

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS MODIFICACIONES AL MÉTODO  
FLUOROMÉTRICO PARA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASA, CON MIRAS A LA FORMULACIÓN DE NUEVOS VALORES  
DE REFERENCIA.**

**DIANA MILENA CAMARGO TORRES**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**BACTERIÓLOGA**

**Bogotá, D.C., Agosto 14 de 2008.**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS MODIFICACIONES AL MÉTODO  
FLUOROMÉTRICO PARA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASA, CON MIRAS A LA FORMULACIÓN DE NUEVOS VALORES  
DE REFERENCIA.**

**DIANA MILENA CAMARGO TORRES**

**APROBADO**

---

**Luis A. Barrera Avellaneda, Ph.D.**  
Instituto de Errores Innatos  
del Metabolismo  
Director

---

**Olga Yaneth Echeverri Peña**  
Bacterióloga,  
Co-directora

---

**Jaime Casas. Q.F. y M. Ed.**  
Jurado

---

**Myriam Saboya, Bacterióloga.**  
Jurado

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS MODIFICACIONES AL MÉTODO  
FLUOROMÉTRICO PARA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASA, CON MIRAS A LA FORMULACIÓN DE NUEVOS VALORES  
DE REFERENCIA.**

**DIANA MILENA CAMARGO TORRES**

**APROBADO**

---

**Ingrid Schuler, Ph.D.**  
**Decana Académica**  
**Facultad de Ciencias**

---

**Luz Amparo Maldonado, Bacterióloga**  
**Directora de Carrera de Bacteriología**  
**Facultad de Ciencias**

**A mi Mamita por brindarme su apoyo y total confianza.**

**A Giovanni por su compañía y amor incondicional.**

**A mi Papá Jorge por darme ánimos y fuerzas mientras estuvo a mi lado.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme llegar al lugar en donde me encuentro, también a mis papas, que aunque mi padre partió muy rápido se que estaría orgulloso de mi.

A Giovanni por exigirme y hacer de mi lo que soy.

Al Doctor Luis Alejandro Barrera por darme la gran oportunidad de aprender cosas interesantes. A Olguita por estar ahí siempre y dispuesta a colaborarme.

A Alex por ser mi guía.

A Joko por esa calidez que siempre me brindó cada vez que empezaba un nuevo día.

A Carolina, Catalina, Linita y Johana por hacer muy ameno el trabajo y sobre todo por enseñarme y responder a mis muchas preguntas.

A Ana Rosita por estar pendiente de cada cosa para que el trabajo no se complicara y por consentirme tanto.

A Jenny por ser tan comprensiva y generosa.

A todos los miembros del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, que hicieron que el proceso de aprendizaje fuera lo mejor posible y por dejar en mí la espina de querer hacer algo por los pacientes que nos necesitan.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	6
TABLA DE CONTENIDO.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE ANEXOS.....	12
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2 MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	21
2.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO.....	21
2.2. GANGLIOSIDOSIS GM1.....	22
2.2.1. GANGLIOSIDOSIS GM1 INFANTIL (TIPO 1).....	24
2.2.2. GANGLIOSIDOSIS JUVENIL (TIPO 2).....	24
2.2.3. GANGLIOSIDOSIS ADULTA O CRÓNICA (TIPO 3).....	25
2.2.4. HALLAZGOS EN EL LABORATORIO.....	25
2.3 SÍNDROME DE MORQUIO B (MPS IVB).....	26
2.3.1. HALLAZGOS EN EL LABORATORIO.....	28
2.4 $\beta$ -GALACTOSIDASA ( $\beta$ -GAL).....	30
2.4.1. MUTACIONES.....	33
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	34
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	34
3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	36

OBJETIVOS.....	37
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	37
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
5.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA.....	39
5.1.2. VARIABLES DE ESTUDIO.....	39
5.2. MATERIALES.....	40
5.2.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	40
5.3. METODOLOGÍA.....	40
5.3.1. OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	40
5.3.2. LISIS DE CÉLULAS.....	41
5.3.3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	42
5.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LISADO CELULAR.....	43
5.4 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	44
5.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	44
5.5.1 CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.....	44
5.5.2 CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	44
RESULTADOS.....	45
6.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	45
6.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	46
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	61

SE ENSAYARON LAS MODIFICACIONES DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASA A PARTIR DE MUESTRAS DE



LEUCOCITOS OBTENIDOS DE PERSONAS QUE VOLUNTARIAMENTE PARTICIPARON DE ESTE ESTUDIO, RELATIVAS TANTO A DISMINUCIÓN DE VOLÚMENES DE REACTIVOS (MODIFICADOS DE 100 $\mu$ L A 15 $\mu$ L) COMO A CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA MUESTRA (MODIFICADA DE 0,020MG-0,030MG A 0,0030-0,0045MG).....	61
RECOMENDACIONES.....	62
ANEXOS.....	63
CONSENTIMIENTO INFORMADO, PARA EL ACCESO A LA INFORMACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASA EN PERSONAS VOLUNTARIAS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE MORQUIO B O GANGLIOSIDOSIS GM1 .....	63
OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS A PARTIR DE SANGRE HEPARINIZADA.....	67
PREPARACIÓN DE LISADOS DE LEUCOCITOS POR SONICADO.....	68
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE FOLIN-LOWRY.....	69
CONSTRUCCIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	71
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LEUCOCITOS.....	73
FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	75
RESOLUCIÓN N° 008430 DE 1993.....	77
(4 DE OCTUBRE DE 1993).....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DEFECTO BIOQUÍMICO EN LA GANGLIOSIDOSIS GM1. LA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASA HIDROLIZA LOS RESIDUOS $\beta$ -GALACTOSIL TERMINALES EN EL GANGLIÓSIDO GM1. TOMADO DE .....	22
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS DEL PRECURSOR DE $\beta$ -GAL. MADURO, TOTALMENTE PROCESADO Y LA ENZIMA S-GAL. TOMADO DE .....	31
FIGURA 3. DEGRADACIÓN DEL GLICOSAMINOGLICANO QUERATÁN SULFATO. TOMADO DE BRENDA. THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION. 2006.....	32
FIGURA 4. CURVA PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE FOLIN-LOWRY. ....	46
FIGURA 5. CURVA DE CONCENTRACION DE UNIDADES DE FLUORESCENCIA EMITIDAS POR CADA ESTADAR DE 4-MU VS. 4-MU EN UNIDADES DE $\mu$ M .....	47
FIGURA 6. CURVA DE CORRELACION DE UNIDADES DE FLUORESCENCIA EMITIDAS POR CADA NMOL DE 4-MU.....	48
FIGURA 7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN DIFERENTES MUESTRAS SIGUIENDO LA METODOLOGÍA SHAPIRA 1988. EN LA GRAFICA SE OBSERVAN LOS RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS A, B, C, D, E Y F SEGÚN LO INDICADO POR LAS FIGURAS LLEVANDO A CABO LAS DETERMINACIONES A VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN DE 1,5ML Y PROTEÍNA POR ENSAYO ENTRE 0,020 A 0,030 MG. EN ROJO SE INDICA LA MEDIA DE LOS DATOS OBTENIDOS PARA CADA MUESTRA. EL EJE X CORTA EN EL EJE Y, EN 48,69 QUE CORRESPONDE A LA MEDIA DE LOS DATOS OBTENIDOS DEL CONJUNTO DE MUESTRAS.....	49
FIGURA 8. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASA APLICANDO VARIACIONES EN VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN Y MILIGRAMOS DE PROTEÍNA EN LA MUESTRA F. EN LA GRAFICA SE OBSERVA LOS RESULTADOS PARA LA MUESTRA F LLEVANDO A CABO LAS DETERMINACIONES A VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN DE 1,5ML Y 200 $\mu$ L. POR CADA DILUCIÓN HECHA EN LA MUESTRA SE HIZO DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. 50	50
FIGURA 9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LA MUESTRAS G, H E I A DIFERENTES VOLÚMENES FINALES DE REACCIÓN Y A DIFERENTES MILIGRAMOS DE PROTEÍNA. PARA LA MUESTRA G, LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN EL ENSAYO PARA 1,5ML ES DE 0,02515MG Y PARA 200 $\mu$ L ES DE 0,0075MG. PARA LA MUESTRA H, A VOLUMEN FINAL DE 1,5 ML, LA PROTEÍNA ES DE 0,02287MG Y PARA 200 $\mu$ L ES DE 0,0068MG. EN LA MUESTRA I, A UN VOLUMEN DE 1,5ML LA PROTEÍNA POR ENSAYO ES DE 0,0344MG Y PARA UN VOLUMEN DE 200 $\mu$ L ES DE 0,0051MG. ....	51
FIGURA 10. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LA MUESTRAS G, H Y J A DIFERENTES MILIGRAMOS DE PROTEÍNA. EN LA GRÁFICA SE OBSERVAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS REALIZADAS POR DUPLICADO MODIFICANDO LA CANTIDAD DE PROTEÍNA PRESENTE EN CADA ENSAYO MANTENIENDO UN VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN CONSTANTE A 1,5ML.....	52

FIGURA 11. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LA MUESTRAS G, H Y J A DIFERENTES MILIGRAMOS DE PROTEÍNA. EN LA GRÁFICA SE OBSERVAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS REALIZADAS POR DUPLICADO MODIFICANDO LA CANTIDAD DE PROTEÍNA PRESENTE EN CADA ENSAYO MANTENIENDO UN VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN CONSTANTE, ES DECIR A 200 $\mu$ L.....53

FIGURA 12. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LA MUESTRAS G, H Y J A DIFERENTES VOLÚMENES FINALES DE REACCIÓN. EN LA GRÁFICA SE OBSERVAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS REALIZADAS POR DUPLICADO MODIFICANDO EL VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN, MANTENIENDO LA CANTIDAD DE PROTEÍNA POR ENSAYO EN EL RANGO SUGERIDO PARA CADA VOLUMEN.....54

## **ÍNDICE DE TABLAS**

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUCOPOLISACARIDOSIS (MPS) .....	29
TABLA 2. DILUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE PROTEÍNA.....	71
TABLA 3. PROCEDIMIENTO TUBOS DE REACCIÓN. ....	73

**ÍNDICE DE ANEXOS**

AGRADECIMIENTOS.....6

TABLA DE CONTENIDO.....7

ÍNDICE DE FIGURAS.....9

.....11

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE ANEXOS.....	12
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2 MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	21
2.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO.....	21
2.2. GANGLIOSIDOSIS GM1.....	22
2.2.1. GANGLIOSIDOSIS GM1 INFANTIL (TIPO 1).....	24
2.2.2. GANGLIOSIDOSIS JUVENIL (TIPO 2).....	24
2.2.3. GANGLIOSIDOSIS ADULTA O CRÓNICA (TIPO 3).....	25
2.2.4. HALLAZGOS EN EL LABORATORIO.....	25
2.3 SÍNDROME DE MORQUIO B (MPS IVB).....	26
2.3.1. HALLAZGOS EN EL LABORATORIO.....	28
2.4 $\beta$ -GALACTOSIDASA ( $\beta$ -GAL).....	30
2.4.1. MUTACIONES.....	33
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	34
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	34
3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	36
OBJETIVOS.....	37
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	37
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
5.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA.....	39

5.1.2. VARIABLES DE ESTUDIO.....	39
5.2. MATERIALES.....	40
5.2.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	40
5.3. METODOLOGÍA.....	40
5.3.1. OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	40
5.3.2. LISIS DE CÉLULAS.....	41
5.3.3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	42
5.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LISADO CELULAR.....	43
5.4 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	44
5.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	44
5.5.1 CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.....	44
5.5.2 CÁLCULO PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	44
RESULTADOS.....	45
6.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	45
6.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	46
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	61
SE ENSAYARON LAS MODIFICACIONES DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASA A PARTIR DE MUESTRAS DE LEUCOCITOS OBTENIDOS DE PERSONAS QUE VOLUNTARIAMENTE PARTICIPARON DE ESTE ESTUDIO, RELATIVAS TANTO A DISMINUCIÓN DE VOLÚMENES DE REACTIVOS (MODIFICADOS DE 100 $\mu$ L A 15 $\mu$ L) COMO A CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA MUESTRA (MODIFICADA DE 0,020MG-0,030MG A 0,0030-0,0045MG).....	61
RECOMENDACIONES.....	62
ANEXOS.....	63
CONSENTIMIENTO INFORMADO, PARA EL ACCESO A LA INFORMACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ -	

GALACTOSIDASA EN PERSONAS VOLUNTARIAS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE MORQUIO B O GANGLIOSIDOSIS GM1 .....	63
OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS A PARTIR DE SANGRE HEPARINIZADA.....	67
PREPARACIÓN DE LISADOS DE LEUCOCITOS POR SONICADO.....	68
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE FOLIN-LOWRY.....	69
CONSTRUCCIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	71
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LEUCOCITOS.....	73
FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	75
RESOLUCIÓN N° 008430 DE 1993.....	77
(4 DE OCTUBRE DE 1993).....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	85

## **RESUMEN**

La enfermedad de Morquio B y la Gangliosidosis  $G_{M1}$ , son entidades caracterizadas por defectos en el gen Gal1 que codifica la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, causando la deficiencia o ausencia en la actividad de dicha enzima. La determinación cuantitativa de la actividad catalítica de la  $\beta$ -Galactosidasa, es indispensable para el diagnóstico de estas enfermedades. Dicha determinación se realiza empleando un sustrato fluorogénico análogo.

Con el fin de aumentar la precisión intra-ensayo, con miras a mejorar la reproducibilidad, disminuir las concentraciones de sustratos, reactivos y lograr niveles de comparabilidad con laboratorios europeos que trabajan en estas enfermedades, se realizaron las primeras aproximaciones a las modificaciones del método propuesto por Shapira y colaboradores en 1988, a partir de muestras recolectadas de personas que voluntariamente participaron en el estudio. Con base en la determinación de actividad de la  $\beta$ -Galactosidasa se derivan algunas conclusiones que pueden ser usadas en otras determinaciones fluométricas en el laboratorio disminuyendo el uso de muestra, sustrato, reactivos y por consiguiente el costo de la prueba.



## **ABSTRACT**

The disease Morquio B and Gangliosidosis  $G_{M1}$ , entities are characterized by defects in the gene Gal1 that codifies the enzyme  $\beta$ -Galactosidase, causing the deficiency or absence in the activity of the enzyme. The quantitative determination of the catalytic activity  $\beta$ -Galactosidase is indispensable for the diagnosis of these diseases. Such determination is made using a fluorogenic substrate.

In order to increase the sensitivity, improving the reproducibility, lower concentrations of substrates, reagents and bring levels of comparability with European laboratories working in these diseases, there were the first approximations to the amendments to the method proposed by Shapira and collaborators in 1988, starting in samples collected from people who voluntarily participated in the study. Based on the determination of activity of the  $\beta$ -Galactosidase derived some conclusions that can be used in other fluometric determinations in the laboratory decreasing the use of sample, substrate, reagents and therefore the cost of proof.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimopatías comprenden un conjunto de defectos ocasionados por mutaciones generadas en el gen que codifica, para una enzima, lo que conlleva a la baja actividad en la misma. La deficiencia hereditaria de la enzima lisosomal  $\beta$ -Galactosidasa, se manifiesta clínicamente en la Gangliosidosis  $G_{M1}$ , enfermedad que se caracteriza fundamentalmente por un proceso de neurodegeneración de los pacientes y en la enfermedad de Morquio tipo B, enfermedad ósea generalizada, sin compromiso del sistema nervioso central .

La Gangliosidosis  $G_{M1}$  es una enfermedad de depósito en donde el Gangliósido  $G_{M1}$  se acumula en vísceras y especialmente en cerebro. Como resultado de este defecto enzimático los pacientes afectados en la mayoría de los casos mueren a temprana edad . Esta enfermedad presenta tres subtipos clínicos de expresión fenotípica: infantil (tipo 1), infantil tardía (tipo 2) y adulta o crónica (tipo 3).

La enfermedad de Morquio B (MPS IVB), se caracteriza por la displasia ósea generalizada y la hiperexcreción de los glicosaminoglicanos Condroitin y Queratán sulfato en la orina. Estos pacientes no sufren deterioro mental y su nivel de inteligencia es normal.

Dado que la sintomatología de estas enfermedades es semejante a la de otros errores innatos del metabolismo, es necesario hacer las pruebas de laboratorio que permitan decidir si se trata de enfermedad de Morquio B, o Gangliosidosis  $G_{M1}$ , para seguir la conducta terapéutica adecuada. .

La enzimología, técnica de elección para el diagnóstico de enfermedades metabólicas, se basa en la transformación enzimática de sustratos, en productos que pueden ser medidos mediante técnicas espectrofotométricas,

fluorométricas, radiométricas, quimioluminiscencia etc. En la interpretación de los análisis enzimáticos para uso en la clínica se deben tener en cuenta:

- a) La fuente de la enzima a analizar: tejido o líquido biológico.
- b) La estabilidad de la enzima durante su manejo y almacenamiento.
- c) Las condiciones en que se hacen las mediciones de la actividad enzimática, incluyendo la presencia de inhibidores, activadores, condiciones óptimas de temperatura, pH etc.
- d) La sensibilidad y especificidad de la técnica.

Además de lo anterior es importante tener en cuenta el fenómeno de la pseudodeficiencia, por el cual individuos completamente normales pueden presentar actividades enzimáticas muy bajas o casi nulas, lo cual complica la interpretación de los resultados de laboratorio; en casos en que esto sucede

Existen diferentes formas de presentación de estas enfermedades: neonatales, infantil, juvenil y en algunos casos tipo adulto.

Desde hace tiempo se ha venido buscando correlación entre los niveles enzimáticos y la severidad de la enfermedad e inclusive con el pronóstico de vida para el paciente. Hasta ahora no ha sido posible lograrlo en parte por la falta de sensibilidad de las técnicas que solo permitían niveles de lectura de una o dos cifras en tanto que los nuevos equipos, para el caso en el que se emplean reacciones fluorométricas, permiten lecturas de cinco o más cifras. Es posible que con el uso de estos nuevos equipos y la optimización de las técnicas enzimáticas, se logre diferenciar entre actividades muy cercanas que permitan entonces establecer correlación con sutiles diferencias fenotípicas.

En este trabajo se muestran los pasos que se tuvieron en cuenta para realizar las primeras aproximaciones a las modificaciones de la técnica de determinación de actividad catalítica de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, cuya deficiencia o actividad disminuida, se observa en las enfermedades de Morquio B y en todas las variantes clínicas de la Gangliosidosis  $G_{M1}$ . Las modificaciones realizadas se realizaron en términos de disminución del volumen de sustrato y de concentración de proteína de la muestra del individuo sano o del paciente. Con base en la mejoría de las condiciones metodológicas empleadas en la determinación de la actividad enzimática, se pretende establecer un método que permita clasificar bioquímicamente al paciente dentro del cuadro de alguna de estas dos enfermedades (Morquio B y  $G_{M1}$ ), para que con base en ello y junto a la historia clínica del paciente, el médico tratante pueda establecer el diagnóstico final, pudiendo así proporcionar el manejo adecuado al paciente.

Este estudio permitió el análisis del comportamiento de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, frente a cambios en la técnica de análisis abriendo el camino para implementar la estandarización de la determinación de actividad catalítica en esta enzima y en otras enzimas relacionadas con los errores innatos del metabolismo.

## 2 MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

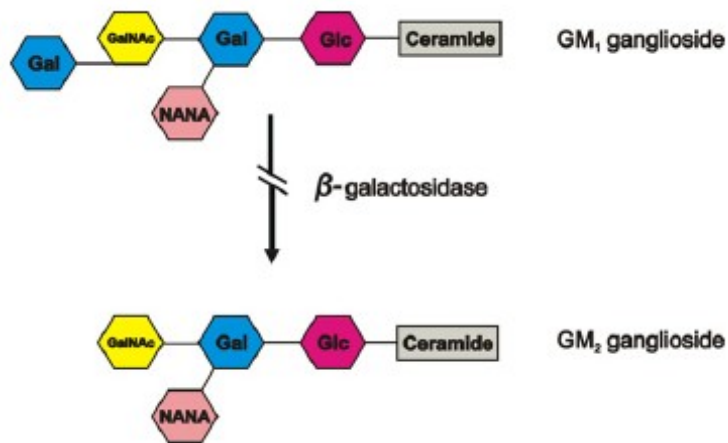
### 2.1 *Errores Innatos del Metabolismo*

La deficiencia en la producción de algunos metabolitos, la acumulación de ciertos sustratos asociados a eventos bioquímicos o la combinación de ambos, fueron llamados por *Garrod*, Errores Innatos del Metabolismo (EIM). Hasta la fecha se han descubierto cerca de 550 y se continúan describiendo, con una prevalencia global de 1/600 recién nacidos vivos. .

La gran mayoría de estas enfermedades se producen por mutaciones que alteran la expresión fenotípica de determinadas proteínas. Las secuencias codificantes de muchos genes estructurales comprenden por lo menos unos cuantos miles de nucleótidos, y el potencial de mutación genera múltiples variaciones en las secuencias de nucleótidos. Algunas mutaciones pueden interrumpir totalmente la producción de cualquier producto génico, dando como resultado el padecimiento de una enfermedad severa. Por otro lado, otras mutaciones pueden causar solamente un cambio silencioso en la secuencia de nucleótidos del gen. La relación entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad es compleja. Muchas mutaciones, tales como deleciones o inserciones, están generalmente asociadas con una enfermedad clínicamente severa, y el fenotipo de la enfermedad entre diferentes individuos afectados tiende a ser similar. Estructuralmente mutaciones sutiles tales como las que resultan por sustituciones en aminoácidos semejantes, están asociadas con fenotipos de enfermedades menos severas. Sin embargo, variaciones en la expresión de la información genética dentro de hermanos aun gemelos univitelinos, suele variar, siendo importante en estas variaciones los factores medio ambientales que rodean a los individuos afectados, además de la interacción con otros genes .

## 2.2. Gangliosidosis $G_{M1}$

Esta enfermedad se caracteriza por el acumulo del Gangliósido  $G_{M1}$  en el sistema nervioso central, desde el momento del nacimiento , debido a la baja actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, La actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa está entre 0 y 5%. . (Figura 1).



**Figura 1. Defecto bioquímico en la Gangliosidosis  $G_{M1}$ .** La enzima  $\beta$ -Galactosidasa hidroliza los residuos  $\beta$ -Galactosil terminales en el gangliósido  $G_{M1}$ . Tomado de .

Este acumulo de  $G_{M1}$  genera neurodegeneración, combinada con características de mucopolisacaridosis, incluyendo disostosis múltiple y hepatoesplenomegalia. Los pacientes generalmente tienen una mancha color rojo cereza en la macula, característica de las neuropilidosis. .

Esta enfermedad presenta tres etapas bien definidas. La *Gangliosidosis infantil o tipo 1*, en donde los síntomas aparecen en la infancia temprana después de un desarrollo normal o desde el mismo momento del nacimiento. En casos severos se presenta inapetencia y la ganancia de peso es lenta en el periodo neonatal. Se observa además ascitis y/o edemas en las

extremidades superiores e inferiores. En la mayoría de los casos, los signos de daño cerebral se presentan desde los tres o seis meses de edad, continuando con un proceso neurodegenerativo progresivo. Por otra parte se observa una hipotonía generalizada, en los estadios iniciales, cambiando lentamente a rigidez y espasticidad, asociadas con cuadros de ataques convulsivos frecuentes .

En la *Gangliosidosis juvenil o tipo II*, también ocurre acumulo de  $G_{M1}$  en todo el cerebro, diferente a lo que podría presentarse en la *Gangliosidosis adulta o crónica*, donde  $G_{M1}$  solo se localiza en caudado y putamen cerebral. Estos pacientes presentan neurodegeneración progresiva, falta de coordinación y debilidad muscular generalizada. El habla, si está presente, es casi nula. Desarrollan espasticidad y rigidez, lo que puede representar un problema a la hora del manejo del paciente afectado .

La forma adulta o crónica presenta ataxia progresiva, mioclonía y espasticidad. La distonía es la característica más común en estos pacientes, comenzando desde los 6 años hasta los 15 o más años de edad.

El Gangliósido  $G_{M1}$  es uno de los gangliósidos que se presenta con mayor abundancia en cerebros de recién nacidos y personas maduras y usualmente comprende cerca del 25% del total el Gangliósidos en cerebro. En la Gangliosidosis  $G_{M1}$  tipo 1 y tipo 2, el total de contenido de gangliósidos en la sustancia gris incrementa entre 3 a 5 veces y el gangliósido  $G_{M1}$  forma un 80% de este incremento. Este gangliósido esta aumentado cerca de 12-20 veces con respecto a los valores de control. En la *Gangliosidosis adulta o crónica*, hay una ligera elevación del gangliósido en la sustancia gris y en los ganglios basales, particularmente en el caudado y el putamen. En órganos, particularmente en el hígado, el gangliósido  $G_{M1}$  se encuentra marcadamente elevado, pero el contenido en este órgano comparado con el que se acumula en cerebro es menor .

### **2.2.1. Gangliosidosis G<sub>M1</sub> Infantil (Tipo 1)**

Sus signos clínicos y síntomas aparecen en la infancia temprana después de un desarrollo normal, pero algunos pacientes muestran anormalidades físicas y neurológicas inmediatamente después del nacimiento. En casos severos, el apetito es bajo, la succión es pobre, y la ganancia de peso es subnormal en el periodo neonatal. Se observan en algunos casos ascitis y/o edemas .

Diferentes estudios realizados con base en las anormalidades que suceden en la sustancia blanca del cerebro por neuroimágenes y las neuropatologías que se presentan en estos pacientes, muestra que los efectos metabólicos recaen directamente en las células de la glía, más específicamente en los oligodendrocitos, contribuyendo así a la desmielinización interfiriendo con el desarrollo y función neuroaxonal cerebral .

### **2.2.2. Gangliosidosis Juvenil (Tipo 2)**

Estos pacientes muestran expresiones fenotípicas heterogéneas. Se conoce el caso de un paciente con retardo del desarrollo psicomotor en la infancia temprana. Sonrió y observó a su madre solo hasta los 8 o 10 meses de edad. El paciente nunca pudo sentarse sin ayuda externa. El deterioro definido comenzó a los 14 meses, las crisis mioclónicas y las convulsiones generalizadas ocurrieron por 2 meses, luego de este cuadro clínico severo el paciente muere a los 25 meses de edad .

En general los cuadros clínicos de este tipo de Gangliosidosis, comienzan aproximadamente desde los 10 ó 12 meses de edad. La mancha ocular rojo cereza, la visceromegalia, y el dismorfismo están ausentes en la mayoría de los casos. Pero se describen casos en donde se detecta la mancha rojo cereza en el fondo de ojo, lo mismo que la displasia esquelética.



### 2.2.3. Gangliosidosis Adulta o Crónica (Tipo 3)

En estos pacientes la edad de comienzo de la enfermedad se da alrededor de los 15 a 22 años de edad. Muestran ataxia cerebral progresiva, mioclonias, mancha rojo cereza ocular y dismorfismo. La actividad intracelular de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa es baja (10% de la actividad normal) pero la actividad enzimática en plasma es normal. La deficiencia de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa es una anomalía secundaria a otro defecto básico molecular, aunque se reportan casos en donde la actividad de la enzima es baja en fibroblastos, leucocitos y en plasma. La distonía es la manifestación neurológica con mayor presencia en estos pacientes.

### 2.2.4. Hallazgos en el Laboratorio

- *Frotis de Sangre Periférica*: Se observan linfocitos vacuolados en más de un 80% de los casos, excepto en los casos de Gangliosidosis  $G_{M1}$  tipo 3. Estas vacuolas aparecen vacías en microscopía electrónica. Los linfocitos y los neutrófilos muestran gránulos citoplasmáticos positivos para la coloración de azul de toluidina. Los linfocitos aparecen marcadamente vacuolados en sangre periférica en Gangliosidosis Infantil.
- *Medula Ósea*: Se observan células englobadas, pero en menor cantidad que las que se pueden observar en medulas de pacientes que padecen la enfermedad de *Gaucher* o la enfermedad de *Niemann-Pick*. El citoplasma de estas células está finamente vacuolado pero no puede ser teñido con Sudan III.
- *Uroanálisis*: El uroanálisis de rutina es normal. Se pueden encontrar en el sedimento urinario células esponjadas mononucleares. La prueba de cloruro de cetilpiridinio (CPC) para mucopolisacáridos precipitables es normal o ligeramente aumentada.
- *Líquido Cefalorraquídeo (LCR)*: El conteo de células y los niveles de proteína son normales. El gangliósido  $G_{M1}$  está aumentado en el LCR en

pacientes jóvenes o adultos. El gangliósido  $G_{M1}$  no es detectado en plasma o en LCR de un paciente adulto por la técnica de inmunocoloración, pero si se detecta aumentado en pacientes infantes y jóvenes. Un incremento de  $G_{M1}$  fue confirmado en pacientes con Gangliosidosis usando la técnica HPLC. La presencia del gangliósido  $G_{M1}$  en LCR es muy útil para el diagnóstico y seguimiento de la Gangliosidosis  $G_{M1}$ .

- *Neuroimágenes*: Se observan atrofas difusas del sistema nervioso central, con atrofia cortical generalizada y agrandamiento del sistema ventricular. Además se observa pérdida de mielina característica en la sustancia blanca cerebral desde etapas tempranas de la enfermedad .

### **2.3 Síndrome de Morquio B (MPS IVB)**

Esta enfermedad ha sido definida clínicamente como una displasia esquelética generalizada con aparición de opacidades corneales. No hay compromiso del sistema nervioso central, por lo que no se ve comprometida la inteligencia del paciente .

En estos pacientes se encuentra en cantidades excesivas el glicosaminoglicano Queratán sulfato en la orina, siendo un buen marcador de la enfermedad.

Las mutaciones alélicas del gen que codifica para la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, fueron sugeridas por estudios de hibridación celular, y el estudio directo del gen, confirmo que las mutaciones que se encuentran en esta enfermedad son diferentes de las que se presentan en aquellos pacientes que sufren la Gangliosidosis  $G_{M1}$  .

La enfermedad de Morquio B es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva. La incidencia de esta enfermedad aun no ha sido calculada. Los pacientes que padecen esta enfermedad tienen raíces en

familias de Arabia, Austria, Alemania, Grecia, Italia, Japón, Polonia o Sur África .

En la enfermedad de Morquio B, la sustancia que más se acumula es el Queratán sulfato, caracterizado por la secuencia repetida de poli(N-acetilglucosamina) de Galactosa (6S),  $\beta 1^4$ GlcNAc (6S)  $\beta 1^3$ Gal (6S)  $\beta 1^4$ GlcNAc (6S) que es sulfatada en la posición C6. Se conocen dos tipos de Queratán sulfatos (KS1 y KS2) son conocidos. El KS1 se encuentra en cornea; este se encuentra unido al grupo amino de la Asparagina por enlaces N; mientras KS2, se encuentra en tejido esquelético y cartílago unido por la N-acetilgalactosamina a la Serina o la Treonina por enlaces O. Ambas formas de Queratán, esquelético y corneal están presentes en la orina de pacientes con la enfermedad de Morquio .

La enfermedad de Morquio tipo B, se caracteriza por la displasia espondiloepifisiaria masiva, que resulta en una baja estatura, hipoplasia odontoide, etc. El primer signo de la enfermedad es el retraso en el crecimiento haciéndose evidente en pacientes con estatura baja en la niñez. Las deformidades físicas progresan con la edad, y se observan cambios característicos como: tronco corto como en el enanismo, protrusión esternal (*pectus carinatum*), hinchazón de las terminaciones distales de los huesos largos, hipoplasia odontoide, entre otras características . El tono muscular esta aumentado patológicamente, los reflejos de los tendones son enérgicos pudiéndose deber a una mielopatía de origen cervical .

El curso clínico de esta enfermedad puede prolongarse por más tiempo, en comparación al que puede tener un paciente con enfermedad de Morquio A, en donde se ve afectada otra enzima (N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa), además hay una gran variación en la severidad de este padecimiento .

### 2.3.1. Hallazgos en el Laboratorio

- *Sangre*: La vacuolización de linfocitos de sangre periférica se observa en el 1% en pacientes normales. No se describen anomalías en las células de sangre periférica ni en la química sanguínea.

- *Orina*: Para un tamizaje metabólico, una solución de cloruro de cetilpiridinio (CPC) o de Bromuro de cetiltrimetil amonio al 5 o 10% se agrega para precipitar GAG's pero el queratán sulfato no es fácilmente precipitable por este método. El Acido Urónico contenido en los glicosaminoglicanos es normal cuantificándose con Azul de Alcian. El diagnóstico de excreción de Queratán sulfato en la orina, se observa incrementado en Cromatografía de capa fina (TLC) o en electroforesis bidimensional. Aquí el patrón es indistinguible entre un paciente con Morquio B o Gangliosidosis GM1. Un patrón de Oligosacáridos similar al que se presenta en GM1 se observa por TLC.

- *Rayos X en Hueso*: La Platiespondilia es el marcador de la enfermedad de Morquio B. Se observa pérdida de la conformación normal cervical y lumbar con alguna acentuación del ángulo lumbosacral. Los huesos de las manos muestran ángulos anormales en las epífisis metacarpianas.

Como en la enfermedad de Morquio B o MPS IVB, en donde se acumula en ciertos tejidos el glicosaminoglicano Queratán, existen otras Mucopolisacaridosis (MPS) en donde se ve afectada la función de cierta enzima, resultando en el acumulo de ciertos Glicosaminoglicanos (GAG's) . En la **tabla 1** se resumen las MPS descritas hasta ahora con sus características más relevantes.

**Tabla 1.** Clasificación de las Mucopolisacaridosis (MPS)

MPS	Nombre de la enfermedad	Enzima deficiente	GAG's acumulados	Manifestaciones clínicas
<b>Tipo I</b>	Hurler	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y Heparán	Opacidad Corneal, Disostosis Múltiple, Organomegalia, Enfermedad Cardíaca, Muerte en la infancia
<b>Tipo I</b>	Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y Heparán	Opacidad Corneal, Rigidez articular, Inteligencia Normal.
<b>Tipo I/S</b>	Hurler/Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidasa	Dermatán y Heparán	Fenotipo Intermedio entre IH y IS
<b>Tipo II</b>	Hunter Leve	Iduronato-2-sulfato (IDS)	Dermatán y Heparán	Inteligencia Normal, Corta estatura, Supervivencia 20-60 años
<b>Tipo II</b>	Hunter Severa	Iduronato-2-sulfato (IDS)	Dermatán y Heparán	Disostosis Múltiple, Organomegalia. Muerte antes de los 15 años.
<b>Tipo IIIA</b>	San Filipo A	Heparán-N-Sulfatasa (Sulfaminidasa)	Heparán Sulfato	Deterioro mental profundo. Hiperactividad. Manifestaciones somáticas medias
<b>Tipo IIIB</b>	San Filipo B	$\alpha$ -N-Acetil Glucosaminidasa	Heparán Sulfato	Fenotipo similar a IIIA
<b>Tipo IIIC</b>	San Filipo C	Acetil CoA: $\alpha$ -glucosamina acetiltransferasa	Heparán Sulfato	Fenotipo similar a IIIA
<b>Tipo IIID</b>	San Filipo D	N-acetil glucosamina -6-sulfato sulfatasa	Heparán Sulfato	Fenotipo similar a IIIA
<b>Tipo IVA</b>	Morquio A	N-acetilgalactosamina -6- sulfatasa (GALNS)	Queratán y Condroitin Sulfato	Deformidades Esqueléticas. Hipoplasia odontóide, Opacidad Corneal.
<b>Tipo IVB</b>	Morquio B	$\beta$ -Galactosidasa	Queratán Sulfato	Espectro similar a IVA
<b>Tipo VI</b>	Maroteaux Lamy	Arilsulfatasa B	Dermatán Sulfato	Disostosis Múltiple, Opacidad Corneal, Inteligencia Normal.
<b>Tipo VII</b>	Sly	$\beta$ -Glucuronidasa	Dermatán, Heparán y Condroitin Sulfato.	Disostosis Múltiple, Hepatoesplenomegalia, Amplio espectro de severidad

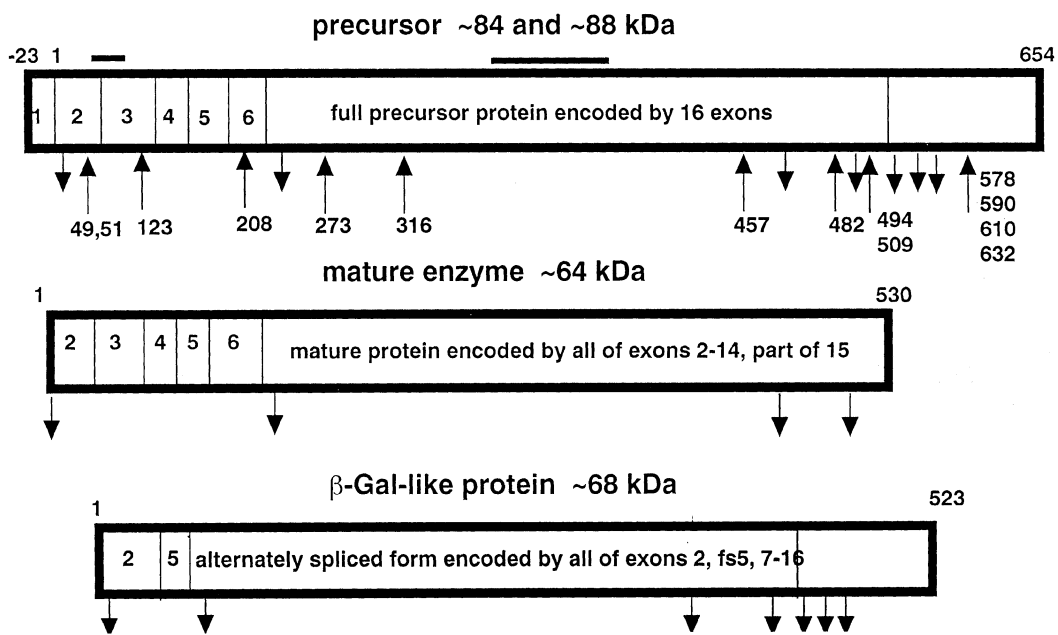
Tomado de .

## 2.4 $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal)

La enzima  $\beta$ -Galactosidasa (EC 3.2.1.23) es una enzima lisosomal que contiene entre 7.5 y 9% de carbohidratos además de un gran contenido de oligosacáridos complejos y bajo contenido de oligosacáridos de tipo oligomanósido.

Esta enzima se codifica por el gen BLG1 que se ubica en el cromosoma 3p21.33. Este gen tiene una longitud de 62.5 kb y está compuesto de 16 exones (**Figura 2**). Morreau y colaboradores describieron dos transcritos en fibroblastos de humanos, uno, más largo (2.4 kb) y RNAm 12 veces más abundante, codifica para la totalidad de la  $\beta$ -Gal lisosomal, mientras que el transcripto menor (2.0 kb), por splicing alternativo da origen a S-Gal.

El gen codifica para un prepolipéptido de 677 aminoácidos, donde un péptido señal amino terminal de 23 aminoácidos es escindido al entrar al retículo endoplasmático, para generar un propolipéptido de 654 aminoácidos.  $\beta$ -Gal es glicosilada post-traduccionalmente a un precursor de 84 kDa y cuando es fosforilada a un precursor de 88 kDa. Tiene 8 residuos de cisteína



**Figura 2. Características del precursor de  $\beta$ -Gal.** Maduro, totalmente procesado y la enzima S-Gal. Tomado de .

$\beta$ -Gal se encuentra presente en gran variedad de tejidos humanos y fluidos corporales, presentando actividad enzimática alta en fibroblastos y linfocitos, así como en el sistema nervioso central. Ha sido estudiada en hígado, cerebro, riñón, orina, placenta y en leucocitos. Su pH óptimo es de aproximadamente 4.5, siendo además termolábil y activada por iones cloruro.

La enzima  $\beta$ -Galactosidasa, tiene como sustratos naturales a la mayoría de los esfingolípidos a excepción de la galactosilceramida y galactosilesfingosina; Otros sustratos para esta enzima son los carbohidratos Queratán sulfato y Condrotín sulfato, glicosaminoglicanos caracterizados por su estructura con unidades repetitivas de poly(galactosa-N-acetilglucosamina) , así como glicoproteínas derivadas de oligosacáridos. La  $\beta$ -Galactosidasa, actúa sobre estos sustratos liberando la  $\beta$  Galactosa terminal unida por enlaces  $\beta$ , 1-4 o  $\beta$ , 1-3 a los glucoesfingolípidos, (**Figura 3**), a el mucopolisacárido Queratán sulfato, entre otros, que se acumulan en la Gangliosidosis  $G_{M1}$  y en la enfermedad Morquio B respectivamente .

Algunas hidrolasas solubles como la  $\beta$ -Galactosidasa, necesitan cofactores como la saposina B, que sirve de activador para la degradación de esfingolípidos. Estos cofactores actúan como detergentes que facilitan la interacción entre enzima-sustrato. La proteína activadora de esfingolípidos I (SAP-1) o saposina B, se requiere en las reacciones *in vivo* para que haya degradación por parte de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa lisosomal, sobre los esfingolípidos. Para llevar a cabo reacciones *in vitro* se utilizan como factores iniciadores de la  $\beta$  Galactosidasa, otro tipo de sustancias detergentes como el *Cutscum* o el Taurocolato, activando la hidrólisis de los sustratos como el Gangliósido  $G_{M1}$  o la Lactosilceramida .

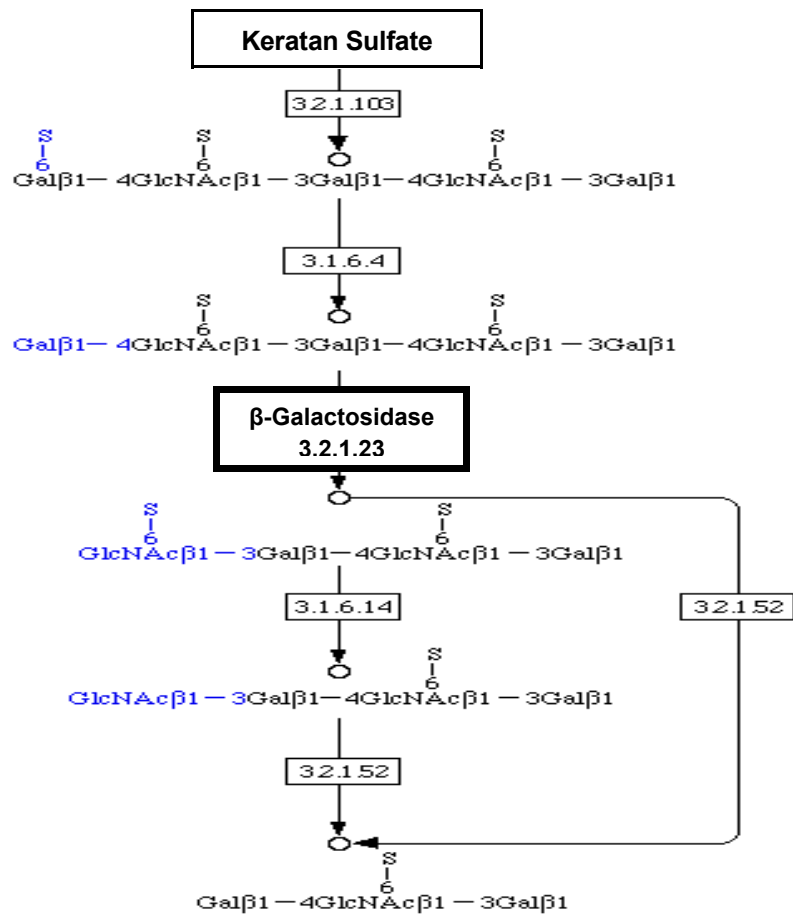


Figura 3. Degradación del Glicosaminoglicano Queratán Sulfato. Tomado de Brenda. The comprehensive enzyme information. 2006



Además de la deficiencia o inactividad presentada por la  $\beta$ -Galactosidasa en la Gangliosidosis  $G_{M1}$  y en el Morquio B, se ha observado que la actividad de la enzima esta disminuida en la Galactosialidosis, debido a fallas genéticas en la proteína protectora/catepsina A originando deficiencia combinada de  $\beta$ -Galactosidasa y Neuraminidasa. En una persona normal, la  $\beta$ -Galactosidasa está unida a la proteína protectora catepsina A y a la enzima Neuraminidasa en el lisosoma, generando un complejo estable y protegido de la inadecuada acción de enzimas proteolíticas lisosomales, permitiendo a su vez que estas enzimas continúen con su proceso de maduración post-traduccional para generar luego enzimas maduras funcionalmente.

En pacientes que padecen la enfermedad de Morquio tipo B, se han encontrado actividades residuales de la enzima  $\beta$  Galactosidasa, entre 1.3 – 7.0 % en fibroblastos, cuando esta actividad es evaluada con sustratos naturales o sintéticos.

#### **2.4.1. Mutaciones**

Dos proteínas relacionadas surgen de los transcritos codificados por el gen GAL, la primera y más abundante, la enzima lisosomal  $\beta$ -Galactosidasa, y la segunda, la enzima similar a  $\beta$ -Galactosidasa (S-Gal) . Esta última no lleva a cabo la misma función de la  $\beta$ -Galactosidasa además de no tenerse claro su rol dentro de los tejidos o en la fisiología de las enfermedades relacionadas con la deficiencia de  $\beta$ -Galactosidasa tal como la Gangliosidosis  $G_{M1}$  y la enfermedad de Morquio B o mucopolisacaridosis IVB.

Las mutaciones genéticas identificadas en la Gangliosidosis  $G_{M1}$  y en Morquio B, incluyen mutaciones con sentido/sin sentido, duplicación/inserción e inserciones causantes de defecto en el *Splicing* . Se han identificado las mutaciones presentes en el gen que codifica para la  $\beta$ -Galactosidasa, reportándose mutaciones en pacientes con fenotipos

diferentes: la R482H en pacientes italianos, siendo común en pacientes con Gangliosidosis  $G_{M1}$  y Morquio B simultáneamente. La R208C en pacientes americanos que cursan con Gangliosidosis  $G_{M1}$  de tipo I o infantil, la R201C en pacientes Japoneses con Gangliosidosis  $G_{M1}$  de tipo II o infantil tardía y la I51T en pacientes japoneses que sufren Gangliosidosis  $G_{M1}$  tipo III .

## **FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

### ***3.1 Formulación del Problema***

Si bien es cierto que la evaluación clínica inicial es fundamental ante la sospecha clínica de Gangliosidosis  $G_{M1}$  o de enfermedad de Morquio B,

especialmente si se tiene en cuenta que la primera de ellas presenta cuadro clínico claro de neurodegeneración con el consecuente compromiso severo de la esfera mental mientras que la segunda se caracteriza por un fuerte compromiso óseo de características similares a los otros tipos de mucopolisacaridosis (MPS), es importante tener en cuenta que el diagnóstico definitivo solo puede ser establecido mediante la determinación de la actividad catalítica de la  $\beta$ -Galactosidasa . Como se decía anteriormente en el caso de Morquio tipo B, su sintomatología suele complicar el diagnóstico inicial, ya que otros tipos de mucopolisacaridosis (MPS) que también comprometen el sistema óseo, sin comprometer el sistema nervioso central, presentan síntomas similares, es el caso de la MPS tipo IVA o Morquio A, la MPS tipo IS o *Sheie*, la MPS tipo II o *Hunter* leve, la MPS VI o *Maroteaux Lamy*.

El estudio preliminar de las modificaciones de la técnica usada para la medición de la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, en términos de disminución de volumen de sustrato y muestra del paciente, permitirá la implementación de las condiciones adecuadas para la estandarización de la determinación de actividad de esta y otras enzimas que se relacionen con los errores innatos del metabolismo (EIM). Todo esto con el fin de evidenciar el problema y dar manejo integral al paciente que tenga sospecha de padecer algún EIM.

Tomando en cuenta las primeras aproximaciones a las modificaciones realizadas a la técnica para la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, variando, tanto el volumen de sustrato como la cantidad de proteína en el ensayo finalmente leído, hace importante crear nuevos valores de referencia para poder así efectuar una evaluación preliminar respecto a la deficiencia o no deficiencia de una enzima.

Teniendo en cuenta la creciente necesidad de un diagnóstico acertado de la deficiencia o ausencia de actividad de las enzimas relacionadas con los EIM, es de especial importancia incrementar la eficiencia de las técnicas de diagnóstico aplicadas en el laboratorio con el objeto de dar manejo integral oportuno a los pacientes permitiendo una mejoría en su calidad de vida.

### **3.2 Justificación de la investigación**

Las enfermedades Gangliosidosis  $G_{M1}$  y Morquio B son ocasionadas por el daño presentado en el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, originando a su vez una producción deficiente o inactiva de dicha enzima. Como consecuencia, los sustratos naturales de la  $\beta$  Galactosidasa se acumulan en cerebro (Gangliósido  $G_{M1}$ ) como es el caso de la Gangliosidosis  $G_{M1}$ . De igual manera la acumulación lisosomal de Glicosaminoglicanos como el Queratán Sulfato o el Condroitín Sulfato, presentes en Morquio B ocasionan el compromiso de sistema músculo esquelético.

En este trabajo se realizó el estudio preliminar del comportamiento de la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, llevando a cabo la disminución en el volumen de sustrato y cantidad de proteína contenida en los ensayos finalmente analizados, de los individuos que participaron en este estudio. Esto con el fin de llevar a cabo posteriores estudios de estandarización de la técnica teniendo en cuenta todas las variables de la cinética de la enzima. De esta manera será posible implementar este estudio como modelo de estandarización para la medición de actividad en otras enzimas lisosomales relacionadas con los EIM. Esto brindará un apoyo diagnóstico al médico tratante de la posible enfermedad con la que este cursando el individuo.

Teniendo en cuenta que en los últimos años se han venido desarrollando tratamientos para los EIM como la terapia de reemplazo enzimático (TRE), disponible hasta este momento para varias enfermedades de depósito

lisosomal, cobra importancia el establecimiento de un diagnóstico preciso no sólo de la enfermedad presente sino también del subtipo clínico, ya que en muchos casos la utilidad de este tipo de terapia depende del subtipo clínico que se presente; tal es el caso de la enfermedad de Gaucher, donde el tipo 1 es la variante susceptible de TRE, mientras que en la variante neuronopática tipo 3, este tratamiento no resulta útil. Igual sucede en el caso de la enfermedad de Morquio donde para el subtipo A (deficiencia de GALNS) dicha terapia se encuentra en fase pre-clínica; caso contrario ocurre en el subtipo B (deficiencia de  $\beta$ -Galactosidasa), indistinguible desde el punto de vista clínico, que por ahora no será susceptible de tratamiento.

## **OBJETIVOS**

### ***4.1. Objetivo General***

Determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa en individuos sanos, para efectuar los estudios preliminares de las variaciones de la técnica fluorométrica.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

- Realizar determinaciones de actividad enzimática de  $\beta$ -Galactosidasa realizando variaciones de la concentración de proteína sugerida por el método propuesto por Shapira y colaboradores (1988).
- Llevar a cabo determinaciones de actividad enzimática de  $\beta$ -Galactosidasa modificando el volumen final de reacción sugerido por el método propuesto por Shapira y colaboradores (1988).
- Determinar, en forma aproximada, bondades de la técnica sugerida, en términos de precisión y reproducibilidad para la determinación de la actividad catalítica de la  $\beta$ -Galactosidasa empleando el fluorómetro *Modulus* (Turner BioSystems).
- Realizar determinaciones preliminares de actividad enzimática siguiendo la metodología modificada, con la proyección de proposición y determinación de nuevos valores de referencia.
- Determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa en individuos sanos, para efectuar aproximaciones a la metodología, evitando someter a neonatos al sufrimiento en lo relativo a la toma de muestra.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Diseño de la Investigación.**

Este estudio fue de carácter experimental de corte transversal.

### 5.1.1. Población de estudio y muestra.

El grupo de investigación estuvo conformado por 10 individuos sanos, que acudieron al Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, como voluntarios para este estudio. La convocatoria para éste se hizo por medio de correo electrónico y los interesados asistieron a la cita programada para la toma de la muestra.

Los individuos pertenecientes a este grupo debieron cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- Estudiantes que participaran como voluntarios del estudio, que previamente leyeron y diligenciaron el consentimiento informado. **(Anexo 1)**.
- Personas que no presentaran sintomatología relacionada con alguna enfermedad metabólica, especialmente con Gangliosidosis  $G_{M1}$  o Morquio B.

Todos los participantes debieron entender y aceptar el documento de consentimiento informado (**Anexo 1**) en donde se explicaba la naturaleza de la investigación y de su participación en la misma.

### 5.1.2. Variables de Estudio

Las variables de este estudio fueron:

- **Variable Independiente:** La concentración de proteína presente en la muestra.
- **Variable Dependiente:** La actividad catalítica de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa presente en las muestras de leucocitos de los convocados al estudio.

## **5.2. Materiales**

### **5.2.1. Recolección de la muestra**

Se obtuvieron muestras de sangre total por venopunción en tubos conteniendo Heparina como anticoagulante, de 10 individuos que participaron voluntariamente en este estudio. De cada participante se obtuvieron un total aproximado de 20 mL divididos en 4 tubos de 5mL cada uno. De las muestras se aislaron Leucocitos.

## **5.3. Metodología**

### **5.3.1. Obtención de Leucocitos**

Se obtuvieron leucocitos a partir de sangre heparinizada, por el método de gradiente de densidad utilizando Dextran Heparina (**Anexo 2**). Este método descrito por Shapira, Blitzer et al., en 1988, tiene por objetivo realizar la separación de los componentes sanguíneos valiéndose de la diferencia de densidades en la muestra.

A cada 5 ml de sangre total obtenida por venopunción se agregó 2 ml de Dextran Heparina al 3%, se mezcló por inversión 5 veces y se dejó en reposo durante 120 minutos. La fase inferior del tubo, contiene eritrocitos y la fase superior de color claro, contiene los leucocitos atrapados en una malla formada por el Dextran.

Si transcurrido el tiempo inicial no se evidenciaba una correcta separación, se permitió la sedimentación a temperatura ambiente por un tiempo adicional hasta lograr su separación.

Ocurrida la separación de las dos fases, se procedió a extraer la primera fase que contiene los leucocitos, teniendo cuidado de no tomar muestra de la fase de glóbulos rojos. Para poder realizar una correcta extracción se hizo uso de una micropipeta de 100 – 1000  $\mu$ L. Esta fase separada se colocó en un nuevo tubo de vidrio y se procedió a realizar lavados sucesivos con



volúmenes equivalentes de agua destilada con el fin de eliminar residuos que pudieran interferir con la muestra.

Para el primer lavado, al volumen obtenido de la fase separada, se le agregó un volumen igual de agua destilada. Se agitó con vortex y se llevó a centrifugar por 3 minutos a 3500rpm. Terminada la centrifugación, en el fondo del tubo se observa un pellet de leucocitos.

Si el botón obtenido luego de la centrifugación todavía no era lo suficientemente limpio, a este se le realizó uno o dos lavados más. Para un nuevo lavado, se descartó el sobrenadante y se reconstituyó el pellet en 1mL de agua destilada. Se agitó con vortex y se llevó de nuevo a centrifugar por tres minutos a 3500 rpm. Se revisó el pellet y cuando fue necesario se repitió el proceso de lavado una vez más.

Una vez se obtiene un precipitado limpio, es decir de color blanco claro, sin presencia de glóbulos rojos, se reconstituyó en 500  $\mu$ L de agua destilada y se colocó en tubo cónico de 1,5mL, se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y se descongeló en el momento de realizar el ensayo de concentración de proteína y actividad enzimática.

### **5.3.2. Lisis de células**

El proceso de lisis celular, se realizó con el objetivo de liberar la enzima  $\beta$ -Galactosidasa presente al interior celular, dentro de los lisosomas. Este proceso se hizo en las muestras de leucocitos mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los leucocitos en la muestra, se descongelan previamente. El lisado se hizo por sonificado o ultrasonido, con el uso del equipo *Sonics Vibra Cell*, a una amplitud del 19% por 3 ciclos, cada uno de 10 segundos, para asegurar un seguro rompimiento de las membranas plasmáticas y lisosomales de los leucocitos.

Una vez realizado el sonicado, se observó cuidadosamente la muestra para comprobar que no hubieran quedado restos celulares sin romper. En algunos casos fue necesario realizar un ciclo adicional de sonicado por 10 segundos para garantizar completa ruptura celular. (**Anexo 3**)

### **5.3.3. Determinación de concentración de proteínas totales.**

En cada muestra de Leucocitos lisados, se determinó la concentración de proteína usando la técnica de Folin-Lowry. (**Anexo 4**); (**Anexo 5**).

Como primer paso para este proceso, se realizó una curva de calibración para determinación de concentración de proteína por el método Folin-Lowry (**Anexo 5**). Para esto, se prepararon estándares de concentración conocida, a partir de Albumina Sérica Bovina diluida en agua destilada. Se prepararon los estándares partiendo de un Stock, con concentración teórica de 3mg/mL de albumina, en agua destilada. De aquí se realizaron diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ , hasta  $\frac{1}{64}$  obteniendo como estándar final uno de concentración teórica de 0,083mg/mL. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro marca *Shimadzu*, a 610nm. Una vez utilizados los estándares, estos eran almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$

Para realizar la grafica de la curva se utilizó el programa Microsoft Excel, graficando cada uno de los promedios de las absorbancias obtenidas por cada duplicado de estándar. Se calculó el error estándar en cada punto teniendo en cuenta las mediciones obtenidas, para determinar la variación entre duplicados. Se determinó la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación.

Teniendo elaborada la curva de determinación de concentración de proteína, se procedió a realizar la determinación de proteínas en las muestras de los participantes en este estudio. Se siguió el método de Folin-Lowry (**Anexo 4**), realizando la medición de cada muestra por duplicado. Se calcularon los promedios de las absorbancias obtenidas por cada duplicado y este valor fue

reemplazado en la ecuación de la recta, proveniente de la curva, en donde el valor para determinar era la concentración de proteína.

#### **5.3.4. Determinación de la actividad enzimática en lisado celular.**

Para realizar la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa Se siguió el método . **(Anexo 6)**.

Se prepararon 10mL de sustrato que contenía 0,0017g de 4-metillumbeliferil- $\beta$ -D-Galactopiranosido, 0,0584g de Cloruro de Sodio en 10mL de buffer acético-acetato 0,1M, pH 4,0.

El buffer Glicina-Carbonato pH 9,8, 0,17M se preparó a volumen de 500mL, conteniendo 6,3g de Glicina y 9,0g de Carbonato de Sodio. Este es el reactivo de parada de la reacción.

Los ensayos de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa se comenzaron siguiendo la técnica sin modificación alguna. Todas las determinaciones de actividad catalítica de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, fueron realizadas por duplicado, triplicado o cuaduplicado dependiendo de la cantidad de muestra disponible, de un mismo individuo para el estudio. Una vez logradas determinaciones de actividad de la enzima en muestras de los participantes, con un coeficiente variación intra ensayo no mayor al 10%, se comenzaron a realizar cambios en el volumen de reactivos, pasando de un volumen final de 1,5mL a uno de 200 $\mu$ L ajustando la cantidad de proteína por ensayo entre 0,0030-0,0045mg. La variación de volumen fue del sustrato de 100 $\mu$ L a 15 $\mu$ L. El volumen de muestra de 100 $\mu$ L a 15 $\mu$ L y el buffer de parada de 1300 $\mu$ L a 170 $\mu$ L, teniendo como volumen final 200 $\mu$ L.

Para la lectura de la fluorescencia emitida por cada reacción, se utilizó el Fluorómetro *Modulus* (Turner BioSystems) que tiene una capacidad de detección de 6 ppt.

#### **5.4 Recolección de la información**

La información de los voluntarios (datos demográficos, epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y resultados del estudio) se recolectarán a través de una encuesta (**Anexo 7**).

#### **5.5 Análisis de la información**

##### **5.5.1 Cálculo para determinación de proteína.**

Para la determinación de la concentración de proteína total presente en las muestras de los participantes en este estudio, se utilizó el método de Folin-Lowry.

A partir de la curva de calibración de proteína se obtuvo la ecuación de la recta, que permitió calcular la concentración de proteína en las muestras así:

$y = 0,283x + 0,002$ , en donde  $x$  será el valor de la concentración a determinar y  $y$  será el valor del promedio de absorbancia de la muestra a analizar.

##### **5.5.2 Cálculo para determinación de actividad enzimática**

Para el cálculo de actividad enzimática se usó una curva de concentración de 4-MU vs Unidades de Fluorescencia emitidas por el

fluorocromo, que permitió establecer el valor de fluorescencia correspondiente a 1 nmol de 4 MU a ser utilizado en la fórmula final de cálculo.

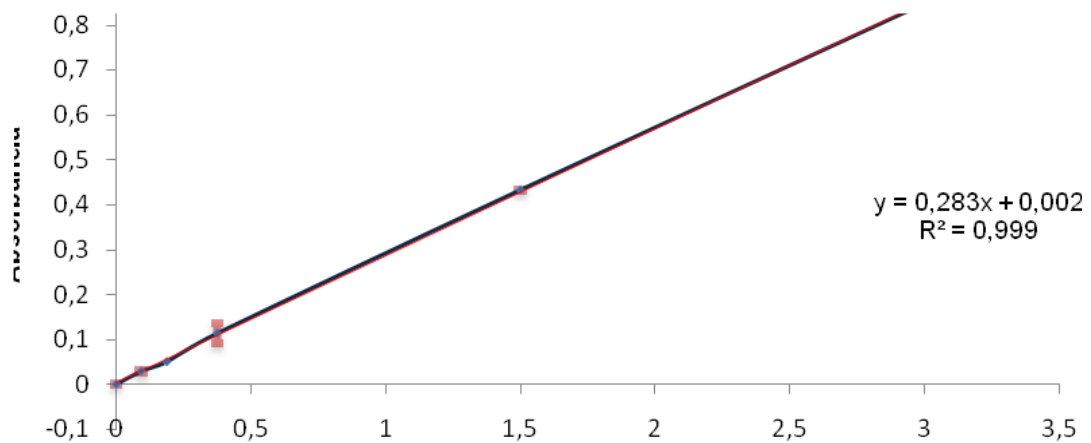
$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{\text{fluorescencia (muestra - blanco)} \times 3}{\text{nmol/hr/mg} \quad \text{mg de proteína por ensayo} \times \text{fluorescencia de 1 nmol de 4 - MU}}$$

## **RESULTADOS**

### ***6.1 Determinación de Proteína Total***

Los resultados obtenidos corresponden a las diferentes determinaciones realizadas a cada muestra por duplicado obteniendo el resultado de concentración de proteína en la muestra a partir de la curva de proteína realizada según lo descrito en la metodología aparte 5.3.3.

A continuación se muestra la curva de proteína, en donde se grafican los promedios de absorbancia de los duplicados de cada patrón, partiendo de un stock de 3mg/mL. La curva ideal debe presentar un coeficiente de correlación muy cercano a 1, indicando que los datos realmente muestran una tendencia lineal. Se halla el error estándar mostrado por los datos de absorbancia de cada conjunto de mediciones de la muestra. **(Figura 4).**



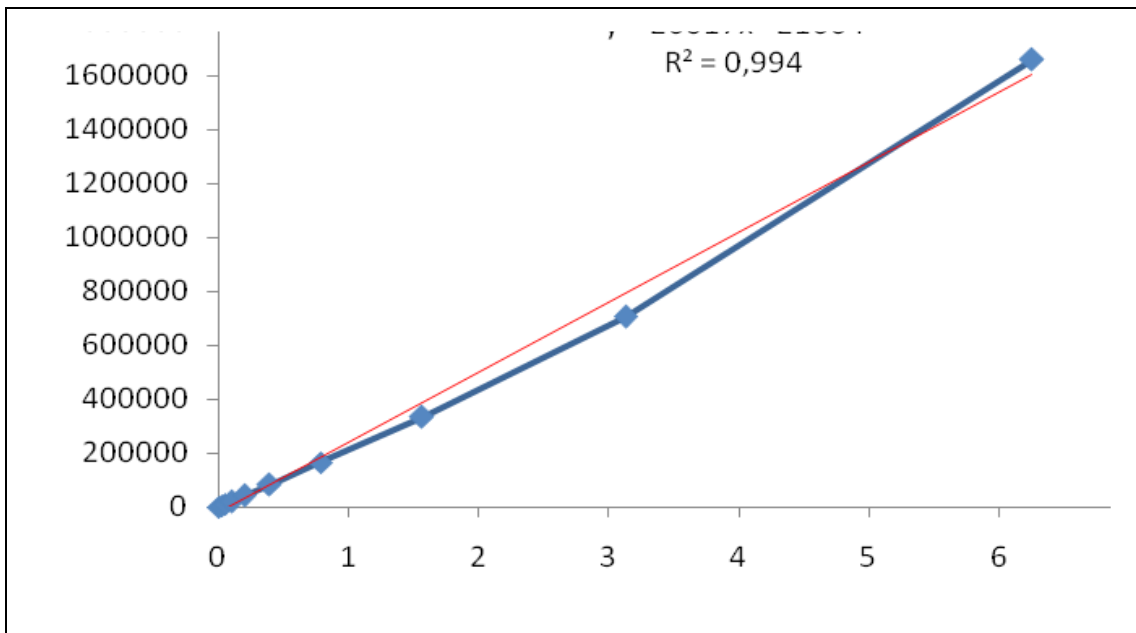
**Figura 4.** Curva para determinación de concentración de proteínas por el método de Folin-Lowry.

## **6.2 Determinación de Actividad Enzimática**

Para la determinación enzimática se siguió la metodología indicada en el numeral 5.3.4., realizando los cálculos de actividad enzimática aplicando la fórmula establecida por el método original.

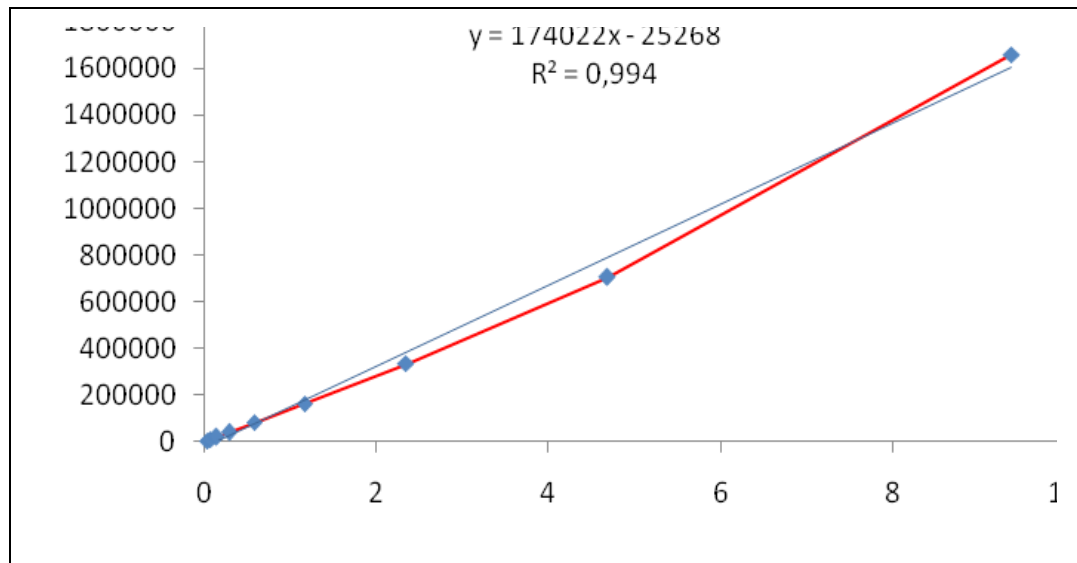
Para obtener el dato de la fluorescencia de 1nmol de 4-MU, se realizó una curva de calibración de 4-metilumbiliferona (4-MU). Esto con el fin de dar un

dato más apropiado en cuanto al comportamiento de un estándar de fluorescencia. **(Figura 5).**



**Figura 5.** Curva de concentración de Unidades de fluorescencia emitidas por cada estándar de 4-MU vs. 4-MU en unidades de  $\mu\text{M}$

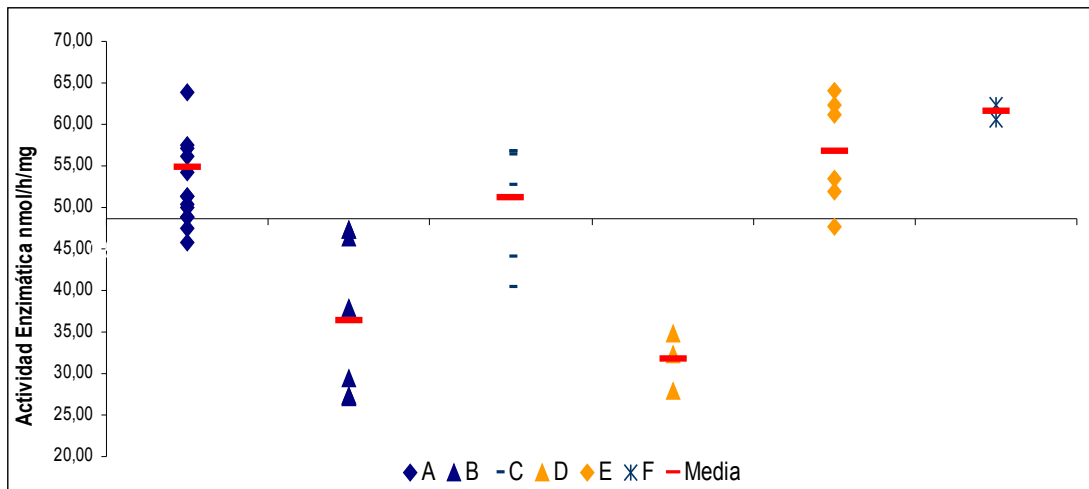
Dado que el resultado de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa se reporta en nmol de sustrato fluorescente por hora, por miligramo de proteína, la curva se convirtió para que la relación fuera de unidades de fluorescencia emitidas por nano moles de 4-metillumbiliferona **(Figura 6).**



**Figura 6.** Curva de correlacion de Unidades de fluorescencia emitidas por cada nmol de 4-MU.

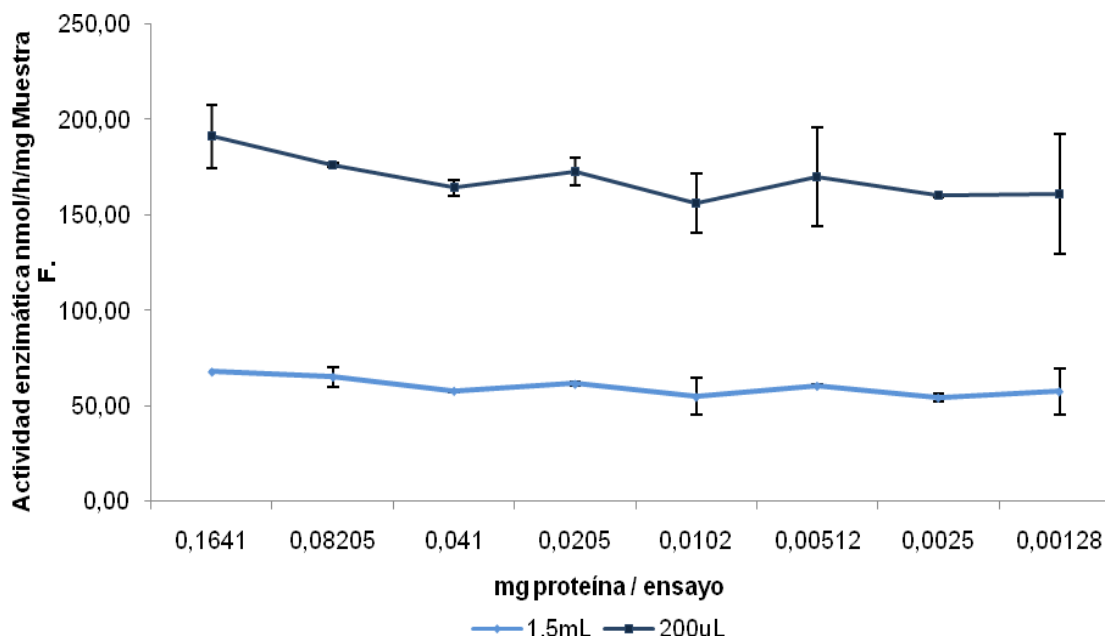
Para los ensayos realizados para la determinación de la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa según el método original propuesto por Shapira y colaboradores, (Volumen final de reacción 1,5ml, proteína por ensayo 0,020 a 0,030mg), se observaron valores de actividad enzimática entre 25 y 65 nmol/mg/h aproximadamente (**Figura 7**), presentándose una media de actividades de 48,69 nmol/mg/h.





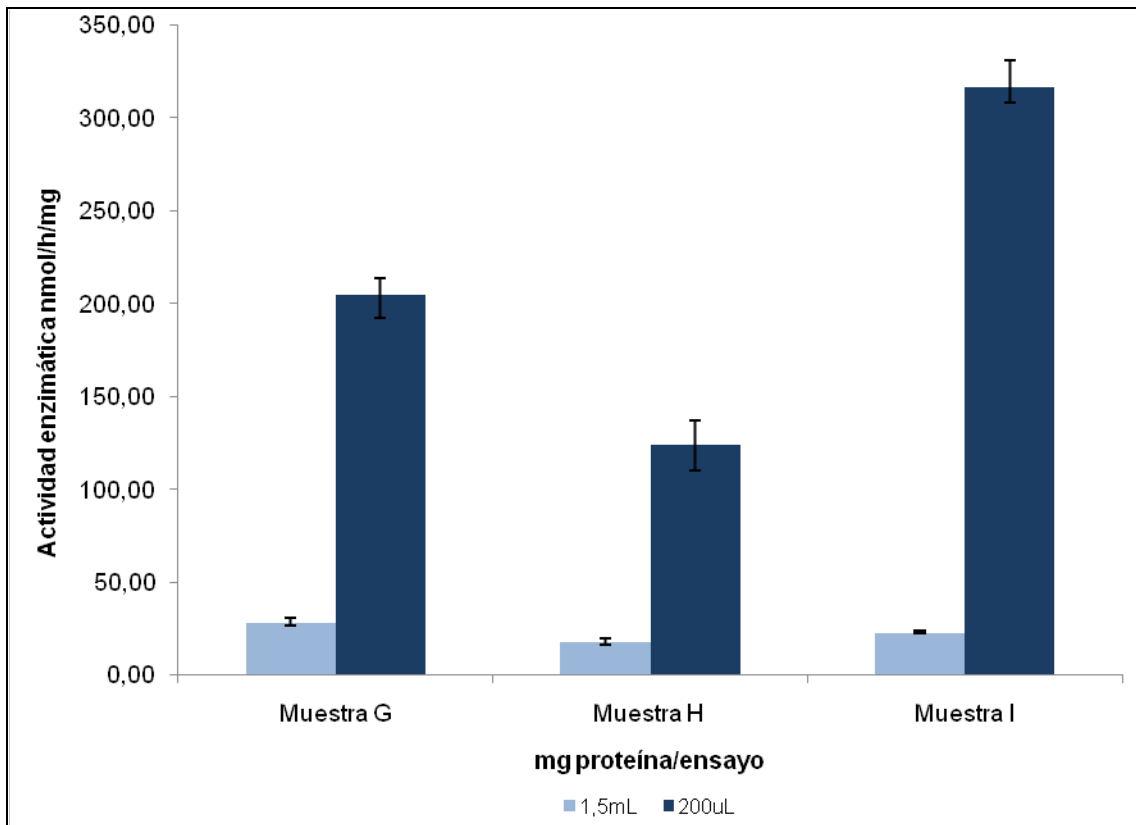
**Figura 7. Actividad enzimática de  $\beta$ -Galactosidasa en diferentes muestras siguiendo la metodología Shapira 1988.** En la grafica se observan los resultados para las muestras A, B, C, D, E y F según lo indicado por las figuras llevando a cabo las determinaciones a volumen final de reacción de 1,5mL y proteína por ensayo entre 0,020 a 0,030 mg. En rojo se indica la media de los datos obtenidos para cada muestra. El eje X corta en el eje Y, en 48,69 que corresponde a la media de los datos obtenidos del conjunto de muestras.

Luego se procedió a hacer variaciones de volumen final de reacción, pasando de un volumen de 1,5mL a un volumen de 200 $\mu$ L. Para estos ensayos se determinó la concentración de proteína presente en la muestra y se procedió a realizar diluciones seriadas de la muestra hasta un nivel bajo, para hacer por cada dilución la determinación de actividad enzimática. Estas determinaciones se hicieron a volúmenes de reacción de 1,5mL y 200 $\mu$ L para diferentes muestras (**Figura 8**).



**Figura 8. Actividad enzimática de  $\beta$ -Galactosidasa aplicando variaciones en volumen final de reacción y miligramos de proteína en la muestra F.** En la grafica se observa los resultados para la muestra F llevando a cabo las determinaciones a volumen final de reacción de 1,5mL y 200 $\mu$ L. Por cada dilución hecha en la muestra se hizo determinación de actividad enzimática.

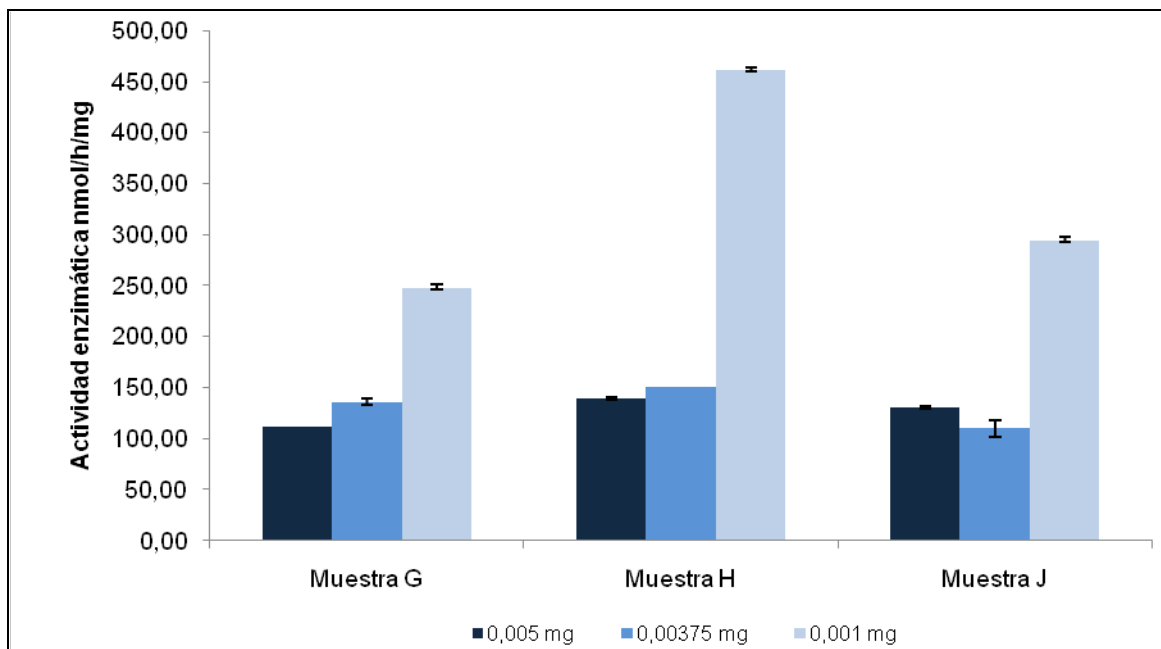
En las muestras **G** y **H** e **I**, se llevaron a cabo comparaciones entre los resultados obtenidos de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa a volumen final de 1,5mL y 200 $\mu$ L, variando además los miligramos de proteína contenidos en cada experimento (**Figura 9**).



**Figura 9. Actividades enzimáticas de  $\beta$ -Galactosidasa en la muestras G, H e I a diferentes volúmenes finales de reacción y a diferentes miligramos de proteína.** Para la muestra **G**, la cantidad de proteína en el ensayo para 1,5mL es de 0,02515mg y para 200 $\mu$ L es de 0,0075mg. Para la muestra **H**, a volumen final de 1,5 mL, la proteína es de 0,02287mg y para 200 $\mu$ L es de 0,0068mg. En la muestra **I**, a un volumen de 1,5mL la proteína por ensayo es de 0,0344mg y para un volumen de 200 $\mu$ L es de 0,0051mg.

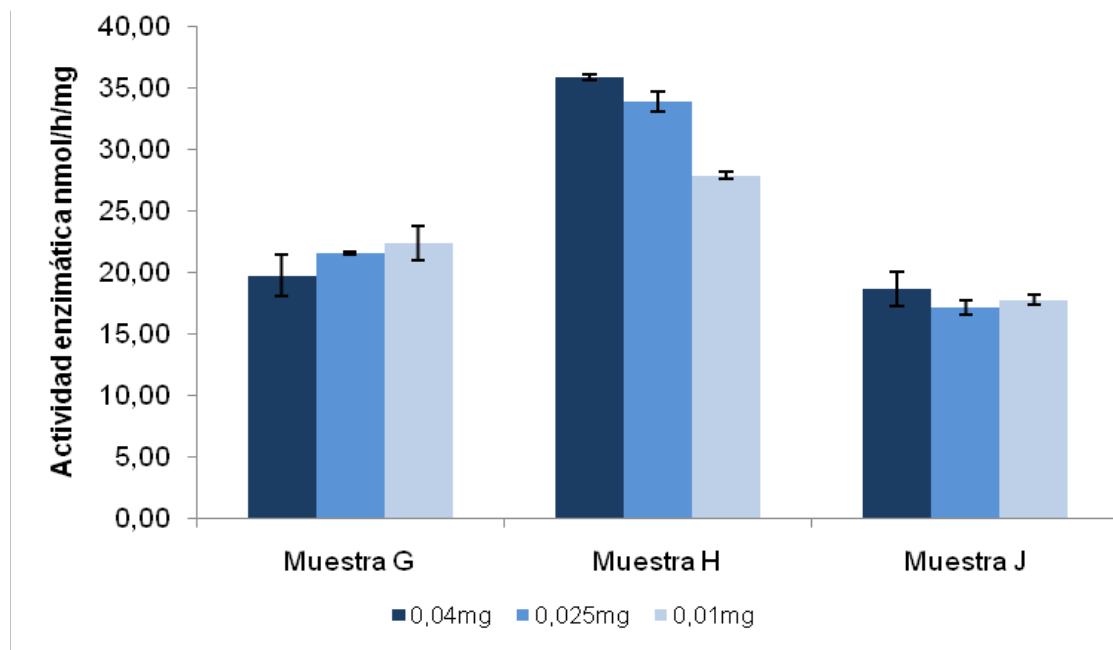
Se realizaron determinaciones de actividad enzimática para ver el comportamiento de la enzima, manteniendo diferentes muestras en un mismo rango de proteína por cada ensayo en volúmenes de 1,5mL (**Figura 10**) y 200 $\mu$ L (**Figura 11**).

Para una misma muestra se realizaron mediciones de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa teniendo en cuenta la cantidad de proteína puesta en cada volumen final de reacción, para observar el comportamiento a niveles altos y bajos, sugeridos por Shapira y col. Para el ensayo a volumen final de 1,5mL, el rango sugerido para la proteína por ensayo está entre 0,020 - 0,030mg y para un volumen final de 200 $\mu$ L proporcionalmente, se sugirió un rango de 0,003 – 0,0045mg.



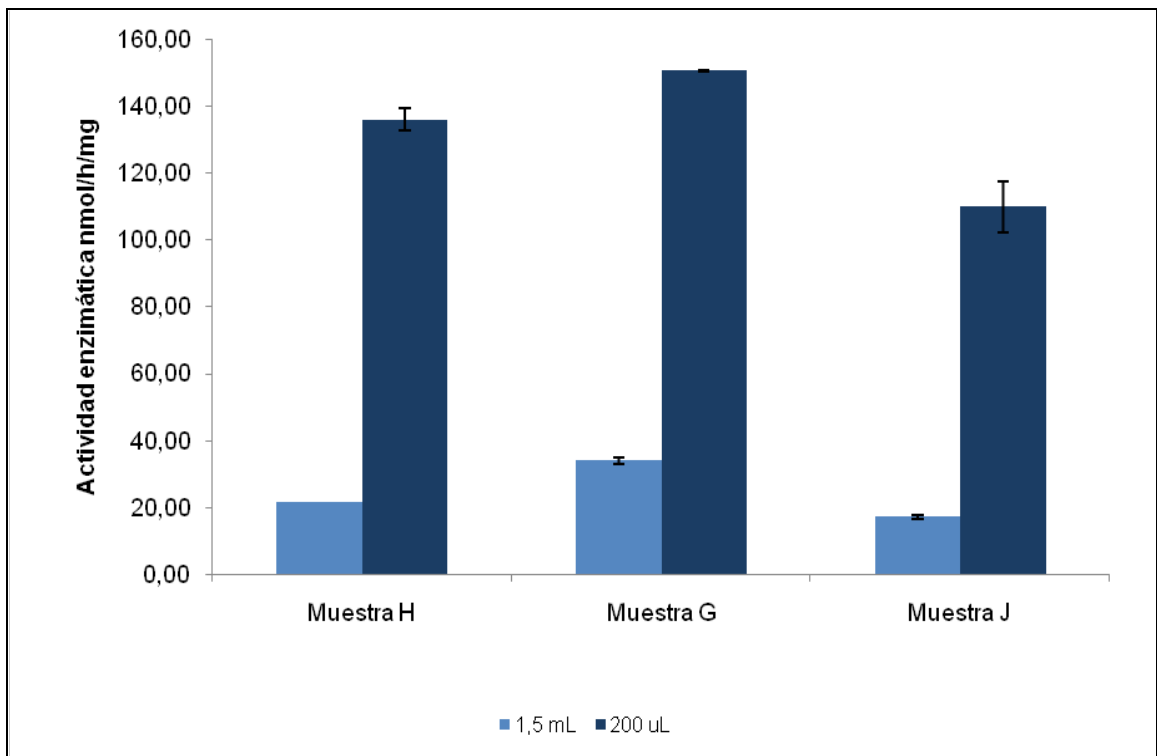
**Figura 10. Actividades enzimáticas de  $\beta$ -Galactosidasa en la muestras G, H y J a diferentes miligramos de proteína.** En la gráfica se observan los resultados obtenidos de las

determinaciones enzimáticas realizadas por duplicado modificando la cantidad de proteína presente en cada ensayo manteniendo un volumen final de reacción constante a 1,5mL.



**Figura 11. Actividades enzimáticas de  $\beta$ -Galactosidasa en la muestras G, H y J a diferentes miligramos de proteína.** En la gráfica se observan los resultados obtenidos de las determinaciones enzimáticas realizadas por duplicado modificando la cantidad de proteína presente en cada ensayo manteniendo un volumen final de reacción constante, es decir a 200 $\mu$ L.

Se hace una comparación entre los resultados obtenidos de actividad enzimática con las muestras **G**, **H** y **J** a volumen final de reacción de 1,5mL y 200 $\mu$ L, manteniendo la cantidad de proteína para cada ensayo dentro del rango sugerido. (**Figura 12**).



**Figura 12. Actividades enzimáticas de  $\beta$ -Galactosidasa en la muestras G, H y J a diferentes volúmenes finales de reacción.** En la gráfica se observan los resultados obtenidos de las determinaciones enzimáticas realizadas por duplicado modificando el

volumen final de reacción, manteniendo la cantidad de proteína por ensayo en el rango sugerido para cada volumen.

## **DISCUSIÓN**

La enzima  $\beta$ -Galactosidasa está localizada en los lisosomas, por lo que fue necesario el rompimiento de las membranas plasmáticas y lisosomales de los leucocitos obtenidos de cada muestra de los individuos participantes en este estudio, para luego ser almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento en que iba a ser analizada. Este rompimiento se realizó por sonicado u ondas de ultrasonido que producen una intensa agitación, destruyendo las membranas celulares .

En estudios previos realizados en el IEIM, se determinó que una vez descongelada una muestra para realizar los ensayos de determinación de proteína total en la muestra y de medición de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, era necesario llevar a cabo todo el estudio en el menor tiempo posible, ya que si se almacena una muestra que no se había usado por completo a  $-20^{\circ}\text{C}$  luego del sonicado, la enzima que había sido liberada en la solución, era desestabilizada por acción de temperatura detectándose en la pérdida de su actividad. En algunos de los ensayos realizados en muestras descongeladas y mantenidas de nuevo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por más de 12 horas, se evidenció una pérdida en su actividad de 30-50%. Se pudo observar además que había pérdida en la actividad enzimática de la  $\beta$ -Galactosidasa en muestras que luego de ser usadas eran mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$  por más de 12 horas, haciéndose evidente la pérdida de fluorescencia en el ensayo.

Para la determinación de proteína total por muestra, se utilizó el método de Folin-Lowry , que permite medir niveles de proteína por ensayo de 1 – 200 $\mu\text{g}$ .

Esto hace de la técnica la más apropiada, ya que detecta dentro del rango establecido para la concentración de proteína requerida, por el método original (0.020-0.030 mg de proteína por ensayo) , que se siguió para la determinación de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa a un volumen de 1,5mL.

Teniendo en cuenta los niveles de proteína total en cada muestra analizada, se determinó la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa. El cálculo de la actividad de la enzima se realizó utilizando la fórmula matemática propuesta por el método original . Para obtener el dato de la fluorescencia de un nmol del compuesto fluorogénico 4-MU, se uso una curva que relaciona las unidades de fluorescencia emitidas por cada nmol del fluorocromo 4-metillubiflerona, resultante del rompimiento del enlace que une el 4-MU con el  $\beta$ -D-Galactósido en el sustrato análogo para esta enzima el 4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-Galactósido 0.5mM, Esta curva permite que sea tomada en cuenta para varios ensayos, haciendo control de calidad de la misma, cada vez que lo determine el laboratorio IEIM. Este control de calidad se practica midiendo las unidades de fluorescencia emitidas por un estándar de 4-MU de concentración conocida.

Los resultados de actividad enzimática obtenidos para la muestra **A, B, C, D, E y F** se muestran en la **figura 7** en donde se indica la dispersión de los datos alrededor de una media de actividad para todas las muestras. En estos primeros ensayos se realizaron varias mediciones de actividad en una misma muestra con el fin de establecer una buena precisión intra ensayo, manteniendo todas las condiciones originales, es decir a un volumen final de reacción de 1,5mL, y manteniendo la cantidad de proteína dentro del rango sugerido por el método original. Las actividades enzimáticas en estas muestras fue de 25 - 65 nmol/mg/h de proteína por ensayo, en concordancia con estudios realizados anteriormente en el IEIM para obtener valores de referencia. Los niveles de actividad en las muestras no entran dentro de los



valores de referencia establecidos por el método , es decir que a pesar de que los individuos no presentaban sospecha clínica de sufrir de Gangliosidosis  $G_{M1}$  o Morquio B (MPS IVB), la actividad enzimática presentada estaba por debajo de los valores de referencia en todos los casos. Esto debido a que los valores de referencia obtenidos para el método original, están elaborados con base en poblaciones diferentes.

Además es de tener en cuenta que cada laboratorio emplea metodologías diferentes, equipos para lectura de fluorescencia diferentes, por lo que es importante que se establezca un sistema propio para la determinación de actividad enzimática, teniendo en cuenta la tecnología y recursos disponibles.

Luego de obtener buena precisión intra ensayo, reflejado en coeficientes de variación intra ensayo menores al 15% se procedió a modificar el volumen final de reacción al que se llevaron los diferentes ensayos realizados en las muestras, es decir, se realizaron ensayos en donde se pudiera comparar el comportamiento de la enzima al volumen final de 1,5mL y a 200 $\mu$ L. Los resultados obtenidos de estos ensayos se muestran en la **figura 8**, en donde se hizo el análisis de la muestra **F**, se hace la comparación de las actividades enzimáticas obtenidas a un volumen final de 1,5mL y 200 $\mu$ L. En estos ensayos la cantidad de proteína que se manejo fue por diluciones partiendo de la más concentrada hasta alcanzar una dilución de la cantidad de proteína 10 veces por debajo de la sugerida por el método. Como resultado se obtiene que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las actividades obtenidas intra ensayo aplicando estas variaciones a 1,5mL y a 200 $\mu$ L de volumen. El coeficiente de variación intra ensayo en este caso no fue mayor al 20% para los ensayos tanto a 1.5mL como a 200 $\mu$ L, indicando que se realizaron las mediciones con una buena precisión. En estos resultados la actividad obtenida a 200  $\mu$ L aumenta entre 4-6 veces en comparación con la obtenida a volumen de 1,5 mL, debido a que la técnica

de fluorescencia utilizada en un menor volumen, es decir utilizando una celda de menor espesor, y con base en consideraciones respecto al trayecto óptico, hace que el haz de luz que incide sobre la especie fluorescente sea mayor, expresándose en una mayor emisión de fluorescencia.

En las muestras **G**, **H** e **I**, se realizaron mediciones de actividad de  $\beta$ -Galactosidasa en ensayos por duplicado, con el fin de establecer si en otras muestras también se detectaba un aumento en la actividad comparando el volumen final de reacción de 1,5mL y 200 $\mu$ L. Además en este ensayo se varió la cantidad de proteína presente en 200 $\mu$ L, para determinar el rango en el que se debería mover la actividad basándose en las proporciones de sustrato y muestra a 1,5mL. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9**, en donde se observa que la actividad a 1,5mL es estable entre muestras ya que el rango de proteína en el que se mueve el ensayo esta dentro del requerido por el sistema; mientras que las reacciones a 200 $\mu$ L muestran que hay variaciones debido a que aquí todavía el rango de proteína no es el correcto, es decir es demasiado alto y la cantidad de sustrato que hay presente en el ensayo es muy baja para que la enzima alcance su velocidad máxima.

Se calculó el rango en el que debe estar la proteína a 200 $\mu$ L proporcionalmente con la cantidad de sustrato, estando entre 0,0030 – 0,0045mg. Esto con el fin de realizar determinaciones enzimáticas en las muestras, que para este caso fueron las **G**, **H** y **J**, y de esta manera comprender el comportamiento de la actividad en este rango. Lo mismo se hizo para realizar el ensayo a un volumen final de 1,5mL poniendo la proteína dentro del rango establecido. También se hicieron mediciones de actividad que tuvieran niveles de proteína para 1,5mL y para 200 $\mu$ L, por encima del rango establecido y en niveles por debajo, en cada muestra por duplicado para verificar que los datos concordaban. Estos datos se muestran en la **figura 10**, en donde se comparan los resultados obtenidos en las tres

muestras analizadas a 1,5mL de volumen final de reacción y teniendo en cuenta niveles de proteína por encima, en el rango establecido (0,020 – 0,030mg) y por debajo del rango. Estos resultados muestran que a la misma cantidad de proteína la actividad varía de acuerdo a la concentración y la actividad propia de la enzima presente en la muestra de cada individuo. Los valores de actividad presentes para este volumen están dentro del rango de referencia que se ha establecido para el IEIM.

Lo mismo se realizó para ensayos a 200 $\mu$ L, en donde se establecieron niveles de proteína en el ensayo por encima, en el rango calculado (0,003 – 0,0045mg) y por debajo de dicho rango. Los resultados de actividad enzimática obtenidos se muestran en la **figura 11** en donde se estudiaron las mismas muestras anteriormente analizadas (**G**, **H** y **J**). Los resultados muestran que a este volumen la actividad aumenta entre 4 a 6 veces, comparada con la actividad en la misma muestra a volumen final de 1,5mL. Se evidenció que en las muestras la actividad enzimática se mantiene dentro de un rango entre 100 – 160 nmol/h/mg de proteína por ensayo. Los resultados obtenidos dentro del rango sugerido a 1,5mL y para 200 $\mu$ L para las mismas muestras se muestran en la **figura 12**.

Con base en los resultados, se sugiere mantener los niveles de proteína específicos por reacción, es decir, para la determinación de actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa para un volumen final de reacción de 1,5mL, utilizando 0.020-0.030 mg de proteína por ensayo.

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante continuar los estudios con miras a establecer valores de referencia propios del IEIM, llevando a cabo ensayos enzimáticos a 200 $\mu$ L, ya que como se demostró, la actividad aumenta y es necesario evaluar un número de muestra más grande y representativo de la población que no tenga sospecha de Gangliosidosis  $G_{M1}$  o Síndrome de Morquio B (MPS IVB) y de pacientes que estén cursando con

alguna de las enfermedades relacionadas con la deficiencia o inactividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa o que tengan sospecha de padecerlas.

El aumento de la actividad en este estudio preliminar permitirá evaluar de manera más eficiente, la diferencia de actividad entre individuos sanos y pacientes, ya que la diferencia en porcentaje de actividad es mucho mayor, teniendo en cuenta además la evaluación de muestras de pacientes con deficiencia en actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa.

Aunque en este estudio fue imposible contar con la participación de personas que fueran diagnosticadas o tuvieran sospecha clínica de padecer Gangliosidosis  $G_{M1}$  o Morquio B, fue importante lograr entender el comportamiento de determinada muestra frente a los diferentes cambios del método original, como la variación de la concentración de proteína y el volumen de reactivos, a partir de muestras de personas aparentemente normales, para lo cual el uso de un fluorómetro de última generación permitió medir fluorescencia emitida a pequeños volúmenes de reacción.

## CONCLUSIONES

- Se ensayaron las modificaciones de la técnica para la determinación de la actividad catalítica de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa a partir de muestras de leucocitos obtenidos de personas que voluntariamente participaron de este estudio, relativas tanto a disminución de volúmenes de reactivos (modificados de 100  $\mu$ L a 15  $\mu$ L) como a concentración de proteínas en la muestra (modificada de 0,020mg-0,030mg a 0,0030-0,0045mg).
- En lo relativo a la precisión intra ensayo se lograron coeficientes de variación porcentual del orden de 10%, lo que indica una aceptable repetibilidad.
- En lo relativo a sensibilidad de la técnica se encontraron incrementos del orden de 4 a 6 veces, en la actividad obtenida con volúmenes finales de 200 $\mu$ L respecto a la obtenida a un volumen final 1,5 mL.
- Aprovechando la disponibilidad de un equipo que permite el uso de volúmenes muy bajos y una mayor sensibilidad en la lectura se establecieron los parámetros para comenzar a disminuir los volúmenes de muestra y sustrato para esta y otras enzimas.

## RECOMENDACIONES

- Efectuar un diseño de experimentos encaminado a optimizar las concentraciones de proteína y de volúmenes de reactivos, para estandarizar la metódica, para asegurar la cinética de orden cero, y para fijar condiciones de trabajo para determinación de actividad enzimática en otras enzimas relacionadas con los EIM.
- Continuar los estudios para la determinación de actividad catalítica en otras enzimas lisosomales involucradas con los errores innatos del metabolismo, modificando las técnicas ya establecidas para llevar a cabo ensayos para volúmenes de 200 $\mu$ L.
- Una vez estandarizada la técnica, y aplicada sobre muestras representativas de neonatos sanos y enfermos, proponer y determinar nuevos valores de referencia. Aquí se ha de tener en cuenta que las actividades enzimáticas detectadas en ensayos realizados a 200 $\mu$ L de volumen final de reacción, se han de aplicar a un número de muestra más grande y representativo de la población que no tenga sospecha de Gangliosidosis G<sub>M1</sub> o Síndrome de Morquio B (MPS IVB) y de pacientes que estén cursando con alguna de las enfermedades relacionadas con la deficiencia o inactividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa o que tengan sospecha de padecer dichas enfermedades.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1.**

***CONSENTIMIENTO INFORMADO, PARA EL ACCESO A LA INFORMACIÓN  
Y TOMA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD  
CATALÍTICA DE LA ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN PERSONAS  
VOLUNTARIAS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE MORQUIO B O  
GANGLIOSIDOSIS  $G_{M1}$ .***

#### **Investigadores Responsables:**

Luis Alejandro Barrera, Ph.D., Director Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana

Olga Yaneth Echeverri, Bacterióloga del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo y Docente de la Pontificia Universidad Javeriana

El presente documento ha sido realizado de acuerdo con el artículo 15 de la resolución número 008430 del 4 de octubre de 1993 emitida por el ministerio de salud de la república de Colombia (Anexo 7), que contiene las normas técnicas, administrativas y científicas para la investigación médica en Colombia

#### **Justificación y Objetivos:**

Se me ha solicitado por parte del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM), de la Pontificia Universidad Javeriana, el permitir que sea conocida mi información médica (o la de mi hijo), y muestras, para el

análisis de la actividad enzimática de la  $\beta$  Galactosidasa en personas normales o en pacientes colombianos con enfermedad de Morquio B o Gangliosidosis GM1. Este estudio hace parte de un esfuerzo por realizar un mejor diagnóstico de estas enfermedades

### **Metodología**

Conozco que el análisis mencionado se realizará en sangre heparinizada para la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$  Galactosidasa.

### **Riesgos**

Según se me ha explicado, no existen riesgos para mi, (para mi hijo), asociados con la participación en este estudio. La información clínica será obtenida mediante la revisión de mis (los) registros médicos (de mi hijo) o mediante los cuestionarios de calidad de vida. Las únicas molestias que pueden encontrarse en este estudio pueden ser: 1) completar un cuestionario y 2) las molestias asociadas con la toma de la muestra de sangre (irritación leve de la zona intervenida).

En caso que los procedimientos realizados en este estudio ocasionen algún daño a mi persona (mi hijo), conozco que el IEIM pondrá a mi disposición el tratamiento y resarcimiento de los problemas causados.

### **Beneficios**

Entiendo que es posible que no haya beneficios directos para mi (mi hijo) derivados de la participación en este estudio, los hallazgos pueden aportar información valiosa para el mejoramiento de la técnica de diagnóstico de la enfermedad Gangliosidosis GM1 y de la enfermedad Morquio B y su posible tratamiento.

### **Confidencialidad**



Entiendo que mi (la) identidad (de mi hijo), al igual que cualquier información obtenida asociada con el estudio será confidencial y no será revelada, excepto a aquellas personas asociadas a este proyecto. Entiendo que la confidencialidad será mantenida utilizando los números de identificación de las personas voluntarias y de los pacientes en lugar de los nombres. Si esta información es utilizada en publicaciones o reportes, este número de identificación será utilizado cuando los datos estén siendo analizados o reportados. Estos reportes, en que se oculta la identidad de los pacientes pueden ser compartidos con los médicos y científicos involucrados en la investigación de la enfermedad Gangliosidosis GM1 y de Morquio B pudiendo ser utilizados para realizar publicaciones de tipo científico.

Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria. La decisión de participar o no en el estudio, o la continuidad en el, de ninguna manera afectara la calidad de vida mía (de mi hijo).

Conozco que las pruebas que serán realizadas en este estudio (determinación de actividad enzimática) no tiene costo para mi (mi hijo).

En caso de necesitar más información respecto a este estudio y sus resultados preliminares, puedo contactar a cualquiera de las personas enunciadas a continuación, quienes se encargaran de responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que puedan surgir respecto a este estudio.

Luis Alejandro Barrera, Ph.D. Teléfono: 3208320 extensiones: 4086/4099.  
Bogotá, D.C.

Olga Yaneth Echeverri. Teléfono: 3208320 extensiones: 4086/4099. Bogotá,  
D.C.

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha:  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(Voluntario, paciente o representante legal) Cédula:  
\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha:  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(Testigo 1) Cédula: \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha:  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(Testigo 2) Cédula: \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2**

### ***OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS A PARTIR DE SANGRE HEPARINIZADA***

1. Tomar de 5 mL de sangre heparinizada (tapa verde), y verterlo en un tubo de aproximadamente de 15 mL. Agregar 2 mL de Dextran Heparina al 3%. Se mezclan estos dos componentes por inversión y se dejan en reposo por aproximadamente 30-45 minutos a temperatura ambiente.
2. Transcurrido el tiempo, se observaran dos fases, una de células rojas y otra en donde se encuentran los leucocitos suspendidos en el gradiente de Dextran Heparina.
3. Se toma la fase superior con ayuda de una pipeta, teniendo cuidado de no tomar muestra de la fase inferior de células rojas.
4. Se sirve en tubo de vidrio de 15 mL y se adiciona el doble de volumen de agua destilada. Se lleva a centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm. Se descarta sobrenadante, sin dejar salir el pellet de leucocitos que ha quedado en el fondo del tubo.
5. Se realizara un segundo lavado adicionando 1 cm<sup>3</sup> de agua destilada. Se agita en vórtex y se lleva a centrifugar de nuevo por 3 minutos a 3500 rpm.
6. Se descarta el sobrenadante. Si se observa un pellet de leucocitos, limpio, es decir sin restos de células rojas, este se reconstituye en 500 µL de agua destilada, en tubo cónico de 1.5 mL de volumen, previamente marcado con los datos de origen de la muestra.

7. Si observa que el pellet todavía no es el adecuado, repita el lavado hasta obtener un precipitado limpio.

### **ANEXO 3**

#### ***PREPARACIÓN DE LISADOS DE LEUCOCITOS POR SONICADO***

1. Introducir la punta del sonicador sin tocar las paredes ni el fondo del tubo cónico, que contiene la muestra de leucocitos en 500  $\mu$ L de agua destilada.
2. Seleccionar la amplitud (19%) evitando la turbulencia en el proceso de lisado dentro del tubo que contiene la muestra.
3. Se activa el sonicado en 3 intervalos de 5 a 10 segundos, verificando que no haya presencia de precipitados en la muestra. Al finalizar debe observarse una solución homogénea.
4. Para realizar el lisado de leucocitos en varias muestras, es necesario el lavado de la punta después de sonicar.
5. Los lisados obtenidos deben permanecer a 4°C de temperatura para evitar la degradación de la muestra si no han de ser procesados de inmediato.

## ANEXO 4

### *DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE FOLIN-LOWRY*

#### **Materiales**

- 10  $\mu\text{L}$  de muestra
- 100  $\mu\text{L}$  de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%
- 100  $\mu\text{L}$  de Reactivo de Cobre (50mL)
- Tartrato de Sodio y Potasio  $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (0.139g)
- Sulfato de Cobre  $\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (0.033g)
- Hidróxido e Sódio (1g)
- Carbonato de Sódio  $\cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (27g)
- 400  $\mu\text{L}$  de Reactivo de Folin Ciocalteu's 6.5%  $\text{V}/\text{V}$ .

#### **Procedimiento:**

1. En un tubo de vidrio se agregan 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 100  $\mu\text{L}$  de SDS 1%; se mezcla y se agregan 100  $\mu\text{L}$  de Reactivo de cobre.
2. Se mezcla de nuevo y se deja incubando por 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Transcurridos los 10 minutos, se adiciona a la mezcla anterior 400  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin Ciocalteu's 6.5 %.

4. Se mezcla y se incuba en baño María por 5 minutos a 56°C, y posteriormente se detiene la reacción colocando por 5 minutos el tubo en frío (-20°C).
5. Se leen las absorbancias en espectrofotómetro a 610 nm, y se determina la concentración de las muestras frente a la curva de calibración para determinación de concentración de proteínas. **Anexo 5**

## ANEXO 5

### ***Construcción Curva de calibración para determinación de proteínas***

Para realizar la curva de calibración de parte de una solución Stock de Albúmina al 0.3% (3mg/mL = 30 µg/30 µL).

1. En la tabla 6 se muestra el procedimiento de preparación de los estándares de proteína para la construcción de la curva de proteína

**Tabla 2.** Diluciones para la preparación de estándares de proteína.

<b>TUBO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Albúmina (3 mg/mL)</b>	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL
<b>Agua (mL)</b>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Factor de Dilución</b>	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<b>Concentración Final (mg/mL)</b>	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.093

2. Agregar 100 µL de SDS a cada tubo de reacción y mezclar.
3. Agregar 100 µL de reactivo de cobre a cada tubo de reacción, agitar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 400 µL de reactivo de Folin Ciocalteau's 6.5 % a cada tubo de reacción, mezclar.

5. Llevar los tubos a baño María por 5 minutos a 56°C y pasado este tiempo detener la reacción por cambio de temperatura, llevando los tubos por 5 minutos a -20°C.
6. Leer las absorbancias de cada tubo en espectrofotómetro a 610 nm.
7. Graficar las Absorbancias vs. las concentraciones teóricas de cada estándar. Determinar la ecuación de la recta y así calcular las concentraciones de proteína de las muestras de pacientes.



## ANEXO 6

### **DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA $\beta$ - GALACTOSIDASA EN LEUCOCITOS**

#### **Solución sustrato:**

- 4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-galactósido 0.5mM
- Buffer Acetato de Sodio – Acido Acético 0.1M, pH 4.0
- Cloruro de Sodio 0.1 M (5.84mg/mL)
- Buffer de Parada de reacción
- Buffer Glicina - Carbonato 0,17M, pH 9.8

#### **Procedimiento:**

1. La concentración de proteína requerida por muestra de leucocitos es de 0.020-0.030 mg/mL. Para esto se diluye la muestra, si la concentración de proteína en la muestra excede la concentración requerida para el ensayo.
2. Se preparan los tubos de reacción como lo indica la tabla 7. Cada muestra se procesará por duplicado.

**Tabla 3.** Procedimiento tubos de reacción.

	<b>Tubo Muestra</b>	<b>Tubo Blanco</b>
<b>Muestra (enzima)</b>	100 $\mu$ L	
<b>Solución Sustrato</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Incubar por 20 minutos a 37°C

<b>Buffer de Parada</b>	1,3mL	1,3mL
-------------------------	-------	-------

Agregar al tubo blanco 100µL de muestra de leucocitos.

Leer fluorescencia de los duplicados de cada reacción. a una longitud de onda de excitación de 360 nm y a una longitud de onda de emisión de 415 nm.

3. Leer fluorescencia de una solución de trabajo que está compuesta de 4-methylumbelliferona (4-MU), en solución con buffer Glicina-Carbonato con el fin determinar la fluorescencia de un nmol de sustrato.

Calcular la actividad presente en la muestra así:

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{\text{fluorescencia (muestra - blanco)} \times 3}{\text{nmol/hr/mg} \quad \text{mg de proteína por ensayo} \times \text{fluorescencia de 1 nmol de 4 - MU}}$$

## ANEXO 7

### FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### I. INFORMACIÓN GENERAL

Encuesta No. \_\_\_\_\_

Fecha de ingreso al estudio

AAAA/MM/DD

Nombre Completo

\_\_\_\_\_

Identificación \_\_\_\_\_

Edad (años) \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento \_\_\_\_\_

Lugar de procedencia \_\_\_\_\_

Acudiente \_\_\_\_\_ Cedula \_\_\_\_\_

Nombre del Padre \_\_\_\_\_

Nombre de la Madre \_\_\_\_\_

Dirección residencia \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

#### 2. ANTECEDENTES

En su familia hay antecedentes de enfermedades hereditarias: SI \_\_\_ NO

—

Cuales \_\_\_\_\_

Toma algún medicamento: SI \_\_\_ NO \_\_. Cual (es)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

—

Sigue alguna dieta especial: SI \_\_\_ NO \_\_. Cual:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

—

## **ANEXO 8**

### **REPÚBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD**

#### ***RESOLUCIÓN N° 008430 DE 1993***

***(4 DE OCTUBRE DE 1993)***

Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

#### **EL MINISTRO DE SALUD**

En ejercicio de sus atribuciones legales en especial las conferidas por el Decreto 2164 DE

1992 y la Ley 10 de 1990

#### **CONSIDERANDO**

· Que el artículo 8o de la Ley 10 de 1990, por la cual se organiza el Sistema Nacional de Salud y se dictan otras disposiciones, determina que corresponde al Ministerio de Salud formular las políticas y dictar todas las normas científico- administrativas, de obligatorio cumplimiento por las entidades que integran el Sistema, Que el artículo 2o del Decreto 2164 de 1992, por el cual se reestructura el Ministerio de Salud y se determinan las funciones de sus dependencias, establece que éste formulará las normas científicas y administrativas pertinentes que orienten los recursos y acciones del Sistema.

**RESUELVE:**  
**TITULO II**  
**DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**  
**CAPITULO 1**  
**DE LOS ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES**  
**HUMANOS**

**ARTICULO 5.** En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar.

**ARTICULO 6.** La investigación que se realice en seres humanos se deberá desarrollar conforme a los siguientes criterios:

- a) Se ajustará a los principios científicos y éticos que la justifiquen.
- b) Se fundamentará en la experimentación previa realizada en animales, en laboratorios o en otros hechos científicos.
- c) Se realizará solo cuando el conocimiento que se pretende producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo.
- d) Deberá prevalecer la seguridad de los beneficiarios y expresar claramente los riesgos (mínimos), los cuales no deben, en ningún momento, contradecir el artículo 11 de esta resolución.
- e) Contará con el Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la presente resolución.
- f) Deberá ser realizada por profesionales con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano bajo la responsabilidad de una

entidad de salud, supervisada por las autoridades de salud, siempre y cuando cuenten con los recursos humanos y materiales necesarios que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.

g) Se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización: del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realice la investigación; el Consentimiento Informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.

**ARTICULO 7.** Cuando el diseño experimental de una investigación que se realice en seres humanos incluya varios grupos, se usarán métodos aleatorios de selección, para obtener una asignación imparcial de los participantes en cada grupo, y demás normas técnicas determinadas para este tipo de investigación, y se tomarán las medidas pertinentes para evitar cualquier riesgo o daño a los sujetos de investigación.

**ARTICULO 8.** En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo, sujeto de investigación, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

**ARTICULO 9.** Se considera como riesgo de la investigación la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio.

**ARTICULO 10.** El grupo de investigadores o el investigador principal deberán identificar el tipo o tipos de riesgo a que estarán expuestos los sujetos de investigación.

**ARTICULO 11.** Para efectos de este reglamento las investigaciones se clasifican en las siguientes categorías:

a) Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta

b) Investigación con riesgo mínimo: Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados en este Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución.

c) Investigaciones con riesgo mayor que el mínimo: Son aquellas en que las probabilidades de afectar al sujeto son significativas, entre las que se consideran: estudios radiológicos y con microondas, estudios con los



medicamentos y modalidades que se definen en los títulos III y IV de esta resolución, ensayos con nuevos dispositivos, estudios que incluyen procedimientos quirúrgicos, extracción de sangre mayor al 2% del volumen circulante en neonatos, amniocentesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores, los que empleen métodos aleatorios de asignación a esquemas terapéuticos y los que tengan control con placebos, entre otros.

**ARTICULO 12.** El investigador principal suspenderá la investigación de inmediato, al advertir algún riesgo o daño para la salud del sujeto en quien se realice la investigación. Así mismo, será suspendida de inmediato para aquellos sujetos de investigación que así lo manifiesten.

**ARTICULO 13.** Es responsabilidad de la institución investigadora o patrocinadora, proporcionar atención médica al sujeto que sufra algún daño, si estuviere relacionado directamente con la investigación, sin perjuicio de la indemnización que legalmente le corresponda.

**ARTICULO 14.** Se entiende por Consentimiento Informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

**ARTICULO 15.** El Consentimiento Informado deberá presentar la siguiente, información, la cual será explicada, en forma completa y clara al sujeto de investigación o, en su defecto, a su representante legal, en tal forma que puedan comprenderla.

a) La justificación y los objetivos de la investigación.

b) Los procedimientos que vayan a usarse y su propósito incluyendo la identificación de aquellos que son experimentales.

- c) Las molestias o los riesgos esperados.
- d) Los beneficios que puedan obtenerse.
- e) Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
- f) La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto.
- g) La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- h) La seguridad que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.
- i) El compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando.
- j) La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho, por parte de la institución responsable de la investigación, en el caso de daños que le afecten directamente, causados por la investigación.
- k) En caso de que existan gastos adicionales, éstos serán cubiertos por el presupuesto de la investigación o de la institución responsable de la misma.

**ARTICULO 16.** El Consentimiento Informado, del sujeto pasivo de la investigación, para que sea válido, deberá cumplir con los siguientes requisitos:

- a. Será elaborado por el investigador principal, con la información señalada en el artículo 15 de ésta resolución.
- b. Será revisado por el Comité de Ética en Investigación de la institución donde se realizará la investigación.
- c. Indicará los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación.
- d. Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal, en su defecto. Si el sujeto de investigación no supiere firmar imprimirá su huella digital y a su nombre firmará otra persona que él designe.
- e. Se elaborará en duplicado quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o su representante legal.

**PARÁGRAFO PRIMERO.** En el caso de investigaciones con riesgo mínimo, el Comité de Ética en Investigación de la institución investigadora, por razones justificadas, podrá autorizar que el Consentimiento Informado se obtenga sin formularse por escrito y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador de la obtención del mismo.

**PARÁGRAFO SEGUNDO.** Si existiera algún tipo de dependencia, ascendencia o subordinación del sujeto de investigación hacia el investigador que le impida otorgar libremente su consentimiento, éste deberá ser obtenido por otro miembro del equipo de investigación, o de la institución donde se realizará la investigación, completamente independiente de la relación investigador-sujeto.

**PARÁGRAFO TERCERO.** Cuando sea necesario determinar la capacidad mental de un individuo para otorgar su consentimiento, el investigador principal deberá acudir a un neurólogo, siquiatra o psicólogo para que evalúe

la capacidad de entendimiento, razonamiento y lógica del sujeto, de acuerdo con los parámetros aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la institución investigadora.

**PARÁGRAFO CUARTO.** Cuando se presuma que la capacidad mental de un sujeto hubiere variado en el tiempo, el Consentimiento Informado de éste o, en su defecto, de su representante legal, deberá ser avalado por un profesional (neurólogo, psiquiatra, psicólogo) de reconocida capacidad científica y moral en el campo específico, así como de un observador que no tenga relación con la investigación, para asegurar la idoneidad del mecanismo de obtención del consentimiento, así como su validez durante el curso de la investigación.

**PARÁGRAFO QUINTO.** Cuando el sujeto de investigación sea un enfermo psiquiátrico internado en una institución, además de cumplir con lo señalado en los artículos anteriores, será necesario obtener la aprobación previa de la autoridad que conozca del caso.

## **BIBLIOGRAFÍA**