó el extracto enzimático con NaCl 0,9% para obtener una cantidad de proteínas entre 10 – 20 µg.
- ii. Cada ensayo fue realizado en triplicado más un blanco de reacción, en tubos eppendorff y sobre hielo.
- iii. Se tomó 10 µL del extracto diluido para la determinación enzimática y 10 µL de NaCl 0,9% para el blanco de reacción.
- iv. Se agregó 10 µL de NaCl 0,2 M a cada tubo eppendorff.

- v. Se agregó 20 μL de sustrato (4-Metilumbeliferil-B-D-galactopiranosido 1,33 mM disuelto en tampón citrato-fosfato 0,1 M a pH 4,0). El sustrato fue preparado al momento del ensayo.
- vi. Se retiraron los tubos del hielo y se sometieron a incubación en baño termoregulado a 37°C por 1 hora.
- vii. Se detuvo la reacción con 300 μL de tampón glicina-NaOH 0,8 M a pH 10,3.
- viii. La lectura de la fluorescencia se realizó en micro-placa de 96 pocillos, tras disponer el contenido de cada tubo eppendorff en un pocillo de la micro-placa. Se utilizó fluorómetro Spectramax M2 mediante el programa SoftMaxPro 4,6 (Excitación: 365 nm y Emisión: 450 nm).
- ix. El cálculo de los nanomoles de 4-MU generados se realizó mediante la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración de 4-MU. Cada curva de calibración se realizó en micro-placa para lectura fluorométrica, añadiendo 20 μL de cada dilución del estándar previamente preparado y mantenido a -20°C hasta su uso, y 320 μL de la solución de parada (tampón glicina-NaOH 0,8M a pH 10,3).

La actividad enzimática específica se expresó como nanomoles de 4-MU generados en una hora por miligramo de proteínas ($\text{nmoles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

IV.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA EN FIBROBLASTOS LISADOS DISPUESTOS SOBRE PAPEL FILTRO.

IV.1.- Disposición de lisados de fibroblastos en papel filtro.

Los lisados de fibroblastos fueron dispuestos en papel filtro Whatman 903 mediante una pipeta automática en forma de gotas independientes de 2,5; 5; 10 y 25 μL . El papel filtro se mantuvo sobre un soporte que permitió un contacto mínimo con las superficies

durante la aplicación del extracto y su secado. Una vez que el volumen de extracto se expandió completamente sobre el papel, con la ayuda de un lápiz grafito, se marcó levemente cuatro puntos del perímetro de la gota obtenida como referencia de ésta. Posterior a esto, cada gota se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora.

IV.2.- Determinación de la actividad de beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos en papel filtro.

Para la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en fibroblastos lisados y dispuestos sobre papel filtro se utilizó el mismo método descrito para la determinación directa en lisados de fibroblastos, con algunas modificaciones. Se obtuvo discos de 3,2 mm de diámetro de papel conteniendo los fibroblastos mediante la utilización del equipo Wallac DBS Puncher (Perkin-Elmer), los cuales fueron recogidos y dispuestos en micro-placas de 96 pocillos para fluorometría. El ensayo se llevó a cabo en la micro-placa, añadiendo a cada pocillo NaCl 0,2M y sustrato correspondientes para la reacción enzimática, manteniendo los mismos volúmenes utilizados para la determinación directa en lisados de fibroblastos. La incubación de 60 minutos se llevó a cabo en una incubadora de micro-placas a 37°C. La reacción fue detenida agregando 300 µL de tampón glicina-NaOH 0,8M a pH 10,3 directamente en cada pocillo. La lectura de la fluorescencia se realizó en el fluorómetro Spectramax M2 (Molecular Devices), utilizando el programa *SoftMaxPro 4,6* (Excitación: 365 nm y Emisión: 450 nm).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.

Para comparaciones entre grupos, se utilizó análisis de ANOVA de una vía, con post hoc test de Bonferroni o de dos vías, dependiendo las variables estudiadas: actividad enzimática, temperatura, tiempo de almacenaje y ciclos de re-almacenaje. Los resultados

fueron expresados como promedio \pm desviación estándar y $p < 0,05$ fue considerado como diferente estadísticamente.

RESULTADOS

I. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA POR ANÁLISIS DIRECTO DE LISADOS DE FIBROBLASTOS.

I.1 Evaluación del método y tiempo óptimo de lisis de celular.

Un cultivo de fibroblastos fue sometido a lisis celular mediante dos métodos distintos con el objetivo de evaluar la eficiencia de uno respecto al otro. El método 1, correspondió a lisis celular en sonicador de “baño”. Este método de lisis, se comparó con el método de referencia descrito (método 2) para la liberación de las enzimas de interés desde los lisosomas de los fibroblastos en estudio ⁽⁹⁾. El método 2, consistió en una lisis celular directa mediante un sonicador de “vástago” utilizando 2 ciclos de 25 segundos, con un intervalo de 30 segundos y una potencia de 45 Watts. Para validar el método 1 frente

al método 2, se sometió el extracto celular a lisis por 2, 4, 6 y 8 ciclos de un minuto cada uno, a una potencia de 30 Watts y con un intervalo de 30 segundos. Luego, se determinó la actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa por el método descrito por Suzuki y cols. ⁽⁹⁾. Cada uno de los ciclos de lisis celular en evaluación para el método 1 fue analizado por triplicado (12 determinaciones en total), y en el caso del método de referencia (método 2), se realizó un total de 9 determinaciones de actividad enzimática previa lisis del extracto mediante este método.

La lisis mediante el método 1, se realizó a extractos celulares con volúmenes entre 0,2 mL - 1 mL aproximadamente, en tubo cónico estéril de 15 mL sumergidos en el agua contenida en el baño de sonicación hasta la marca de 3 mL del tubo. Entre cada ciclo de 1 minuto, el tubo fue retirado del baño y sumergido por 30 segundos en hielo. Esto último, con el objetivo de evitar la desnaturalización de la enzima por la generación de calor propia del proceso de sonicación.

Las medias de actividad de beta-galactosidasa obtenidas para cada grupo en estudio se muestran en la figura 5. Los resultados obtenidos para cada tiempo de lisis se compararon con la actividad enzimática obtenida utilizando el método de referencia (método 2). Comparando ambos métodos de lisis celular, la actividad de la enzima beta-galactosidasa no mostró diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía; $p > 0,05$), lo mismo ocurrió al comparar entre los distintos tiempos de lisis para el método 1.

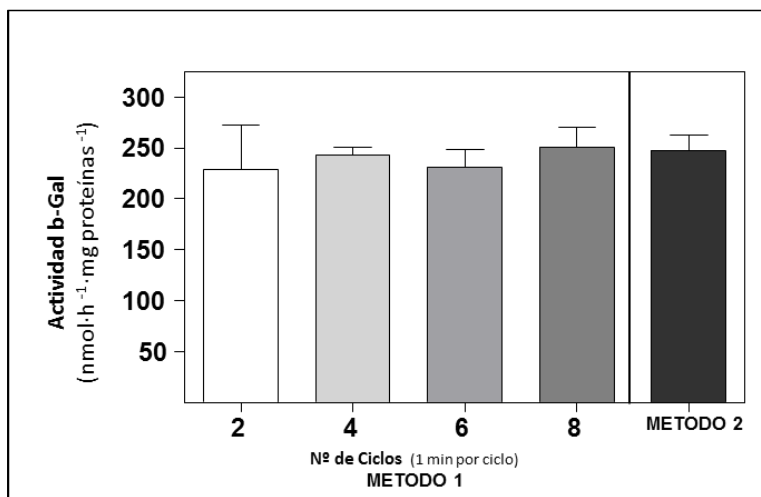


Figura 5. Evaluación del método y tiempo de lisis celular en función de la actividad de la enzima beta-galactosidasa. Método 1: Método en evaluación. Lisis celular mediante sonicador de baño (2, 4, 6 y 8 ciclos/minuto) Cada ciclo ensayado en triplicado. Método 2: Método de referencia. Lisis celular mediante sonicador de vástago (2 ciclos/25 segundos).

A partir de estos resultados, se validó el método 1 como método eficiente de lisis de fibroblastos y se determinó utilizar 8 ciclos de 1 minuto cada uno para los siguientes procesos de destrucción celular.

I.2.- Generación de la curva de calibración de 4-Metilumbeliferil (4-MU) para la determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa.

Se generó un total de 6 curvas de calibración de 4-MU, producto obtenido de la reacción enzimática, en distintos ensayos y en triplicado para cada concentración de 4-MU. (Figura 6).

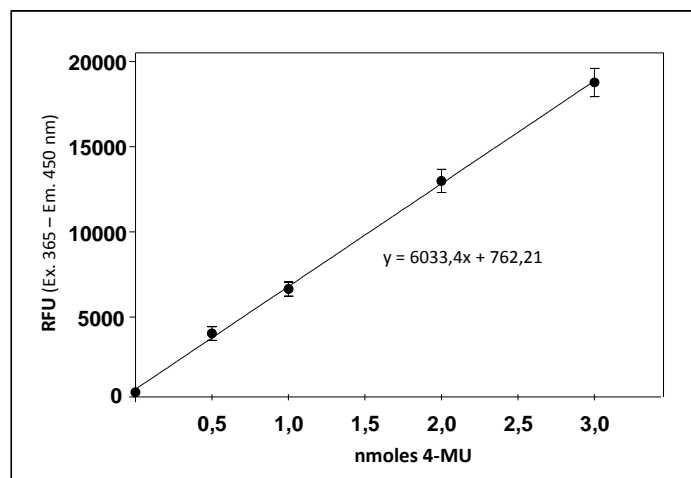


Figura 6. Curva de calibración de 4-Metilumbeliferil (4-MU) para la determinación de la actividad de beta-galactosidasa. Curva obtenida a partir del promedio de 6 curvas de calibración, realizadas en distintos ensayos y en triplicado para cada punto. r de Pearson > 0,99 para cada curva realizada.
RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia.

I.3.- Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry y cols.

I.3.1.- Evaluación de la linealidad del método.

Para la evaluación de la linealidad del método se utilizó como estándar una solución de albúmina de bovino a una concentración de 0,94 µg/µL.

Se obtuvo un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 2,3%. La determinación de la concentración de proteínas fue lineal hasta 100 µg de proteínas tal como se muestra en la figura 7.

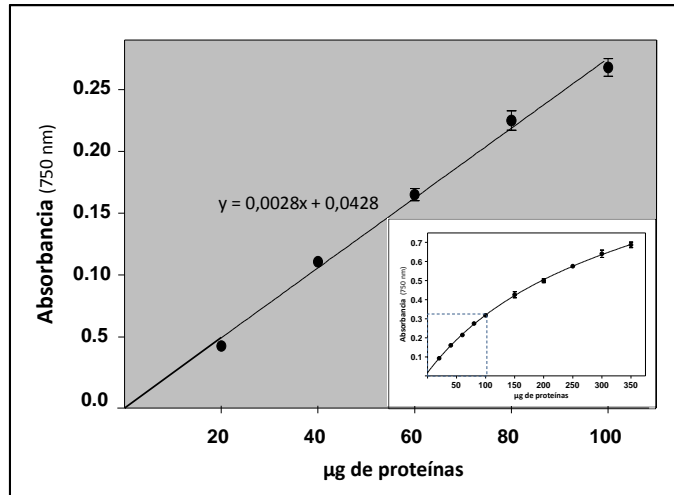


Figura 7. Curva de calibración de proteínas mediante el método de Lowry y cols. y evaluación de la linealidad del método. Cada punto ensayado en triplicado. r de Pearson > 0,998.

A partir de la curva de calibración de proteínas, se calculó la cantidad de proteínas presentes en los extractos enzimáticos, valor que junto a los nanomoles de 4-MU determinados, permitió obtener la actividad enzimática específica de beta-galactosidasa para cada uno de los lisados de fibroblastos ensayados.

I.3.2.- Determinación de la concentración de proteínas del lisado de fibroblastos.

Cada extracto fue sometido a cuantificación de proteínas ⁽³¹⁾ para determinar la actividad de la enzima beta-galactosidasa. Mediante el análisis de 10 lisados de fibroblastos, se determinó que la concentración de proteínas en los extractos de fibroblastos resuspendidos en 200 µL de suero fisiológico fue de $1,02 \pm 0,17$ mg de proteínas/mL de extracto.

I.4.- Determinación de las condiciones óptimas de ensayo enzimático.

I.4.1.- Evaluación de la generación de producto en función del pH del medio.

Se estudió la generación de producto (4-MU) de un lisado de fibroblastos a distintas condiciones de pH (Tampones citrato-fosfato 0,1 M a pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 y 5,0). Según el método descrito por Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾, el sustrato de la reacción 4-metilumbeliferil-B-D-galactopiranosido se disolvió en cada uno de los tampones preparados, a una concentración de 1,33 mM. Se realizaron los ensayos enzimáticos mediante la técnica descrita utilizando los tampones preparados.

Un pH 4,0 del medio de incubación fue el pH óptimo para la reacción de la enzima beta-galactosidasa en la línea celular 3T3-L1, mostrando una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los pH estudiados (ANOVA de una vía $p < 0,023$) (Figura 8).

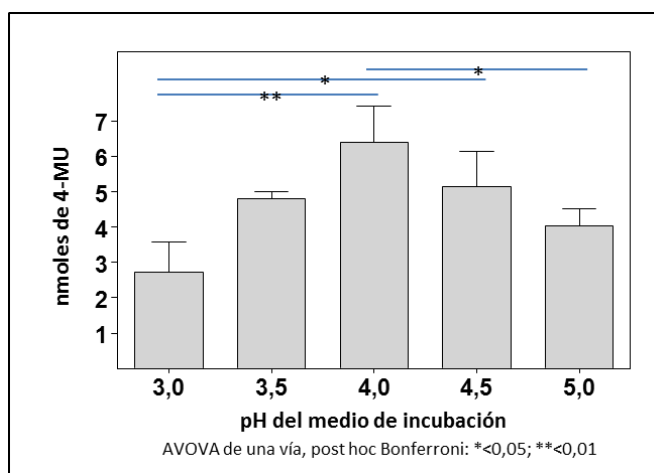


Figura 8. Generación de producto en función del pH del medio de incubación en análisis de fibroblastos lisados. Cada pH ensayado en triplicado más un blanco de reacción.

I.4.2.- Curva temporal del ensayo de actividad de beta-galactosidasa.

Se estudió la generación de producto (4-MU) de un extracto de lisados de fibroblastos a distintos tiempos de incubación a 37°C. Mediante este análisis se demostró que la generación de producto es lineal hasta 3 horas de incubación a 37°C (Figura 9).

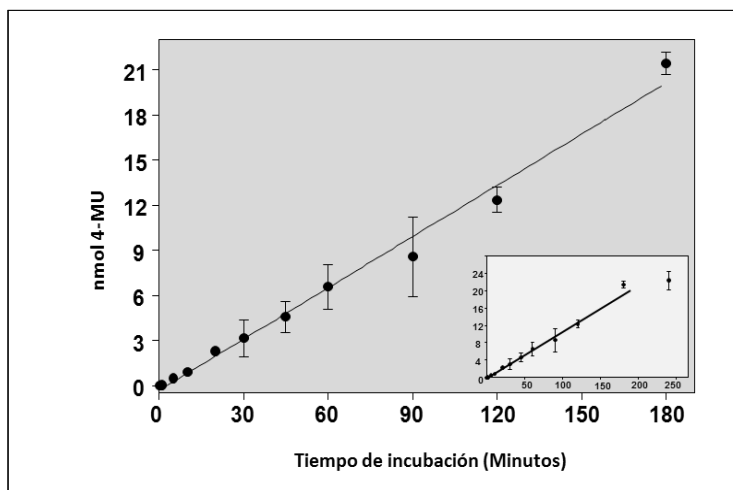


Figura 9. Generación de producto en función del tiempo de incubación en análisis de fibroblastos lisados. Cada tiempo ensayado en duplicado más un blanco de reacción.

I.5.- Evaluación del ensayo enzimático para la determinación de la enzima beta-galactosidasa.

Se realizó 4 ensayos enzimáticos en triplicado mediante el método de Suzuki y cols.⁽³⁰⁾. Cada ensayo se realizó bajo las mismas condiciones utilizando células frescas (descongeladas el mismo día del análisis) con el objetivo de eliminar variables por efectos de almacenaje de los extractos lisados. Se evaluó reproducibilidad mediante obtención de % de Coeficiente de Variación (%CV) inter e intra ensayo, además de determinar el intervalo de actividad de beta-galactosidasa esperable para el ensayo directo del lisado de fibroblastos.

Se obtuvo un CV inter e intra ensayo de 9,6% y 8,7%, respectivamente. El valor promedio obtenido para la actividad de beta-galactosidasa en ensayos directos del lisado de fibroblastos fue de $213,7 \pm 18,5 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. No se observó diferencias estadísticas entre las actividades de los cuatro extractos evaluados (ANOVA de una vía; $p > 0,05$) (Figura 10). Esto indica, que bajo las condiciones de ensayo utilizadas en este análisis, el método es reproducible para la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en fibroblastos lisados.

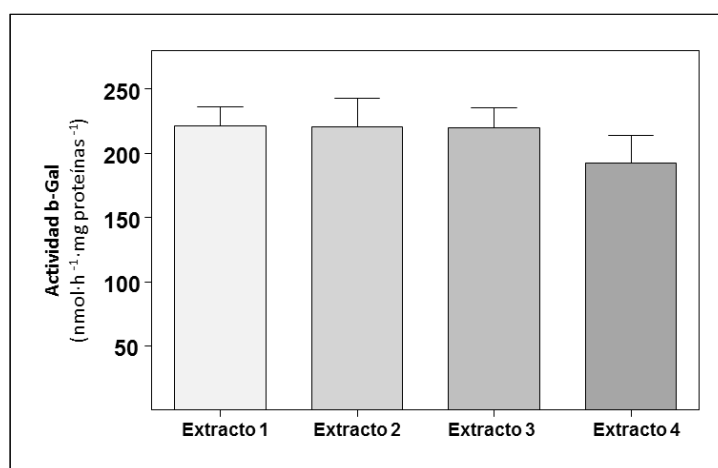


Figura 10. Evaluación de la reproducibilidad en la determinación de la actividad enzimática de la beta-galactosidasa en extractos de fibroblastos lisados. Cada extracto ensayado en triplicado. ANOVA de una vía; $p > 0,05$, entre extractos.

II.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA EN LISADOS DE FIBROBLASTOS DISPUESTOS EN PAPEL FILTRO.

II.1.- Establecimiento de las condiciones del ensayo.

II.1.1- Selección del volumen de lisado depositado sobre papel filtro para la determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa.

Se evaluó el volumen del lisado de fibroblastos óptimo a depositar sobre papel filtro para la determinación de la actividad de beta-galactosidasa. Mediante el uso de una

pipeta automática se dispuso en papel filtro Whatman 903 un total de 10 alícuotas del extracto lisado en forma de gotas independientes para cada volumen estudiado. Para evaluar el volumen de sembrado óptimo, se consideró la variación inter gotas del diámetro obtenido para cada volumen, la utilidad del diámetro de la gota obtenido en función del número de discos de 3,2 mm extraíbles a partir de cada gota obtenida y la facilidad para la siembra; este último, como parámetro cualitativo.

En la Tabla 1 se observa que a medida que aumenta el volumen de sembrado, disminuye la variación del diámetro de la gota obtenido. Al considerar la utilidad del diámetro resultante, el volumen de 10 μL fue el más eficaz para el ensayo enzimático considerando la realización de este en triplicado, lo que no ocurre para los volúmenes de 2,5 y 5 μL , donde ambos diámetros exigen obtener cada disco a partir de una gota distinta; lo que considerando el mayor %CV del diámetro obtenido para estos volúmenes, afectaría la reproducibilidad del método. Lo contrario ocurre en el caso del diámetro obtenido al disponer un volumen de extracto de 25 μL en papel filtro; que a pesar de presentar un bajo %CV, acarrea una significativa pérdida de muestra al utilizar menos de la mitad del volumen total dispuesto en el papel. Al considerar de modo cualitativo la facilidad de la aplicación de la gota en el papel filtro, se encontró mayor dificultad al aplicar menores volúmenes, lo que también puede aportar al %CV obtenido para volúmenes menores.

Por otro lado, se evaluó la homogeneidad resultante de los extractos enzimáticos al disponerlos sobre el papel filtro. Para esto, se tomaron 4 discos (de 3,2 mm de diámetro cada uno) para cada volumen en estudio y 4 discos de papel filtro sin extracto enzimático que fueron utilizados como blanco. Cada disco se recogió en un pocillo independiente de la micro-placa y se procedió a realizar el ensayo enzimático en fibroblastos lisados dispuestos en papel filtro, con las modificaciones previamente descritas. Se calculó la media, desviación estándar y %CV intra ensayo para cada volumen de sembrado en

estudio, en función de la medida de fluorescencia obtenida tras el ensayo enzimático (Tabla 1).

La figura 11 muestra que al comparar cada uno de los volúmenes de sembrado contra el blanco, existe una diferencia significativa entre el blanco y los distintos volúmenes utilizados. Sin embargo, al comparar entre sí los distintos volúmenes estudiados, no hubo diferencias (ANOVA de una vía $p < 0,001$; Bonferroni $p > 0,05$).

		VOLUMEN DE EXTRACTO			
		2,5 μ L	5 μ L	10 μ L	25 μ L
Diámetro	Media \pm DE (mm)	6,4 \pm 1,1	8,0 \pm 0,5	10,9 \pm 0,2	15,9 \pm 0,2
	%CV	16,8	6,0	2,2	1,5
	Utilidad (ds.3,2 mm)	1	1	3	6
Facilidad de trabajo (Difícil = 0, Fácil = 1)		0	0	1	1
RFU (Ex.365-Em. 450nm)	Media \pm DE	10209 \pm 1894	10705 \pm 1904	9555 \pm 1548	9418 \pm 2161
	%CV	18,6	17,8	16,2	22,7

Tabla 1. Evaluación del volumen de extracto enzimático dispuesto sobre papel filtro. DE: Desviación Estándar; Utilidad: Utilidad del diámetro de la gota obtenido en función del número de discos de 3,2 mm extraíbles; ds.: Discos. RFU: Unidades de Fluorescencia Relativa. %CV: Coeficiente de Variación.

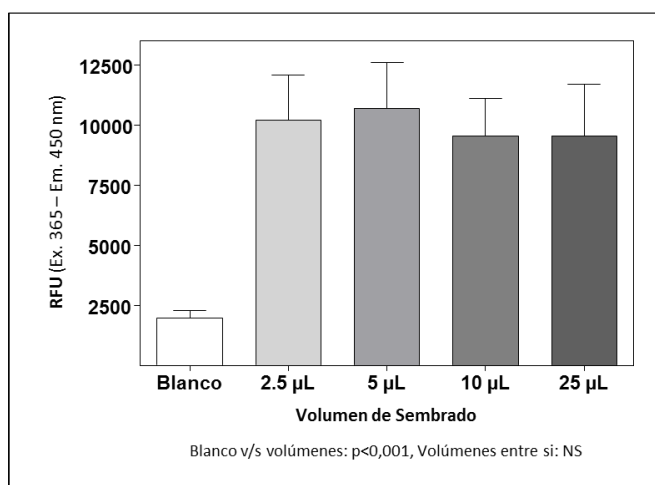


Figura 11. Fluorescencia generada según el volumen de extracto enzimático dispuesto sobre el papel filtro. Cada volumen ensayado en 4 discos de papel filtro. Blanco: 4 discos de papel filtro sin extracto enzimático. NS: No significativo estadísticamente.

A partir de los resultados obtenidos en este análisis, los siguientes ensayos de determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa, en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro, fueron realizados en triplicado obteniendo discos de 3,2 mm a partir de una única gota seca tras sembrar 10 μ L del extracto, tal como se muestra en la figura 12.

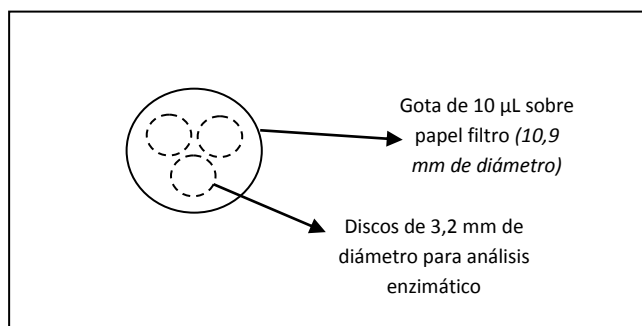


Figura 12. Esquema de obtención de discos de 3,2 mm para ensayos enzimáticos a partir de la gota obtenida por disposición de 10 μ L de extracto enzimático en papel filtro.

II.2- Evaluación de la fluorescencia emitida en función del tiempo de incubación en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.

Con el objetivo de verificar que el tiempo de incubación descrito para la determinación enzimática directa en el lisado de fibroblastos también es aplicable a fibroblastos dispuestos sobre papel filtro, se realizó el ensayo enzimático empleando discos de 3,2 mm de diámetro y variando el tiempo de incubación a 37°C. Cada tiempo se analizó por duplicado, más un blanco de reacción (disco de papel filtro sin extracto). Para esto, cada disco obtenido se transfirió a un tubo eppendorff y se incubó en baño termoregulado. La reacción se detuvo con tampón glicina-NaOH 0,8 M a pH 10,3 a los tiempos

preestablecidos. La solución resultante se transfirió a un pocillo de la micro-placa para la medición de la fluorescencia.

La figura 13 muestra la curva obtenida, en la cual se puede apreciar que la generación de producto (representado como fluorescencia (RFU)) fue lineal hasta al menos 200 minutos de incubación. Con esto se validó un tiempo de incubación de 1 hora para la determinación de la enzima beta-galactosidasa en el lisado de fibroblastos dispuesto sobre papel filtro.

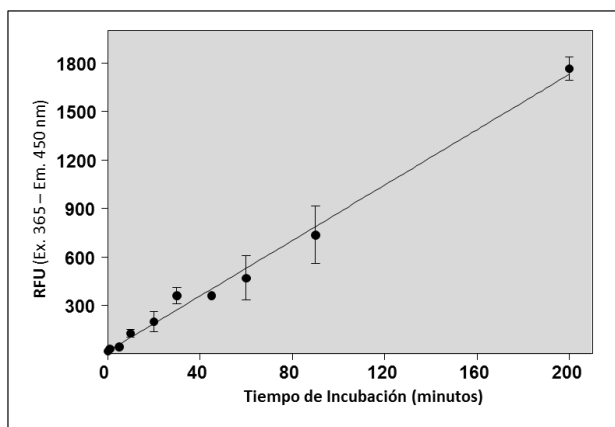


Figura 13. Evaluación del tiempo de incubación en función de la fluorescencia generada en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro. Cada volumen ensayado en 4 discos de papel filtro. Ensayo realizado en tubos eppendorf. Cada tiempo ensayado en duplicado más un blanco de reacción.

II.3- Evaluación del ensayo enzimático en lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro.

Se generaron distintas diluciones a partir de un extracto de lisado de fibroblastos con concentración de proteínas conocida (extracto primario) utilizando una solución de NaCl 0,9%. A partir de la mezcla de ambas, en las proporciones necesarias, se obtuvieron diluciones con 0,25; 0,5 y 0,75 partes del extracto primario. Se dispuso en papel filtro

gotas de 10 μL para cada una de las diluciones generadas, además de gotas de 10 μL de solución de NaCl 0,9% (representando 0 partes del extracto) y gotas de 10 μL del extracto primario (representando 1 parte del extracto). El ensayo se realizó en triplicado y en paralelo se realizó ensayo enzimático directo del lisado de fibroblastos sobre las mismas diluciones.

La fluorescencia obtenida para cada dilución del lisado fue en ambos ensayos estadísticamente diferente a la solución sin extracto enzimático correspondiente (ANOVA de una vía; $p < 0,001$); excepto en el caso de la fracción 0,25 del análisis en papel filtro (Figura 14).

El análisis post hoc de Bonferroni, mostró diferencias estadísticas entre la totalidad de las diluciones evaluadas para el ensayo directo del lisado de fibroblastos, sin embargo en el caso del ensayo en papel filtro, no se observó diferencias significativas entre las diluciones del extracto adyacentes.

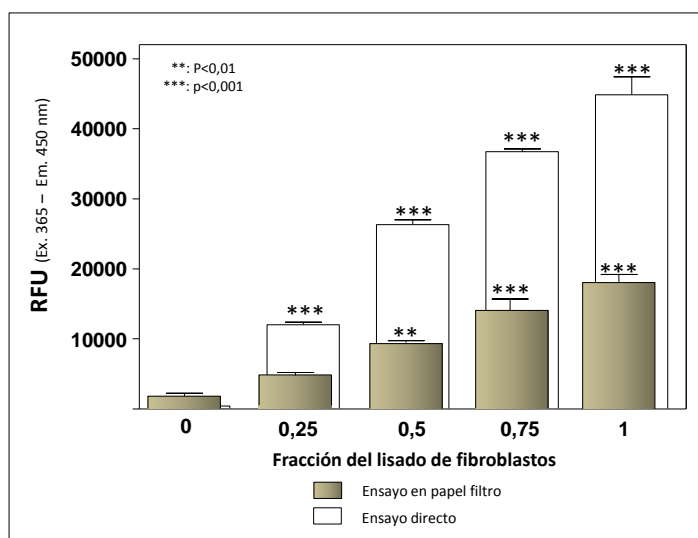


Figura 14. Evaluación de la emisión de fluorescencia en ensayo de beta-galactosidasa en fibroblastos lisados. Ensayo directo de fibroblastos versus ensayo de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro. Cada dilución ensayada en triplicado para ambos ensayos. ANOVA de una vía, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la figura 14 se observa para ambos casos una tendencia lineal positiva, con un valor de r de Pearson $>0,99$; a pesar de que la emisión de fluorescencia (RFU) para el ensayo de la enzima beta-galactosidasa en papel filtro es menor respecto a la determinación en fibroblastos por análisis directo.

Se estimó la cantidad de proteínas presentes en cada fracción del lisado evaluado y se determinó su correlación con la fluorescencia generada. La concentración de proteínas en el extracto enzimático sin diluir (extracto primario) fue de 0,9 mg/mL. Considerando que para el análisis en fibroblastos directo, el volumen utilizado fue de 10 μ L del extracto previamente diluido en suero fisiológico en una proporción de 1:4, el volumen real del extracto utilizado corresponde a 2,5 μ L, conteniendo 2,25 μ g de proteínas. Para las fracciones 0,25, 0,5 y 0,75 del extracto lisado, la cantidad de proteínas presentes correspondieron a 0,56; 1,13; y 1,69 μ g respectivamente (Tabla 2).

En el caso de los ensayos de lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro, la concentración de proteínas presentes, se calculó a partir del área de la gota generada tras la disposición de 10 μ L del extracto primario y del área del disco utilizado para el ensayo (3,2 mm). Considerando que el área de una circunferencia es $\pi * r^2$ ($\pi=3,1416$; $r=radio$) y que la media de los diámetros de la gota de 10 μ L fue 10,9 mm, se obtuvo un área de 93,31 mm² y para el disco de 3,2 mm un área de 8,04 mm². A partir de esto, se calculó la cantidad teórica de proteínas contenidas en un disco de 3,2 mm de diámetro para cada una de las diluciones del lisado de fibroblastos evaluadas. Se calculó que 10 μ L de extracto enzimático sin diluir sembrados en el papel filtro contenían 9 μ g.

La cantidad de proteínas calculadas para cada dilución del lisado de ambos ensayos se muestran en la tabla 2.

Tipo de ensayo	Fracción del lisado	Proteínas utilizados en el ensayo (μg)	RFU (Media de triplicado)	Desviación Estándar
Directo	0,25	0,56	11313,0	513,3
	0,50	1,13	25627,3	1149,4
	0,75	1,69	36029,0	720,6
	1	2,25	44200,0	4347,9
Papel Filtro	0,25	0,19	2526,8	694,9
	0,50	0,38	7038,4	357,5
	0,75	0,58	12444,4	2993,7
	1	0,77	15021,7	2760,8

Tabla 2. *Fluorescencia emitida según la cantidad de proteínas utilizada en el ensayo enzimático.* Ensayo directo de fibroblastos y ensayo en fibroblastos dispuestos en papel filtro.

Al evaluar la correlación entre la cantidad de proteínas presentes en el extracto utilizado y la emisión de fluorescencia en los ensayos enzimáticos directo de fibroblastos lisados y en los lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro, se observó una tendencia lineal positiva con un r de Pearson $>0,99$ (Figura 15).

Este resultado señala que la sensibilidad en la detección de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos en papel filtro no varía en comparación al método descrito originalmente por Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾ para análisis directo de fibroblastos, y por lo tanto, la menor producción de fluorescencia en el ensayo en papel filtro observada en la figura 15, se explica por la menor cantidad de extracto enzimático utilizado en el ensayo.

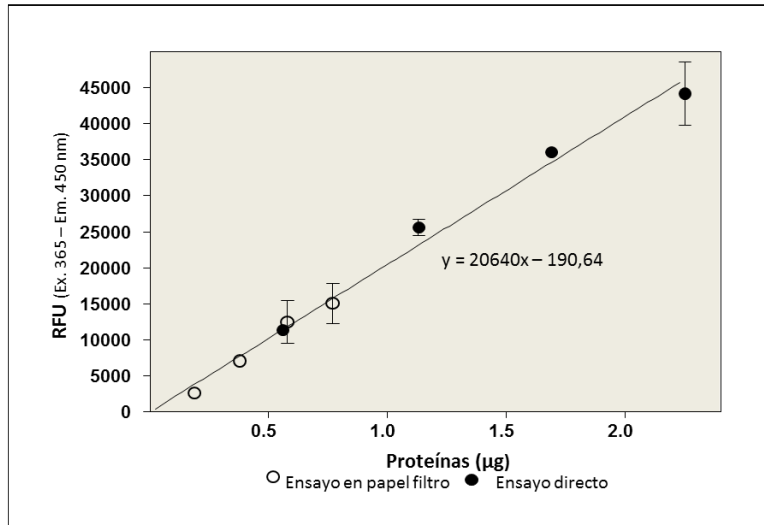


Figura 15. Correlación entre la cantidad de proteínas y la fluorescencia generada. Ensayo directo de fibroblastos y ensayo en fibroblastos dispuestos en papel filtro. r de Pearson >0,99

II.4.- Evaluación del efecto de la concentración del extracto enzimático en la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en papel filtro.

Se evaluó el método de determinación enzimática en lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro a mayores concentraciones (µg) que el extracto estándar utilizado. Para esto, se descongeló un total de cinco viales, los cuales fueron resuspendidos en un volumen de 50 µL de suero fisiológico cada uno. Los extractos celulares obtenidos, se mezclaron y luego lisaron para obtener un extracto de fibroblastos con mayor concentración (3,6 mg proteínas/mL). Se ensayó, en función de la concentración de proteínas, extractos con 0,9; 1,8 y 3,6 mg/mL, los dos primeros obtenidos a partir de la dilución del tercero. Para cada una de las concentraciones se sembraron 4 gotas de 10 µL en papel filtro, luego fueron secadas a temperatura ambiente por 60 minutos. Se obtuvo tres discos de 3,2 mm de diámetro para la realización del ensayo en triplicado. El análisis estadístico demostró que el método utilizado para la determinación de la enzima beta-galactosidasa en papel filtro permite un adecuado análisis de lisados de fibroblastos con mayores concentraciones a las previamente utilizadas en este estudio (ANOVA de dos

vías; $p < 0,001$). No hubo diferencia significativa entre las fluorescencias obtenidas para las gotas de un mismo grupo (Figura 16).

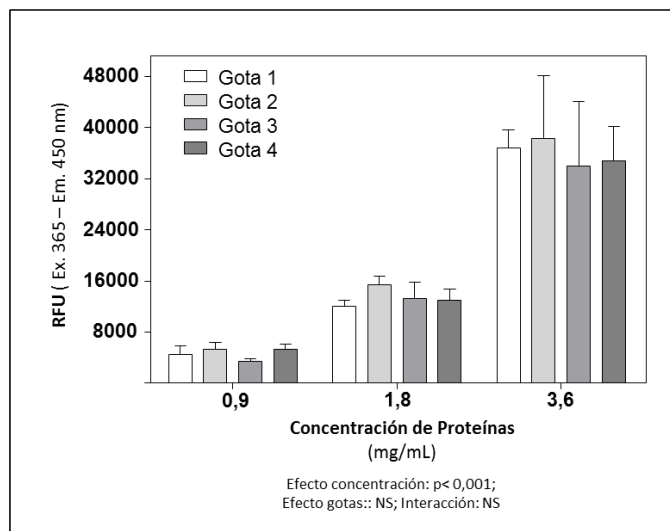


Figura 16. Evaluación del efecto de la concentración del extracto dispuesto sobre papel filtro. Cada gota de 10 μ L ensayada en triplicado más un blanco.

Al graficar la media de RFU obtenida para cada concentración de proteínas se pudo observar una tendencia lineal y una correlación con un *r de Pearson* $> 0,998$. (Datos no mostrados).

II.5.- Cálculo de la actividad enzimática de beta-galactosidasa para ensayo de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.

El cálculo de la actividad enzimática de beta-galactosidasa determinada por ensayo de fibroblastos lisados dispuestos en papel filtro se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{\text{nmoles 4-MU} * \text{FD}}{\text{mg de proteínas}/0,1\text{mL}}$$

donde: los nmoles de 4-Metilumbeliferil fueron obtenidos a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración (Figura 2) y FD corresponde al factor de dilución 11,6.

Con el objetivo que los valores de actividad obtenidos por el ensayo enzimático directo en el lisado de fibroblastos y en el ensayo del lisado de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro sean comparables entre sí, se calculó un factor de dilución (FD). Este factor de dilución se obtuvo mediante la razón del volumen total de extracto utilizado en el ensayo directo del lisado de fibroblastos (10 μL) y el volumen de extracto real utilizado en el ensayo en papel filtro (0,86 μL). Este último valor, se obtuvo considerando el volumen de siembra de 10 μL , y la generación de una gota con un área calculada de 93,31 mm^2 , de la cual, al extraer un disco de 3,2 mm de diámetro, con un área calculada de 8,04 mm^2 , el volumen real de extracto utilizado es de 0,86 μL . La actividad de beta-galactosidasa de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro se expresó en nanomoles de 4-MU generados en 1 hora por miligramo de proteína ($\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

III.- EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y DEL TIEMPO DE ALMACENAJE SOBRE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA EN MUESTRAS DE LISADOS DE FIBROBLASTOS DISPUESTOS SOBRE PAPEL FILTRO.

III.1.- Influencia del tiempo y la temperatura de almacenaje de los lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro en la actividad de beta-galactosidasa.

Para la evaluación de la influencia del tiempo y la temperatura de almacenaje en la actividad de beta-galactosidasa se preparó suficientes muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro en gotas independientes de 10 μL secadas por 60 minutos a temperatura ambiente y en una superficie no absorbente. Se determinó la actividad enzimática al día 0 de almacenaje, en triplicado y utilizando como blanco un disco de

papel filtro sin extracto. Posterior a esto, las muestras fueron introducidas en bolsas plásticas selladas, con unidades desecantes en su interior para su almacenaje a 4 temperaturas distintas: -70°C (Congelador: Ilshin Freezer, WhisperFreeze), 4°C (Refrigerador: Brouwer, con control de temperatura), 22°C (área del laboratorio con temperatura controlada) y 37°C (Estufa de cultivo: Orthmann, con control de temperatura). A los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenaje se retiró una muestra de papel filtro (conteniendo cada una 4 gotas de $10\ \mu\text{L}$ del lisado) de las temperaturas en estudio para realización de ensayo enzimático en triplicado y utilizando papel filtro sin extracto como blanco de muestra (Figura 17).

El valor de actividad enzimática obtenido al día 0 fue de $232,1 \pm 34,2\ \text{nmol 4-MU} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. Este valor fue considerado como el valor basal de actividad para la evaluación de la estabilidad de la actividad de la enzima beta-galactosidasa dispuesta en papel filtro, tras ser sometida a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje. En la evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática en los lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro mantenidos a una temperatura de almacenaje de -70°C , se observó que se mantiene la actividad enzimática hasta el día 21 de almacenaje. Al día 28 hubo una disminución de la actividad enzimática (ANOVA una vía $p < 0,05$) respecto a la actividad basal (Día 0) (Figura 17). Llevado a unidades de actividad enzimática, la disminución observada entre el día 0 y el día 28 de fue de $65,8\ \text{nmol 4-MU} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, correspondiente a un 28,3% de la actividad enzimática basal.

Al evaluar la estabilidad de la actividad de la beta-galactosidasa en lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro que fueron mantenidos a 4°C , se observó que la actividad enzimática se mantiene estable durante la totalidad del tiempo de almacenaje estudiado (ANOVA una vía; $p > 0,05$), es decir hasta el día 28 (Figura 17).

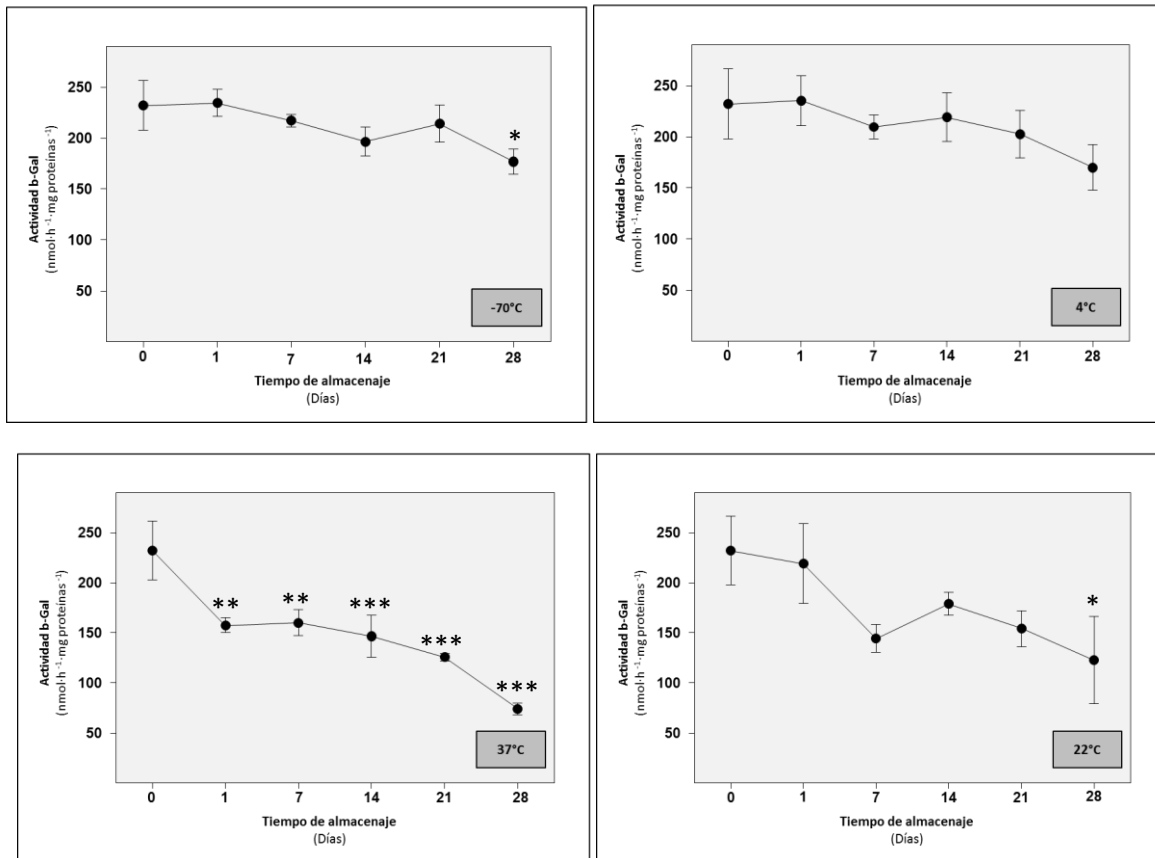


Figura 17. Efecto del tiempo y la temperatura de almacenaje en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro. Cada tiempo ensayado en triplicado para 4 gotas de 10 μ L. ANOVA de una vía; pos hoc Bonferroni. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, respecto al nivel basal (Día 0).

En el caso de las muestras almacenadas a 22°C, se encontró que la actividad de la enzima se mantuvo estable hasta el día 21, observándose una disminución significativa estadísticamente al día 28 de almacenaje (ANOVA de una vía; $p < 0,05$) (Figura 17). En términos de unidades de actividad enzimática, la disminución observada entre el día 0 y el día 28 de fue de $109,2 \text{ nmol } 4\text{-MU} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$, correspondiente a un 47,0% de la actividad de beta-galactosidasa basal.

Al realizar el análisis de la actividad enzimática obtenida a partir de las muestras almacenadas a 37°C, se observó diferencias significativas a partir del día 1 de almacenaje

con respecto al día 0 ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (Figura 17). La disminución del valor de la actividad enzimática entre el día 0 y el día 28 de almacenaje fue de $157,8 \text{ nmol 4-MU} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, correspondiente al 67,9% de la actividad enzimática basal.

III.2.- Influencia de los ciclos de re-almacenaje de los lisados de fibroblastos dispuestos en papel filtro en la actividad enzimática de beta-galactosidasa.

Las muestras utilizadas en el ensayo de evaluación del efecto de la temperatura fueron retiradas de sus condiciones de almacenaje original cada 7 días (7 días = 1 ciclo), para ser sometidas a ensayo enzimático. La totalidad de los análisis se realizó en triplicado y utilizando como blanco de reacción un disco de papel filtro sin extracto. La figura 23, muestra el comportamiento de los niveles de actividad enzimática de beta-galactosidasa de muestras que fueron retiradas para ensayo enzimático desde sus condiciones de almacenaje al día 1, correspondiendo al nivel basal en el gráfico. De esta forma, el ciclo 1, 2, 3 y 4 corresponden a ensayos realizados a las mismas muestras, los días 7, 14, 21 y 28 de almacenaje respectivamente.

Se observó que las actividades enzimáticas de las muestras almacenadas a -70°C y a 4°C mantienen su estabilidad durante los ciclos 1 y 2 de re-almacenaje, comparado con el basal (día 1) (ANOVA de una vía; NS). Sin embargo, durante los ciclos 3 y 4 de re-almacenaje a ambas temperaturas, hubo diferencia respecto al día 1 (Figura 18) (ANOVA de una vía; $p < 0,05$ y $p < 0,001$). Al comparar las actividades obtenidas entre el nivel basal y los ciclos de re-almacenaje en las muestras mantenidas a 22°C , se observó diferencias en la totalidad de los ciclos de re-almacenaje estudiados respecto al día 1 (Figura 18) (ANOVA una vía; $p < 0,01$ y $p < 0,001$). En el caso de las muestras mantenidas a 37°C se observó diferencia estadísticamente significativa solo entre las actividades obtenidas para los ciclos 3 y 4 respecto al nivel basal (Figura 18) (ANOVA una vía; $p < 0,001$), debido a la importante pérdida de actividad observada al día 1 de almacenaje (nivel basal).

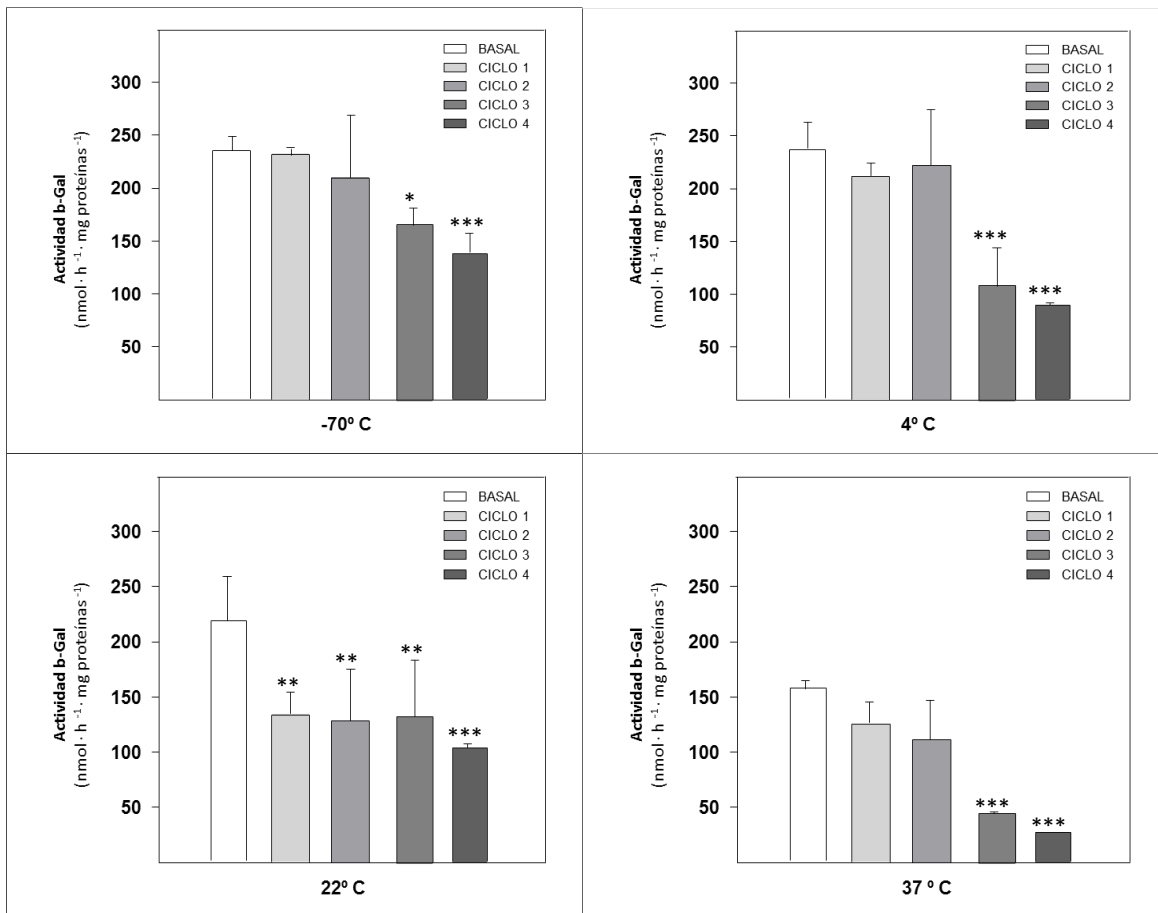


Figura 18. Efecto de los ciclos de re-almacenaje en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro. Cada tiempo ensayado en triplicado a partir 4 gotas de 10 μ L. ANOVA de una vía; pos hoc Bonferroni. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, respecto al nivel basal correspondiente.

DISCUSION

La primera parte del presente estudio logró demostrar que la determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa en lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro mediante la técnica de Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾, con las modificaciones descritas para su realización en este tipo de soporte, es posible de realizar. Sin embargo, se deben tener ciertas consideraciones. En primer lugar, toda determinación debe ser realizada al menos en triplicado, esto debido a los altos valores de desviación estándar intra-ensayo observado en algunas determinaciones. En segundo lugar, es primordial utilizar un blanco de muestra, que corresponde a un disco de papel filtro sin extracto, para eliminar el efecto matriz del papel filtro.

A partir de los resultados obtenidos tras la evaluación de la variación de la actividad enzimática de los lisados de fibroblastos depositados sobre papel filtro y sometidos a distintas condiciones de temperatura y de tiempo de almacenaje, se pudo observar que las muestras almacenadas a 4°C muestran una mayor estabilidad respecto al resto de las temperaturas evaluadas, por lo que se puede establecer que la temperatura de almacenaje de elección para este tipo de muestras es a 4°C, tal como se ha reportado para el almacenaje de muestras de sangre seca en el mismo soporte para el estudio de varias enzimas lisosomales ^(32, 33) y otros metabolitos ⁽³⁴⁾.

En contraste, como era de esperar, las muestras mantenidas a 37°C muestran una importante disminución de la actividad enzimática. En un estudio de estabilidad realizado en gotas de sangre seca dispuestas sobre papel filtro ⁽³⁵⁾, se demostró que cuando estas son almacenadas a 37°C se acelera el proceso de degradación de varios metabolitos y enzimas de interés para el estudio de errores innatos del metabolismo.

Sin embargo, en el presente estudio no se pudo establecer hasta que tiempo de almacenaje se mantiene la actividad de la enzima, para lo cual se debiera realizar el ensayo de actividad enzimática para tiempos más prolongados de almacenaje a 4°C, de manera poder de establecer un tiempo límite para la realización de los ensayos enzimáticos. Por otro lado, en este estudio no fue evaluada la temperatura de almacenaje a -20°C, la cual corresponde a una temperatura común de almacenaje de muestras en los laboratorios.

En el caso de los ciclos de re-almacenaje, las muestras almacenadas a -70°C y 4°C muestran mantención de la actividad enzimática durante los ciclos 1 y 2 de re-almacenaje, perdiendo esta característica en los ciclos 3 y 4. Lo mismo no ocurrió en el caso de las muestras almacenadas a 22°C, en donde la pérdida de la estabilidad enzimática se produjo desde el ciclo 1 de re-almacenaje. En el caso de las muestras almacenadas a 37°C, al día 1 de almacenaje ya se observó pérdida de la actividad enzimática, lo que indica para este caso, que el estudio a esta temperatura de re-almacenaje no es recomendable para estudios clínicos, debida a la pérdida de sensibilidad del ensayo. Esta información es de utilidad cuando es necesario re-analizar las muestras para el estudio de otras enzimas lisosomales, suponiendo que poseen una estabilidad similar a la enzima estudiada bajo las mismas condiciones de almacenaje.

Por otra parte, a través de este estudio, se demostró mediante dos ensayos que la utilización de fibroblastos obtenidos a partir de la línea celular 3T3-L1 es útil para el estudio enzimático y es consistente con los valores obtenidos bajo la metodología descrita por Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾ para la determinación de la actividad de la enzima en fibroblastos humanos. Tanto la curva temporal de beta-galactosidasa como la determinación del pH óptimo de incubación para la enzima beta-galactosidasa indicaron que las condiciones óptimas para el ensayo enzimático en lisados de la línea celular 3T3-L1 son idénticas a las establecidas para fibroblastos humanos. Esto es significativo en el ámbito del estudio de enzimas lisosomales, ya que *a priori* se podría establecer la línea celular 3T3-L1 como un

modelo celular adecuado para la evaluación de varias otras enzimas implicadas en el metabolismo lisosomal, considerando además que este tipo de línea celular posee ciertas ventajas tales como: estar disponibles comercialmente, ser de rápida proliferación y de fácil manipulación. Por otro lado, se podría prescindir del uso de fibroblastos humanos obtenidos desde biopsias de piel, evitando de esta forma todo lo que conlleva la realización de estudios sobre muestras humanas.

A pesar de que los resultados obtenidos indican que la actividad de la enzima beta-galactosidasa mantiene su estabilidad bajo las condiciones descritas en este estudio, para considerar el presente método de análisis enzimático como una herramienta de diagnóstico útil de Gangliosidosis tipo GM1, es necesario satisfacer otros requisitos. Se requiere realizar a futuro un estudio de caso-control con muestras de fibroblastos de piel depositados en papel filtro provenientes de pacientes con diagnóstico de Gangliosidosis tipo GM1 y pacientes sin la patología, con el objetivo de evaluar si el ensayo enzimático del lisado de fibroblastos humanos depositados en papel filtro logra discriminar de manera eficiente la deficiencia enzimática de beta-galactosidasa respecto a los pacientes sin la patología. Por otro lado, se deberá evaluar si otras enzimas implicadas en el metabolismo lisosomal, cuyo ensayo diagnóstico es realizado hoy en día en muestras de fibroblastos de piel, muestran una característica similar en cuanto a su estabilidad en este tipo de soporte. Esto permitiría establecer este método de análisis enzimático como una nueva alternativa de diagnóstico para las Enfermedades de Depósito Lisosomal.

En la figura 19, se muestra la propuesta del procedimiento a realizar para la determinación de la enzima lisosomal beta-galactosidasa en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.

Debido a que en la actualidad no se conocen estudios en esta línea, el presente trabajo corresponde a una primera aproximación del análisis de enzimas lisosomales a partir de muestras de fibroblastos lisados y dispuestos en papel filtro Whatman 903,

aportando bases técnicas para su aplicación en otras enzimas del metabolismo lisosomal y demostrando de esta forma, que el acceso al diagnóstico confirmatorio de Enfermedades de Depósito Lisosomal de un mayor número de pacientes y a un menor costo, es factible.

**ANALISIS DE MUESTRAS DE LISADOS DE FIBROBLASTOS DISPUESTOS EN PAPEL FILTRO PARA
DETERMINACION DE LA ENZIMA LISOSOMAL BETA-GALACTOSIDASA**

1. Preparación de la muestra

- a. Obtención de cultivo de fibroblastos a partir de biopsia de piel.
 - i. Obtener aproximadamente un 80% de confluencia celular.
 - ii. Resuspender extracto celular en 200 μ L de suero fisiológico.
- b. Lisis celular.
 - i. Sonicación del extracto celular en baño ultrasónico o sonicador de vástago (pp. 18-19).
- c. Determinación de concentración de proteínas al lisado obtenido.
 - i. Cuantificación de proteínas mediante método de Lowry (pp. 12-13).
- d. Disposición del lisado en papel filtro Whatman 903.
 - i. Disponer con una micropipeta volúmenes de 10 μ L, en forma de gotas independientes.
 - ii. Marcar suavemente perímetro de la gota.
 - iii. Secar por 60 minutos a temperatura ambiente, en superficie plana no absorbente.

2. Almacenaje y transporte (*En los casos en que la muestra no sea procesada de forma inmediata*).

- a. Almacenaje.
 - i. Disponer muestras en bolsas plásticas y con unidades desecantes.
 - ii. Almacenar a 4°C hasta 28 días.
- b. Envío a laboratorio de diagnóstico.
 - i. Disponer en bolsas plásticas y con unidades desecantes.
 - ii. Enviar a temperatura ambiente en un rango de tiempo no mayor a 7 días.
 - iii. Realización del ensayo enzimático o de lo contrario almacenar a 4°C hasta 21 días.

3. Ensayo enzimático.

- a. Retirar bolsas plásticas con muestras desde lugar de almacenamiento.
- b. Mantener 30 minutos a temperatura ambiente.

- c. Obtener 3 discos de 3,2 mm de diámetro desde una única gota de 10 μ L de fibroblastos lisados.
- d. Obtener 1 disco de 3,2 mm de diámetro de papel filtro sin extracto para blanco.
- e. Disponer discos en pocillos de la micro-placa.
- f. Ensayo enzimático para determinación de beta-galactosidasa, método de Suzuki y cols. modificado (pp. 14 – 16).

Figura 19. Propuesta para la determinación de la enzima lisosomal beta-galactosidasa en fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que:

- 1.- La determinación de la actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa mediante el método de Suzuki y cols. ⁽³⁰⁾ para análisis directo del lisado de fibroblastos humanos, es un método reproducible y aplicable en fibroblastos provenientes de la línea celular 3T3-L1 utilizada en este estudio. Las condiciones óptimas de pH y tiempo de incubación descritas para la enzima beta-galactosidasa, fueron comprobadas experimentalmente en este estudio.
- 2.- La lisis celular mediante un sonicador de baño Ultrasónico (Elmasonic S10), demostró ser válido en comparación con el método de referencia para la determinación de la enzima en estudio.
- 3.- La disposición de 10 μ L del lisado de fibroblastos sobre papel filtro, demostró ser el volumen de sembrado adecuado para la realización de los análisis enzimáticos en este tipo de soporte.
- 4.- La determinación de la actividad enzimática de beta-galactosidasa en lisados de fibroblastos dispuestos sobre papel filtro mediante el método de Suzuki y cols. ⁽⁹⁾ modificado, mostró una sensibilidad comparable con el ensayo enzimático directo en fibroblastos lisados.
- 5.- La actividad enzimática de beta-galactosidasa en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro es estable hasta al menos 28 días cuando es almacenada a 4°C, y hasta los 21 días si son almacenadas a -70°C ó 22°C en bolsas plásticas y con unidades desecantes. Las muestras mantenidas a 37°C no preservan la actividad de la enzima.

6.- La actividad enzimática de beta-galactosidasa en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro se mantiene, cuando las muestras son sometidas a 2 ciclos de re-almacenamiento (7 días cada uno), a 4° C y a -70° C, en bolsas plásticas y con unidades desecantes.

REFERENCIAS

1. Guthrie, R., Susi, A. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32: 338–343 (1963).
2. Mei, J., Richard A., Adam, B., Band, Hannon, H. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. Division of Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. GA 30341:1631S-1636S (2001).
3. Boerma, J.T., Holt E., Black, R. Measurement of Biomarkers in Surveys in Developing Countries: Opportunities and Problems. *Population and Development Review*, 27: 303–314 (2001).
4. Solomon, S., Rodgiguez, I., McGarvey, S., Ganesh, A., Thyagarajan, S., Mahajan, A., Mayer, K. Dried Blood Spots (DBS): A Valuable Tool for HIV Surveillance in Developing/Tropical Countries. *International Journal of STD & AIDS*, 13: 25–28 (2002).
5. Worthman, C., Stallings, J. Hormone Measures in Finger-Prick Blood Spot Samples: New Field Methods for Reproductive Endocrinology. *American Journal of Physical Anthropology*, 104: 1–22 (1997).
6. Hannon, W. H., Boyle, J., Davin, B., Marsden, A., McCabe, E. R. B., Schwartz, M., Scholl, G., Therrell, B. L., Wolfson, M. & Yoder, F. Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Programs, 3er edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards Document A4A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA (1997).

7. McDade, T., Stallings, J., Angold, A., Costello, E., Burleson, M., Cacioppo, J., Glaser, R., Worthman, C. Epstein-Barr Virus Antibodies in Whole Blood Spots: A Minimally-Invasive Method for Assessing an Aspect of Cell-Mediated Immunity. *Psychosomatic Medicine*, 62: 560–567 (2000).
8. McDade, T., Burhop, J., Dohnal, J. High Sensitivity Enzyme Immunoassay for C-Reactive Protein in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*, 50: 652–654 (2004).
9. Galjaard H. Genetic Metabolic Diseases. Early Diagnosis and Prenatal Analysis. *Human Genetics*, 33: 319-321 (1981).
10. Hopwood, J., Morris, C. The mucopolysaccharidoses: Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Molecular biology and medicine*, 7: 381-404 (1990).
11. Imarzuki, M., Gushi, K., Kriwit, W. Long term effects of bone marrow transplantation for inborn errors of metabolism a study of four patients with lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica*, 36: 30-33 (1994).
12. Caridad, M., Zaldívar, C., Gonzalez-Quevedo, A. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. Instituto de Neurología y Neurocirugía. *Revista Cubana de Pediatría*. Versión On-line ISSN 1561-3119. Ciudad de la Habana (2002).
13. Duve, Ch., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. Tissue fraction studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochemical Journal*, 60: 604-617 (1995).
14. Hers, H. Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochemical Journal*, 86: 11-16 (1963).

15. Reuser, A., Poretz, R., Kross, M., Visser, W., Willemsen R. Lysosomal storage diseases: celular pathology, clinical and genetic heterogenelly therapy. *Annales de Biologie Clinique*, 52: 721-728 (1994).
16. Furst, W., Sandhoff, K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipids catabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126: 1-16 (1992).
17. Pisoni, R., Theone, J. The transport system of mammalian lysosome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1071: 351-373 (1991).
18. Chabás, A., Coll, M., Malalties lisosómiques. *Del Cromosoma al Gen. Libro conmemorativo de los 25 años del Instituto de Bioquímica Clínica. Corporación Sanitaria*. pp. 317-388 (1995).
19. Harrison, P. A guide to skin biopsy excisions. *Clinical and Experimental Dermatology*, 5: 235-243 (1980).
20. Michelin, K., Wajner, A., Goulart, L., Fachel, A., Pereira, M.L. Biochemical study on β -glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clinica Chimica Acta*, 343: 145–153 (2004).
21. Colombo, C., Cornejo, V., Raimann, C. *Errores Innatos en el Metabolismo del Niño. Tercera Edición. Editorial Universitaria*. pp. 264-266 (2010).
22. Brunetti-Pierri, N., Scaglia, F. GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94: 391–396 (2008).
23. Suzuki, Y., Nakamura, N., Fukuoka, K. GM1-gangliosidosis: accumulation of ganglioside GM1 in cultured skin fibroblasts and correlation with clinical types. *Human Genetics*, 43: 127–131 (1978).

24. Folberg, A., Giugliani, R. Study of fibroblast and leucocyte beta-galactosidase activity in a family with multiple cases of GM1 Gangliosidosis. *Rev. Brasil Genetics*, 15,3: 675-686 (1992).
25. Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4: 140-143 (1907).
26. Freshney, R. *Culture en animal cells*. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 295 (1983).
27. Smith, N. *Histopathology of the skin – general principles*. Texto de Dermatología (Champion, R.H., Burton, J. and Ebling, F.J.G., eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 171-179 (1992).
28. Coelho, J., Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 269-271 (2000).
29. Cooper, G. *The cell. A molecular approach*. Oxford University press. ASM press. Washington, USA. pp. 28 (1996).
30. Suzuki, K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. Glew, R. H. Peters. *Practical enzymology of the sphingolipidoses*. New York. Alan R. Liss. pp. 101-136 (1977).
31. Lowry, O., Rosebrouch, N. Farr, A., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193: 265-275 (1951).
32. Civallero, G., Michelina, K., De Mari, J., Viapiana M., Burin, M., Coelho, J., Giugliani, R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of

patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, 372: 98–102 (2006).

33. Camelier, M., Burin, M., De Mari, J., Vieira, T., Marasca, G., Giugliani, R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clinica Chimica Acta*, 412: 1805-1808 (2011).
34. McDade, T., Williams, S., Snodgrass, J. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 44: 899-925 (2007).
35. Adam, B., Hall, E., Stemberg, M., Lim, T., Flores, S., O'Brien, S., Simms, D., Li, L., De Jesus, V., Hannon, W. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders en the United States. *Clinical Biochemistry*, 44: 1445-1450 (2011).