



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA

**“ DEFICIENCIA DE LA *B*-GALACTOSIDASA EN POBLACIONES
CON RETARDO MENTAL EN EL AREA METROPOLITANA
DE MONTERREY, N. L. MEXICO ”**

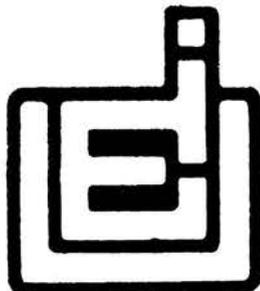
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

REBECA PALACIOS CORONA



MEXICO, D. F.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

CON TODO MI AMOR

Y AGRADECIMIENTO

.....A MI ESPOSO Y A MI HIJO POR TODO EL AMOR,
APOYO, Y COMPRESION QUE ME HAN BRINDADO Y QUE
GRACIAS A ELLO HA SIDO POSIBLE LA CULMINACION
DE ESTE TRABAJO.

.....A MIS PADRES POR EL INMENSO CARIÑO Y APOYO
QUE HE RECIBIDO DE ELLOS DURANTE EL LARGO CAMINO
RECORRIDO HASTA OBTENER LA META DESEADA.

.....A MIS HERMANOS QUE ME HAN AYUDADO EN TODO
MOMENTO Y ME HAN APOYADO EN LA LUCHA POR SALIR
ADELENTE.

CON CARIÑO Y AGRADECIMIENTO A LA
DRA. MERCEDES ALVAREZ LEAL,
DIRECTORA DEL PRESENTE TRABAJO
POR TODO EL APOYO Y ASESORAMIENTO
QUE ME HA BRINDADO.

A LA ENEP IZTACALA Y A MIS PROFESORES
POR HABERME DADO LA OPORTUNIDAD DE
PREPARARME Y REALIZARME
PROFESIONALMENTE

AL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DEL
NORESTE POR EL APOYO MATERIAL Y LA GUIA
QUE ME BRINDARON Y POR HABERME PERMITIDO
LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO

A TODAS LAS PERSONAS QUE ME SERIA DIFICIL
MENCIONAR PERO QUE DE MANERA DESINTERESADA
HAN CONTRIBUIDO EN EL DESARROLLO DEL
PRESENTE TRTABAJA

INDICE

RESUMEN	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
INTRODUCCION	1
Hipótesis	2
Objetivos	3
ANTECEDENTES	4
Generalidades	4
Características generales de la enzima β -galactosidasa	5
Relación entre la enzima β -galactosidasa y su sustrato natural	9
Historia de la deficiencia de la enzima β -galactosidasa	10
Mecanismo Hereditario	13
Historia de la Gangliosidosis GM1	13
Manifestaciones clínicas	15
Características del retardo mental	16
MATERIAL Y METODOS	18
Población estudiada	18
Origen de los reactivos	18
Preparación de los reactivos	19
Lugar de trabajo	20
Obtención de la muestra	20
Procesamiento de la muestra	20
Evaluación de los resultados	22

RESULTADOS Y DISCUSION	23
CONCLUSIONES	30
APENDICE	31
BIBLIOGRAFIA	37

RESUMEN

La β -galactosidasa es una enzima lisosomal que se encarga de degradar a los gangliósidos, al existir una deficiencia de esta enzima pueden ocurrir enfermedades metabólicas caóticas como lo es la Gangliosidosis GM1, que se caracteriza por el retardo mental, anormalidades óseas, etc, y produce la muerte temprana del paciente.

Con el propósito de seguir contribuyendo al conocimiento de la deficiencia de enzimas lisosomales que intervienen en la degradación de compuestos tales como los glicoesfingolípidos, entre los que se encuentran los gangliósidos mencionados, se estudió la actividad de la enzima β -galactosidasa en muestras de orina fresca de 50 individuos con retardo mental y 50 individuos sin retardo mental del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se midieron los niveles de actividad de la enzima en ambas poblaciones y se realizó una comparación de los mismos, tomando en cuenta la asociación de los parámetros sexo y edad. Es importante mencionar que en la población con retardo mental, los niveles enzimáticos con respecto al sexo fueron diferentes comparados con los de la población normal, no siendo así con la edad. Asimismo, se encontró una gran variabilidad en los niveles enzimáticos de la β -galactosidasa en la población con retardo y en la población sin retardo. Apesar de los resultados anteriores concluimos que el retardo mental es una característica importante que se debe tomar en cuenta para realizar este tipo de estudios y es recomendable tener precaución en la exclusión de individuos

con retardo mental provocado por factores conocidos, que de antemano no implican errores metabólicos. Se sugiere la realización de este tipo de estudios para incrementar el conocimiento epidemiológico de enfermedades humanas causadas por deficiencias de enzimas lisosomales.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Rangos Promedios (RP), obtenidos por la prueba de Mann-Whitney, de los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto al sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)
- Tabla 2. Prueba de Mann-Whitney, sobre los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto al sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)
- Tabla 3. Rangos Promedios (RP), obtenidos por la prueba de Mann-Whitney, de los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto a la edad y el sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)
- Tabla 4. Prueba de Mann-Whitney, sobre los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto a la edad y el sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)
- Tabla 5. Niveles de actividad de la enzima β -Galactocidasa (β -GAL), Sexo y Edad de individuos pertenecientes a la población I.
- Tabla 6. Niveles de actividad de la enzima β -Galactocidasa (β -GAL), Sexo y Edad de individuos pertenecientes a la población II.

LISTA DE FIGURAS

- fig. 1. frecuencia de los niveles de actividad de la β -galactosidasa en la población sin retardo mental
- fig. 2. frecuencia de los niveles de actividad de la β -galactosidasa en la población con retardo mental
- fig. 3. figura que muestra al gangliósido GM 1, el cual es hidrolizado por una β -galactosidasa en su galactosa terminal.

INTRODUCCION

Dentro de la ruta degradativa de los gangliósidos, la enzima β -Galactosidasa hidroliza la galactosa terminal presente en el gangliósido GM1 (glicoesfingolípido). Esto involucra la conversión del gangliósido GM1 al gangliósido GM2 (9).

La deficiencia a la enzima β -galactosidasa provoca el acúmulo de estos gangliósidos en los lisosomas, provocando: daños cerebrales, anormalidades óseas, incoordinación y debilidad de miembros inferiores, etc. (2-6).

El propósito del presente trabajo consistió en medir los niveles de actividad enzimática en personas con retardo mental en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, las que se compararan con los niveles enzimáticos de personas normales, agrupadas de acuerdo a su sexo y edad.

La importancia del presente estudio estriba en que si de alguna manera observamos diferencias en los niveles de esta enzima entre ambas poblaciones podríamos determinar el riesgo relativo que tiene un neonato de presentar Gangliosidosis GM1, enfermedad provocada por la deficiencia de la β -galactosidasa, cuya transmisión hereditaria es en forma autosómica recesiva y generalmente ambos padres son portadores y presentan niveles bajos de esta enzima.

HIPOTESIS

Se considera que los niveles de actividad de la enzima β -galactosidasa son más bajos en individuos con retardo mental, que en los individuos normales. Y los que presentan los niveles alterados de esta enzima pueden tener el error metabólico correspondiente a Gangliosidosis GM1.

OBJETIVOS

- 1.- Se midieron y se compararon los niveles de actividad de la enzima β -galactosidasa, en dos poblaciones agrupadas de acuerdo a su sexo y edad:
 - a) Individuos que presenten cualquier tipo de retardo mental
 - b) Individuos que no presenten retardo mental (controles)

- 2.- Se correlacionaron y se compararon los niveles de esta enzima con la edad de los individuos de acuerdo a su sexo y estado de salud.

ANTECEDENTES

Generalidades.

Los errores congénitos del metabolismo son enfermedades atribuidas a la deficiencia congénita de una enzima específica, la cual es debida a la presencia de un gen anormal; este término fue descrito por Garrod en 1909 (citado en 13).

La naturaleza básica del defecto es conocida en algunos casos y puede representar la síntesis de una enzima estructuralmente alterada con propiedades catalíticas diferentes. En otros casos es una proteína inestable y/o rápidamente degradada en los tejidos. Finalmente puede haber una reducción parcial o completa de la síntesis de la enzima (40).

Los defectos enzimáticos en el metabolismo de los gangliósidos son llamados comúnmente como Gangliosidosis GM1 o errores congénitos del metabolismo de los gangliósidos (7).

Los defectos genéticos del locus B-gal causan la deficiencia o reducción de la actividad enzimática y acumulación de los sustratos en los lisosomas (8). Entre estos sustratos se encuentran el gangliósido GM1, el asialo GM1, oligosacáridos similares al queretán sulfato y las glucoproteínas, los cuales normalmente son hidrolizados por la enzima β -galactosidasa que se localiza en los lisosomas. La etapa inicial en la ruta degradativa involucra la conversión del

gangliósido GM1 en gangliósido GM2, debido al rompimiento del enlace β -galactosa terminal del gangliósido GM1 por una β -galactosidasa. En ausencia de esta actividad dicha conversión no tendría lugar (10,14).

Se conocen otras β -galactosidasas como las que hidrolizan la galactosilceramida y la lactosilceramida, de las que no se conocen deficiencias, por lo que estos compuestos no se acumulan (15).

Existen al menos tres formas de deficiencia de la enzima β -galactosidasa:

- 1) La deficiencia primaria, que produce las Gangliosidosis Infantil, Infantil tardía o Juvenil y la forma Adulta
- 2) La deficiencia combinada de neuraminidasa y β -galactosidasa y,
- 3) La deficiencia combinada de β -galactosidasa y varias enzimas lisosómicas en una enfermedad de células I (Mucopolipidosis Tipo II) (15).

En este trabajo nos referiremos de manera particular a la deficiencia primaria de la enzima β -galactosidasa.

Características generales de la enzima β -galactosidasa

Los primeros estudios que se conocen sobre purificación de la enzima β -galactosidasa fueron realizados en el año de 1951 por Cohn y Monod, quienes obtuvieron preparaciones altamente purificadas de la enzima a partir de cepas de *Escherichia coli* K

12 y ML, ambas inducidas con lactosa. Ellos reportaron que las dos enzimas de cada una de las cepas eran inmunológica y enzimáticamente indistinguibles (citado en 27).

Posteriormente Cohn, en 1957, purificó otra enzima β -galactosidasa de cepas de E. coli y encontró que la enzima era heterogénea por el método de ultracentrifugación y mostró dos fracciones o picos, un componente mayor monodisperso (80% del total) con un peso molecular de 700,000 y un componente menor polidisperso (20% del total) constituido por productos polimerizados, con un peso molecular de 70,000; ambos componentes presentaron actividad enzimática (citado en 27).

Estudios posteriores realizados por los mismos autores reportaron datos sobre la estabilidad y el pH de la enzima β -galactosidasa. Ellos mostraron que la inactivación térmica de la enzima es una reacción de primer orden; a bajas temperaturas la enzima resultó excepcionalmente estable. En lo que respecta al pH, la actividad de la enzima iba en disminución marcada ($\text{pH} < 6$) y lenta cuando el pH estaba entre 6 y 8 (citado en 27).

Zarnitz en 1958, realizó estudios similares sobre estabilidad de la enzima β -galactosidasa. Este autor trabajó con extractos purificados de la enzima obtenidos de la cepa ML 309 de E. coli; y encontró resultados muy similares que los reportados por Cohn y Monod en 1951 (citado en 27). Wallenfels y otros investigadores en 1959, trabajaron con la enzima utilizada por Zarnitz y encontraron que ésta enzima no contenía ningún componente no proteínico. Mostraron que la enzima estaba

constituida por 51.5% de Carbono, 6.33% de Hidrógeno, 16.10% de Nitrógeno y 0.93% de Azufre (citado en 27).

Más tarde, en 1978, O'Brien realizó estudios sobre la enzima obtenida de tejidos humanos, utilizando sustratos sintéticos y encontró diferentes tipos de β -galactosidasas: la A, la B y la neutral, a las cuales denominó isoenzimas (16).

La isoenzima A, ha sido purificada a homogeneidad aparente a partir de hígado humano (24). La isoenzima B y la Neutral han sido estudiadas solo en crudo o parcialmente purificada (25,26, 28).

Las β -galactosidasas A y B poseen pH óptimo en la región ácida (4.2-4.4), por lo que se les denominó β -galactosidasas ácidas. Ambas eran estimuladas y estabilizadas por cloruro de sodio (28), eran termolábiles y capaces de romper enlaces aril β -D-galactosido. Ambas hidrolizaban residuos de enlaces β -galactosa del gangliósido GM1 (25,28) y asialo fetuina (24). La β -galactosidasa B tiene un peso molecular de 600,000 a 800,000 cerca de 10 veces más que el de A (72,000), ambas son sialoglicoproteínas (29,30).

La β -galactosidasa neutral presentaba un pH óptimo de 5 a 6 y un peso molecular menor al de A ó B (57,000). Esta enzima fue inhibida con cloruro de sodio y más estable al calor que A ó B (35), esta rompía enlaces aril- β -galactósido y aril- β -D-glucósido, pero no rompía la galactosa del gangliósido GM1 o de la asialo fetuina (25,28).

En hígado normal humano, usando 4-metil, umbeliferil o p-nitrofenol- β -galactósido como sustrato, aproximadamente del

85% de la actividad ensayada a pH 4.5 era debida a la isoenzima A, 10% a B y 5% a la Neutral (16).

Más recientemente, en 1989, O'Brien reportó que la enzima β -galactosidasa ácida era un polipéptido monomérico con un peso molecular de 64 kDa que contenía un 7.5% de carbohidratos y estaba presente en todas las células nucleadas (8).

La β -galactosidasa ácida existe en forma monomérica (A1), dimérica (A2), y multimérica (A3), compuesta de una o más subunidades de 64 k Da (8).

Wallenfels y Well reportaron que las β -galactosidasas de origen animal se pueden agrupar en dos categorías, de acuerdo con su localización celular : Un grupo comprende a las enzimas localizadas en las vellosidades de la mucosa del intestino delgado, que parecen ser verdaderas lactasas, e involucrado en el rompimiento de los β -D-galactósidos de los alimentos, especialmente de lactosa. Estas enzimas han sido altamente purificadas de intestino delgado de ternera, rata y mono. El segundo grupo comprende a las β -galactosidasas lisosomales y se localizan en las células de mamíferos. Estas enzimas no desdoblan al compuesto 6-bromo-2-naphtyl- β -D-galactósido, característica que las diferencia del primer grupo de enzimas.

Las β -galactosidasas ubicadas en los lisosomas son caracterizadas como hidrolasas lisosomales, ya que actúan a pHs ácidos de 3 a 4. Su función fisiológica es de catabolismo de glicolípidos complejos, mucopolisacáridos y glicoproteínas que contienen

residuos β -galactosil. Además estas enzimas están involucradas con errores innatos del catabolismo, los cuales son caracterizados por una baja actividad enzimática y por el acúmulo de dichos productos en diferentes órganos. Además observaron que ambas enzimas en cerebro de conejo tenía una alta actividad para los sustratos artificiales, los cuales son: p-nitrofenil- β -D-galactosidos y lactosa (41).

Relación entre la enzima β -galactosidasa y su sustrato natural

La enzima β -galactosidasa es una hidrolasa lisosomal la cual participa en la degradación de gangliósidos (31).

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos ácidos, que característicamente contienen una molécula o más del ácido N-acetil-o-N-glicolil neuramínico (ácidos siálicos). Se encuentran en diversos tejidos del organismo, aunque en mayor proporción en el cerebro. Ernst Klenk los descubrió y los llamó así debido a su alta concentración en células ganglionares o neuronas. En el cerebro humano se observan al menos diez tipos distintos de gangliósidos, y cuatro de ellos comprenden cerca del 90 % del total. El mayor monosialogangliósido de cerebro es el GM1. En el cerebro, los gangliósidos se localizan primariamente en las membranas de las terminales nerviosas. Su síntesis empieza con el desarrollo inicial del cerebro y continúa lentamente hasta la madurez, existe un sistema de multiglicosiltransferasas localizado en el aparato de Golgi, que es el responsable de dicha síntesis (7).

Por lo que se refiere a la nomenclatura del gangliósido, esta dada de la siguiente forma:

Gangliósido GM1, donde G= Gangliósido; M= Mono (cantidad de residuos de ácido siálico o NANA); 1= cadena intacta (integridad del polisacárido (7)).

La enzima B-galactosidasa lleva a cabo una hidrólisis secuencial de los residuos del carbohidrato terminal por remoción de oligosacáridos de dos o más azúcares o por deacilación inicial (38).

Dentro de la ruta degradativa de gangliósidos conocidos, hay 4 compuestos, los cuales poseen un residuo β -galactosa en la terminal no reductora (38).

- 1.- gal - galNAc - gal [NeuNAc] - glc - ceramide
(gangliósido GM1)
- 2.- gal - galNAc - gal - glu - ceramide (asialo GM1 - gangliósido)
- 3.- gal - glu - ceramida (lactosilceramida)
- 4.- gal - ceramida (galactosil ceramida)

El gangliósido GM1 y el asialo gangliósido GM1, son hidrolizados por las enzimas β -galactosidasas A y B. La lactosilceramida y la galactosilceramida son hidrolizadas por otras β -galactosidasas (15).

Historia de la deficiencia de la enzima β -galactosidasa

Brady, en 1966 fue el primero en sugerir un probable

defecto enzimático en una etapa inicial del metabolismo del gangliósido (citado en 32).

En 1967, Sacrez reportó una deficiencia de β -galactosidasa en el hígado de un paciente con Gangliosidosis GM1 (34).

Esta observación fue confirmada por otros investigadores como Okada y O'Brien quienes también encontraron una marcada deficiencia de la actividad de la enzima en los tejidos de dos pacientes con Gangliosidosis GM1 (1). Este estudio fue realizado en una autopsia obteniendo tejido congelado, ya que anteriormente, Zarnitz observó que la enzima era estable en congelación (citado en 27).

Okada y O'Brien reportaron niveles bajos de actividad de la enzima β -galactosidasa en vísceras y cerebro humanos y demostraron que la actividad disminuída de la enzima no era debida a la presencia de inhibidores endógenos solubles (1).

Thomas H.G. en 1969, realizó un estudio sobre la deficiencia de la enzima β -galactosidasa en orina de un paciente con Gangliosidosis GM1 Infantil, y reportó una marcada deficiencia de dicha enzima (9).

La actividad de la β -galactosidasa no se encontraba disminuída en otras enfermedades de almacenamiento de esfingolípidos (7). La deficiencia de la enzima en Gangliosidosis GM1 es específica para β -galactosidasa. Las actividades de otras enzimas lisosomales se encuentran dentro de los rangos normales (1).

O'Brien (33), Sacrez (34), Seringe (35) y Dacremont (36), entre otros, se dedicaron a demostrar la deficiencia de la

β -galactosidasa en pacientes con Gangliosidosis GM1.

Okada y O'Brien demostraron que la deficiencia de la β -galactosidasa es responsable de la acumulación de gangliósidos GM1 en la enfermedad Gangliosidosis GM1. Ellos utilizaron gangliósido GM1 marcado con ^{14}C en la galactosa terminal y lo usaron como sustrato para la β -galactosidasa. El grado de rompimiento de galactosa ^{14}C del GM1 fue notablemente bajo en Gangliosidosis GM1 cuando utilizaron preparaciones de β -galactosidasa de hígado y materia gris cerebral (1). Brady y colaboradores demostraron que la actividad β -galactosidasa con otros sustratos como galactosil ceramida y lactosil ceramida, fue normal en Gangliosidosis GM1. Esto enfatizó la especificidad de la deficiencia con gangliósido GM1 (37). Existen otras β -galactosidasas que hidrolizan estos sustratos, que no se acumulan y por lo tanto no se conocen deficiencias (15).

En la actualidad, como se mencionó anteriormente se conocen tres formas de deficiencia de la enzima β -galactosidasa, las cuales son las deficiencias :

- 1) Primaria
- 2) Combinación de neuraminidasa y β -galactosidasa y
- 3) Combinación de β -galactosidasa y varias enzimas lisosomales (15).

Mecanismo hereditario

La deficiencia de la enzima β -galactosidasa en el humano es un desorden hereditario con un tipo de herencia autosómica recesiva, es decir, que solamente los homocigotos presentan manifestaciones clínicas (7). El gen que determina la estructura de la molécula de la β -galactosidasa está localizado en la banda p21 cen del cromosoma 3 (8).

La expresión completa del trastorno se manifiesta en ambos sexos : varón homocigoto (XY) y mujer homocigota (XX) (7).

Singer H.S y colaboradores realizaron estudios de la actividad de la enzima β -galactosidasa en padres de pacientes afectados e individuos normales y encontraron actividad enzimática intermedia y actividad total respectivamente (39). Esto es una evidencia de que la enfermedad es transmitida en forma autosómica recesiva (39).

Historia de la Gangliosidosis GM1

En 1881, Warren Tay fue el primero en describir un error en el metabolismo de los gangliósidos, la condición que él describió se conoce ahora como la enfermedad de Tay Sach o Gangliosidosis GM2. La Gangliosidosis GM1 se descubrió 84 años después, en 1965 (16).

La Gangliosidosis GM1 anteriormente fué clasificada en dos formas: Gangliosidosis Generalizada o tipo I y Gangliosidosis Tipo II (7,17).

La primera descripción clínica de Gangliosidosis tipo I, fue publicada por R.N. Norman y sus colaboradores en 1959 llamándola " Enfermedad de Tay Sach con involucramiento visceral " (18).

La Gangliosidosis tipo I fue definida por Thomas en 1969, como una enfermedad degenerativa y progresiva del sistema nervioso central asociada con una acumulación del gangliósido GM1 en el interior de las neuronas y varios órganos viscerales (9). El gangliósido acumulado, fue identificado como un gangliósido GM1 por O'Brien y sus colaboradores en 1965 (19). Scott y colaboradores en 1967 describieron hermanos afectados por este padecimiento (20). Okada y O'Brien en 1968 demostraron que la deficiencia de la β -galactosidasa era el defecto fundamental en Gangliosidosis tipo I, basándose en el descubrimiento realizado por Hers en 1963, quien encontró una deficiencia de B-galactosidasa en el hígado de un paciente con esta enfermedad (1).

La Gangliosidosis tipo II fue descrita por Derry y sus colaboradores en 1968 (21). Ellos reportaron a dos hermanos de ancestros Franco-Canadienses que presentaron alteraciones motoras y deterioración mental progresiva. En el exámen Post-mortem descubrieron la acumulación del gangliósido GM1 en el cerebro. También descubrieron que dicho gangliósido no se acumula en vísceras en la Gangliosidosis Tipo II, como era el caso de la Gangliosidosis Tipo I.

En 1971, Goldberg y sus colaboradores fueron los primeros en describir variantes de la enfermedad, es decir, pacientes que eran clínicamente similares a los de la

Gangliosidosis tipo I, pero con anormalidades óseas menos severas (23). Algunos pacientes eran clínicamente semejantes a los pacientes de la Gangliosidosis Tipo II a diferencia de que el inicio de los síntomas era más tardío y su tiempo de sobrevivencia era mayor (22). Esta nueva variación del padecimiento fue llamada forma adulta, la cual también presentaba deficiencia de la enzima β -galactosidasa moderada o severa. En la actualidad se ha reconocido como la tercera forma de la enfermedad, denominada Gangliosidosis GM1 tipo Adulta o crónica (8).

Manifestaciones clínicas

La gangliosidosis GM1 ha sido clasificada en tres formas clínicas en base a la severidad y edad de aparición de los síntomas (8) :

- a) Gangliosidosis GM1 Infantil, que se caracteriza por deterioración psicomotora rápidamente progresiva, dismorfismo y manchas maculares rojo-cereza, anormalidades óseas severas y hepatoesplenomegalia prominente. Los síntomas aparecen usualmente dentro de los primeros 6 meses de vida y la muerte ocurre alrededor de los dos años de edad.
- b) Gangliosidosis GM1 Infantil tardía o Juvenil, con deterioración neurológica moderada, anormalidades óseas mínimas y hepatoesplenomegalia ausente, los síntomas usualmente aparecen por el primero o el segundo año de vida y la muerte ocurre aproximadamente antes de los 10 años de edad.

c) Gangliosidosis GM1 Adulta o Crónica, presenta un curso clínico más prolongado, las principales manifestaciones son disartia, anormalidades en la marcha, distonía en el cuello y extremidades, manchas maculares rojo-cereza, dismorfismo y visceromegalia. Un número significativo de pacientes presentan problemas relacionados con convulsiones y el retardo mental varía de moderado a severo. El rango de la edad de inicio de los síntomas es de 4-30 años y la edad en que ocurre la muerte aún no es bien conocida.

Características del retardo mental

El retardo mental no es una enfermedad sino solo un síntoma, la expresión de un bajo nivel del funcionamiento intelectual, por lo que no existe una definición satisfactoria del retardo mental.

La Asociación Psiquiátrica Americana propone que el término retardo mental se refiere " al funcionamiento intelectual general subnormal y que tiene su origen durante el periodo del desarrollo y está asociado con dificultades de aprendizaje, ajuste social y/o maduración (43).

El retardo mental puede ser clasificado etiológicamente de acuerdo a las causas principales que lo determinan :

1. Secuelas de infecciones o intoxicaciones.
2. Traumatismos o agresión de agentes físicos.
3. Trastornos del metabolismo, del crecimiento o de la nutrición.

4. Enfermedad encefálica posnatal.
5. Patología prenatal.
6. Anomalías cromosómicas.
7. Prematurez o inmadurez
8. Trastornos psiquiátricos importantes.
9. Privación social.
10. Otras.

Los recientes descubrimientos en la ciencia médica han permitido identificar alteraciones cromosómicas (1 en 200 nacimientos), metabólicas (1 en 1000 nacimientos) y otras en número menor. Se puede estimar que en México el número de sujetos con " necesidad de ayuda especial " es muy alto, aunque no se conoce con exactitud, de los cuales, un gran porcentaje sufre de algún tipo de retardo mental (43).

MATERIAL Y METODOS

Población estudiada

Se seleccionaron dos poblaciones, una de individuos con retardo mental pertenecientes a escuelas de educación especial, y la población control, constituida por individuos normales pertenecientes a escuelas del sistema federal y estatal. Las dos poblaciones fueron individuos de ambos sexos y con edades de entre 5 y 20 años.

Se excluyeron : aquellos individuos que no se encontraban dentro del rango de edad mencionado, los que no presentaban retardo mental e individuos con Síndrome Down (ya que se conoce de antemano que los individuos con éste síndrome no presentan alteraciones de la enzima β -galactosidasa).

Se obtuvo un total de 100 individuos, de los cuales 50 fueron individuos que exhibían retardo mental y 50 individuos que no presentaban retardo mental.

Origen de los reactivos

1.- De Sigma Chemical Company:

- A) p-Nitrofenol cristalino. 104-8
- B) Glicina G-7126.
- C) Acetato de sodio trihidratado.
- D) Carbonato de sodio. S-2127.
- E) p-Nitrofenil-D-galactopiranosido.

2.- J. T. Baker, S.A. de C.V.

A) Acido Acético.

Preparación de los reactivos

- 1.- Buffer de Acetatos 0.5 M pH 5.0 : se diluyeron 2.86 ml de ácido acético 99% a un volumen final de 100 ml. Se agregaron 29.6 ml de esta solución de acetato de sodio 0.5 M (6.8 gr. de acetato de sodio trihidratado en agua destilada y fue llevada a un volumen final de 100 ml). Se ajustó a un pH final de 5.0.
- 2.- p-Nitrofenil- β -D-galactosido 0.005 M : en buffer de acetatos 0.5 M pH 5-.0 : Se disolvieron 3.01 mg de p-nitrofenil- β -D-galactosido monohidratado en un pequeño volumen de buffer de acetatos y se diluyeron a un volumen final de 2.0 ml.
- 3.- Buffer de Glicina 0.25 M pH 10.0 : se disolvieron en 1.88 gr. de glicina y 2.65 gr. de carbonato de sodio en agua destilada y se diluyeron a un volumen final de 100 ml.
- 4.- Solución estandar de p-nitrofenol, 1000 nmol/ml : se disolvieron 13.9 mg. de p-nitrofenol en agua destilada y se diluyeron a un volumen final de 100 ml.

5.- Solución de Bicarbonato de Na-EDTA : Se disolvieron en 10 gr. de Bicarbonato de sodio en agua bidestilada; al solubilizarse, se agregaron 0.1861 gr. de EDTA; se disolvió y se aforó a 500 ml. (NaHCO₃)-EDTA. (10).

Lugar de trabajo

Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste (IMSS), en Monterrey, N.L. México.

Obtención de la muestra

Los individuos estudiados entregaron una muestra de orina fresca en frascos esteriles, los cuales fueron colocados en cajas de poliuretano con hielo para su traslado al área de trabajo.

Procesamiento de la muestra

La determinación de la enzima β -galactosidasa en orina se realizó de acuerdo a la Técnica descrita por Thomas G. H. (11). Modificada de acuerdo a nuestros propósitos.

a) Se colocaron 12 ml. de cada muestra de orina en tubos de 20 x 150 mm. y se centrifugaron en una centrífuga refrigerante (de 3 a 6°C) durante 15 minutos a 2500 rpm.

b) Se colocaron exactamente 10 ml. de la muestra centrifugada en tubos de diálisis de 27 x 80 mm.

prehumedecidos, los cuales retienen material con un peso molecular mayor a los 12,000 daltones.

c) Se dializó por un tiempo de 20 horas de 3 a 6°C, se realizaron algunos cambios de agua destilada enfriada.

d) Después de este tiempo se sacó el tubo de diálisis con la orina dializada, se removi6 y se midi6 el vol6men final en una probeta de 25 ml.

e) Se prepararon 2 mezclas de incubaci6n en tubos de 13 x 75 mm. para cada muestra de orina dializada de la siguiente manera:

	TUBO 1	TUBO 2
ORINA	0.8 ml	0.8 ml
p-Nitrofenil-B-D-galactosido	0.2 ml	0.2 ml

f) Inmediatamente se coloc6 el tubo 1 en ba6o de agua fría. Este sirvi6 de blanco.

g) El tubo 2 se coloc6 en ba6o de agua a 37°C.

h) Después de una hora se agregaron 0.4 ml de buffer de glicina 0.25 M a los 2 tubos y se mezcl6 bien.

i) Y al final se midi6 la absorci6n de cada muestra a 400 nm. en el espectrofot6metro. El tubo 1 sirvi6 como blanco para el tubo 2.

j) 1 unidad de actividad equivale a 1 nmol de p-nitrofenol liberado por 1 ml de orina a 37°C en 1 hora.

Evaluación de los datos

Las prueba estadística utilizada en el presente estudio fue la de Mann-Whitney (no-paramétrica) (42), donde se compararon los rangos promedios de las variables a) niveles enzimáticos y b) edad en las poblaciones (ver tablas 1-4) :

- 1.- masculina sin retardo vs femenina sin retardo.
- 2.- masculina con retardo vs femenina con retardo.
- 3.- sin retardo vs con retardo.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre los niveles de actividad de la β -galactosidasa en la población con retardo mental y la población sin retardo mental, los datos no presentaron una distribución normal (Fig 1,2 y Tablas 5,6), por lo cual se realizó la prueba de Mann-Whitney (grupos independientes) para su análisis estadístico (42).

De las 100 personas estudiadas se encontró lo siguiente:

1.- En cuanto los niveles enzimáticos, al compararse los rangos promedios (RP) de los grupos analizados mediante la prueba de Mann-Withney se encontró que las poblaciones:

1. masculina sin retardo (RP = 26.95, n = 21) vs femenina sin retardo (RP = 24.95, n = 29) no presentaron diferencias significativas (Z= -0.60; P > 0.05).
2. masculina con retardo (RP = 18.59, n = 17) vs femenina con retardo (RP = 29.06, n = 33) si presentaron diferencias significativas (Z= -2.41; P < 0.05).
3. sin retardo (RP = 51.77, n = 50) vs con retardo (RP = 49.23, n = 50) no presentaron diferencias significativas (Z= -0.44; P >0.05).

(Tablas 1 y 2)

2.- En cuanto a la edad, al compararse los rangos promedios (RP) de los grupos analizados se encontro que las poblaciones:

1. masculina sin retardo (RP = 22.05, n = 21) vs femenina sin retardo (RP = 28.00, n = 29) no presentaron diferencias significativas (Z= -1.43 P > 0.05).
2. masculina con retardo (RP = 24.21, n = 17) vs femenina con retardo (RP = 26.17, n = 33) no presentaron diferencias significativas (Z= -0.45; P > 0.05).
3. sin retardo (RP = 45.54, n = 38) vs con retardo (RP = 53.54, n = 62) no presentaron diferencias significativas (Z= -1.34; P >0.05).

(Tablas 3 y 4)

Por lo anterior, podemos decir, que el sexo, puede ser un factor que afecte la variación de los niveles de actividad de la β -galactosidasa en individuos con retardo mental, siendo interesante realizar estudios posteriores en cuanto a la relación de sexo (factores hormonales) con la actividad de esta enzima.

Por otro lado, el factor edad no reveló diferencias significativas, por lo que podríamos considerar que al efectuar este estudio enzimático, no sería necesario tomar en cuenta los rangos de edad, sirviendo este estudio de base para aquellos investigadores que deseen realizar trabajos referentes a la β -galactosidasa.

En el presente estudio no pudimos realizar comparaciones sobre los niveles de actividad de la enzima β -galactosidasa de la población con retardo mental con otras poblaciones similares

que hayan sido estudiadas, debido a que no encontramos referencias en la literatura, por lo que consideramos que este estudio puede servir de referencia para efectuar estudios similares en nuestra población mexicana.

Los niveles de actividad de la β -galactosidasa presentaron una gran variabilidad, de 5.86 a 378.26 u. en la población con retardo mental y de 19.79 a 396.11 u. en la población sin retardo mental. Estos valores coincidieron en cuanto a variabilidad, con los valores reportados, de 80 a 354 u. por Lombardo y Ericksson (citados en 44). Ellos midieron la enzima en suero de 45 individuos normales y nosotros utilizamos muestras de orina. Sin embargo, aunque las muestras utilizadas no son las mismas, podemos realizar una comparación de ambos valores, observándose que los niveles enzimáticos que reportó Hultberg también presentaron variabilidad (10 - 70 nmoles/ml/hr/37°C) y el número de individuos muestrados es muy similar al que nosotros empleamos (45 y 50 respectivamente) (citado en 44). Por otro lado, Zetina y Gonzalez, realizaron un estudio sobre enfermedades hereditarias lisosomales en México y cuantificando la actividad de la enzima β -galactosidasa en leucocitos de 70 individuos normales, encontraron una gran variabilidad (80-354 nmol/mg/h) en los niveles de actividad de la enzima (11,12). Aunque estos resultados están expresados en diferentes unidades que las descritas en nuestro estudio, podemos hacer la comparación en cuanto a que en ambos casos existe una notable variabilidad enzimática.

De acuerdo con la literatura no se han estudiado los factores

que afectan la actividad de la enzima β -galactosidasa, solo existe un estudio realizado por Hultberg y Isaksson en 1981 (citado en 44), donde trabajaron con mujeres embarazadas y encontraron que los niveles de actividad de la β -galactosidasa se elevan tres veces más de lo normal. Aún no se conocen las causas de estos hallazgos.

Dado lo anterior, sería importante realizar estudios posteriores sobre la determinación de los factores que provocan variación de los niveles de actividad de la enzima β -galactosidasa.

Con respecto a la selección de nuestra población, consideramos que podría recomendarse la clasificación de retardo mental propuesta por Valenzuela (43), en los individuos muestreados, tomando en cuenta algunos de los siguientes puntos :

1. Existencia de un patrón clínico más o menos idéntico en más de un miembro de la familia
2. Signos físicos asociados a algunos de los numerosos síndromes conocidos hepatoesplenomegalia, cambios esqueléticos, opacidades corneales, dermatitis recurrentes, incoordinación de miembros inferiores, etc.
3. Signos neurológicos cambiantes o progresivos.
4. Deficiencias de estatura y peso u otras manifestaciones de dismorfismo.

De esta forma, los individuos de la población a estudiar tendrían un conjunto de características seleccionadas. En ellos

se medirían los niveles de actividad de la β -galactosidasa y podrían entonces compararse con los niveles de la enzima obtenidos en nuestro estudio y tratar de esclarecer de esta manera, ya sea corroborando o descartando la idea de que el retardo mental está asociado a otros aspectos en los individuos de una población, siendo una característica importante para encontrar niveles bajos de actividad de la β -galactosidasa. Al mismo tiempo, podrían detectarse pacientes con la enfermedad Gangliosidosis GM1, que de acuerdo con la edad se clasificarían en algunos de los tipos de Gangliosidosis GM1.

Así como también sería recomendable hacer un estudio de esta enzima en el cual se tendría que realizar un incremento en el tamaño de la muestra e igualmente buscar la normalización del parámetro (enzima) en las poblaciones ya sea por métodos logarítmicos para efectuar comparación por medio de varianza bifactorial

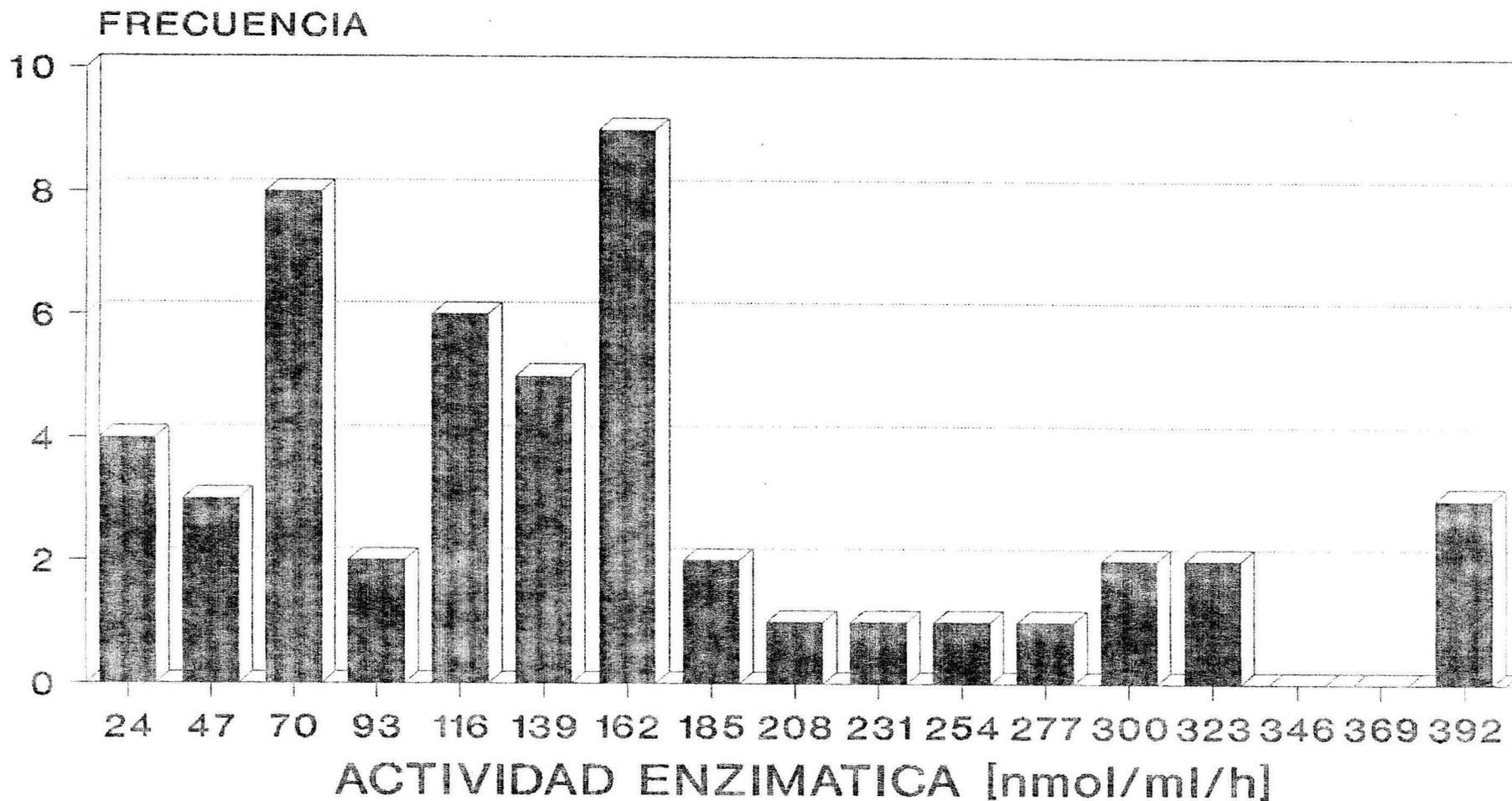


FIG.1. Frecuencia de los niveles de actividad de la β -galactosidasa en la población sin retardo mental.

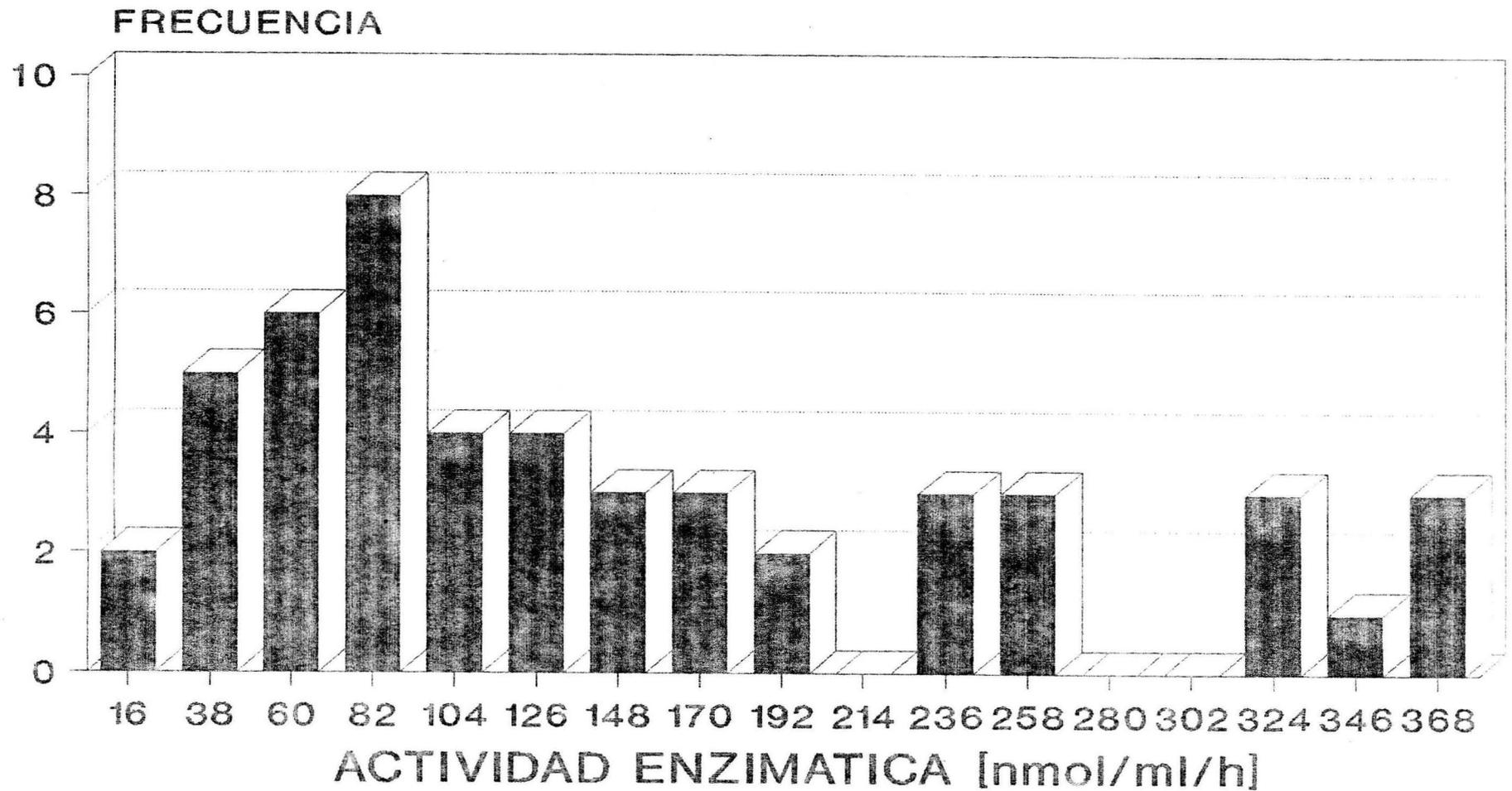


FIG. 2. Frecuencia de los niveles de actividad de la β -galactosidasa en la población con retardo mental.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos proponer las siguientes conclusiones :

Los rangos promedios de los niveles de actividad de la β -galactosidasa, en los individuos de la población con retardo mental y en los individuos pertenecientes a la población sin retardo mental, fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$).

En lo que respecta a los factores estudiados , edad y sexo, revelaron que la edad no influye en la actividad de la β -galactosidasa, mientras que el parámetro sexo puede alterar los niveles de actividad de la enzima, como lo observamos en nuestro estudio.

Asimismo, se encontró una gran variabilidad de la enzima β -galactosidasa, tanto en la población con retardo mental como en la población sin retardo, datos que coinciden con lo reportado por otros autores (citados en 44).

Es de interés mencionar, que sería conveniente seleccionar previamente, a los sujetos con retardo mental que impliquen errores metabólicos, en los cuales es más probable que se observen deficiencias de la β -galactosidasa.

Se sugieren estudios futuros para incrementar el conocimiento de los errores innatos del metabolismo provocados por la deficiencia de enzimas lisosomales.

APENDICE

Tabla 1. Rangos Promedios (RP), obtenidos por la prueba de Mann-Whitney, de los niveles de actividad de la β -galactosidasa co respecto al sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)

ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA		
	RP de la Poblacion 1	RP de la Poblacoion 2
SEXO M	26.95	18.59
SEXO F	24.95	29.06
AMBOS SEXOS	51.77	49.23

Tabla 2. Prueba de Mann-Whitney, sobre los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto al sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)

ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA		
	Poblacion 1	Poblacoion 2
SEXO M Vs SEXO F	Z = -0.60 P > 0.05	Z = -2.41 P < 0.05
AMBOS SEXOS	Z = -0.44 P > 0.05	

Tabla 3. Rangos Promedios (RP), obtenidos por la prueba de Mann-Whitney, de los niveles de actividad de la β -galactosidasa co respecto a la edad y el sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)

ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA		
	RP de la Poblacion 1	RP de la Poblacoion 2
SEXO M	22.05	24.21
SEXO F	28.00	26.17
AMBOS SEXOS	45.54	53.54

Tabla 4. Prueba de Mann-Whitney, sobre los niveles de actividad de la β -galactosidasa con respecto a la edad y el sexo (Masculino = M, Femenino = F), en la población de individuos sin retardo mental (1) y la población de individuos con retardo mental (2)

ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA		
	Poblacion 1	Poblacoion 2
SEXO M Vs SEXO F	Z = -1.43 P > 0.05	Z = -0.045 P > 0.05
AMBOS SEXOS	Z = -1.34 P > 0.05	

Tabla 5. Niveles de actividad de la enzima β -Galactocidasa (β -GAL), Sexo (1=masculino, 2=femenino) y Edad (años) de individuos pertenecientes a la población I (sin retardo).

POBLACION I			
No	ACTIVIDAD β -GAL	EDAD	SEXO
1	173.60	5	1
2	38.99	5	1
3	28.71	5	1
4	100.34	5	2
5	154.45	6	2
6	315.55	6	1
7	19.79	6	2
8	396.11	7	2
9	104.94	7	2
10	66.75	7	2
11	165.59	8	1
12	40.25	8	1
13	105.96	8	2
14	76.17	9	2
15	158.34	9	2
16	152.38	9	1
17	49.86	10	2
18	64.36	10	1
19	162.09	10	2
20	169.20	10	2
21	32.27	11	2
22	385.42	11	1
23	145.02	11	1
24	211.80	11	1
25	142.38	12	1
26	160.32	13	1
27	299.45	13	1
28	171.34	13	1
29	170.74	13	2
30	304.02	13	2
31	33.96	14	1
32	76.24	15	1
33	246.19	15	1
34	95.23	15	1
35	70.32	16	1
36	69.61	16	2
37	231.22	16	1
38	60.06	16	1
39	149.33	16	2
40	266.88	16	2
41	143.99	17	1
42	329.91	17	2
43	386.45	18	2
44	149.67	18	1
45	109.40	19	1
46	74.99	20	1
47	126.42	20	1
48	117.55	20	1
49	177.06	20	2
50	119.44	20	1

Tabla 6. Niveles de actividad de la enzima β -Galactocidasa (β -GAL), Sexo (1=masculino, 2=femenino) y Edad (años) de individuos pertenecientes a la población II (con retardo).

POBLACION II			
No	ACTIVIDAD β -GAL	EDAD	SEXO
1	75.77	5	2
2	226.25	5	1
3	141.24	5	1
4	161.89	6	2
5	33.80	6	1
6	78.22	6	2
7	123.19	7	1
8	152.58	7	2
9	171.79	7	1
10	106.33	7	1
11	144.16	8	2
12	172.75	8	1
13	36.56	8	1
14	66.23	8	2
15	34.51	8	2
16	135.44	9	1
17	262.80	9	1
18	113.22	9	1
19	38.99	9	1
20	191.80	9	1
21	111.31	10	2
22	93.76	11	1
23	48.15	11	2
24	81.49	11	1
25	89.27	11	1
26	327.19	11	1
27	60.70	11	1
28	56.72	13	2
29	123.53	13	1
30	87.11	13	2
31	350.28	14	1
32	257.01	14	2
33	90.36	14	1
34	185.79	14	2
35	334.42	14	1
36	259.10	14	1
37	49.42	15	1
38	58.04	15	2
39	378.25	16	1
40	243.38	16	1
41	128.98	17	1
42	333.01	17	1
43	373.94	17	1
44	242.96	17	1
45	92.32	18	1
46	371.83	18	1
47	5.86	19	2
48	65.82	19	2
49	75.98	19	2
50	18.31	20	1

BIBLIOGRAFIA

1. Okada S & O'Brien J S. Generalized Gangliosidosis: Beta-galactosidase deficiency. *Science* 1968;160:1002-1004.
2. Glew R H, Basu A, Prencz E M, Remaley A T. Biology of disease: lysosomal storage diseases. *Lab. Invest* 1985;3:250-68.
3. Watts, R W E, Gibbs D A. Lysosomal storage diseases : biochemical and clinical aspects . London: Taylor & Francis 1986;43-117.
4. Galijaard H. Genetic metabolic diseases = early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biochemical Press 1980;39-57.
5. Hoff Feds. Lysosomes and storage diseases. New York: Acad Press Inc. 1973; 148-53.
6. Herschkowitz N, Schulte F J. The Lipidoses : from defect to dysfunction . *Neuropediatrics* 1984;15:110-1.
7. O'Brien J S . GM1 Gangliosidosis. En Stanbury J S, Wyngaarden J B & Fredereckson D S . The Metabolic Basis of Inherited Disease, 3rd ed. Mc Graw-Hill, New York, 1972, 639-662.
8. O'Brien J S . β -Galactosidase deficiency (GM1 Gangliosidosis, Galactosialidosis, and Morquio syndrome type B) : ganglioside sialidase deficiency (Mucopolipidosis IV). En Stanbury J S, Wyngaarden J B & Frederickson D S. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th ed McGraw-Hill, New York 1989, 1797-1806.
9. Thomas G H. β -Galactosidase in human urine. Deficiency in Generalized Gangliosidosis. *J. Lab. & Clin. Med.* 1969; 74: 725-731
10. Thomas G H and Howell R R. Selected Screening Tests for Genetic Metabolic Diseases. Year Book Medical Publishers Inc., 1973
11. Zetina G M E y González N A. Enfermedades Hereditarias Lisosomales en Mexico. III. Diagnóstico de laboratorio para Esfingolipidosis. *Rev. Invest. Clin.*, 1991; 43:152-160.
12. Zetina G M E y González N A. Enfermedades Hereditarias Lisosomales. I. Resultados iniciales del programa para su diagnóstico en México. *Rev. Invest. Clin.*, 1989; 41:319-326.

13. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: En the metabolic basis of inherited disease. Stanbury J B, Wyngaarden, J B, Fredereckson D S (eds), 4a ed. Mc. Graw-Hill. New York,1978. 1430
14. Gatt, S. Ensymatic hydrolisis of sphingolipids. V. hidrolisis of monosialoganglioside and hexosylceramides by rat brain β -galactosidase. Biochem. Biophys., 1967; 137:192-195.
15. Rowland M D. Tratado de Neurologia, Salvat Editores, S.A., 3a Ed. Barcelona, España, 1987, 417.
16. O'Brien J. S. GM1 Gangliosidosis. En: The Metabolic Basis of inherited disease. Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredereckson D.S.(eds) 4a. Ed, Mc Graw-Hill. New York 1978
17. Landing B H. et.al. Familial neurovisceral lipidosis. Am.J.Dis. Child,1964,108:503.
18. Norman R M, Urich H, Tingey A H, and Goodbody R A. Tay Sachs disease whith visceral involvement and its relationship to Nieman-Picks disease. J. Path. Bact. 1959; 72,409.
19. O'Brien J S, Stern M B, Landing B H, O'Brien J K, and Donnell G N. Generalized Ganliosidosis:another inborn error of ganglioside metabolism?. Am.J.Dis.Child. 1965; 109: 338-346.
20. Scott C R, Lagunoff D, and Trump B F. Familial neurovisceral lipidosis. J.Pediat., 1967; 71: 357-366.
21. Derry D M, Fawcett J S, Andermann F, and Wolfe L S. Late infantile systemic lipidosis (major monosialogangliosidosis delineation of two types) .Neurology,1968; 18:340-347.
22. Feldges A, Mueller H J, Buechle E, and Stalder. GM1 Gangliosidosis. Part I. Clinical aspects and biochemistry. Helv. Paediat. Acta.,1973; 28: 511-519.
23. Goldberg M F, Cotlier E, Fichenscher L G, Kenyon K, Enat R, and Borowsky S A. Macular cherry-red spot, corneal clouding, and β -galactosidase deficiency. Arch.intern.Med. 1971,; 128: 387-398.
24. Norden A G W, Tennat L L. and O'Brien J S. GM1 Ganglioside β -galactosidase A: Purification and studies of the enzyme from human liver. J.Biol.Chem.,1974; 249:7969.
25. Norden A G W. and O'Brien J S. Gangliosido GM1 β -galactosidase:Studies in human liver and brain. Arch.Biochem.Biophys., 1973; 139:383

26. Ho M W. and O'Brien J S. Differential effect of chloride ions on β -galactosidase isoenzymes: A method for separate assay. *Clin.Chim.Acta*, 1971; 32:443.
27. Wallenfels K, Malhotra P O. *Methods In Enzymology*. Academic Press. 1960. Tomo 9;409-430.
28. Ho M W, Cheetham P. and Robinson D. Hydrolysis of GM1-ganglioside by human liver β -galactosidase isoenzymes. *BiochemJ.*, 1973;136:351.
29. O'Brien J S and Norden A G W. Nature of the mutation in adult β -galactosidase deficient patients. *Am.J.Hum.Genet.*, 1977; 29:184.
30. Norden A G. and O'Brien J S. Binding of human liver β -galactosidase to plant lectins insolubilized on agarose. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1974; 56:193.
31. Werner R. *Fundamentos de Bioquímica Moderna*, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza España.1988, 121,122.
32. Gardner M D, Lytt I. *Enfermedades Genéticas y Endocrinas de la Infancia*. Salvat Editores, S A, Barcelona España,1971, 1120.
33. O'Brien J S, Stern M B, Landing B H, O'Brien J K. and Donell G N.Generalized Gangliosidosis. *Amer.J.Dis.Child.*, 1965;109:338.
34. Sacrez R, Juif J G, Gigonnet J M. and Gruner J E. La Maladie de Landing, oidiote amaurotique infantile precoce avec gangliosidose généralisée. *Pediatric*,1967; 22:143.
35. Seringe P, Plainfosse B, Lautmann F, Lorilloux J, Calamy G, Berry J P. and Watchi J M. Gangliosidose Généralisée du type Norman-Landing, a GM1. *Ann.Pediat.*, 1968; 15:165.
36. Dacremont G. and Kint J A. GM1-ganglioside accumulation and β -galactosidase deficiency in a case of GM1 Gangliosidosis (Landing disease) *Clin.Acta*,1968; 21:421.
37. Brady R O, O'Brien J S, Bradley R M and Gal A E. Sphingolipids hydrolases in brain tissue of patients with Generalized Gangliosides. *Biochim.Acta*, 1970; 210:193.
38. Suzuki K, Tanaka H, Yamanaka T. and Damme V O. The specificity of β -galactosidase in the degradation of gangliosides. en: Svennerholm L, Mendel P, Dreyfus H. and Urban P F. *Structure and Function of Gangliosides*. Plenum Press ed. New York. 1980

39. Singer H S. and Schaffer I A. White cell β -galactosidase activity. *Neur.Eng.J.Med.*, 1970; 282:571.
40. Stuart K. Trafficking of Lysosomal Emzymes in Normal and Disease Status. *J.Clin.Invest*, 1986;77:1-6.
41. Wallenfels K, Weil R. *Methods in Enzimology*. Academic Press.1970.Tomo 13; 617-663.
42. Norman H N, et. al. *Statistical Package for the Social Sciences*. Mc Graw-Hill book Company. New York. 1975.
43. Valenzuela R H, Luengas J, Marquet L. *Manual de Pediatría*. 10 ed. Interamericana. México. 1980.
44. CIBA- GEIGY. *Tablas Científicas*. 8a. ed. C. Lenter. New York. 1984. Vol. III.