

## Enzimas lisosomales en células F. P.

MA. E. LEFRÁN Y P. LÓPEZ SAURA

*Dpto. de Patobioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
Ciudad de la Habana, Cuba*

*Recibido 1º de diciembre de 1979*

**ABSTRACT.** The results obtained in the characterization of six activities of acid hydrolases and 5' nucleotidase in cells F. P. (skin fibroblast) homogenates are presented. The kinetic parameters, enzyme concentration, substrate concentration and optimal pH for each are described.

**RESUMEN.** Se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de 6 actividades de hidrolasas ácidas y de la actividad de 5' nucleotidasa en homogeneizados de células F. P. (fibroblastos de piel). Se describen los parámetros cinéticos, concentración de enzimas, concentración de sustratos y pH óptimos para cada una de ellas.

### INTRODUCCION

Las células en cultivo constituyen un modelo experimental simple para estudios de la bioquímica y la biología celulares. Han sido caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y del fraccionamiento celular, las células F. L. (*Rubio, 1975*) y las células HTC (*López Saura, 1978*).

Los estudios bioquímicos en las enfermedades lisosomales se han limitado a la caracterización química de la sustancia que se acumula y a la búsqueda de una deficiencia enzimática. Sólo en el caso de la enfermedad de células I (*Neufeld, 1974*), se han hecho estudios de los mecanismos celulares en las células alteradas.

Los fibroblastos de piel han sido utilizados en el diagnóstico de enfermedades lisosomales (*Reuser y cols., 1976*).

En algunos estudios se han reportado la corrección de defectos metabólicos por administración de preparaciones enzimáticas a fibroblastos en cultivo (*Kresse y Neufeld, 1972* y *Von Figura Kresse, 1972*).

Nosotros hemos emprendido el trabajo de caracterización bioquímica de una línea de fibroblastos de piel humanos (células FP) con el objetivo de utilizarlos como control en estudios sobre mecanismos de la fisiología celular en las enfermedades de acumulación, así como para el diagnóstico de este tipo de alteraciones.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de 6 actividades de hidrolasas ácidas y la actividad de 5' nucleotidasa en homogeneizado de células F.P.

### MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron células F. P. suministradas por el Lab. de Cultivo de Tejidos del CENIC, sembradas en medio Eagle Basal, suplementadas con un 10% de suero de ternero.

Después de 3 a 5 días, cuando la monocapa estuvo completa se desprendieron por tripsinización y se lavaron con PBS centrifugando 10 minutos a 1000 rpm para eliminar los restos de tripsina.

El sedimento celular obtenido después de los lavados se resuspendió en H<sub>2</sub>O bidestilada y se conservó en frío.

*Determinaciones enzimáticas.* Para la determinación de fosfatasa ácida se utilizó como sustrato  $\beta$ -glicerofosfato de sodio 50 mM.

Después de detener la reacción con ácido tricloro acético al 15% se midió al fósforo liberado según la técnica de Fiske-Subarrow (1925).

La N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa se determinó usando como sustrato el p-nitrofenil 2 acetamido 2 deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosido 4 mM y para la  $\beta$ -galactosidasa se utilizó el paranitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido 5 mM. En ambos casos la reacción se detuvo con tampón glicina 0,4 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25 M, NaCl 0,2 M, pH 10,7 y se midió el para-nitro-fenol liberado por su absorción a 400 nM.

La  $\alpha$ -glucosaminidasa se determinó utilizando como sustrato el 4 metil-umbeliferil-  $\alpha$ -D-glucopiranosido 2,08 mM y la  $\alpha$ -manosidasa con el 4 metil-umbeliferil-  $\alpha$ -D-manopiranosido 2,97 mM. En los dos casos la reacción se detuvo con el mismo tampón glicina señalado anteriormente y se midió la cantidad de metil-umbeliferona liberada en un fluorímetro Locate con una longitud de onda de excitación de 365 nM y una de emisión de 460 nM.

La actividad de Catepsina D se determinó utilizando hemoglobina bovina al 1,58%. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5% frío y se midieron los péptidos ácido solubles liberados por el método de Lowry y cols. (1951).

La 5' nucleotidasa se determinó usando 5'AMP 5 mM y  $Cl_2Mg$  28 mM. Después de detener la reacción con ácido tricloroacético al 5% se midió el fósforo liberado por el método de Fiske-Subarrow (1925).

En todas las determinaciones anteriores se utilizaron los pH óptimos obtenidos, todas las incubaciones se realizaron a 37°C y en todos los casos se incluyó en la incubación tritón x-100 al 0,2%, excepto en la 5'nucleotidasa.

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry y cols., (1951).

## RESULTADOS

En la Tabla I se observan las actividades obtenidas para las hidrolasas lisosomales.

TABLA I

*Actividades enzimáticas para las hidrolasas ácidas (expresadas en mU/mg proteínas*

	N	Actividad
Fosfatasa ácida	5	18,6 ( 3,04)*
Na $\beta$ -gasa	6	20,92 ( 7,42)
$\beta$ -galactosidasa	6	8,32 ( 0,716)
$\alpha$ -glucosidasa	4	3,5 ( 0,8)
Catepsina-D	5	69,3 (16,5)
$\alpha$ -manosidasa	6	31,2 ( 6,1)

\* entre paréntesis las D. S. obtenidas.

En la Tabla II se observan las actividades obtenidas a pH 5,2 y 6,6 para la 5'nucleotidasa. La actividad a pH 5,2 resultó inhibida en mayor proporción que la actividad a pH 6,6.

En la Fig. 1 se unen las curvas de pH obtenidas para las distintas hidrolasas.

En la Fig. 2 se aprecia la curva de pH de la 5'nucleotidasa donde se muestran dos picos de actividad, uno a pH 5,2 y otro a 6,6.

En la Fig. 3 se observan las curvas de concentración de sustrato, presentando todas las cinéticas michaelianas.

En la Fig. 4 se aprecia que en todos los casos la actividad fue lineal con la concentración de enzimas con el tiempo.

## DISCUSION

Las seis actividades de hidrolasas ácidas que se ensayaron fueron encontradas en este sistema celular. Presentaron características de pH óptimos similares a las encontradas en otras células humanas (*Rubio, 1975*).

Resulta interesante el hecho de que se hayan obtenido dos máximos de actividad de 5'nucleotidasa. El máximo a pH 5,2 podría deberse a la acción de fosfatasa ácida inespecífica sobre el 5'AMP, mientras el máximo a pH neutro pudiera ser la verdadera 5'nucleotidasa. Para probar esta hipótesis se hizo la experiencia de incluir tartrato de sodio 40 mM en el medio de incubación enzimática, ya que se ha reportado que esta sustancia inhibe la actividad de fosfatasa ácida y no la 5'nucleotidasa (*López Saura, 1973*).

El resultado mostrado en la Tabla II va a favor de esta suposición, sin embargo, queda una actividad a pH 5,2 no inhibida por tartrato y en una proporción demasiado grande para que sea la actividad de 5'nucleotidasa residual a ese pH, por lo que pensamos que existe otro factor involucrado no inhibible por tartrato en la hidrólisis del 5'AMP lo cual debe ser aclarado en estudios futuros de fraccionamiento celular.

TABLA II

*Actividad y % de inhibición con tartrato 40 mM de la 5'nucleotidasa  
(expresada en mU/mg de proteínas)*

pH	Sin tartrato	Con tartrato	% inhibición
5,2	0,78	0,44	43,6
6,6	0,84	0,68	19,9

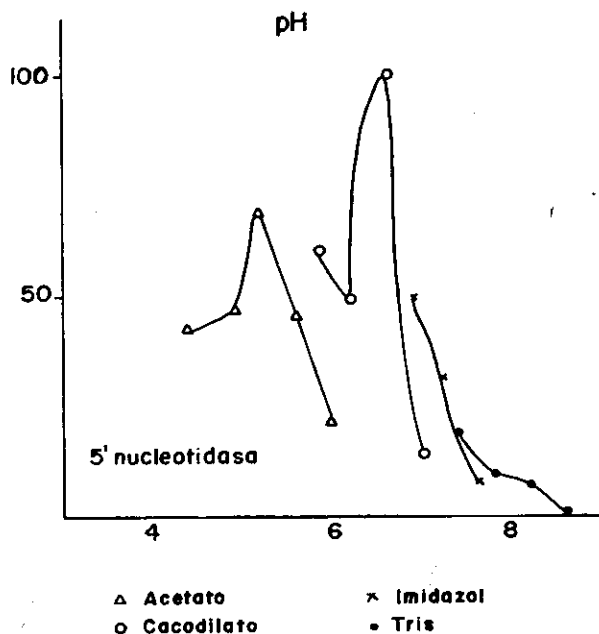


Fig. 2.

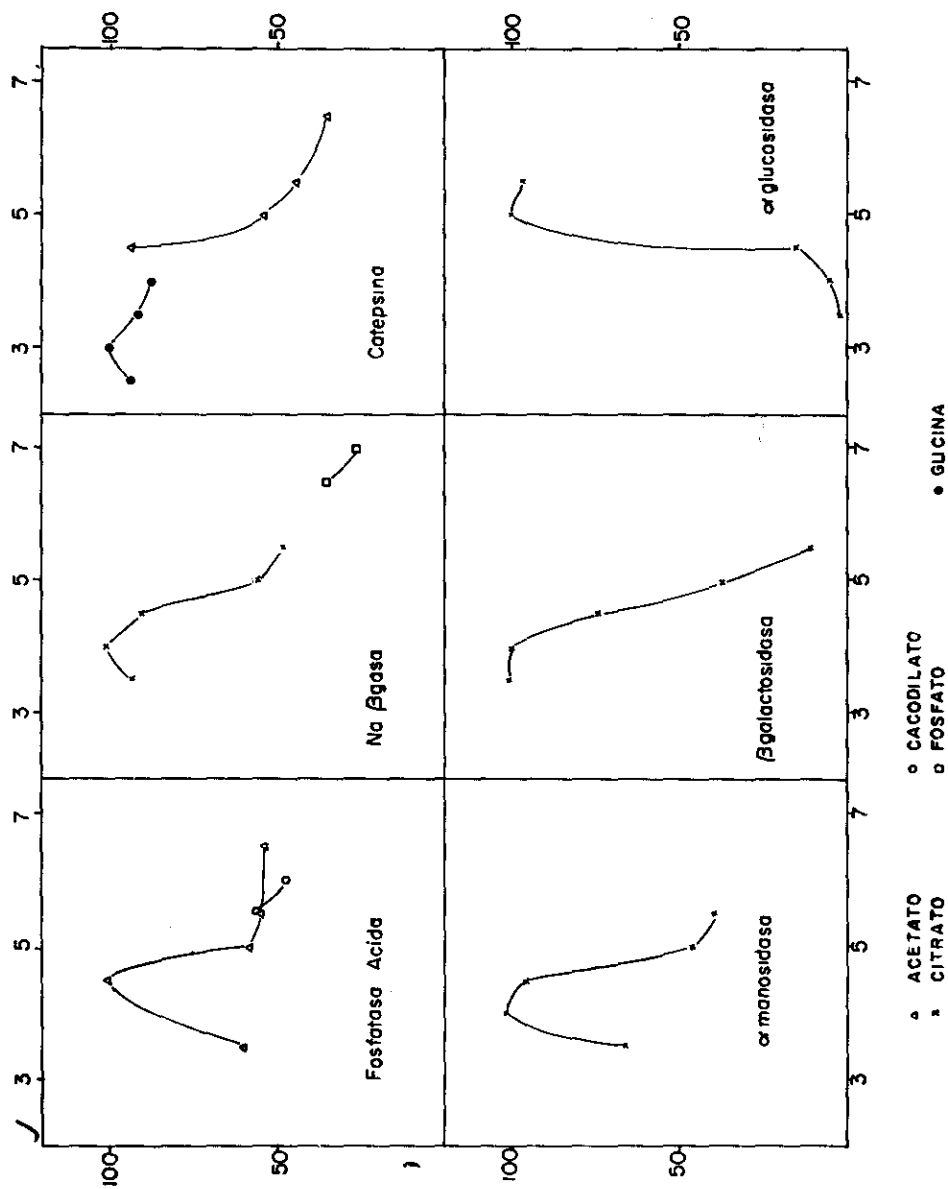


Fig. 1.

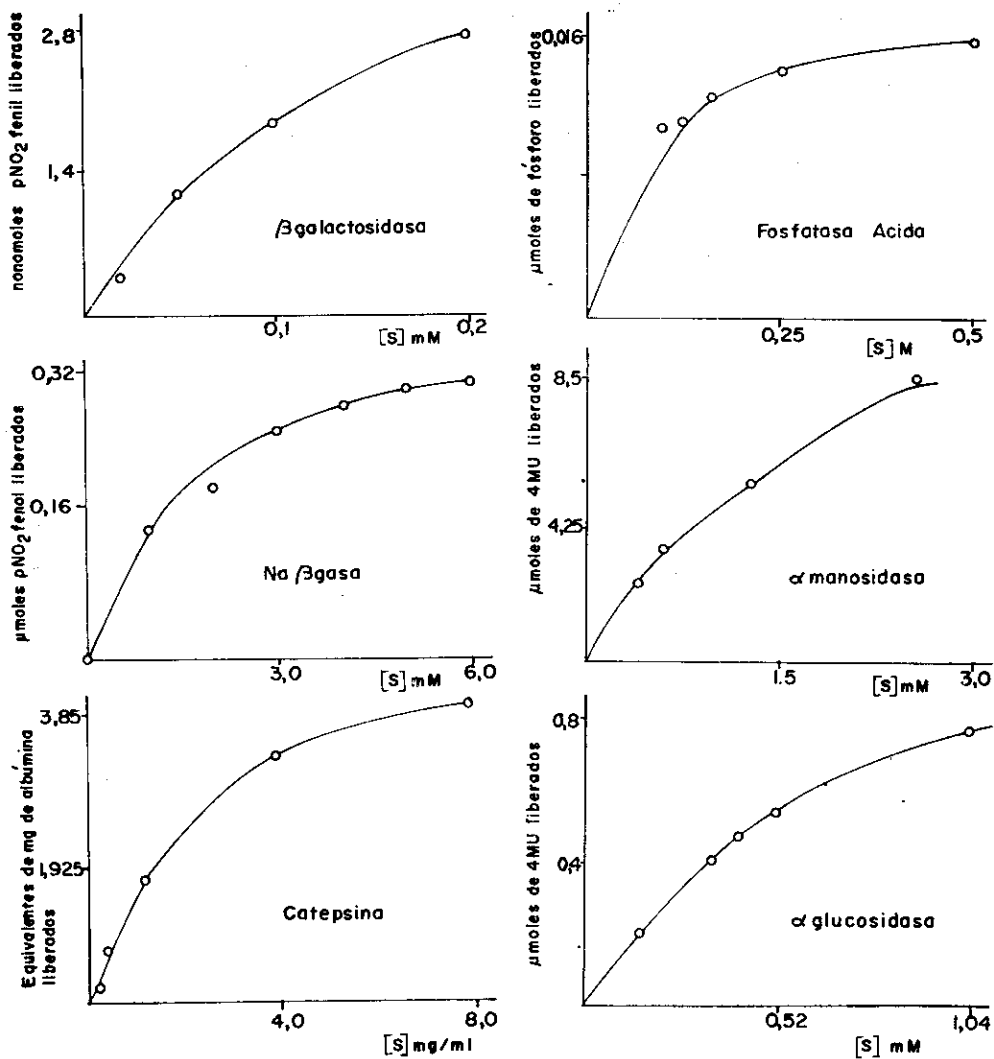


Fig. 3.

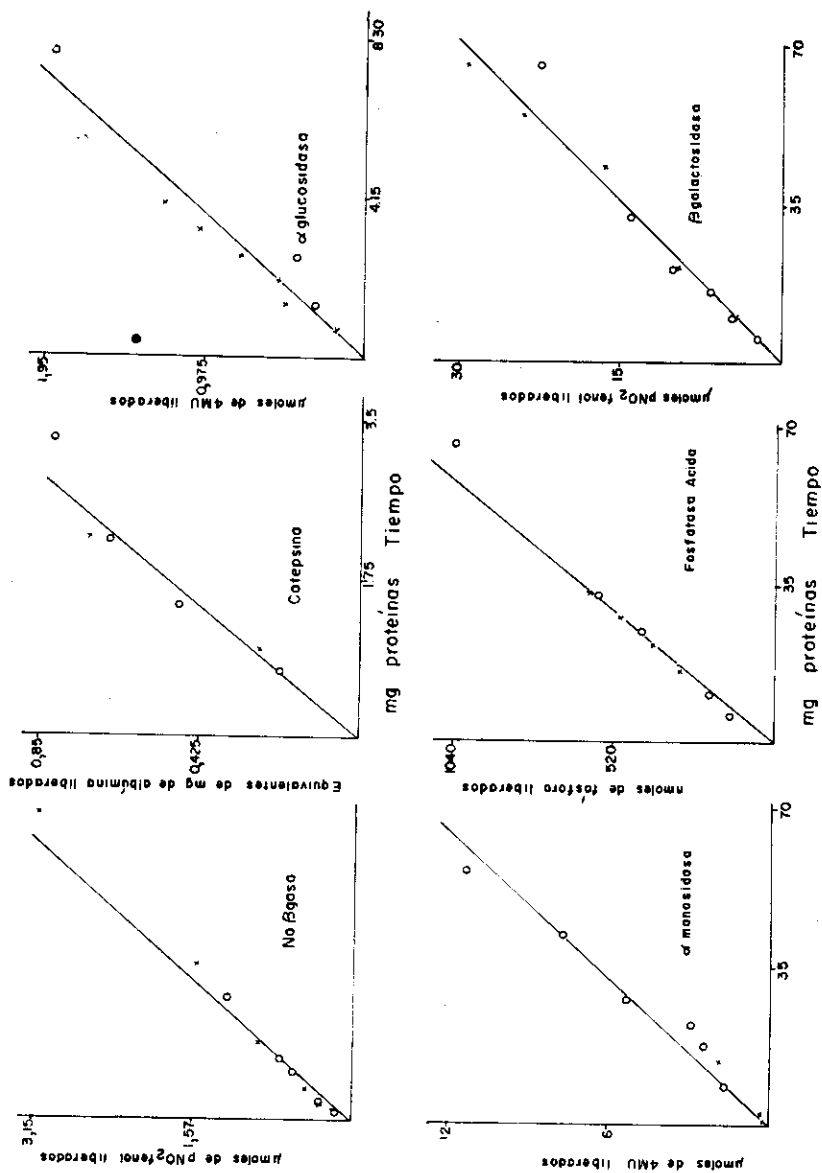


Fig. 4.

## REFERENCIAS

- FISKE C. H. AND SUBARROW Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925.
- KRESSE H. AND NEUFELD E. F. The sanfilippo a corrective factor. Purification and mode of action. *J. Biol. Chem.* 247, 2164, 1972.
- LOWRY D. H., ROSENBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- LÓPEZ SAURA P. Tesis de especialidad CENIC 1973.
- LÓPEZ SAURA. P. TROQUET A. AND TULKENS P. Analytical fractionation of cultured hepatoma cells. (HTC cells). *Broch. Bioph. Acta* 543, 430, 1978.
- NEUFELD E. F. The biochemical basis for muco polysaccharideses and mucolipidoses en Progress in Medical Genetics. Vol. X. Steinberg and Bearn. Eds. 81-101. Grune and Stratton. Inc. 1974.
- REUSER A., HALLEY D. AND DE WIT E. HOOGVEEN VAN DER KAMP M. MULDER M. GALJAARD H. Intracellular exchange of lysosomal enzymes: enzymes assays in single human fibroblast after co-cultivation. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 69, 311, 1976.
- RUBIO BERNAL E. Tesis de Especialidad CENIC, 1975.
- VON FIGURA K. AND KRESSE H. The Sanfilippo B. corrective factor and N-acetyl-alfa-glucosaminidase. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 98, 262, 1972.