



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

2 of
18

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CRITERIOS PARA EL ESTUDIO DE LA COMPARTIMENTACION
MEDIANA POR UN NUEVO SISTEMA DE TRANSPORTE PARA
ENZIMAS LISOSOMALES EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN
CULTIVO."

TESIS DE LICENCIATURA

Biología
RAUL BARRERA RODRIGUEZ

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION:	Pag.
I Endocitosis -----	11
A) Fagocitosis -----	1
B) Pinocitosis -----	1
C) Pinocitosis Absortiva -----	2
D) Descripción del Proceso -----	2
II Enfermedades por atesoramiento -----	6
III Antecedentes -----	10
Objetivos -----	11
MATERIAL Y METODOS	
Medio de cultivo de fibroblastos -----	12
Solución de verseno -----	12
Solución de tripsina -----	12
Fijador formol-calcio-acetona -----	12
Ensayos enzimáticos -----	13
Determinación de proteínas -----	13
Cultivo de fibroblastos -----	13
Purificación de enzimas -----	14
Ensayos de internalización y unión -----	15
Localización citoquímica de β -glucuronidasa internalizada -----	17
Incorporación de mucopolisacáridos -----	17
Fraccionamiento subcelular -----	18
Resultados -----	20
Discusión -----	33
Conclusión -----	37
Referencias -----	38

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Pag.

FIGURAS

Figura 1	Pinocitosis adsortiva -----	5
Figura 2	Ensayo de internalización de β -glucuronidasa -----	16
Figura 3	Cinetica de internalización de β -glucuronidasa bovina a diferentes tiempos. -----	25
Figura 4	Curvas de saturación de β -glucuronidasa bovina a concentraciones crecientes de enzimas adicionada por caja -----	26
Figura 5	Localización citoquímica de β -glucuronidasa bovina internalizada en fibroblastos humanos en cultivo -----	28
Figura 6	Distribución subcelular de β -glucuronidasa humana en comparación con β -hexosaminidasa endógena -----	29
Figura 7	Distribución subcelular de β -glucuronidasa bovina en comparación con β -hexosaminidasa endógena -----	30
Figura 8	Distribución de radioactividad asociada a MPS intracelulares en comparación con β -hexosaminidasa endógena -----	31
Figura 9	Pérdida de radioactividad de MPS intracelulares por efecto de β -glucuronidasa internalizada -----	32

TABLAS

Tabla 1	Efecto de mam-6-P sobre la internalización de β -glucuronidasa antes y después de autodigestión -----	24
Tabla 2	Constantes cinéticas del nuevo receptor en comparación con el receptor para mam-6-P -----	27

"CRITERIOS PARA EL ESTUDIO DE LA COMPARTIMENTACION
MEDIADA POR UN NUEVO SISTEMA DE TRANSPORTE PARA
ENZIMAS LISOSOMALES EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN
CULTIVO".

Raúl Barrera Rodríguez

Unidad de Genética de la Nutrición

Instituto de Investigaciones Biomédicas

U.N.A.M., 1986.

Introducción

I. Endocitosis.

Endocitosis es en general un término que se refiere al proceso por el cual las células ingieren materiales extracelulares, atrapándolos por medio de invaginaciones de la membrana plasmática, las cuales se desprenden de su superficie, dando lugar a la formación de vesículas intracelulares (1). La endocitosis ocurre ampliamente en Protozoa en donde el proceso presenta un obvio papel nutricional (2). En los organismos multicelulares fue primero identificado en macrófagos y otras células fagocíticas las cuales ingieren gran cantidad de partículas, que son conducidas al lisosoma para ser degradadas. Con la ayuda del microscopio electrónico se observó que el proceso endocítico no solo era una particularidad de estos tipos celulares, sino que la presentaban casi todas las células animales (2,3).

La actividad endocítica ha sido dividida en dos categorías: fagocitosis y pinocitosis.

A) Fagocitosis:

El término fagocitosis se utiliza para describir la ingestión de grandes partículas como microorganismos o restos celulares. Como marcadores para visualizar la fagocitosis se han utilizado partículas de latex, emulsiones de aceite, así como también organismos unicelulares como levaduras y bacterias, y en algunas ocasiones eritrocitos (3,6). La fagocitosis es característica de ciliados y de células macrofágicas en organismos pluricelulares, presentando una función nutricia en los primeros y de defensa en los segundos. El proceso fagocítico es inducido por la partícula que se va a ingerir, presentando diferentes requerimientos que la pinocitosis, y depende fuertemente del citoesqueleto y microfilamentos de la célula (1,3).

B) Pinocitosis:

El término pinocitosis es utilizado para describir la captación de casi todo tipo de partículas pequeñas contenidas en el líquido extracelular como material soluble (1,4-6). En este proceso la célula invagina partes pequeñas de la membrana plasmática, dando lugar a la formación de pequeñas vesículas que se presume contienen el material soluble y el fluido extracelular. Como marcadores para visualizar este proceso se han utilizado macromoléculas como sacarosa, polivinilpirrolidona (PVP), y más frecuentemente peroxidasa de rábano (1,5,6).

A su vez, la pinocitosis ha sido dividida en dos eventos denominados: pinocitosis fluida y pinocitosis adsorptiva o mediada por receptor. Estos términos hacen referencia a la forma en que las partículas son captadas por la célula. Así, en la pinocitosis fluida, las macromoléculas son captadas junto con el fluido extracelular a través de una vesícula pinocítica, mientras que en la pinocitosis adsorptiva, regularmente existe un reconocimiento y unión a un receptor presente en membrana plasmática.

La pinocitosis adsorptiva es reconocida como un mecanismo de concentración selectivo desarrollado por la célula para ingerir grandes cantidades de ligandos específicos sin tomar consecuentemente grandes cantidades de fluido extracelular (1,6).

C) Pinocitosis Adsorptiva:

La pinocitosis adsorptiva puede ser distinguida de la pinocitosis fluida por medio de los siguientes criterios:

- 1) Es un proceso saturable en función de concentraciones crecientes de ligando.
- 2) Es específico para un cierto tipo de ligando, y por lo tanto es susceptible de ser inhibido por el uso de inhibidores competitivos.
- 3) Es un proceso que depende de energía.
- 4) Tiene un poder de concentración en contra de un gradiente.

A la fecha más de trece sistemas de pinocitosis adsorptiva han sido descritos dentro de los que encontramos por ejemplo: el transporte de IgA a través de las células del intestino a la sangre de animales lactantes (7); la captación de factores de crecimiento (8,9,10), transferrina (11), enzimas lisosomiales (12-13), y LDL (14,19) por fibroblastos en cultivo; así también se conoce que algunos virus encapsulados (SFV) explotan este mecanismo de penetración a las células en el inicio de la infección (15).

D) Descripción del proceso (Fig.1) (16).

En el proceso de pinocitosis mediada por receptor, el ligando se une a un receptor específico en la superficie de la membrana plasmática, difundiendo en forma de un complejo a lo largo de la superficie de la membrana hacia regiones especializadas de la misma denominadas invaginaciones cubiertas ("coated pits"). Estas invaginaciones de 0.1 μ m de diámetro presentan en su cara citoplásmica una zona opaca cuando son vistas a microscopía

electrónica de transmisión. La cubierta citoplásmica está constituida por una familia de proteínas, dentro de las cuales la especie mayor presenta un peso molecular de 150,000 daltones y es denominada clatrina (17). La clatrina y las otras proteínas accesorias se autoensamblan en una estructura llamada trieskellion. Cuando estas invaginaciones han sido vistas al microscopio electrónico de barrido, dan la apariencia de estar contenidas en un cesto compuesto de un enrejado poligonal de hexágonos y pentágonos. En general, las invaginaciones cubiertas comprenden del 1-2% de la superficie de la membrana plasmática de muchas células, aunque ciertos tipos pueden presentar proporciones mayores (18).

Se ha encontrado que algunos receptores se encuentran localizados en las invaginaciones cubiertas aún antes de unirse al ligando, sin embargo otros se encuentran dispersos en la superficie de la membrana, y en el momento en que se realiza la unión ligando-receptor migran como un complejo y caen dentro de las invaginaciones (17). Una vez que este complejo ligando-receptor se encuentra dentro de la invaginación, esta se separa de la membrana y forma las vesículas cubiertas de 50-150 μm de diámetro. Así, el proceso de formación de las vesículas es simultáneo con la pérdida de ligando y receptores en la superficie de la membrana.

Las vesículas cubiertas parecen ser estructuras poco duraderas ya que una vez que estas se han formado, la cubierta de clatrina comienza a desensamblarse, originando finalmente vesículas desprovistas de la misma. Estas vesículas desprovistas de clatrina, junto con su contenido de ligando-receptor son liberadas en el compartimento endosomal, compuesto de una red de túbulos y vesículas, los cuales forman un retículo dentro del citoplasma periférico de la célula. Esta compleja estructura es el compartimento dentro del cual muchos ligandos se disocian de su receptor y en el cual muchos receptores son distinguidos unos de otros. Este grupo de estructuras ha sido denominado de muchas formas, dentro de las que encontramos: vesículas endocíticas, receptosomas o compartimento de desacople receptor-ligando CURL (18).

Este compartimento es similar pero no idéntico en muchos tipos celulares; por ejemplo en fibroblastos, unidades individuales pueden existir, mientras que en hepatocitos parece existir un CURL superficial y otro más profundo asociado con el aparato del Golgi (16).

La existencia de una bomba de protones la cual es responsable de la acidificación del compartimento endosomal ya ha sido demostrada (20), aunque no se sabe si es la misma que se presenta en lisosoma.

La acidificación de este compartimento es entonces responsable de que algunos ligandos se liberen de su receptor llevándose a cabo la segregación de ambos y conduciendolos a distintos sitios de la célula. Si bien en muchos casos el ligando es conducido al compartimento lisosomal (lisosoma secundario) en donde puede ser degradado o llevar a cabo alguna función fisiológica, no obstante se han identificado otras rutas de internalización de ligandos (21), como por ejemplo: a) diacitosis ha sido observada que ocurre en células epiteliales, en donde el ligando captado por la célula es excitado a través de una superficie diferente a la que entro, siendo este fenómeno observado en la secreción de IgA en bilis (4,22,23), en la captación de IgG por las células del trofoblasto (24), así como también en la captación de IgA proveniente del calostro, por células del intestino delgado, y otras mds (7,24,25) ;b) una ruta de internalización hacia el aparato de Golgi ha sido recientemente identificada para el receptor de transferrina (27); c) en algunas ocasiones se ha reportado la expulsión del ligando sin haber pasado a ningún organelo subcelular, tal es el caso de transferrina captada por reticulocitos en sus últimos estados de diferenciación (28,29).

Fig. 1

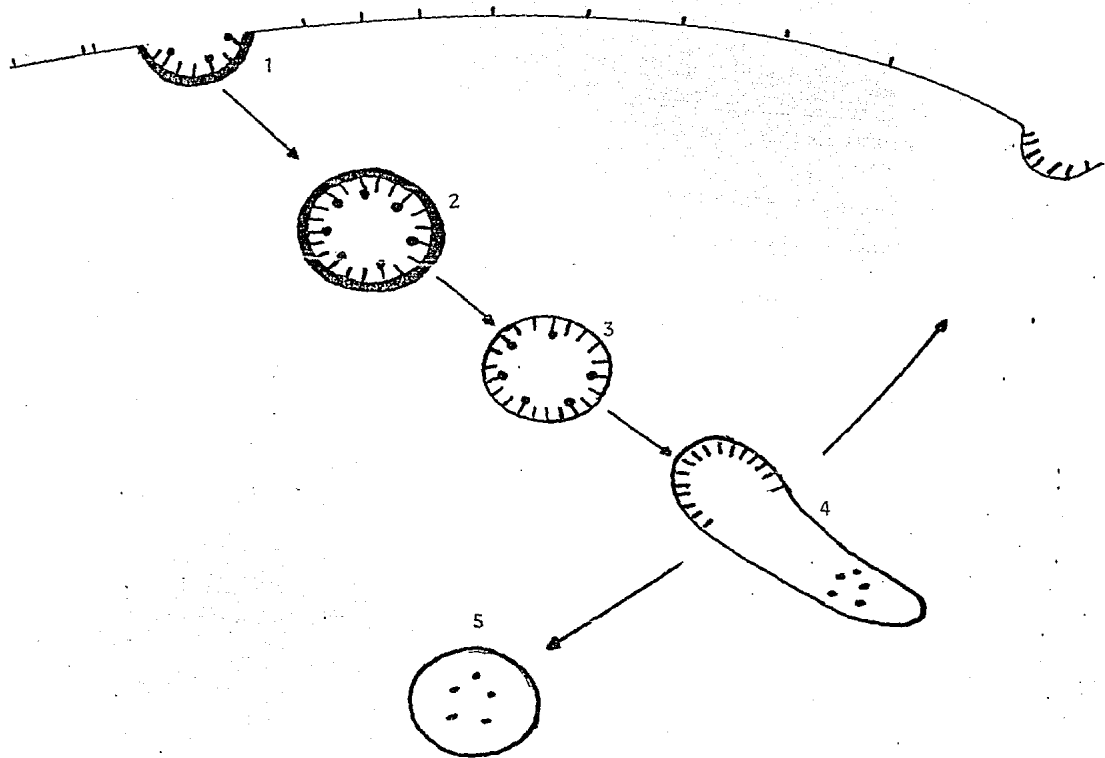


Fig. 1 Pinocitosis adsortiva

En el proceso de pinocitosis adsortiva el ligando se une al receptor presente en membrana plasmática. El complejo formado tiene la capacidad de emigrar hacia las invaginaciones cubiertas de clatrina (1); estas invaginaciones se desprenden de la membrana, originando las vesículas cubiertas (2); poco tiempo después, la clatrina que envuelve estas vesículas, se desensambla formando las vesículas desnudas (3); estas vesículas fusionan con un compartimiento en el cual ocurre el desacople del receptor-ligando y el cual es conocido como endosoma (4); el ligando liberado es conducido frecuentemente al lisosoma (5), mientras que el receptor es reciclado hacia membrana plasmática.

II. Enfermedades por Atesoramiento.

El descubrimiento y la identificación de cerca de 30 enfermedades por atesoramiento lisosomal se ha generado en las últimas dos décadas. Las primeras descripciones de las condiciones clínicas que eventualmente caen dentro de esta categoría comenzaron el siglo pasado con el reporte de Warren Tay's en 1881, acerca de un niño que presentaba una mancha rojo-cereza en la región macular del fondo óptico. Warren asumió que esta condición había sido heredada, y en 1887 B.Sachs describió casos adicionales y dio clara evidencia del extensivo daño ocasionado al sistema nervioso central de estos pacientes. Esta condición es ahora conocida como enfermedad de Tay-Sachs.

Un año después de la publicación de Warren Tay's, C.P.E. Gaucher reportó un paciente con agrandamiento de bazo e hígado, condición que más adelante se demostró que pertenecía a una enfermedad por atesoramiento transmitido genéticamente.

No fue hasta 1929, con los trabajos de Von Gierke estudiando pacientes con enfermedad de Pompe, que la química de los materiales almacenados comenzó a conocerse. Para esta enfermedad en particular el almacenamiento de glucógeno fue demostrado. Así mismo, Aghion en 1934, reportó que glucocerebrósido es el material almacenado en la enfermedad de Gaucher.

Toda esta información sentó las bases para el conocimiento del material acumulado en este tipo de enfermedades, sin embargo la causa bioquímica de esta acumulación aún no se conocía.

Basados en estudios de la formación de cerebrósido en preparaciones de bazo, Tams y Brady concluyeron en 1960 que una enzima responsable del catabolismo de los esfingolípidos, podía ser la causa de las enfermedades por acumulación de los mismos.

En 1963 Herz demostró que α -1,4-glucosidasa fue la enzima deficiente en una glicogenosis. Poco tiempo después, deficiencias enzimáticas precisas fueron demostradas en otras enfermedades.

El conocimiento de las causas responsables de las enfermedades por atesoramiento se vio favorecido gracias al desarrollo de las técnicas de mantenimiento de cultivos in vitro y a que los fibroblastos de estos pacientes conservan todas las características responsables de la enfermedad.

Neufel, Fratantoni y Hall (30) estudiando fibroblastos de pacientes con mucopolisacáridosis, concluyeron que un paso degradativo estaba también alterado en el catabolismo de los mucopolisacáridos. Estudios posteriores probaron que existían ciertos factores presentes en el medio de cultivo de

Fibroblastos, capaces de "corregir" la deficiencia en cualquier tipo de mucopolisacaridosis siempre que no se tratase del mismo tipo del cual se extrajeron. Así, factores extraídos del medio de cultivo de fibroblastos de Hunter podían corregir otras variantes con excepción del Hunter mismo (31,32).

El estudio de estos "factores correctivos" probó que éstos eran enzimas lisosomales (perdidas en cada desorden), las cuales eran secretadas al medio de cultivo por los fibroblastos (33-36).

Estudios en la captación de las enzimas lisosomales por fibroblastos con mucopolisacaridosis demostró que éstas podían ser tomadas del medio de cultivo mediante un proceso de captura específico y saturable, por lo que se sugirió que eran captadas a través de pinocitosis adsorptiva. Las propiedades de este proceso de captura implicaban que podía haber señales de reconocimiento en las enzimas lisosomales, y receptores para estas señales en la superficie de la membrana (37).

El estudio de la captación de las enzimas lisosomales en fibroblastos provenientes de pacientes con Mucopolipidosis II conocidos como fibroblastos de células "I", significó un importante avance en el conocimiento de la bioquímica de estas enzimas. Estos fibroblastos presentan una deficiencia múltiple enzimas lisosomales. Esta deficiencia es debida a que las enzimas lisosomales sintetizadas por estos fibroblastos son secretadas al medio extracelular. Por otra parte, a diferencia de las enzimas lisosomales producidas normalmente en fibroblastos, las enzimas secretadas por células "I" no pueden ser capturadas por este último tipo celular (40).

Hickman y Neufeld en 1972 (39), en base a estos estudios con células "I" postularon las siguientes hipótesis: a) que muchas hidrolasas contenían una señal de reconocimiento común para pinocitosis por fibroblastos, la cual no está presente en las hidrolasas de células "I" ;b) que fibroblastos normales producen enzimas que deben ser secretadas al medio extracelular y luego recapturadas a través de pinocitosis adsorptiva para entonces ser conducidas al compartimento lisosomal.

La primera hipótesis recibió fuerte evidencia gracias a los estudios de cinética de inhibición de la internalización de las enzimas lisosomales, en los que se presentaba al azúcar manosa con el grupo fosfato en posición 6 (man-6-P) como la posible señal de reconocimiento (37,38). Esta señal inicialmente se sugirió que estaba contenida en los carbohidratos, ya que el tratamiento con periodato a hexosaminidasa abatió su capacidad de internalización sin alterar su actividad enzimática (40).

La forma en que se descubrió al grupo de man-6-P como la señal de reconocimiento fue de manera indirecta. Hieber en 1976 (41), reportó que altas concentraciones de manosa inhibieron la pinocitosis de β -galactosidasa por fibroblastos, y que el pretatamiento con α -manosidasa causó un efecto inhibitorio. Estos estudios interpretaron primeramente a manosa como la señal de reconocimiento para las hidrolasas. Esta opinión poco después cambió al descubrirse que man-6-P era un inhibidor más potente en la internalización de β -glucuronidasa (38), así como otras enzimas lisosomales (42,43).

Estos estudios llevaron a proponer al Dr. Sly et al (12), a man-6-P como un componente esencial en la señal de reconocimiento para la pinocitosis de enzimas lisosomales por fibroblastos, y que esta señal es perdida o enmascarada en las enzimas lisosomales producidas por las células "I". Esta última predicción fue más tarde confirmada por la observación de que ³²P no es incorporado dentro de las enzimas secretadas por células "I" (43), y siendo esta falla en la incorporación debida a la deficiencia de UDP-NAcetilglucosamina-1-fosfotransferasa (UDP-NAcgluc.) (13,44).

La segunda hipótesis propuesta por Hickman-Neufeld llamada secreción-recaptura fue descartada como vía principal de conducción de las hidrolasas al compartimento lisosomal, ya que el uso de man-6-P para inhibir la internalización de β -hexosaminidasa en fibroblastos normales, no consiguió depletar los niveles intracelulares de la enzima y solo se encontraron cambios marginales en los niveles extracelulares de la misma (45).

Gonzalez-Noriega et al en 1980 (46), propusieron una ruta alternativa a la hipótesis de secreción-recaptura para la segregación de las enzimas lisosomales a lisosoma, reconociendo la existencia de la pinocitosis de las hidrolasas en fibroblastos, pero postulando una ruta intracelular como vía principal de conducción de las hidrolasas a lisosoma. Ellos sugirieron que las

enzimas recién sintetizadas en retículo endoplásmico recibían la señal de reconocimiento de man-6-P, lo cual hace que puedan ser reconocidas y unidas por un receptor de membrana que hace que se concentren en vesículas específicas del aparato del Golgi, dando lugar a la formación del lisosoma primario. Así, si la señal de reconocimiento no es adicionada a las enzimas recién sintetizadas, como sucede en la enfermedad de células "I", las enzimas no son reconocidas por los receptores intracelulares, los cuales fallan en conducirlos al compartimento lisosomal y estas hidrolasas son entonces secretadas al medio extracelular.

El uso de la microscopía electrónica (26,47), y la disección bioquímica del fenómeno con el empleo de mutantes en los pasos de glicosilación, así como el desarrollo de las técnicas de fraccionamiento subcelular (48), han permitido confirmar que la ruta intracelular es la ruta principal seguida para el transporte y segregación de las enzimas lisosomales.

III. Antecedentes.

En fibroblastos de células "I" se ha encontrado que existe una deficiencia generalizada de enzimas lisosomales, debido a que estas células son incapaces de fosforilar sus hidrolasas (36). Sin embargo en estas células se ha encontrado que fosfatasa ácida y β -glucocerebrosidasa se encuentran en concentraciones intracelulares normales (12,36). Esta evidencia abre la posibilidad de que existan otras señales diferentes a la señal de man-6-P que impidan la secreción al medio extracelular de estas hidrolasas. La existencia de otras señales para la internalización de enzimas lisosomales en otros tipos celulares ya ha sido reportada. Así por ejemplo; las células de Kupffer y macrófagos alveolares presentan un receptor para manosil/N-Acetilglucosamina que permite la captura de hidrolasas presentes en el plasma (42,49); otro ejemplo lo encontramos en el receptor para galactosa que se encuentra presente en hepatocitos (42,50).

Estudios recientes llevados a cabo por los grupos de Robins y Kornfeld (51-53), con el uso de mutantes de macrófagos de ratón han reportado la existencia de un nuevo receptor para la pinocitosis de hidrolasas el cual sin embargo también reconoce el residuo de man-6-P, aunque este reconocimiento depende de un ión divalente (Mn^{++}) a diferencia del receptor reportado en fibroblastos (54).

Estudiando la internalización de β -glucuronidasa bovina, en el laboratorio del Dr. González-Noriega, se encontró la existencia de un nuevo sistema de internalización para esta enzima lisosomal en fibroblastos humanos en cultivo. Evidencias previas obtenidas en este laboratorio por Rocío Coutino mostraron que el empleo de man-6-P como inhibidor competitivo sólo logra inhibir 5-10% la internalización; así mismo, la acción de fosfatasa ácida, y el empleo de anticuerpos dirigidos contra el receptor de man-6-P tampoco resultan en una inhibición de la internalización (González-Noriega *et al*, manuscrito en preparación)

El objetivo del presente trabajo consiste en mostrar evidencias de que β -glucuronidasa de hígado bovino es internalizada a fibroblastos humanos en cultivo a través de un proceso de endocitosis mediado por receptor, diferente al receptor para man-6-P, así como el conocer destino final que esta enzima alcanza en este tipo celular.

MATERIAL Y METODOS

CULTIVO DE TEJIDOS.

Medio de cultivo para fibroblastos.

Medio mínimo de Eagle en polvo (Gibco)-----	9.6 g/l
Ricarbonato de Sodio (J.T.Baker)-----	2.2 g/l
Piruvato de Sodio (Sigma Chemical Co.)-----	0.1 g/l
Suero fetal bovino (Microbiological Associates) inactivado 56°C por 30 min-----	100 ml/l

Solución de verseno.

EDTA (J.T. Baker)-----	0.2 g
Cloruro de Sodio (J.T.Baker)-----	8.0 g
Cloruro de Potasio (J.T. Baker)-----	0.4 g
Tris-Base (Sigma Chemical Co)-----	3.0 g
Rojo de fenol, sol. al 0.5% (Merck)-----	2.0 ml
Agua bidestilada-----	998 ml

Solución de tripsina.

Tripsina (Difco Lab.)-----	1.25 g
Solución de verseno-----	500 ml

FIJADOR UTILIZADO EN LA TECNICA DE TINCION.

Fijador formol-calcio.

Formaldehido 37-40% (J.T. Baker)-----	10 ml
Cloruro de calcio (J.T.Baker)-----	1.1 g
Agua destilada-----	90 ml

Fijador formol-calcio-acetona.

Acetona (J.T.Baker)-----	7 ptes.
fijador formol-calcio-----	3 ptes.

ENSAYOS ENZIMATICOS

La actividad de β -glucuronidasa fue determinada fluorometricamente utilizando el sustrato artificial 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronido, a una concentración de 10 mM en buffer de acetato de sodio 0.1 mM a pH=4.5. Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando 25 μ l de la enzima y 10 μ l del sustrato durante 30 min. a 37°C. La reacción enzimática fue terminada por la adición de 1.8 ml de buffer de glicina carbonatos a pH=10.5. La fluorescencia emitida por el sustrato hidrolizado fue leída con ayuda de un fluorómetro modelo AMINCO a 448 nm de emisión y 360 nm de excitación, con lampara de Xenón.

Una unidad de actividad enzimática fue tomada como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 nm de sustrato por hora. 10 nm de umbeliferona fue tomada como estandar en todas las determinaciones.

DETERMINACION DE PROTEINA.

La cantidad de proteína fue determinada colorimétricamente mediante el método de Lowry-Follin, utilizando albúmina de suero bovino como estandar (55).

CULTIVO DE FIBROBLASTOS.

Fibroblastos humanos deficientes en β -glucuronidasa obtenidos de un paciente con Mucopolisacaridosis VII, fueron generosamente donados por el Dr. William Sly y fibroblastos humanos deficientes en β -hexosaminidasa de un paciente con Sandhoff, fueron generados en nuestro laboratorio mediante biopsia del deltoides.

El cultivo de fibroblastos fue realizado en frascos T-75 (75 cm de superficie; COSTAR) a 37°C, bajo una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire; alimentados tres veces por semana con medio de cultivo MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1.3 mM de glutamina, 100 u/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin.

PURIFICACION DE ENZIMAS.

β -Glucuronidasa de bazo humano (obtenida postmortem) fue purificada según el método de Natowicz et al (56). El bazo humano es rutinariamente homogenizado con ayuda de FOLITRON (Kinematica) en 25 mM de tartrato de sodio/ 10 mM de fosfato de sodio/ 25 mM de EDTA/ 0.02% de azida de sodio a pH=6.2 (4 ml/g de tejido). Después de homogenizado se agrega deoxicolato de sodio a una concentración final de 0.2%, incubando durante 1h en agitación a 4°C. Después de lo cual el homogenado es centrifugado a 11,000 rpm por 30 min a 4 °C en centrifuga SORVALL RC-5E con un rotor GSA. El sobrenadante obtenido es filtrado a través de gasa, calentado a 65°C durante 1h y centrifugado una vez más a 11,000 rpm por 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido es entonces llevado a 55% de saturación con sulfato de amonio, agitado durante 1h a 4 °C y centrifugado posteriormente a 11,000 rpm por 30 min a 4°C. En este paso, el sobrenadante es desechado, y el precipitado es resuspendido en un quinto del volumen del sobrenadante con 50 mM de tris-HCl/ 10 mM de fosfato de sodio/ 150 mM de cloruro de sodio/ 0.02% de azida de sodio a pH=6.8 (buffer de tris-fosfatos). El precipitado, resuspendido y dializado contra el mismo buffer es adsorbido en bache por anticuerpos-sefarosa (dirigidos contra β -glucuronidasa bovina) dejando en agitación durante toda la noche. La elución es realizada con 6 M de urea y la enzima obtenida es dializada contra buffer tris-fosfatos pH=6.8 y concentrada por ultrafiltración en AMICON con una membrana XM50 bajo una atmósfera de N₂.

β -Glucuronidasa de hígado bovino fue purificada de acuerdo al método de Flapp y Cole (57) con algunas modificaciones realizadas por González-Noriega et al (manuscrito en preparación). β -glucuronidasa de hígado bovino es rutinariamente homogenizada con ayuda de FOLITRON en buffer de tartrato de sodio a pH=6.2 (descrito anteriormente). A partir de aquí, todos los pasos de la purificación son realizados a 4°C. El homogenado es incubado durante 1h en agitación con la adición de deoxicolato de sodio hasta alcanzar una concentración final de 0.2%, después de lo cual es filtrado a través de gasa y centrifugado a 11,000 rpm por 30 min en centrifuga SORVALL RC-5E con rotor GSA. El precipitado obtenido

es desechado y el sobrenadante es llevado a través de dos pasos de saturación con sulfato de amonio. En el primer paso se alcanza una saturación de 30%, dejando incubarse la muestra durante 1h y centrifugando posteriormente a 11,000 rpm por 30 min.. El sobrenadante obtenido es entonces llevado a 55% de saturación e incubado una vez más durante 1h y centrifugado a 11,000 rpm por 30 min.. El precipitado de esta última centrifugación es resuspendido en un quinto del volumen del sobrenadante en buffer de tris-fosfatos, pH=6.8 y dializado contra el mismo buffer. Posteriormente la muestra es llevada a pH=5 por la adición de ácido acético 0.1 M y dializada contra buffer de acetatos 0.07 M/ EDTA 1 mM a pH=5 durante 4h. (choque ácido). Posteriormente la muestra es centrifugada a 11,000 rpm por 30 min y el sobrenadante obtenido es resuspendido y dializado en buffer tris-HCl 50 mM/cloruro de sodio 150 mM/ azida de sodio 0.02% a pH=6.8 durante toda la noche a 25°C (autodigestión). Terminada la autodigestión, se agrega fosfato de sodio a la muestra para obtener una concentración final de 10 mM y la preparación es dializada una vez más contra el buffer de tris-fosfatos a pH=6.8. Finalmente la muestra es adsorbida a anticuerpos-seferosa (anticuerpos dirigidos contra β -glucuronidasa bovina) y la enzima eluida con 6 M de urea. La enzima obtenida es dializada extensivamente en buffer de tris-fosfatos pH=6.8 y concentrada por ultrafiltración en AMICON con membrana XM50 bajo una atmósfera de N_2 .

ENSAYOS DE INTERNALIZACION Y UNION. (Fig. 2).

Los ensayos se realizan por duplicado en cultivos confluentes de fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa crecidos sobre cajas petri de 35 mm (Falcon), conteniendo 0.2-0.3 mg de proteína celular. Las cajas son puestas en hielo, se les retira el medio de cultivo por aspiración y se les adiciona 1 ml de medio MEM (en el que el bicarbonato de sodio es sustituido por 25 mM de BES a pH=6.8) con las cantidades requeridas de enzima. Después de 2h de incubación a 37°C, las cajas son lavadas seis veces con buffer fosfato salino (PBS) frío, y lisadas por la adición de 0.5 ml de deoxicolato de sodio al 0.02% durante 30 min a 4°C. Las cajas son raspadas posteriormente con la ayuda de gendarmes a fin de resuspender los restos celulares y la actividad enzimática, así como la cantidad de proteína son determinadas como se mencionó anteriormente.

ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN
DE B-GLUCURONIDASA

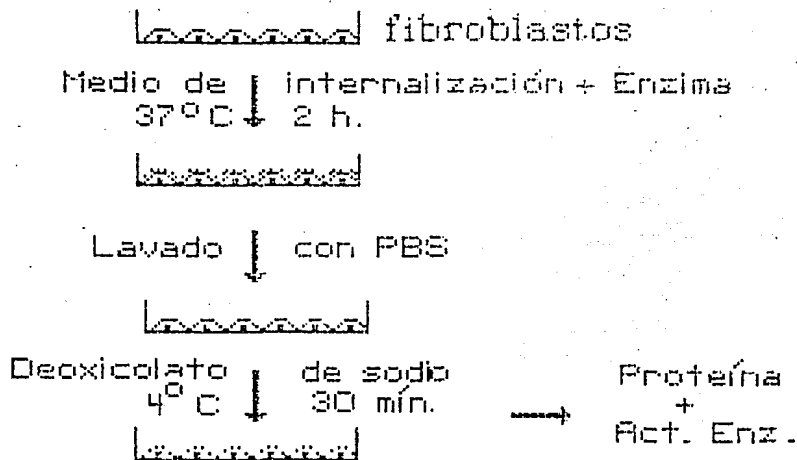


Fig. 2 Esquema que muestra los pasos seguidos en la realización de un ensayo de internalización.

Los ensayos de unión son llevados a cabo de la misma forma que los ensayos de internalización, sólo que en los primeros, las células siempre son mantenidas a 4°C.

LOCALIZACION CITOCQUIMICA DE β -GLUCURONIDASA INTRACELULAR.

La localización intracelular de β -glucuronidasa se determinó mediante el método de Lagunoff et al (59). Fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa o β -hexosaminidasa son cultivados sobre cubreobjetos (3.5 X 0.8 cm) dentro de tubos de cultivo Leagton y alimentados normalmente con medio de cultivo MEM, suplementado. El ensayo de internalización es llevado a cabo dentro de los tubos de cultivo, a los cuales se les aspiró el medio de cultivo por medio de aspiración y se les adicionó 1 ml del medio de internalización suplementado con las cantidades requeridas de enzima, e incubado durante 2 h a 37°C. Después de este tiempo, el medio es retirado y las células lavadas seis veces con 2 ml de PBS frío. La fijación de las células se lleva a cabo por la adición de 2 ml de fijador formal-calcio-acetona durante 30 min y son lavadas posteriormente 4 veces con 2 ml de buffer de acetatos 0.05 M a pH=4.5. Las células fijadas y lavadas son posteriormente preincubadas durante 5 h a 4°C en 25 mM de naftol-AS-BI- β -D-glucuronido disuelto en el mismo buffer. La tinción se lleva a cabo durante otras 4 h más a 37°C con la misma concentración de sustrato pero a pH=5.2 y con la adición de 0.06 M de Hexosativado pararsarsilina. Seguidamente las células son lavadas con agua destilada, deshidratadas en alcoholes graduales y montadas en balsamo sobre portaobjetos.

INCORPORACION DE MUCOPOLISACARIDOS (MPS).

Fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa son crecidos en cajas de petri de 60 mm (FALCON) y alimentadas con medio de cultivo MEM suplementado. Cuando la densidad celular alcanza 0.5×10^6 células/caja, las cajas son alimentadas con 1.5 ml de medio MEM suplementado (en el que el $MgSO_4$ es sustituido por $MgCl_2$, y penicilina utilizada como única fuente de antibióticos), al cual se le adiciona $^{35}SO_4$ ($6-8 \times 10^4$ cpm/ml) incubado por espacio

de tres días a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Terminado el marcaje las células son lavadas tres veces con 3 ml de verseno y alimentadas con 1.5 ml de medio MEM suplementado y con las cantidades requeridas de β -glucuronidasa. Al término del experimento las células son despegadas por la acción de tripsina 0.25% durante 10 min, diluidas en 10 ml de PBS frío y centrifugadas a 1,500 rpm por 10 min a 4°C en centrífuga Beckman TJ-6. Cada muestra es dividida en dos alícuotas, con el fin de determinar por una parte actividad enzimática y proteína y por el otro extraer la fracción de MF³⁵S.

Para la extracción de MF³⁵S se tomó ventaja de la insolubilidad de los mismos en etanol a 80% en punto de ebullición (30). A cada alícuota se le adiciona 2 ml de etanol al 80%, y se resuspende con ayuda de Vortex. Posteriormente todas las muestras son introducidas en un baño María de agua hirviendo durante 2 min. Seguidamente las muestras son introducidas en un baño de agua de hielo durante 5 min y centrifugadas a 1,400 rpm por 10 min en centrífuga Beckman TJ-6. El sobrenadante de cada muestra es desechado y el botón resuspendido en 0.5 ml de NaCl 2 M. A cada muestra se le adiciona 2 ml de etanol y se repite una vez más el calentamiento, enfriamiento y la centrifugación. El sobrenadante de cada una de las muestras es desechado y el botón resuspendido en 1 ml de NaCl 1 M. La radioactividad asociada a MF³⁵S es determinada por la adición de 0.100 ml de la muestra en 10 ml de LIQUIFLUOR y la cantidad de radioactividad es leída en un contador para centello líquido modelo Packard 3390 en canal para ¹⁴C.

Para determinar la actividad enzimática y proteína, a cada alícuota se le adiciona 0.5 ml de deoxicolato de sodio 0.02%, incubando por espacio de 30 min a 4°C. Al cabo de este tiempo la actividad enzimática y proteína se determinan como ya se mencionó anteriormente.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

Se cultivan fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa en frascos de cultivo T-75 (COSTAR). Uno de los frascos antes de llegar a confluencia es marcado con sulfato radioactivo (a fin de marcar la fracción de MF³⁵S) con $6-8 \times 10^6$ cpm/ml, como ya se mencionó anteriormente. Otros dos frascos con células en

confluencia (1×10^6 células), los cuales previamente habían internalizado β -glucuronidasa bovina o humana fueron utilizados en el fraccionamiento. En estas condiciones, cada frasco es lavado 4 veces con 0.25 M de sacarosa / 2 mM de EDTA / 10 mM Tris-HCl (HM) a 4°C. A partir de este momento todas las manipulaciones son realizadas a 4°C. Cada frasco conteniendo 10 ml de buffer HM es raspado con ayuda de gendarmes con el fin de resuspender el mayor número de células, y estas traspasadas a tubos cónicos. Las muestras son centrifugadas a 2,000 rpm por 10 min en centrífuga Beckman TJ-6 y el sobrenadante obtenido es retirado con pipeta pasteur. El botón celular es resuspendido en buffer HM y las células son lisadas por repetidos ascensos y descensos de las células a través de la pipeta y el choque con el fondo del tubo. El homogenado obtenido es centrifugado a 1,500 rpm por 10 min y el sobrenadante (fracción postnuclear) guardado. La fracción nuclear es resuspendida en 0.5 ml de buffer HM en dos ocasiones, y en cada una de ellas centrifugado a 1,500 rpm por 10 min. Todos los sobrenadantes obtenidos del lavado de la fracción nuclear son reunidos con la fracción postnuclear y este material es el utilizado para llevar a cabo el fraccionamiento subcelular en un gradiente de Percoll. En la realización del gradiente, aproximadamente 3 ml del material postnuclear son adicionados a 7 ml de Percoll, (el cual alcanza una concentración final de 30%) y todas las muestras son centrifugadas a 25,000 rpm durante 60 min a 4°C en ultracentrífuga Beckman L5-50, con un rotor Ti-50. Al término de la formación del gradiente, fracciones de 0.4 ml fueron colectadas, comenzando por el fondo del tubo, y con ayuda de una bomba peristáltica. Para cada una de las fracciones, la actividad de β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa y MF⁵S (en las muestras correspondientes) fue determinada.

RESULTADOS

Diversos tipos de criterios han sido utilizados en la literatura para demostrar la endocitosis de macromoléculas a las células: bioquímicos, cinéticos y citoquímicos.

En este trabajo hemos utilizado estos criterios para estudiar la endocitosis de β -glucuronidasa de hígado bovino a fibroblastos humanos en cultivo mediada por un nuevo receptor, encontrado en el laboratorio (González-Noriega *et al*, manuscrito en preparación).

La β -glucuronidasa bovina puede ser internalizada a fibroblastos humanos vía dos diferentes sistemas de internalización que involucran receptores con diferentes especificidades: el primero de ellos ya ha sido descrito ampliamente y requiere la presencia de man-6-P presente en cadenas de alta manosa (12,13); el "nuevo" receptor, reconoce un grupo cuya composición está siendo estudiada en el laboratorio.

Para contestar las preguntas que nos hemos planteado en este trabajo requerimos poseer una enzima que sólo sea endocitada a través del "nuevo" sistema de internalización. Mediante el protocolo descrito en material y métodos, fuimos capaces de eliminar el componente fosforilado de la β -glucuronidasa bovina. La enzima purificada mediante éste protocolo, no es reconocida por el receptor de man-6-P, ya que cuando se utiliza este azúcar como un inhibidor competitivo, la internalización de β -glucuronidasa no es alterada (tabla 1).

1. CINÉTICA DE INTERNALIZACIÓN.

Al incubar fibroblastos humanos deficientes en β -glucuronidasa a diferentes tiempos en presencia de enzima bovina añadida exógenamente (no internaliza a través del componente fosforilado), se puede observar lo siguiente (figura 3): a) que la cantidad de enzima que se asocia a los fibroblastos es mayor cuando los cultivos se incuban a 37°C que a 4°C; b) que la cantidad de enzima que se asocia a fibroblastos a 4°C alcanza un equilibrio después de 2 h; y c) que la cantidad de enzima que se asocia a los cultivos a 37°C es lineal al menos durante 4 h.

La velocidad con que esta misma enzima se asocia a fibroblastos en cultivo es proporcional a la cantidad de enzima que se añade exógenamente y a la temperatura de incubación de los cultivos (figura 4a y b). En estas condiciones se alcanza una saturación cuando al cultivo se han añadido más de 26,000 unidades de enzima. V_{max} de internalización y K_m de internalización fueron calculados a partir de los interceptos obtenidos en una grafica de dobles reciprocos. El valor obtenido para V_{max} fue de 2.4×10^{-7} mol/mg/h y el de K_m fue de 3.9×10^{-7} mol (tabla 2).

Saturabilidad, dependencia de temperatura y velocidad de endocitosis han sido utilizados como requisitos para demostrar que una molécula está siendo internalizada a una célula a través de un sistema de pinocitosis mediado por receptor (1,5,6,37,61). La internalización de β -glucuronidasa bovina a fibroblastos cumple con estos requisitos, por lo que pensamos que esta es la forma a través de la cual la enzima está siendo pinocitada.

LOCALIZACION INTRACELULAR DE β -GLUCURONIDASA.

A) Criterios citoquímicos.

Estudios previos han mostrado la posibilidad de localizar histoquímicamente β -glucuronidasa en diversos tejidos humanos (58), así como también β -glucuronidasa internalizada a través del receptor que reconoce el residuo de man-6-P en fibroblastos humanos en cultivo (59).

β -glucuronidasa de bazo humano es endocitada en fibroblastos humanos, exclusivamente por el receptor que reconoce el residuo de man-6-P. Esta enzima una vez internalizada a la célula, es transportada a lisosomas. Por ello es utilizada como control que nos permitirá comparar el destino final la β -glucuronidasa bovina después de ser internalizada.

Los resultados de la localización citoquímica de β -glucuronidasa bovina, así como de β -glucuronidasa humana se observan en la figura 5 y muestran lo siguiente: a) β -glucuronidasa humana cuya pinocitosis es mediada por el receptor que reconoce man-6-P y es posteriormente transportada a lisosoma, se encuentra localizada en la región perinuclear (figura 5a); b) este mismo patrón es observado en fibroblastos deficientes en β -hexosaminidasa pero que contienen β -glucuronidasa endógena (figura 5b); c) fibroblastos los cuales internalizan β -glucuronidasa bovina muestran un patrón de tinción similar al de los casos anteriores (figura 5c); d) en el caso en que fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa no son suplidos exógenamente con ningún tipo de enzima, no se observa coloración alguna (figura 5d). Diferencias en las intensidades de la coloración son debidas a la cantidad de enzima presente intracelularmente.

Inclusiones con una distribución perinuclear son características de fibroblastos de pacientes con enfermedades por atesoramiento y en el caso de deficiencias de β -glucuronidasa y β -hexosaminidasa (A y B) mucopolisacáridos y gangliósidos son almacenados en lisosomas secundarios respectivamente. Ambos tipos de observaciones sugieren que la enzima bovina que ha sido internalizada es transportada al compartimento lisosomal.

B) Fraccionamiento subcelular

Con el fin de comprobar que efectivamente la β -glucuronidasa bovina internaliza a fibroblastos y es transportada al compartimento lisosomal, fibroblastos humanos que habían internalizado previamente β -glucuronidasa bovina se lisaron y se fraccionaron en un gradiente de Percoll. La actividad de β -glucuronidasa y β -hexosaminidasa así como la fracción conteniendo los $MP^{55}S$ (ambos utilizados como marcadores lisosomales) fueron determinadas en cada una de las fracciones. Los resultados del fraccionamiento muestran los siguientes resultados: a) β -glucuronidasa humana que es captada a través del receptor para man-6-P, comigra en un solo pico de actividad en las fracciones más densas del gradiente, en las mismas fracciones en que encontramos la actividad de β -hexosaminidasa (figura 6), y $MP^{55}S$ (figura 8); b) β -glucuronidasa también comigra como un sólo pico de actividad y en las mismas fracciones en que encontramos actividad de β -hexosaminidasa (figura 7) y mucopolisacáridos (figura 8).

C) Degradación de mucopolisacaridos (MP³⁵S).

Estudios previos han demostrado que β -glucuronidasa humana internalizada por fibroblastos deficientes en la misma, es capaz de restituir la vía catalítica en la degradación de los MPS almacenados en lisosoma(34), por lo cual, en términos de reemplazo enzimático es importante averiguar si β -glucuronidasa bovina llega al mismo tipo de lisosoma en el que se encuentran almacenados los MPS como consecuencia de la deficiencia, y de esta manera restituir la vía de degradación.

Fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa que previamente habían sido marcados con ³⁵SO₄ fueron incubados en presencia de enzima bovina y humana durante 2 h, a partir de las cuales se midió la cantidad de radioactividad intracelular asociada a las células como MP³⁵S (degradación). En este experimento se utilizaron enzimas bovina y humana con la misma velocidad de internalización a fibroblastos .

Los resultados obtenidos son los siguientes (figura 9): a) β -glucuronidasa humana, como ya ha sido reportado anteriormente, es capaz de restituir la vía de degradación de los MP³⁵S; b) β -glucuronidasa bovina también restituye la vía de degradación de los MP³⁵S.

La restitución en la vía degradación de los MPS puede asumirse que es debida al reemplazo en la actividad perdida en este tipo de enfermedad, ya que fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa a los cuales no se les suplió de alguna de las dos enzimas, a las 24 h conservan un 70% de los MP³⁵S. El patrón de degradación que se observa es básicamente el mismo para ambos tipos de enzimas, por lo que puede sugerirse que ambas enzimas llegan al compartimento lisosomal con la misma velocidad.

Tratamiento de B-glucuronidasa	mam-6-P	internalización (U/mg/h)	inhibición (%)
Sin Autodigestión	-	34.7	- - -
	+	28.6	17.5
Con Autodigestión	-	104	- - -
	+	100	0

Tabla 1. Efecto de mam-6-P sobre la internalización de B-glucuronidasa bovina antes y después de la autodigestión.

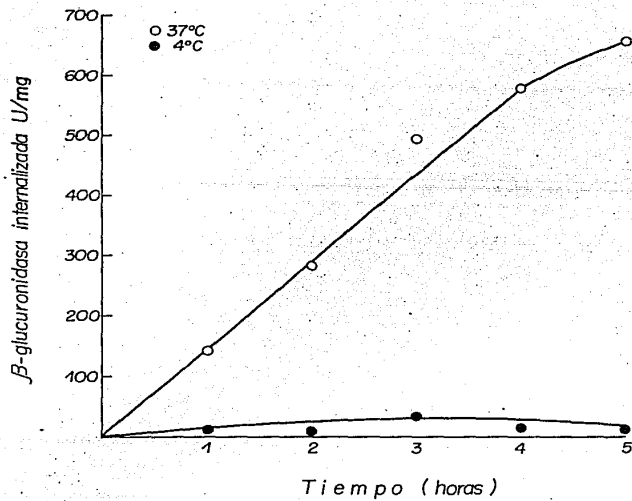


Fig. 3 Cinética de internalización de β -glucuronidasa Bovina a diferentes tiempos.

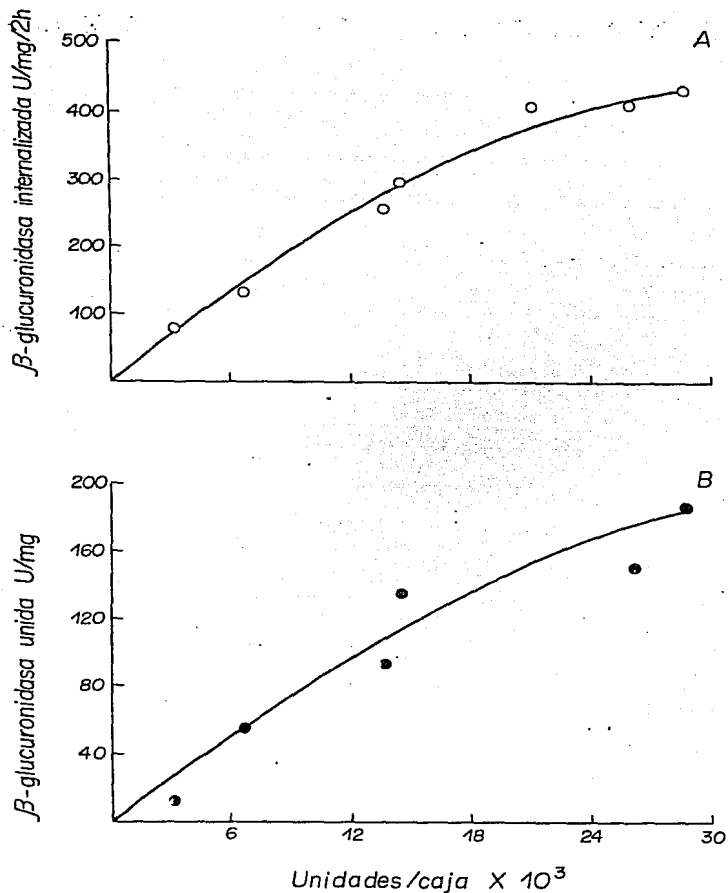


Fig. 4 Curvas de saturación de B-glucuronidasa bovina a concentraciones crecientes de enzima adicionada por caja.
 A) Internalización de B-glucuronidasa a 37°C y B) unión de B-glucuronidasa a 4°C.

TIPO
DE
RECEPTOR

Km inter.

Vmax inter.

mam-6-P¹

1.16×10^{-8} Mol.

8.9×10^{-13} M/mg/h.

"NUEVO"

3.4×10^{-9} Mol.

2.4×10^{-13} M/mg/h.

1. Valores obtenidos de González-Noriega et al (46)

Tabla 2. Constantes cinéticas obtenidas del "nuevo" receptor en comparación con el receptor para mam-6-P.

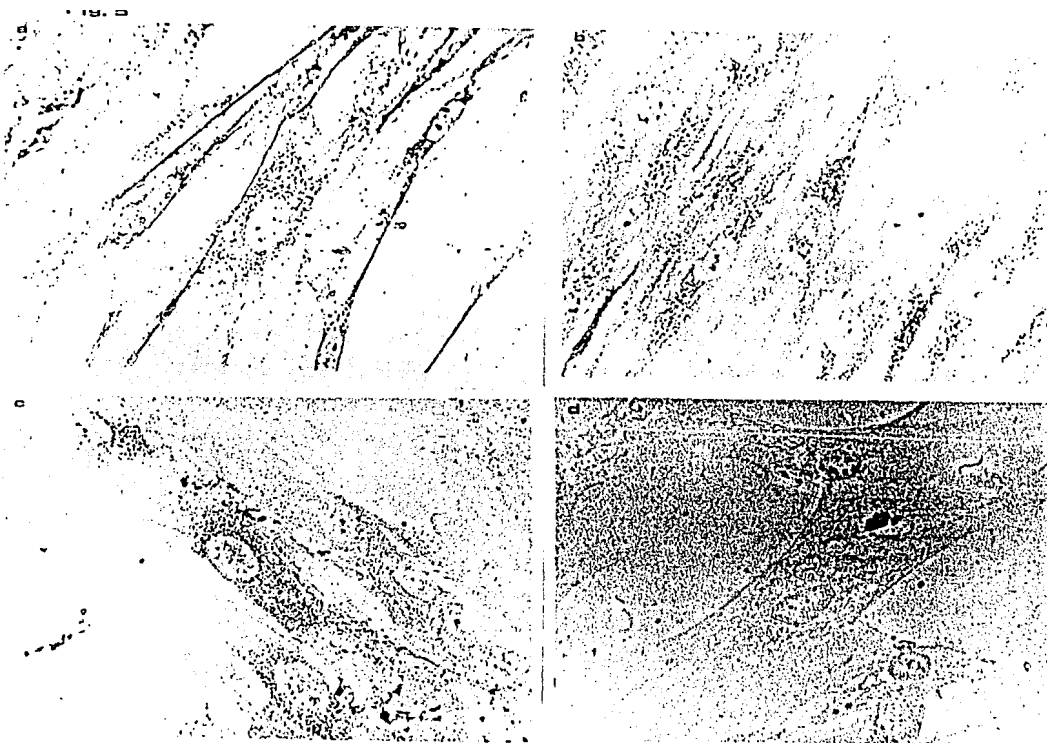


Fig. 5 Localización citoquímica de β -glucuronidasa bovina internalizada en fibroblastos humanos. En cada recuadro se muestra que el patrón obtenido para, a) β -glucuronidasa humana internalizada, b) β -glucuronidasa endógena, c) β -glucuronidasa bovina internalizada y d) Fibroblastos deficientes en β -glucuronidasa a los que no se les añadió enzima.

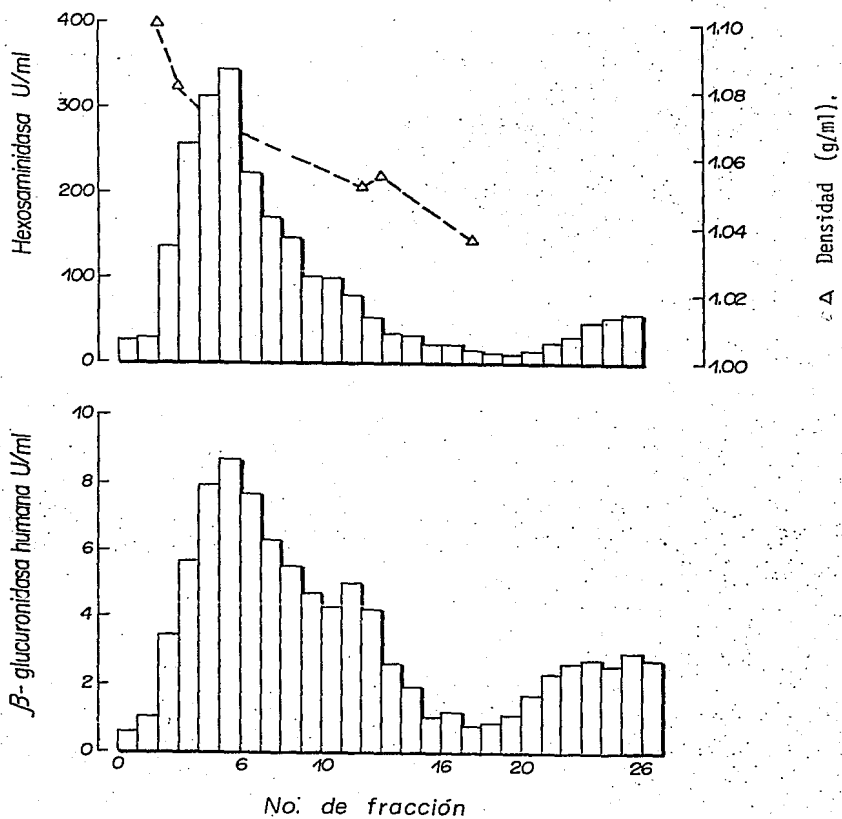


Fig. 6 Distribución subcelular de β -glucuronidasa humana en comparación β -hexosaminidasa endógena,

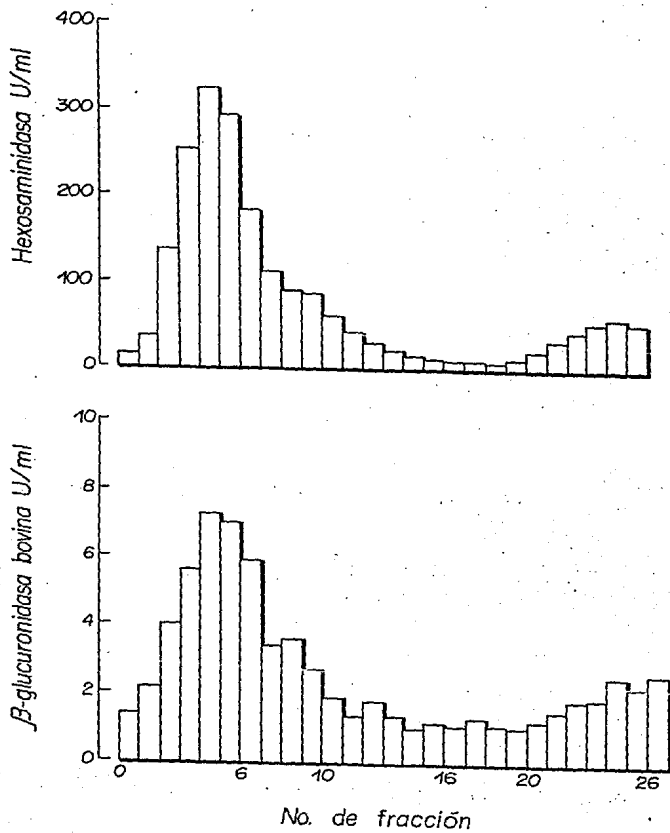


Fig. 7 Distribución subcelular de β -glucuronidasa bovina en comparación con β -hexosaminidasa endógena.

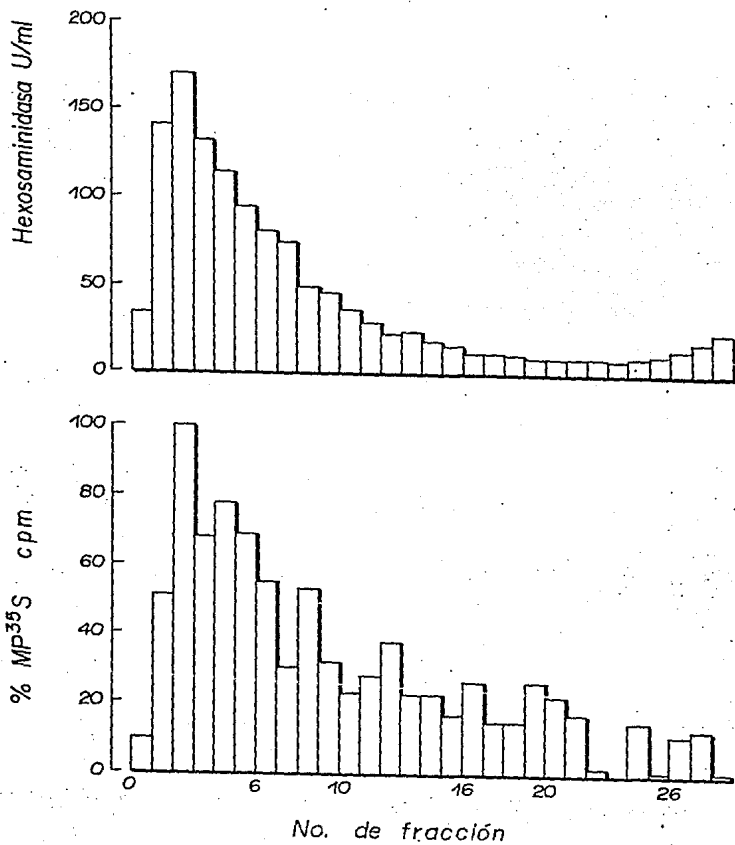


Fig. 8 Distribución de radioactividad asociada a MPS intracelulares en comparación con β -hexosaminidasa endógena.

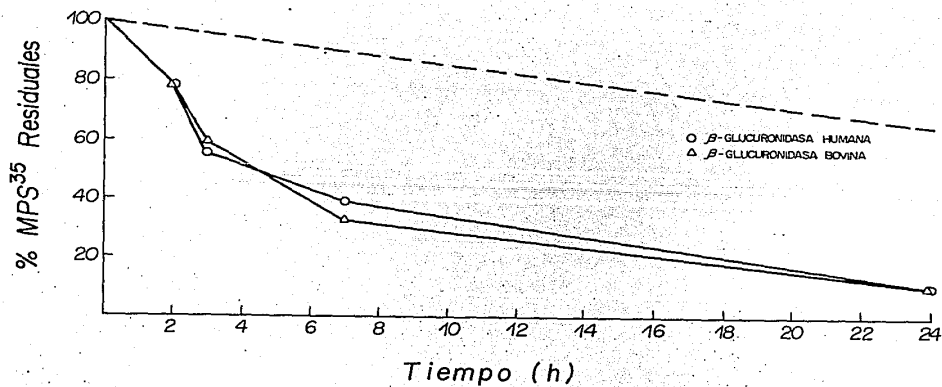


Fig. 9 Perdida de radioactividad de MPS intracelulares por efecto de B-glucuronidasa humana o bovina internalizada.
La línea punteada indica la pérdida de radioactividad en células deficientes de B-glucuronidasa a las que no se añadió enzima.

DISCUSION

La observación de que en fibroblastos de células "I" la mayor parte de las enzimas lisosomales son secretadas debido a la ausencia del marcador man-6-P y que en estas células fosfatasa ácida y glucocerebrosidasa se encuentran en concentraciones intracelulares normales, sugirió la posibilidad de que existan otro tipo de señales diferentes a la de man-6-P que estén involucradas en el transporte intracelular y la compartimentación de las enzimas lisosomales a lisosoma. Varios investigadores han tratado de encontrar estas señales en la captación de enzimas lisosomales a través de pinocitosis a fibroblastos en cultivo (13). Hieber *et al* (61), reportaron que la internalización de β -glucuronidasa de hígado bovino a fibroblastos humanos en cultivo se lleva a cabo a través de un "nuevo" sistema de internalización el cual no es inhibible por man-6-P, sin embargo no caracterizaron de una manera más profunda este sistema. En el laboratorio del Dr. González-Noriega, se ha encontrado también que β -glucuronidasa de hígado bovino es internalizada a fibroblastos a través no solo de este "nuevo" sistema que no requiere la presencia del residuo de man-6-P sino también del que reconoce este residuo fosforilado aunque en menor proporción (González-Noriega *et al*, manuscrito en preparación).

En este trabajo se presentan evidencias de que la enzima lisosomal que se presenta como modelo, realmente es endocitada por un "nuevo" sistema y una vez dentro de la célula es transportada al compartimento lisosomal.

Los resultados cinéticos de la internalización de β -glucuronidasa presentados en este trabajo muestran las siguientes características propias de un sistema de pinocitosis adsorptiva:

- a) dependiente de tiempo y de temperatura.
- b) depende de la concentración de enzima presente en el medio.

Además la velocidad de internalización de la β -glucuronidasa bovina es compatible con la velocidad esperada en un proceso de pinocitosis adsorptiva. Hemos calculado que para nuestro sistema es de 2.6%, la cual es similar a la reportada por Hieber *et al* (61) para la endocitosis de esta enzima y es 104 veces mayor a la velocidad normalmente reportada para la endocitosis fluida utilizando HRP. Estos resultados son consistentes con un proceso de endocitosis mediado por receptor.

El estudio de las constantes cinéticas de internalización derivadas de las curvas de saturación (tabla 2) indica que la V_{max} de internalización de la enzima que penetra vía este nuevo receptor son comparables a las descritas en otros sistemas de pinocitosis adsorptiva; sin embargo, la K_m de internalización es un orden de magnitud menor que la correspondiente a la β -glucuronidasa que es captada por fibroblastos vía el receptor de man-6-P. Este ha sido uno de los criterios que se obtuvieron en el laboratorio para mostrar la existencia de dos receptores diferentes en fibroblastos humanos para la endocitosis de enzimas lisosomales (González-Noriega et al, manuscrito en preparación).

Por otra parte, comparando las cinéticas de internalización y unión de β -glucuronidasa a fibroblastos encontramos que la cantidad de enzima que se asocia a la célula a 37°C es mayor a la cantidad de enzima que se asocia a 4°C. Este incremento puede ser explicada en dos formas: a) que exista un reciclaje de receptores como en el caso del receptor para man-6-P y/o; b) que exista una poza intracelular muy elevada capaz de sustituir los receptores que han desaparecido de la membrana. De la enzima unida a saturación (12.5 u/mg) y de la máxima cantidad de enzima internalizada (132.5 u/mg/h), nosotros calculamos que este nuevo receptor puede ser reemplazado o reutilizado aproximadamente cada 5 min., un tiempo semejante al tiempo reportado para el receptor para manosa que es de 5 min (46); sin embargo este tiempo que hemos encontrado puede cambiar cuando la cantidad total de enzima unida sea corregida por la cantidad de enzima unida específicamente. La existencia de reciclaje de receptores ha sido mostrada en varios sistemas de internalización, en donde el ligando no tiene una modulación negativa sobre el receptor (11,14,46,63). Así también, evidencias previas obtenidas en el laboratorio han mostrado la existencia de una poza interna muy alta para este "nuevo" receptor (González-Noriega et al, manuscrito en preparación).

Distintas vías involucradas en la internalización de ligandos a través de receptores, en las cuales el ligando no necesariamente es conducido al compartimento lisosomal ya han sido reportadas (21), por lo que resulta importante identificar el compartimento al cual la β -glucuronidasa bovina es transportada después de ser internalizada.

La localización citoquímica de β -glucuronidasa bovina fue un primer indicio de que esta enzima está siendo transportada a un compartimento que por su disposición perinuclear es identificado como lisosoma, ya que concuerda con la localización de: a) el material acumulado en estas células como consecuencia de la deficiencia enzimática (mucopolisacáridos y gangliósidos); b) así como la localización tanto de la β -glucuronidasa endógena, como de la β -glucuronidasa humana internalizada a través del receptor para man-6-P.

El fraccionamiento de fibroblastos que previamente habían internalizado β -glucuronidasa bovina es una evidencia más en favor de que esta enzima es conducida al compartimento lisosomal, ya que la fracción en la cual se encontró esta enzima comigra con la fracción en la cual se encuentran los marcadores lisosomales (hexosaminidasa y mucopolisacáridos) y a una densidad que corresponde a la reportada para el compartimento lisosomal (1.085) (35).

Cloroquina y cloruro de amonio han sido utilizados para inhibir del reciclaje de receptores, ya que estos compuestos tienen la propiedad de alterar el pH lisosomal e inhibir por consecuencia la liberación del ligando de su receptor. En el caso del receptor para man-6-P se ha mostrado que el empleo de alguno de estos agentes lisosomotrópicos hace que los receptores ocupados queden dentro de la vesícula endocítica, desapareciendo de la membrana plasmática y como consecuencia la pinocitosis de las hidrolasas se ve abatida (44,26). En el laboratorio se ha encontrado que el empleo cloroquina o cloruro de amonio no inhiben la captación de β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos (González-Moriega *et al*, manuscrito en preparación). De estos resultados pensamos que puede existir una ruta diferente en la conducción de β -glucuronidasa bovina y que sin embargo hace que su destino final sea el compartimento lisosomal.

En términos de reemplazo enzimático, se han tratado de encontrar diferentes receptores involucrados en la captación de hidrolasas, capaces de conducir éstas al compartimento lisosomal para restituir la vía de degradación afectada (42). En este trabajo nosotros mostramos también que la β -glucuronidasa bovina es capaz de restituir la vía de degradación de los MPS.

El descubrimiento de un nuevo receptor involucrado en la internalización de β -glucuronidasa bovina, diferente al receptor para man-6-P, es una alternativa bastante atractiva en la búsqueda de señales involucradas en la vía biosintética de las enzimas lisosomales, y así como también en la búsqueda de receptores con una posible utilidad con fines de remplazo enzimático.

Finalmente el descubrimiento de otro sistema de internalización para una enzima lisosomal abre los siguientes interrogantes:

a) ¿Cuál es el papel que el receptor juega en la célula?

Evidencias previas obtenidas en el laboratorio han mostrado que la cantidad de sitios de unión para la enzima es mayor dentro de la célula que en membrana plasmática. Esta observación abre la posibilidad de que a semejanza de los que sucede con el receptor para man-6-P, el papel principal de este "nuevo" receptor se encuentre en algún paso de la vía biosintética de las enzimas lisosomales. Para comprobarlo será necesario determinar si otras enzimas lisosomales también pueden ser captadas a través de este receptor, así como también determinar la distribución intracelular del mismo en los distintos compartimentos subcelulares involucrados en la vía biosintética de las hidrolasas.

b) ¿Se encuentra en otros tipos celulares este "nuevo receptor"?

Evidencias previas (datos no mostrados) apuntan a la presencia de este receptor en células CHO-K1 (CHO var.), ya que estas células al ser incubadas en presencia de β -glucuronidasa bovina mostraron un ligero incremento en la cantidad de enzima asociada. No obstante debido a la cantidad de enzima endógena propia de estas células, este dato aún debe de ser tomado con reserva.

c) ¿Porqué β -glucuronidasa bovina presenta una mayor proporción del componente que es reconocido por el "nuevo" receptor en comparación con β -glucuronidasa humana?

Cabe señalar la posibilidad de que estemos frente a un fenómeno casuístico y que este receptor esté involucrado en el reconocimiento de otras proteínas diferentes a las hidrolasas, por lo que creo que resulta importante el generalizarlo a través del reconocimiento de otras enzimas lisosomales.

CONCLUSION

A partir de los datos anteriormente presentados podemos concluir que:

- a) β -glucuronidasa de hígado bovino es captada a fibroblastos humanos en cultivo a través de un sistema de pinocitosis adsorptiva, a través de un receptor diferente del receptor que reconoce man-6-P.
- b) Que esta enzima después de ser internalizada a fibroblastos es transportada al compartimento lisosomal.
- c) En el compartimento lisosomal es capaz de restituir la vía de degradación de los mucopolisacáridos.

REFERENCIAS.

1. Silverstein, S.C., R.M. Steiman and Z.A. Cohn. 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 669-722.
2. Allen, R.D., and L.A. Staehelin. 1981. Digestive system membranes: Freeze-fracture evidence for differentiation and flow in *Paramecium*. *J. Cell. Biology* 87,9-20.
3. Silverstein, S.C., J. Michi, and S.S. Sung. 1978. Transport of macromolecules in cell systems: Phagocytosis. ed. *Dahlem Konferenzen*. pp. 245-264.
4. Brice, A., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, R. Keith, and J.D. Watson. 1983. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc: New York & London. pp. 1133
5. Steiman, R.H., S.E. Brodie and Z.A. Cohn. 1976. Membrane flow during pinocytosis. *Journal of Cell Biology*, 68, 665-687.
6. Steiman, R.H., I.S. Mellman, W.A. Miller and Z.A. Cohn. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 96, 1-27.
7. Rodewald, R. and D.R. Abrahamson. 1982. Receptor-mediated transport of IgG across the intestinal epithelium of neonatal rat. *Membrane recycling*. Pitman Books LTD, London. (Ciba Foundation Symposium) pp. 209-232.
8. Carpenter, G. and S. Cohn. 1976. ¹²⁵I-Labelled human epidermal growth factor: Binding, internalization and degradation in human fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 71, 159-171.
9. Cohn, S., G. Carpenter and K.J. Lembach. 1975. Interaction of epidermal growth factor with cultured fibroblasts. *Adv. Metabolic. Disorders*. Academic. Press. New York. pp. 265-284.

10. Mc Kanna, J.A., H.T. Haigler and S.Cohn. 1979. Hormone receptor topology and dynamics: Morphological analysis using ferritin-labeled epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 5689-5693.
11. Klausner, R.D., J. Van Renswoude, G. Aswell, C. Kempf, A.N. Sheshter, A. Dean, and K.R. Bridges. 1982. Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K 562 cells. J. Biol. Chem. 258, 4715-4724.
12. Sly, W.S., M.D. Fisher, A. Gonzalez-Noriega, J.H. Grubb and N. Natowicz. 1981. Role in the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. Methods in Cell Biology. 23, 191-212.
13. Barranger, J.A., and R. o Brady. 1984. Molecular basis of lysosomal storage disorders. Academic. Press. Inc. 502 p
14. Brown, M.S., R.G.W. Andersen and J.L. Goldstein. 1983. Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins. Cell. 32, 663-667.
15. Simons K., H. Garoff and A. Helenius. 1982. How an animal virus gets into and out its of host cell. Sci. Am. pp. 58-66.
16. Stahl, P. and A. L. Schwartz. 1986. Receptor mediated endocytosis. J. Clin. Invest. 77, 657-662.
17. Willingham and Pastan. 1980. The receptosome: an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. Cell. 21, 67-77.
18. Willingham, M.C. and I. Pastan. 1985. Receptosomes, endosomes, CURL. Diferent terms for the same organelle system. TIRS. May. pp.190-191.
19. Goldstein, J.L., R.G.W. Andersen and M.S. Brown. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor mediated endocytosis. Nature. 279, 679B-685.
20. Tycko, B. and F.R. Maxfield. 1982. Rapid acidification of endocytic vesicles containing α -macroglobulin. Cell. 28: 643-661

21. Farquhar, M.G. 1983. Multiple pathways of exocytosis, endocytosis and membrane recycling: validation of a golgi route. Fed. Proc. 42, 2407-2413.
22. Mullok, B.M. and R.H. Hinton. 1981. Transport of proteins from blood to bile. IBS. pp. 188-190.
23. Finean, J.R., R. Coleman and R.H. Michell. 1984. Membranes and their cellular functions. third edition. Blackwell Scientific Publications. 227 p.
24. Rodewald, R. and Jean-Pierre Kraehenbuhl. 1984. Receptor-mediated transport of IgG. J. Cell Biology. 99, 159-164.
25. Tizard, I.R., Immunology: An Introduction. 1984. cap. 15. Saunders College Publishing. 428 p.
26. Brown, J.W., E. Constatinescu, and M.G. Farquhar. 1984. Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and cloroquine. J. Cell Biology 99, 320-326.
27. Woods, J.W., M. Doriaux and M.G. Farquhar. 1984. Transferrin receptor recycle to cis and middle as well as trans Golgi cisternae in Ig-secreting myeloma Cells. J. Cell Biology. 103, 277-286.
28. Harding, C., J. Hauser and P. Stahl. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes J. Cell biology. 97, 329-339.
29. Pan, B.T. and R.M. Johnstone. 1983. Cell. 33, 967-977.
30. Fratantoni, J.C., C.W. Hall and E.F. Neufeld. 1968. The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolisaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60, 699-706.
31. Fratantoni, J.C., C.W. Hall and E.F. Neufeld. 1969. The defect in Hurler and Hunter syndromes, II. deficiency of specific factors involved in mucopolisaccharide degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64, 360-366.

32. Neufeld, E.F. and M.J.Cantz. 1971. Corrective factors for inborn errors of mucopolisaccharide metabolism. New York Academy Science. 179, 580-587.
33. Hall, C.W., M. Cantz and E.F. Neufeld. 1973. A β -glucuronidase deficiency mucopolisaccharidosis: studies in cultured fibroblasts. Archives of Biochemistry and Biophysics. 153, 32-38.
34. Brot, E.F., J.H. Glaser, K.J. Roosen and W.S. Sly. 1974. In vitro correction of deficient human fibroblasts by β -glucuronidase from different human sources. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1-8.
35. Rome.L.H., A.J.Gsrvin, M.M. Allietta and E.F. Neufeld. 1979. Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. Cell. 17,143-153.
36. Neufeld, E.F., T.W. Lim and L.J. Shapiro. 1975. Inherited disorders of lysosomal metabolism. Annu. Rev. Biochem. 44, 357-376.
37. Kaplan, A.,D. Fisher, D.T. Achord and W.S. Sly. 1977. Phosphohexosyl recognition is a general characteristic of pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblasts. J. Clin. Invest. 60, 1088-1093.
38. Kaplan, A. D.T. Achord and W.S. Sly, 1977. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 2026-2030.
39. Hickman, S., and E.F. Neufeld. 1972. A Hypotesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 992-999.
40. Hickman S., L.J. Shapiro and E.F. Neufeld. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 55-61.
41. Hieber, V., J. Distler, K. Myerowitz, R.D. Schmickel and G.W. Jourdan. 1976. The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of β -galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 710-717.

42. Desnik, R.J., 1980. Enzyme therapy in genetic diseases:2. birth defects: Original article series. Vol XVI. No.I. Alan R. Liss, Inc.
43. Hasilick, A., L.N. Rome and E.F. Neufeld. 1979. Processing of lysosomal enzyme in human skin fibroblasts. Fed. Proc. 38,477(Abstr)
44. Lang, L., M. Reitman, J. Tang, R.M. Roberts and Kornfeld. 1984. Lysosomal enzyme phosphorylation. J. Biol. Chem. 259, 14663-14671.
45. von Figura, K., and E. Weber. 1978. An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts. Biochem. J. 176, 943-950.
46. González-Noriega, A., J.H. Grubb, V. Talkad and W.S. Sly. 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal secretion by impairing recycling. J. Cell Biology. 85,839-852.
47. Geuze, H.J., J.W. Slot, Ger J.A.M. Strous, A. Hasilik and K. von Figura. 1985. Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. J. Cell Biology. 101,2253-2262.
48. Gabel, C.A., and A.F. Shapiro. 1984. Lysosomal enzyme trafficking in mannose 6-phosphate receptor-positive mouse L-cells: demonstration of a steady state accumulation of phosphorylated acid hydrolases. J. Cell Biology. 102, 943-950.
49. Archard, D.T., E.F. Brot, C.E. Bell and W.S. Sly. 1978. Human β -glucuronidase: In vitro clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. Cell. 15, 269-278.
50. Aswell, G., and A.G. Morell. 1974. Adv. Enzim. 41, 99-128.
51. Robins, A.R., and R. Myerowitz. 1981. The mannose 6-phosphate receptor of chinese hamster ovary cells: compartmentalization of acid hydrolases in mutants with altered receptors. J. Cell Biology.

52. Gabel, C.A., D.E. Goldberg and S. Kornfeld. 1983. Identification and characterization of cell deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 775-779.
53. Gabel, C.A., and S. Kornfeld. 1984. Targeting of β -glucuronidase to lysosomes in mannose 6-phosphate receptor-deficient MOPC 315 cells. *J. Cell Biology.* 99, 296-305.
54. Haflak, B. and S. Kornfeld. 1985. Lysosomal enzyme binding to mouse P388 D1 macrophage membranes lacking the 215 KDa mannose 6-phosphate receptor: evidence for the existence of a second mannose 6-phosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 4428-4432.
55. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-267.
56. Natowicz, M.R., M.M.Y. Chi, O.H. Lowry, and W.S. Sly. 1979. Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of β -glucuronidase for human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4322-4326.
57. Flapp, R.U., and R.D. Cole. 1966. Purification and characterization of bovine liver β -glucuronidase. *Arch. Biochem. and Biophys.* 116, 193-206.
58. Fishman, W.H., H. Ide, and R. Rufo. 1969. Dual localization of acid hydrolases in endoplasmic reticulum and lysosomes. *Histochemie.* 20, 287-299.
59. Lagunoff, M.D., B.A. Nicol and B.S. Pritzl. 1973. Uptake of β -glucuronidase by deficient human fibroblasts. *Lab. Invest.* 29, 449-453.
60. Troyer, H. PH.D. 1980. Principles and techniques of histochemistry. Little, Brown and Company, Inc. 431 p.

61. Hiebery, U., J. Distler, R. Myerowitz, R.D. Schmickel and G.W. Jourdan. 1980. Selective, noncompetitive assimilation of bovine testicular β -galactosidase and bovine liver β -glucuronidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. J. Clin. Invest. 65, 879-884.
62. Fisher, H.D., A. González-Noriega, W.S. Sly and D.J. Morre. 1980. Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver: subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes. J. Biol. Chem. 255, 9608-9615.

RESUMEN.

El descubrimiento y la identificación de cerca de 30 enfermedades por atesoramiento lisosomal se ha generado en las últimas dos décadas. En este tipo de enfermedades, la deficiencia de alguna de las enzimas lisosomales trae como consecuencia la acumulación del material no degradado en lisosomas.

En los estudios sobre la captación de las enzimas lisosomales en fibroblastos provenientes de pacientes con alguna enfermedad por atesoramiento, se ha demostrado que estas son captadas a través de un proceso de pinocitosis adsorptiva. En este proceso, un receptor presente en membrana plasmática, el cual reconoce el azúcar man-6-P, une la molécula de la enzima y la conduce al compartimeinto lisosomal.

A la fecha se sabe que este recptor desempeña su papel principal en la conducción de las enzimas lisosomales recién sintetizadas a lisosoma.

En este trabajo se ha estudiado la captación de β -glucuronidasa de hígado bovino a fibroblastos humanos en cultivo, la cual es captada a través de un receptor diferente al que reconoce man-6-P (González-Noriega et al, manuscrito en preparación).

Las curvas de saturación de la internalización de β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos muestran que esta enzima es captada a través de un proceso de pinocitosis adsorptiva. La localización citoquímica de la enzima que ha internalizado, así como el uso del fraccionamiento subcelular muestran que β -glucuronidasa bovina es conducida al compartimento lisosomal. La pérdida de radioactividad asociada a MP^{35S} muestran que esta enzima después de llegar al compartimento lisosomal es capaz de restituir la vía de degradación de los mismos, los cuales son su sustrato natural.