

ARTÍCULOS ORIGINALES

Actividades catalíticas β -galactosidasa en suero

L. Gómez-Chacón, P. Coma, B. García, E. Fernández, M.A. Ortiz de Apodaca^a

Resumen

El objeto de este trabajo ha sido estudiar la presencia en suero de las actividades catalíticas de la enzima β -galactosidasa ácida y neutra. Para ello se ha realizado una curva de pH y se han aplicado los criterios diferenciales ya establecidos para identificar dichas actividades catalíticas en tejidos humanos: efecto del cloruro, termoestabilidad y efecto de la solución amortiguadora tris. También se ha estudiado la estabilidad de la actividad catalítica en el almacenamiento.

Nuestros resultados sugieren que en suero sólo existe la actividad catalítica β -galactosidasa ácida, que es estable 13 días, conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que una descongelación no afecta a su actividad catalítica.

El intervalo de referencia de la actividad catalítica β -galactosidasa ácida sérica en 40 individuos presuntamente sanos, presenta una actividad catalítica media de 6,4 nKat/L, siendo su intervalo interfractilico 2,5-97,5 de 4,3 nKat/L-8,6 nKat/L, respectivamente.

Summary

The aim of this work was to study the presence of acid and neutral β -galactosidase catalytic activity in serum. The pH effect was studied and also differential criteria were applied which had already been established for the identification of these catalytic activities in human tissues: chloride ions effect, thermal stability, and tris effect. The stability of the catalytic activity during storage was also studied.

These studies suggested that only acid β -galactosidase is found in serum. The enzyme is stable 13 days when kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and unfreezing does not affect this catalytic activity.

The reference interval for the catalytic activity of serum acid β -galactosidase in 40 healthy subjects shows a mean catalytic activity of 6,4 nKat/L. Its interfractile interval 2,5-97,5 was 4,3-8,6 nKat/L, respectively.

Introducción

Trabajos publicados anteriormente evidencian alteraciones de enzimas hidrolasas en diversas enfermedades (1,2,3,4). Se ha iniciado una línea de estudio con el fin de establecer si la determinación en suero de estas enzimas permite la aplicación de criterios diagnósticos en el caso de alteraciones digestivas. La mayoría de estas enzimas, muestra una actividad catalítica heterogénea, con diferentes pH óptimos, por lo que en primer lugar hay que establecer cuál de estas formas existe en el suero y su correspondiente intervalo de referencia. Este trabajo presenta el estudio correspondiente a la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23).

^a Laboratorio de Bioquímica. Hospital Virgen de la Salud.
Recibido: 2-9-91.
Aceptado: 9-9-92.

En el hígado, Ho y O'Brien (5) demostraron la presencia de dos actividades catalíticas β -galactosidasa con diferente comportamiento frente a la concentración de iones cloruro y a la estabilidad térmica: una actividad ácida de pH óptimo 4,3, termolábil que se estimula por el cloruro y otra actividad neutra de pH óptimo 5,8, termoestable y fuertemente inhibida por concentraciones elevadas de cloruro.

Se han aplicado estos criterios diferenciales al suero y además se ha estudiado el efecto del tris, ya que este compuesto es un inhibidor de la mayoría de las actividades catalíticas neutras de las glicosidasas (6,7).

Material y métodos

Reactivos: 4 metilumbeliferil β -galactósido y tris [hidroximetil amino metano], de Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, USA). Los restantes productos empleados fueron de Merck Darmstadt, de calidad analítica.

Determinación de la actividad catalítica β -galactosidasa. La mezcla de incubación contiene 50 μ L de solución amortiguadora y 100 μ L de 1,4 mM 4-metilumbeliferil β -galactósido en un volumen final de 375 μ L. A tiempo cero y tras 60 minutos de incubación a 37 °C se toman 50 μ L del medio de incubación y se añaden a 3 mL de solución amortiguadora carbonato 0,5 mol/L pH=10,6. La metilumbeliferona liberada se mide en un fluorímetro Perkin-Elmer a 360 nm de excitación y 450 nm de emisión y se compara con la fluorescencia de un estándar de 4 metilumbeliferona. Un blanco con las mismas cantidades de solución amortiguadora y sustrato, pero agua en vez de suero se trata de la misma forma, con el fin de corregir cualquier fluorescencia no debida a la hidrólisis enzimática.

La solución amortiguadora usada es citrato-fosfato 0,2 mol/L en el intervalo de pH de 3,6—8,0.

La actividad catalítica ácida se estudia a pH=4,3 y la actividad catalítica neutra a pH=5,8.

El efecto de los iones cloruro (NaCl) se estudia a la concentración de 200 mmol/L en el medio de incubación y el tris a la concentración de 0,1 mol/L en el me-

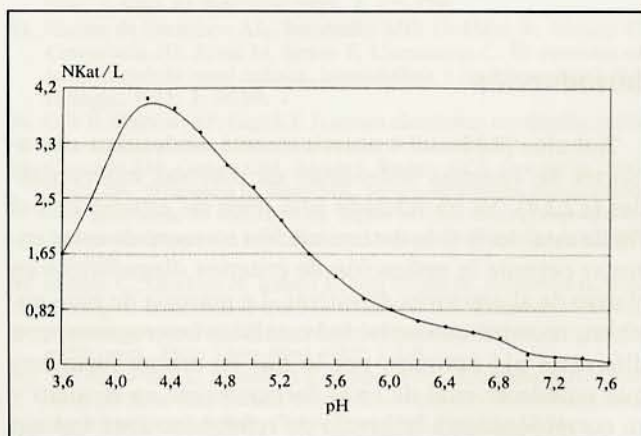


Figura 1. Curva de la actividad enzimática β -galactosidasa en función del pH.

Tabla I
Criterios diferenciales de las actividades catalíticas β -galactosidasa ácida y neutra, estudiadas en suero

	pH 4,3	pH 5,8
Sin aditivos	100	100
Adición tris 0,1 mol/L	88 \pm 11	80 \pm 10
Adición iones cloruro 200 mmol/L	108 \pm 8	110 \pm 8
Calentamientos: 37 °C	38 \pm 5	38 \pm 5
50 °C	0	0

Los resultados se expresan como ($x \pm s$) % de la actividad catalítica residual, tomando 100% como la actividad catalítica en ausencia de tris e iones cloruro

dio de incubación, previamente ajustado al pH del ensayo.

La estabilidad térmica de la actividad catalítica se estudia calentando 50 μ L de suero y 50 μ L de solución amortiguadora fosfato sódico 5 mmol/L, pH=7 a 37 °C y a 50 °C durante 30 minutos (3). Seguidamente se analiza de la manera explicada anteriormente en la determinación de la actividad catalítica β -galactosidasa. La actividad enzimática se expresa en nKat/L. Un katal se define como 1 mol de sustrato transformado por segundo a 37 °C.

Estabilidad de la actividad catalítica β -galactosidasa en suero durante el almacenamiento: Tras la obtención del suero, éste se divide en alícuotas, una de las cuales se analiza inmediatamente. Las restantes se guardan a -20 °C, analizándose en días sucesivos. Se han analizado 10 especímenes séricos diferentes por duplicado. Se compara el valor medio obtenido el primer día, con el de los días sucesivos, mediante la prueba de la *t* de Student para datos apareados.

Intervalo de referencia: El cálculo del intervalo de referencia se realiza con 40 sueros procedentes de donantes de sangre presuntamente sanos, 25 mujeres y 15 hombres, de edades comprendidas entre 20 y 60 años. Tras comprobar que los valores obtenidos se ajustan a una distribución de Gauss (prueba de Kolmogorov-Smirnov), aquellos valores que difieren más de 3 desviaciones estándar de la media se excluyen para dicho cálculo. Para hallar el intervalo de referencia se utiliza el intervalo interfráctilico 2,5-97,5 con los intervalos de confianza del 90 % para cada extremo.

Resultados

En la figura 1 se muestra la curva de la actividad enzimática β -galactosidasa en función del pH. El perfil sugiere una sola actividad enzimática con un óptimo a pH=4,3.

En la tabla I se muestra el efecto de los iones cloruro, tris y temperatura sobre las actividades catalíticas medidas a los pH óptimos de actuación de las actividades ácida y neutra.

Como en dicha tabla puede observarse, es similar el comportamiento de las actividades catalíticas medidas en pH=4,3 y pH=5,8 frente al tris, iones cloruro y temperatura. Los iones cloruro producen una pequeña activación y el tris una inhibición de las actividades catalíticas estudiadas, mientras que el tratamiento por el calor a 37 °C produce una pérdida de actividad catalítica media del 62 % y a 50 °C la inactivación de la enzima (estudio efectuado sobre 10 sueros diferentes).

La actividad catalítica β -galactosidasa ácida en suero almacenado a -20 °C, es estable durante 13 días, pasados los cuales hay una pérdida de la actividad del 7 % en el día número 19 y aproximadamente de 16 % cuando ha transcurrido un mes y medio. Por otra parte, una descongelación del suero, conservado a -20 °C, no afecta a la actividad catalítica β -galactosidasa ácida, pero una segunda descongelación supone una pérdida de un 22-35 % de la misma.

En la tabla II se presentan la media, desviación estándar e intervalo interfráctilico de la actividad catalítica β -galactosidasa ácida, correspondiente a 40 personas sanas, no habiéndose encontrado diferencia significativa con la relación al sexo y edad.

Tabla II
Actividad catalítica β -galactosidasa ácida en suero, procedente de individuos presuntamente sanos

\bar{x}	6,4 nKat/L
S	2,1 nKat/L
Intervalo interfráctilico 2,5	4,3 nKat/L
Intervalo interfráctilico 97,5	8,6 nKat/L

n = 40

Discusión

La finalidad de este trabajo es determinar que tipo de actividad catalítica β -galactosidasa predomina en suero. Para ello, dado que no existe ningún estudio en este aspecto en la literatura, nos hemos basado en los estudios realizados en tejidos para su diferenciación.

Examinando nuestros datos resulta que:

1. La curva de pH sugiere una sola actividad catalítica cuyo pH óptimo de actuación es 4,3.
2. El efecto de los iones cloruro y tris estudiado a los pH óptimos de las actividades β -galactosidasa ácida y neutra, es similar en ambas.
3. La termoestabilidad es idéntica en ambos casos.

El similar comportamiento frente al tris, iones cloruro y calor unido a la curva de pH, sugiere una sola actividad β -galactosidasa en suero, que correspondería a la ácida por su pH óptimo de 4,3 y su activación por los iones cloruro y su termolabilidad.

Es necesario señalar, que con respecto a la estimulación de la actividad catalítica β -galactosidasa ácida por

iones cloruro, nuestros resultados están más de acuerdo con la actividad encontrada por Tanaka y Suzuki (8), entre un 10-30 %, que con la descrita por Ho y O'Brien que es del 180 %. Algo similar sucede con el estudio de la termoestabilidad a 37 °C de la actividad catalítica estudiada. En nuestro caso, existe un fuerte grado de inactivación, alrededor del 62 %, pero no es completa como encuentra Ho y O'Brien (5)

Bibliografía

1. Severini G, Malaguti L, Di Gironalmo M, N-acetyl- β -glucosaminidase isoenzymes in Serum and Urine of Patients with Diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1988; 34: 2430-2432.
2. Reglero A, Carretero MI, Cabezas JA Increased serum α -L flucosidase and β -N-Acetylglucosaminidase activities in diabetic, cirrhotic and gastric cancer patients. *Clin Chim Acta* 1980; 103: 155-158.
3. Cabezas-Delamare MJ, Reglero A, Cabezas JA. Hydrolytic enzyme activities, mainly from lysosomal localization in sera from patients who ingested a toxic oil. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 53-51.
4. Alhaffef JA, Thom D, Holzinger RT. Activity levels and properties of acid glucosidase from liver and neutral α -glucosidase from sera of cystic fibrosis patients and controls. *Clin Chim Acta* 1981; 117: 113-249.
5. Ho MW, O'Brien J.S. Differential effect of Chloride ions on β -galactosidase Isoenzymes: A method for separate assay. *Clin Chim Acta* 1971; 32: 443-450.
6. Kolinska J, Semenza G. Studies on intestinal sucrase and on intestinal sugar transport. V Isolation and properties of sucrase-isomaltose from rabbit small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1967; 146: 181-195.
7. Ortiz Apodaca M.A., Fernández E, De la Fuente G. Un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe, mediante leucocitos polimorfonucleares. VII Congreso de la Sociedad Española de Química Clínica, Benalmádena (Málaga) 1988.
8. Tanaka H, Suzuki K. Lactosylceramide β -galactosidase in Human Sphingolipidoses. *J Biol Chem* 1975; 250: 2324-2332.