



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**  
**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MICHOACÁN**



**“SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN LISOSOMAL DE UNA LÍNEA DE  
CÉLULAS TUBULARES PROXIMALES EN CULTIVO Y SU  
CARACTERIZACIÓN”**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**  
**p.Q.F.B. JORGE ALEJANDRO BÉJAR ADAME**

**ASESOR**  
**D.C. RAFAEL MEDINA NAVARRO**

**Morelia Michoacán, octubre de 2017**

## *Agradezco y dedico esta tesis a...*

A mis padres y mis hermanos que han sido un apoyo incondicional durante toda mi formación académica, y a quienes les debo la persona que soy ahora. Por sus consejos, desvelos, amor sin medida, trabajo duro, preocupaciones, soporte, y mucho más; los amo.

A mi asesor, el D.C. Rafael Medina Navarro por sus grandes enseñanzas, por reprenderme cuando era necesario, por su tiempo y paciencia invertidos en mí, por ser además de un profesor académico uno de vida, gracias por esas largas pláticas y clases de filosofía que me impartió, gracias por sus consejos y, sobre todo, muchas gracias por creer en mí.

A mi mejor amigo y hermano de toda la vida Gandhi Daniel Sandoval, porque con él inicié esta aventura y ha sido una excelente compañía durante todos estos años, te quiero.

A mis amigos Hugo Fernández, Miguel Patiño, Jocelyn Castillo por hacerme parte de su vida y compartir conmigo días de estudio, desvelos, risas; a Iñaki Durán que sin haber sido un compañero de clase se convirtió en un buen amigo muy pronto, a José Jesús Villagómez que, aunque se unió casi al final de esta travesía ha mostrado ser un amigo fiel y estoy seguro lo seguirá siendo por mucho tiempo más, a todos ustedes los quiero.

A la D.C. Anel Gómez y la futura M.C. Diana Villalpando por haber hecho de mi estancia en el servicio social y la realización de este trabajo, momentos increíbles, gracias por haber estado conmigo todo este tiempo, por los almuerzos y las horas de recreación social que compartieron conmigo. Espero se sienta orgullosa de mi doctora Anel, las quiero.

A mis profesores, D.C. Sandra Sánchez, E.H.D.L. Judith Prieto, E.B.C. Virginia Campos por ser un modelo que seguir, por el amor y la vitalidad con la que imparten sus clases, la manera en que logran inspirar a sus alumnos, en cómo me inspiraron a mí, gracias por compartir una pequeña parte de sus conocimientos y su pasión.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
2.1. La enfermedad renal.....	5
2.2. Historia de los lisosomas.....	12
2.3. Formación de los lisosomas.....	26
2.4. Acción lisosomal en el proceso de degradación.....	29
2.5. La estructura de los lisosomas.....	36

2.6. Las catepsinas.....	38
2.7. N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa (NAGasa).....	40
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>42</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>44</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>44</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>44</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
7.1. Las células tubulares proximales.....	45
7.1.1. Línea celular.....	45
7.1.2. Cultivo.....	45
7.1.3. Subcultivo.....	46
7.1.4. Bioseguridad y normas de trabajo en los laboratorios de cultivos celulares.....	48
7.1.5. Medio de cultivo.....	50
7.1.6. Manipulación de los cultivos celulares.....	50
7.1.7. Nivel de bioseguridad.....	51
7.1.8. Requerimientos del laboratorio BSL-2.....	52

7.2. Procedimiento para obtención de las células en cultivos.....	52
7.3. Procedimiento para la separación de lisosomas.....	55
7.4. Método para la determinación de fosfatasa ácida. ....	59
7.4.1. Componentes del kit.....	59
7.4.2. Reactivo y equipo requerido, pero no proporcionado.....	59
7.4.3. Instrucciones de preparación. ....	60
7.4.4. Almacenamiento y estabilidad.....	60
7.4.5. Ensayo en placa de 96 pocillos.....	61
7.4.6. Cálculo de los resultados. ....	62
<b>VIII. RESULTADOS. ....</b>	<b>62</b>
8.1. Actividad enzimática de la Fosfatasa Ácida.....	62
8.2. Evaluación de la actividad de las proteasas (Catepsina B). ....	66
8.3. N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa (NAGasa).....	70
<b>IX. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>74</b>
<b>X. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>78</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Tendencias en la incidencia de la insuficiencia renal tratada: número de pacientes por cada millón de habitantes por país entre el 2000 y el 2013. Fuente: USDRS.....	8
Figura 2. Esquema que muestra los pasos de la vía secretora.....	28
Figura 3. Esquema que ilustra y describe los pasos del proceso de autofagocitosis. .....	32
Figura 4. Esquema que ilustra y describe los pasos del proceso de digestión de material endocitado por fagocitosis y pinocitosis.....	33
Figura 5. Principales funciones de los lisosomas y su relación con los procesos clave de la célula.....	34
Figura 6. Algunas categorías funcionales clave de las proteínas de la membrana lisosómica.....	38
Figura 7. Fotografía de uno de los cultivos de células tubulares proximales HK2 visto bajo el microscopio de contraste de fases. ....	47
Figura 8. Esquema que muestra el método desarrollado para la obtención de los lisosomas y su evaluación enzimática.....	58
Figura 9. Molécula del sustrato 4-Metilumbeliferil-N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminida para la enzima N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Propiedades de los endo lisosomas intermedios. ....	35
Tabla 2. Esquema de reacción para ensayos en placa de 96 pocillos. ....	61
Tabla 3. U/mL de actividad enzimática que se obtuvieron para cada una de las evaluaciones realizadas. ....	63
Tabla 4. Esquema de reacción para la evaluación enzimática de Catepsina B. ...	68



## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Comparación de las actividades enzimáticas de fosfatasa ácida para cada una de las fracciones lisosomales. ....	66
Gráfica 2. Curva estándar de 7-Amido-4-Metilcoumarina (7-AMC). ....	67
Gráfica 3. Muestra la tendencia en el tiempo de la actividad enzimática de las catepsinas B de la muestra problema y el control. ....	69
Gráfica 4. Muestra las $\mu$ Unidades/Tiempo de actividad enzimática tanto en la muestra problema como en el control. ....	70
Gráfica 5. Curva estándar de 4-Metilumbeliferona (4-MU). ....	71
Gráfica 6. Muestra la tendencia en el tiempo de la actividad enzimática de NAGASA en la muestra problema como en el control en unidades de fluorescencia. ....	72
Gráfica 7. Muestra los $\mu$ mol de 4-Metilumbeliferona liberados para cada una de las mediciones. ....	73

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

<b>4-MU</b>	4-Metilumbeliferona
<b>7-AMC</b>	7-Amido-4-metilcoumarina
<b>CENETEC</b>	Centro nacional de excelencia tecnológica en salud
<b>Da</b>	Daltones
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>IMSS</b>	Instituto mexicano del seguro social
<b>INEGI</b>	Instituto nacional de estadística geografía e historia
<b>IR</b>	Insuficiencia renal
<b>IRC</b>	Insuficiencia renal crónica
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>μmol</b>	Micromol
<b>NAGasa</b>	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
<b>ppmh</b>	Pacientes por millón de habitantes
<b>REDTJAL</b>	Registro estatal de diálisis y trasplante de Jalisco
<b>USDRS</b>	Sistema de datos renales de Estados Unidos

## **RESUMEN.**

La frecuencia de la enfermedad renal crónica secundaria a diabetes mellitus muestra tendencias crecientes. Los lisosomas son los compartimientos catabólicos primarios de las células eucariotas. Descomponen material extracelular que han sido secuestrados por endocitosis y componentes intracelulares a través de la autofagia. Un enfoque poderoso para entender la multiplicidad de las actividades llevadas a cabo por las células vivas es fraccionar la célula en sus componentes subcelulares. En el presente trabajo se propone un método de fraccionamiento celular en cultivos de células tubulares proximales para obtener una fracción lisosomal la cual ha sido caracterizada a través de dos de sus enzimas más importantes (fosfatasa ácida y catepsina B) y un marcador de daño renal, NAGasa (N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa). Los datos arrojados señalan que el método ha sido efectivo hasta este punto de la investigación. La actividad enzimática de la fosfatasa ácida en cada una de las fracciones deja ver que efectivamente la fracción obtenida ha sido rica en estos organelos al tener la mayor actividad de esta enzima en la fracción que llamamos "filtrado", y que la acción enzimática del resto de las fracciones es sólo la actividad libre producida por la adhesión de la enzima a las mitocondrias y algunos otros organelos.

Palabras clave: lisosomas, células tubulares, fosfatasa ácida, catepsina B, nefropatía.

## **ABSTRACT.**

The frequency of chronic kidney disease secondary to diabetes mellitus shows increasing trends. Lysosomes are the primary catabolic compartments of eukaryotic cells. They decompose extracellular material that has been sequestered by endocytosis and intracellular components through autophagy. A powerful approach to understanding the multiplicity of activities carried out by living cells is to fractionate the cell into its subcellular components. In the present work, we propose a method of cell fractionation in cultures of proximal tubular cells to obtain a lysosomal fraction which has been characterized through two of its most important enzymes (acid phosphatase and cathepsin B) and a marker of renal damage, NAGase (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase). The data show that the method has been effective until this point of the investigation. The enzymatic activity of the acid phosphatase in each of the fractions shows that the fraction obtained has been rich in the organelles since the enzyme has the highest activity in the fraction that we call "filtrate", and that the enzymatic action of the rest of the fractions is just the free activity produced by the adhesion of the enzyme to the mitochondria and some organelles.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

En el curso de una investigación destinada a caracterizar la glucosa-6-fosfatasa de tejido hepático, en 1955, Christian de Duve descubrió una clase distinta de una sola población de gránulos homogéneos que contenían cinco hidrolasas ácidas. Se propuso hacer referencia a estos gránulos como lisosomas, por su riqueza en términos de enzimas hidrolíticas<sup>1</sup>. El hallazgo de que estas hidrolasas actúan sobre diferentes sustratos sugirió que los lisosomas, también conocidos como “bolsas suicidas”, podrían desempeñar un papel en la digestión intracelular a pH ácido<sup>2</sup>.

En el sistema lisosomal, la degradación de proteínas es el resultado de la acción combinada aleatoria y limitada de diversas proteasas. Con el fin de lograr la degradación eficiente de macromoléculas biológicas dentro de los lisosomas, estos contienen una serie de diversas hidrolasas, incluyendo proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas. Entre las aproximadamente 50 hidrolasas lisosomales conocidas, de particular importancia son la aspártica, serina y cisteína proteasas<sup>2</sup>.

Exclusivos de las células animales, los lisosomas son responsables de degradar ciertos componentes que se han tornado obsoletos para la célula o el organismo. El proceso por el cual el organelo envejecido se degrada en un lisosoma se denomina autofagia. Los materiales llevados por endocitosis o fagocitosis hacia el interior de una célula también pueden ser degradados en los lisosomas. En la fagocitosis, partículas insolubles grandes son envueltas por la membrana plasmática e internalizadas<sup>3</sup>. Los lisosomas son organelos de forma variada que

miden de 0.2-2  $\mu\text{m}$ , los cuales están rodeados por una membrana simple. En general se encuentran algunos centenares de lisosomas por célula<sup>4</sup>.

Los lisosomas desempeñan un papel importante en la degradación de las biomacromoléculas a través de la acción concertada de las diversas proteasas contenidas en ellos<sup>5</sup>, cuyo pH óptimo es usualmente bajo, entre 4.5 y 5<sup>6</sup>. Todas las enzimas lisosómicas trabajan con mayor eficiencia a valores de pH ácidos, este pH ayuda a desnaturalizar las proteínas, haciéndolas accesibles a la acción de las hidrolasas lisosómicas. Las enzimas lisosomales son poco activas al pH neutro de las células y de la mayoría de los líquidos extracelulares, así, si un lisosoma libera sus enzimas al citosol, donde el pH se encuentra entre 7 y 7.3 causa poca degradación de los componentes citosólicos<sup>3</sup>.

El hallazgo de que estas enzimas degradan numerosas macromoléculas biológicas sugirió que los lisosomas son los principales responsables de la degradación intracelular no específica. Los lisosomas se han descubierto en todas las células eucariotas y se comprobó que estaban relacionados en la digestión del material extracelular tomado por endocitosis y del material intracelular segregado por autofagia. Una de las hidrolasas lisosomales tiene un papel especial, las proteasas, que son responsables de la degradación de las proteínas<sup>7</sup>. Los lisosomas están involucrados en la degradación de una amplia variedad de sustancias estructuralmente diversas en sus moléculas más básicas, tales como proteínas, glicosaminoglicanos, esfingolípidos, glucógeno, ácidos nucleicos, oligosacáridos y lípidos complejos<sup>8</sup>.

## **II. ANTECEDENTES.**

### **2.1. La enfermedad renal.**

La frecuencia de la enfermedad renal crónica muestra una tendencia creciente, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo<sup>9</sup>.

La enfermedad renal crónica se define como una disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular o un aclaramiento de creatinina estimado inferior a 60 mL/min, o como la presencia de daño renal (alteración histológica o presencia de marcadores urinarios como albuminuria o proteinuria elevadas, alteraciones en el sedimento urinario o en las pruebas de imagen) durante al menos 3 meses. Las cifras de morbilidad y mortalidad son alarmantes; en México, esta es una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias. Está considerada una enfermedad catastrófica debido al número creciente de casos, por los altos costos de inversión, recursos de infraestructura y humanos limitados, la detección tardía y altas tasas de morbilidad y mortalidad en programas de sustitución. Hasta el momento, México carece de un registro de pacientes con enfermedad renal crónica por lo que se desconoce el número preciso de pacientes en cualquiera de sus estadios, los grupos de edad y sexo más afectados, así como el comportamiento propio de los programas. Se estima una incidencia de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia de 1,142; cuenta con alrededor de 52,000 pacientes en terapias sustitutivas, de los cuales el 80 % son atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)<sup>9</sup>.

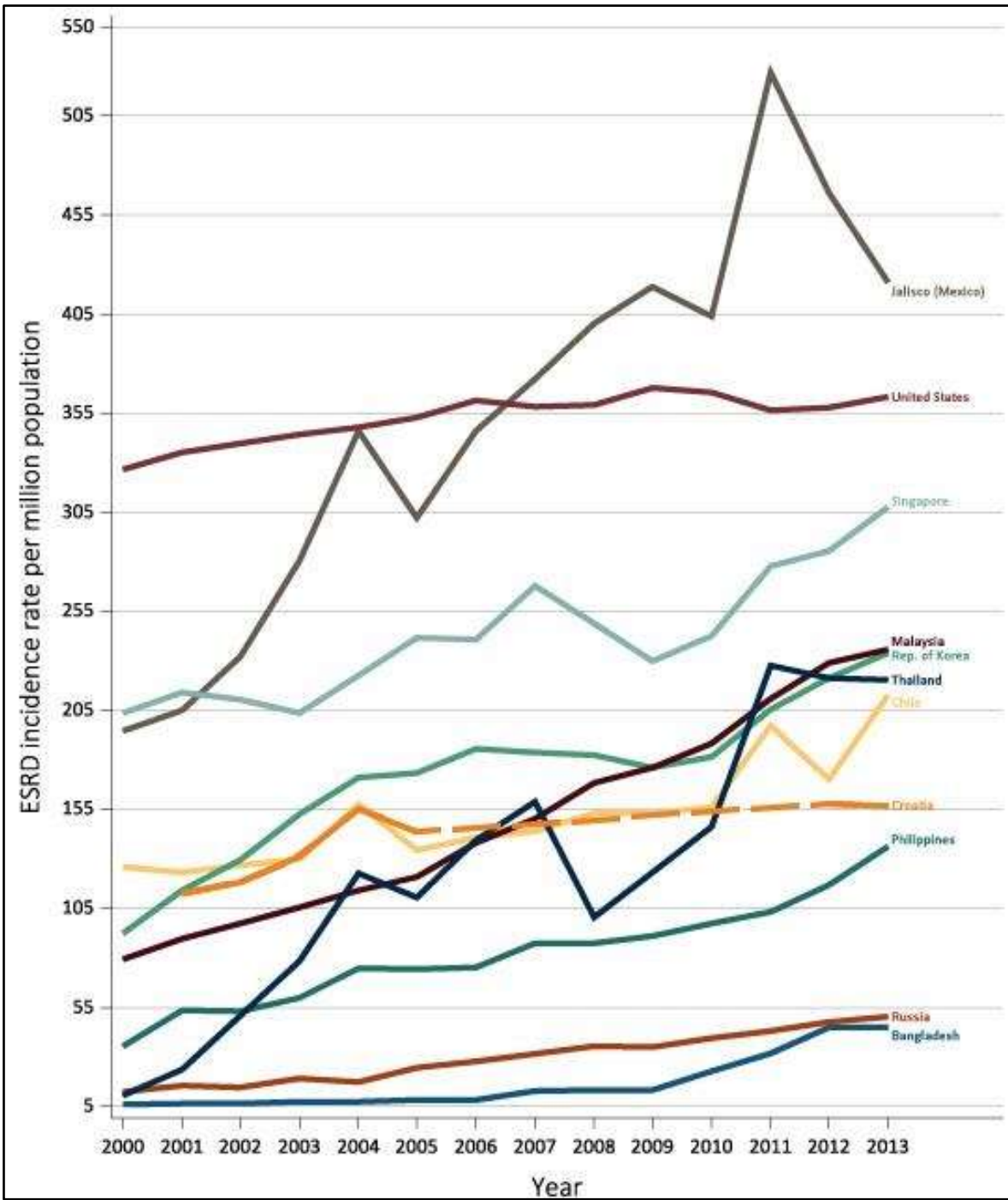
En el estudio “Epidemiología de la Insuficiencia Renal en México”, dado a conocer por la Secretaría de Salud en el 2010, se destacaba que cada año se sumaban, al menos, 40,000 nuevos casos de insuficiencia renal en el país. Sin embargo, debido a una falta de cultura de prevención, este padecimiento ha tenido un rápido crecimiento en los últimos años (11 % anual), llegándose a duplicar la incidencia de nuevos casos en la población mexicana como lo reporta un estudio comparativo del Sistema de Datos Renales de Estados Unidos (USDRS). De acuerdo con este estudio en ningún país se registran niveles de incidencia tan altos como en México, en donde se reportan arriba de 500 enfermos por cada millón de habitantes.

La insuficiencia renal es un padecimiento que consiste en la pérdida progresiva, permanente e irreversible de las funciones de los riñones, entre ellas: la capacidad de filtrar sustancias tóxicas de la sangre, la eliminación natural de líquidos y la capacidad endócrina (producción de hormonas). Éste deterioro paulatino de las funciones renales impacta negativamente el buen funcionamiento del organismo y provocan: retención de agua, acidosis, hipertensión, anemia y alteraciones en el esqueleto hasta llegar a provocar la muerte del individuo.

La Insuficiencia Renal es causada principalmente por padecimientos crónico-degenerativos mal controlados entre los que destacan la Diabetes Mellitus y la Hipertensión Arterial, ambos con altos índices de prevalencia en México, 7.2 % y 16.3 % respectivamente. Desafortunadamente, la Insuficiencia Renal es una enfermedad silenciosa ya que no produce síntomas sino hasta que el paciente se encuentra en fases muy avanzadas de la enfermedad, generalmente, cuando su



función renal ya ha disminuido por debajo del 15 %. Esto provoca que su detección se realice en etapas casi terminales en las cuales el único tratamiento consiste en el “Reemplazo de la Función Renal”, a través de métodos como la diálisis peritoneal, la hemodiálisis o, en el mejor de los casos, un trasplante de riñón.



**Figura 1.** Tendencias en la incidencia de la insuficiencia renal tratada: número de pacientes por cada millón de habitantes por país entre el 2000 y el 2013. Fuente: USDRS.

De acuerdo con cifras reportadas recientemente por la Fundación Mexicana del Riñón existen actualmente en México, entre 8 y 9 millones de personas con Insuficiencia Renal en etapas tempranas, 109,000 personas con Insuficiencia Renal Crónica (estadío 5) y cerca de 60,000 personas con tratamiento sustitutivo de la función renal (ya sea diálisis peritoneal o hemodiálisis). El INEGI ha reportado que actualmente la Insuficiencia Renal es la 5ta causa de muerte más importante entre la población mexicana, ya que anualmente mueren cerca de 12 mil personas por complicaciones derivadas de la insuficiencia renal. Recalcó que las entidades con mayor incidencia son: el Estado de México con mil 487 fallecimientos, el Distrito Federal con 948, Jalisco con 920, Puebla con 756, Guanajuato con 604 y Nuevo León, con 392.

De continuar el rápido incremento en los niveles de incidencia de esta enfermedad, para el 2025 existirán alrededor de 212,000 pacientes diagnosticados con Insuficiencia Renal, de los cuales morirán 160,000 cada año, de acuerdo con estimaciones realizadas por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC).

El Registro Estatal de Diálisis y Trasplante de Jalisco (REDTJAL) ha informado un aumento continuo en el número de pacientes con IRCT. En términos de incidencia, la cifra se incrementó de 92 pacientes por millón de habitantes (ppmh) en 1999 a 400 ppmh en el año 2008, sólo superado por el estado de Morelos con 557 ppmh; ambos estados mexicanos son epidemiológicos de la IRCT y ocupan los primeros lugares en el mundo. A manera de comparación, en Japón en el 2008 se registraron 288 nuevos ppmh con IRCT y en Estados Unidos 362 ppmh (quienes

tradicionalmente habían tenido la más alta incidencia en el mundo). Por otro lado, la prevalencia de IRCT en Jalisco en el año 2003 fue de 394 ppmh, mientras que en el 2008 fue de 1,030 ppmh.

Cuando se compara globalmente el porcentaje de pacientes incidentes por diagnóstico de diabetes mellitus (DM) como causa de IRCT, nuestro país ocupa el primer lugar mundial; de hecho, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la primera causa de IRCT en México (en Jalisco causa el 55 % de todos los casos nuevos), con lo que queda claro la relevancia de esta enfermedad crónico-degenerativa como causa de falla renal en nuestro medio<sup>10</sup>.

El costo del tratamiento de la IRCT es extremadamente caro. En países como Estados Unidos en el año 2008 el gasto total fue de 39.5 mil millones de dólares. En México, en el año 2009 la insuficiencia renal ocupó el tercer lugar en el gasto por padecimiento dentro del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), con una inversión de 4,712 millones de pesos en tan sólo 4 % de los derechohabientes, lo que representa un incremento del 27 % con respecto al 2005. Por otro lado, la Secretaría de Salud informó en 2009 que sólo el 22 % de los pacientes que requieren terapia de reemplazo renal en realidad la reciben, lo que tiene un costo anual estimado de 7,550 millones y probablemente ascendería a 33,000 millones de pesos si se atendiera al 100 % de los pacientes que lo requieren<sup>10</sup>.

Durante muchas décadas el fenómeno de recambio proteico fue aceptado como un proceso aleatorio, no regulado e inespecífico. En una década este concepto cambió enormemente, y en la actualidad, se acepta que la degradación de las proteínas celulares es un fenómeno altamente complejo, temporal y espacialmente controlado y altamente regulado, que juega un papel principal en una gran variedad de vías y procesos celulares. Entre estos procesos están, el ciclo celular, el desarrollo, la diferenciación y la regulación de la transcripción, la presentación de antígenos, la transducción de señales, la endocitosis mediada por receptor, el control de calidad y la modulación de diversos procesos metabólicos. El concepto ha venido cambiando tanto y tiene tanta importancia, que no es de sorprender que al mismo tiempo el mal funcionamiento de los procesos de degradación celular se vincule con numerosos procesos patológicos incluyendo el cáncer, varias patologías neurodegenerativas y del sistema inmune, así como con el proceso inflamatorio. En la enfermedad renal estos conceptos cobran una importancia particular debido al procesamiento masivo que el riñón lleva a cabo con las proteínas en el organismo, particularmente con la albúmina, la principal proteína del plasma.

Sin embargo, uno de los grandes retos para seguir avanzando en el estudio de las proteínas y su procesamiento renal, es contar con modelos confiables y versátiles, que permitan trascender la barrera que impone la dificultad de llevar a cabo estudios a nivel celular y molecular en modelos con organismos vivos y en seres humanos.

## **2.2. Historia de los lisosomas.**

Un enfoque poderoso para entender la multiplicidad de las actividades llevadas a cabo por las células vivas es fraccionar la célula en sus componentes subcelulares. De esta manera, es posible localizar funciones celulares específicas y evaluar el papel de cada uno de los organelos en el funcionamiento de la célula. El fraccionamiento celular también facilita el estudio de la biogénesis de los componentes celulares, su transporte intracelular, ensamblaje de membrana y, por lo tanto, los factores que regulan el control de dicha dinámica.

Cristian de Duve y colaboradores, en 1949 realizaron observaciones peculiares sobre la glucosa-6-fosfatasa específica del tejido hepático, encontrando que estaba asociada con gránulos por algún tipo de enlace débil<sup>11</sup>.

Así, en 1951, J. Berthet y C. de Duve utilizaron hígado de rata para intentar aislar una fracción mitocondrial en la cual pudieran estudiar este fenómeno. Una vez extraído el hígado, se conservaba en una solución isotónica fría para posteriormente ser presionado contra una malla de alambre con el fin de eliminar la red vascular y conectiva principal, la pasta resultante era homogeneizada en sacarosa 0.25 M<sup>11</sup>.

El homogenado resultante fue sometido a una serie de centrifugaciones a diferentes velocidades donde la fracción nucleica fue obtenida a 600 g, la mitocondrial a 8,500 g, además de la fracción microsomal que fue obtenida a 20,000 g<sup>11</sup>.

Se realizaron diversos ensayos para averiguar en qué medio homogeneizador se puede recuperar la mayor proporción de enzima unida. Generalmente se llevaron a cabo experimentos gemelos, en los que se homogeneizaron muestras de la misma pulpa hepática en dos medios diferentes, los cuales fueron sacarosa 0.25 M y KCl 0.15 M. También se investigaron los siguientes medios: agua destilada, sacarosa 0.25 M, sacarosa 0.88 M, sacarosa 0.25 M más albúmina sérica al 7 % (p/v) y cloruro de potasio 0.45 M<sup>11</sup>. Cabe destacar que a excepción del agua destilada que provoca una liberación rápida de la enzima, todos los medios anteriores proporcionan preparaciones de aproximadamente la misma baja actividad. Sin embargo, los resultados muestran que la activación espontánea ocurre más rápidamente en el KCl isotónico que en la sacarosa isotónica<sup>11</sup>.

Es muy importante mencionar que la actividad de fosfatasa ácida medida hasta este punto de la investigación sólo pertenecía a aproximadamente un 15 % de la actividad total puesto que los ensayos se llevaban a cabo sin provocar la activación de la enzima. Este 15 % de actividad reportado fue llamado como “actividad libre”, es decir, la actividad de fosfatasa ácida unida de alguna manera por adsorción a las mitocondrias.

Posteriormente J. Berthet y colaboradores en 1951<sup>12</sup>, demostraron que las preparaciones frescas de subfracciones mitocondriales de hígado de rata muestran muy poca actividad enzimática cuando se ensayan bajo condiciones que preservan su integridad morfológica; se activan fácilmente mediante una serie de tratamientos, que provocan la liberación simultánea de la enzima en forma soluble. Las investigaciones sobre este fenómeno llevaron a la conclusión de que la

fosfatasa ácida se mantiene dentro de los gránulos mediante una barrera parecida a una membrana, impermeable a la sacarosa y al glicerofosfato, pero no a una serie de otras sustancias, tales como glicerol, glucosa y diversas sales orgánicas. Los gránulos parecían comportarse como sistemas osmóticos típicos<sup>13</sup>.

Hasta esta etapa de la investigación, C. de Duve, Appelmans, J. Berthet y L. Berthet, habían descubierto que la forma unida de la enzima, aunque asociada principalmente con la mitocondria también se recupera hasta cierto punto con los microsomas, llegando a la conclusión de que la fosfatasa ácida está unida a un tipo especial de gránulos citoplásmicos, que difieren tanto de las mitocondrias portadoras de citocromo oxidasa como de los microsomas que contienen glucosa-6-fosfatasa.

No fue hasta 1955 que Françoise Appelmans, R. Wattiaux y C. de Duve, separaron las fracciones de mitocondria y microsomas utilizando la misma técnica de separación que utilizaron Berthet & Duve en 1951<sup>11</sup>. Todos los experimentos que realizaron mantenían el propósito de demostrar de una manera más eficiente las diferencias que había entre la actividad de la enzima citocromo oxidasa con respecto a la fosfatasa ácida, perteneciendo esta última como suponían, a una clase distinta de gránulos citoplásmicos ya que la enzima citocromo oxidasa no mantenía la peculiaridad de la fosfatasa ácida de ser recuperada incluso en las subfracciones microsomales<sup>14</sup>.

La fosfatasa ácida, como enzima principal y característica de estos nuevos gránulos citoplásmicos, fue medida a 37 °C en presencia de 0.05 M de  $\beta$ -glicerofosfato y 0.05 M de acetato, el pH se ajustó a 5.0 con HCl. Para las



determinaciones de actividad libre, las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 minutos en presencia de sacarosa 0.25 M, bajo cuyas condiciones la enzima encerrada dentro de los gránulos intactos es usualmente no reactiva. La actividad total se estimó en preparaciones previamente tratadas durante 3 minutos en el Waring Blendor (homogeneizador tipo licuadora), generalmente después de una dilución 1:10 con agua destilada y congelando y descongelando al menos 10 veces<sup>14</sup>.

Con el fin de investigar la causa de la distribución atípica encontrada para la fosfatasa ácida unida en experimentos previos, se comparó el comportamiento de sedimentación de esta enzima con el de la actividad respiratoria, que ha sido demostrado pertenecer exclusivamente a las mitocondrias<sup>14</sup>.

Los resultados le dan un mayor soporte a los obtenidos por Novikoff, Podber, Ryan & Noe en 1953<sup>15</sup>, que han descrito una disociación parcial de la fosfatasa ácida de las oxidasas. El hecho de que la enzima recuperada en las fracciones más ligeras esté presente principalmente en forma unida, muestra claramente que la separación de la fosfatasa ácida de la enzima citocromo oxidasa refleja una verdadera diferencia en las características de sedimentación de los gránulos en los que se concentran ambas enzimas<sup>14</sup>.

Es necesario aclarar que la actividad de la fosfatasa ácida unida no es otra cosa que la enzima liberada de los gránulos citoplásmicos que la contienen a través de una lesión en su membrana. Los gránulos intactos se han estimado como la diferencia entre la actividad total y la libre.

Hasta aquí, llegaron a considerar que ambas enzimas, citocromo oxidasa y fosfatasa ácida están presentes en todos los gránulos, pero en una proporción que varía con uno de los factores, tamaño o densidad, que determinan el comportamiento de sedimentación de las partículas granulares. O también, consideraron a las fracciones subcelulares como mezclas de dos clases distintas de gránulos, con propiedades de sedimentación ligeramente diferentes y caracterizadas cada una por una de las dos enzimas estudiadas.

Los resultados sugieren muy fuertemente que la fracción mitocondrial clásica se compone principalmente de gránulos que poseen actividad oxidativa, pero carecen de fosfatasa ácida. En vista de las numerosas observaciones morfológicas realizadas por otros autores, estos gránulos que contienen citocromo oxidasa se comportan como una población bastante homogénea. En consecuencia, la principal información proporcionada por este estudio es que las mitocondrias típicas están probablemente libres de fosfatasa ácida, pero que, cuando están aisladas por centrifugación diferencial, están contaminadas por gránulos de un segundo tipo que son muy ricos en esta enzima.

Mientras tanto, algunos datos indirectos son proporcionados por los resultados registrados en este y otros trabajos. A partir de los datos de sedimentación, se puede calcular que los diámetros de los gránulos deben oscilar entre 0.25 y 0.8  $\mu\text{m}$  si su densidad es baja (1.10) o entre 0.13 y 0.4 si su densidad es alta (1.30)<sup>14</sup>.

El hallazgo de que la fosfatasa ácida del hígado de rata está encerrada dentro de un tipo especial de gránulos citoplasmáticos, con propiedades de sedimentación intermedias entre las mitocondrias y los microsomas, ha llevado al desarrollo de

un nuevo esquema de fraccionamiento, por el cual las enzimas unidas a estos gránulos pueden ser fácilmente identificados<sup>16</sup>.

Este nuevo esquema de fraccionamiento se utilizó para estudiar varias enzimas como las catepsinas que mostraron asemejarse a la fosfatasa ácida al estar distribuidas desigualmente entre las mitocondrias y los microsomas.

A través de una serie de centrifugaciones a diferentes velocidades, las cuales, junto a las condiciones en las que se realizaron están descritas en el artículo<sup>16</sup>, lograron obtener una fracción nuclear 1:4 (w/v) en sacarosa 0.25 M además de un extracto citoplásmico 1:10. Una vez obtenidas estas dos fracciones, el extracto citoplásmico se fraccionó adicionalmente de acuerdo al esquema esbozado por Appelmans *et al.*<sup>14</sup>, para obtener así tres fracciones particuladas, dos mitocondriales y una microsomal, las cuales fueron aisladas por fuerzas integradas de 33,000 g/min, 250,000 g/min y 3,000,000 g/min respectivamente. Los sedimentos de cada fracción fueron primero separados por centrifugación de 30-40 mL de fluido colectados en un mismo tubo, y se administraron dos lavados con sólo 10 mL de volumen con el fin de reducir la dilución en el sobrenadante<sup>16</sup>. La fosfatasa ácida y catepsinas fueron medidas como lo describen Gianetto y Duve en 1955<sup>17</sup>.

Según los patrones de distribución de los resultados de este artículo, las enzimas estudiadas se pueden dividir en 4 grupos, que se cree que corresponden a al menos tres clases distintas de gránulos citoplasmáticos.

El primer grupo comprende la enzima citocromo oxidasa, el citocromo-succinato-c-reductasa, la rodanasa y el 40 % de la fumarasa total. Se ha encontrado que todas

estas enzimas están asociadas, con los gránulos citoplasmáticos más pesados, y por lo tanto pueden considerarse verdaderamente mitocondriales<sup>16</sup>.

En el segundo grupo se comprende las enzimas microsómicas, donde se encuentra principalmente la glucosa-6-fosfatasa. Por último, en el tercer grupo de enzimas se encuentra la fosfatasa ácida, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, catepsina y 80 %, si no toda, de la actividad de la glucuronidasa<sup>16</sup>.

Existen fundamentos sólidos para creer que la distribución peculiar de la fosfatasa ácida refleja la existencia de una clase distinta de gránulos y el hallazgo registrado anteriormente de que las mitocondrias parecen ser homogéneas con respecto a una serie de enzimas proporciona apoyo adicional a esta interpretación. El hecho de que las otras enzimas estén disociadas de la enzima citocromo oxidasa casi tan marcadamente como la fosfatasa ácida y muestren patrones de distribución muy similares a la de esta última enzima, justifican la conclusión provisional de que pertenecen a gránulos de la misma clase<sup>16</sup>.

Numerosas publicaciones se han dedicado a la caracterización de este nuevo grupo de partículas citoplasmáticas llamadas lisosomas. En el hígado de rata, los lisosomas pueden diferenciarse de las mitocondrias, aunque no están completamente separados de ellos, gracias a una velocidad de sedimentación algo más lenta en sacarosa 0.25 M. Se comportan en preparaciones recién aisladas como bolsas pequeñas esencialmente inertes que, tras la lesión de cualquiera de una variedad de medios, liberan una colección de enzimas hidrolíticas solubles con un pH ácido óptimo.

Los medios hasta ahora conocidos para efectuar la liberación de enzimas lisosómicas dependen de la rotura mecánica, rotura osmótica, disrupción fisicoquímica o algún tipo de ruptura autolítica. Las vibraciones sonoras también han demostrado ser eficaces en algunos experimentos preliminares<sup>18</sup>. Es probable que estos tratamientos actúen causando una lesión primaria a la membrana de partícula, la cual entonces permite que los sustratos externos penetren dentro de los gránulos, así como las enzimas internas que escapen de ellos. Esto explica la activación y solubilización simultánea de las hidrolasas unidas.

En 1959 H. Beaufay y C. de Duve, investigaron los efectos sobre el estado de las hidrolasas lisosómicas de pretratar los gránulos con diversas preparaciones enzimáticas, también estudiaron el efecto de la activación termal.

Todos los experimentos se realizaron sobre las fracciones mitocondriales aislados del hígado de rata según lo descrito por Appelmans y de Duve en 1955<sup>13</sup>. Las cantidades adecuadas de las preparaciones mitocondriales, que corresponden en la mayoría de los casos a 0.2 g de hígado fresco, se preincubaron durante 10 minutos o más a 25 °C en un volumen total de 1 mL que contenía sacarosa 0.25 M, tampón clorhidrato de glioxalina 15 mM, pH 7.4, y el agente enzimático estudiado junto con su activador o inhibidor<sup>18</sup>.

Los experimentos descritos por Beaufay y de Duve, han establecido que el pretratamiento de preparaciones mitocondriales con enzimas lipolíticas o proteolíticas, pero no con ribonucleasa o lisozima, provoca una liberación gradual de todas las hidrolasas lisosómicas. Estos fenómenos se interpretan más fácilmente como consecuencias de una desorganización inducida

enzimáticamente o químicamente de una barrera de lipoproteínas, que restringe la libertad física de las hidrolasas ácidas, así como su capacidad para interactuar con sus sustratos<sup>18</sup>.

Con respecto a la liberación térmica, la energía de activación relativamente baja del proceso sugiere que es debido a la acción de la enzima más que a la desnaturalización. La catepsina es un candidato muy bueno para esta función como proteasa<sup>18</sup>.

Así pues, de acuerdo con los resultados obtenidos en estos experimentos, Beaufay y de Duve concluyen que la liberación de las enzimas lisosómicas se debe a la disrupción de una barrera de lipoproteínas que restringe su libertad física y su accesibilidad a sus respectivos sustratos.

En las investigaciones descritas en el artículo publicado por H. Beaufay, D. S. Bendall, P. Baudhuin, R. Wattiaux y C. de Duve en 1959<sup>19</sup>; analizan de manera más detallada la distribución de diversas enzimas en fracciones mitocondriales a partir de hígado de rata, con ayuda de la centrifugación por gradiente de densidad, ya que hasta ahora, los resultados obtenidos en estudios anteriores ya habían confirmado la distinción entre las mitocondrias y los lisosomas.

Todos estos experimentos se realizaron en fracciones mitocondriales lavadas y preparadas de acuerdo con Appelmans y de Duve descritas en su artículo de 1955<sup>13</sup>.

En este mismo artículo, se ha podido concluir que entre el 80 % y el 90 % de las proteínas de las fracciones analizadas pertenecen a las mitocondrias y que en

todos los subgrupos mitocondriales que se separaron en estos experimentos, la actividad específica de la enzima citocromo oxidasa era esencialmente la misma, por lo que se deduce que las mitocondrias son esencialmente homogéneas en contenido enzimático. Mientras tanto en los lisosomas, las hidrolasas lisosómicas medidas en este experimento muestran diferencias típicas del grupo mitocondrial, así como obvias similitudes en el comportamiento, lo que confirma aún más la afirmación de que pertenecen a un grupo distinto de partículas. La heterogeneidad enzimática de este grupo, que contrasta con la homogeneidad de las mitocondrias, también ha sido discutida anteriormente por C. de Duve *et al.* 1955<sup>16</sup>, Beaufay y de Duve, 1959<sup>18</sup>; y es nuevamente evidente en los presentes experimentos<sup>19</sup>.

Beaufay, Bendall, Baudhuin, Wattiaux y de Duve en este mismo artículo publicado en 1959<sup>19</sup>, describieron experimentos en los que las fracciones mitocondriales del hígado de rata se resolvieron parcialmente en sus componentes por equilibrio de densidades de sacarosa, ya sea con H<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O como disolvente.

De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, en 1964 H. Beaufay, P. Jacques, P. Baudhuin, O. Z. Sellinger, J. Berthet y C. de Duve publicaron un artículo en donde las fracciones mitocondriales de hígado de rata se centrifugaron en gradientes de glucógeno, con soluciones de sacarosa de varias concentraciones definidas, como disolvente para el polisacárido. Utilizaron glucógeno ya que se dieron cuenta que los experimentos mencionados anteriormente sufrían del hecho de que las partículas debían ser expuestas a medios de muy alta osmolaridad y a choques osmóticos bastante severos. Por lo tanto, realizaron una búsqueda de un soluto de alto peso molecular de densidad,

solubilidad e inocuidad bioquímica adecuadas para permitir la formación de gradientes de densidad prácticamente isoosmóticos de cualquier presión osmótica deseada, en la que las preparaciones en partículas podrían subfraccionarse por equilibrio de densidad sin complicaciones osmóticas<sup>20</sup>.

Todos los experimentos se realizaron en fracciones mitocondriales lavadas de hígado de rata, correspondientes esencialmente a la suma de las fracciones M y L de C. de Duve, Pressman, Gianetto, Wattiaux y Appelmans en 1955<sup>16</sup>.

Concorde a los experimentos de medición de citocromo oxidasa que realizaron a las fracciones mitocondriales, concluyen que la distribución de la enzima citocromo oxidasa refleja fielmente la de la masa mitocondrial y puede servir como patrón de referencia válido para comparar contra cualquier otra distribución enzimática. Por otro lado, los resultados obtenidos en la medición de las hidrolasas ácidas en gradientes de glucógeno proporcionan pruebas adicionales de la asociación de estas enzimas con un grupo especial de partículas distintas de las mitocondrias, los lisosomas. Esto queda claro, por los resultados que estos científicos reportan en la tabla 10, que muestran estrechas correlaciones entre las seis hidrolasas, así como desplazamientos relativamente importantes con respecto a la enzima citocromo oxidasa<sup>20</sup>.

Desde un punto de vista práctico, la heterogeneidad enzimática de los lisosomas plantea el problema de una enzima de referencia adecuada. En la mayoría de los experimentos, se observaron las diferencias más amplias entre la fosfatasa ácida, que parece estar más concentrada en las partículas menos densas, y la desoxirribonucleasa ácida, que tiende a ser particularmente abundante en las



densas. Por esta razón, se ha acostumbrado, siempre que las mediciones de numerosas hidrolasas ácidas resultaron impracticables, basarse en estas dos enzimas para una estimación de la distribución de sus partículas huésped<sup>20</sup>.

Cada uno de los artículos citados anteriormente muestran el proceso que a través de los años realizaron los científicos pioneros en el descubrimiento de los lisosomas y las técnicas utilizadas por ellos están relatadas con mayor detenimiento en cada uno de estos mismos artículos. Cabe mencionar, que a pesar de que el presente trabajo no se haya realizado sobre tejido de hígado de rata, sí se tomaron las bases para poder obtener las fracciones subcelulares aun en cultivos de células HK2.

En el libro "Methods in enzymology" volumen XXXI parte A, referido a las biomembranas<sup>21</sup>, proponen un nuevo método de fraccionamiento subcelular a través de gradientes de concentración donde utilizan hígado de rata para los experimentos. El procedimiento será relatado a continuación, sin embargo, solamente se describirá el proceso de centrifugación omitiendo la manera en que preparan el homogenado ya que para el presente trabajo no es de mayor interés al estar nosotros trabajando con cultivos celulares y no con hígado de rata.

El procedimiento de fraccionamiento se diseñó para separar todos los organelos celulares membranosos del mismo homogeneizado. La separación de las fracciones celulares se lleva a cabo usando centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa.

El homogeneizado filtrado se centrifuga a 3,500 rpm en un rotor JA-20 (960 g  $R_{av}$ , 7.0 cm; 1450 g  $R_{max}$ , 10.8 cm) en la centrífuga modelo Beckham J-21 durante 10

minutos. El sobrenadante se decanta a través de varias capas de estopilla. El residuo o pellet es utilizado para separar membrana plasmática, mitocondria y núcleos, mientras que el sobrenadante será el de interés para nosotros ya que de ahí es de donde se van a obtener los lisosomas junto a peroxisomas y mitocondria<sup>21</sup>.

El sobrenadante 1 (aproximadamente 70 mL) se filtra a través de dos capas dobles de estopilla para eliminar los lípidos y se centrifuga a 18,000 rpm durante 10 minutos en un rotor de tipo Spinco 42.1 (25,000 g en  $R_{av}$ ). El sedimento o pellet, puede usarse para la purificación de mitocondrias o para la separación de mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. El sobrenadante 2 es decantado<sup>21</sup>.

Antes de hablar sobre la separación por gradiente de densidad, es importante mencionar que los estudios fueron llevados a cabo con ratas que fueron previamente inyectadas con Triton WR 1339. Para cada preparación, dos ratas machos (200-250 g Sprague-Dawley) fueron inyectadas intraperitonealmente con el detergente Triton WR 1339. La cantidad de Triton usada para la inyección fue de 75 mg/100 g de peso de la rata en una solución de 200 mg/mL de Triton en NaCl al 0.9 %. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de su sacrificio y se mataron 3.5 días después de la inyección de Triton WR 1339<sup>21</sup>.

El residuo o pellet es preparado como se describió anteriormente. La cantidad de microsomas contaminantes deben ser reducidos resuspendiendo el pellet con sacarosa-EDTA tamponada que contiene etanol 0.1 %, sedimentando a 18,000 rpm durante 10 minutos en un rotor de tipo Spinco 42.1 y descartando la capa ligera superior. El sedimento marrón inferior se resuspende en un volumen final de

4 mL de una solución de sacarosa 0.25 M que contiene 0.1 % de etanol y se utiliza para la separación en tritosomas, mitocondrias y peroxisomas usando un gradiente de densidad de sacarosa continua. En la parte inferior de un tubo de centrifuga para un rotor SW 50 se añaden 4 gotas de 65.1 % de sacarosa. Después se forma un gradiente lineal (4.0 mL), que varía de 35 % a 57.5 % de sacarosa (densidad 1.15-1.27) en el tubo usando un formador de gradiente. Las soluciones de sacarosa utilizadas para formar los gradientes se fortifican con Dextran-10 al 5 % (w/w) y etanol al 0.1 %<sup>21</sup>.

Un mL de la fracción mitocondrial se coloca cuidadosamente en la parte superior de cada tubo y los tubos se centrifugan a 49,000 rpm (199,000 g en  $R_{av}$ ) en un rotor Spinco SW 50 durante 90 minutos. Tres bandas definidas son obtenidas. Una banda ligera superior en la interfaz contenía los tritosomas que se recogieron usando una jeringa. La banda verdosa inferior, los peroxisomas, se recogió a través de un agujero hecho en la parte inferior del tubo. La banda media marrón es la mitocondria<sup>21</sup>.

Los lisosomas tienen una distribución de densidad amplia y por lo tanto no pueden separarse fácilmente de las mitocondrias y de los peroxisomas por centrifugación con gradiente isopícnico. El Tritón, que fue inyectado, se recogió selectivamente y se acumula dentro de los lisosomas, disminuyendo su densidad. Tales lisosomas se cargan con Triton (tritosomas) y luego se pueden separar fácilmente. El EtOH 0.1 % es usado para prevenir la acción de la catalasa<sup>21</sup>.

### **2.3. Formación de los lisosomas.**

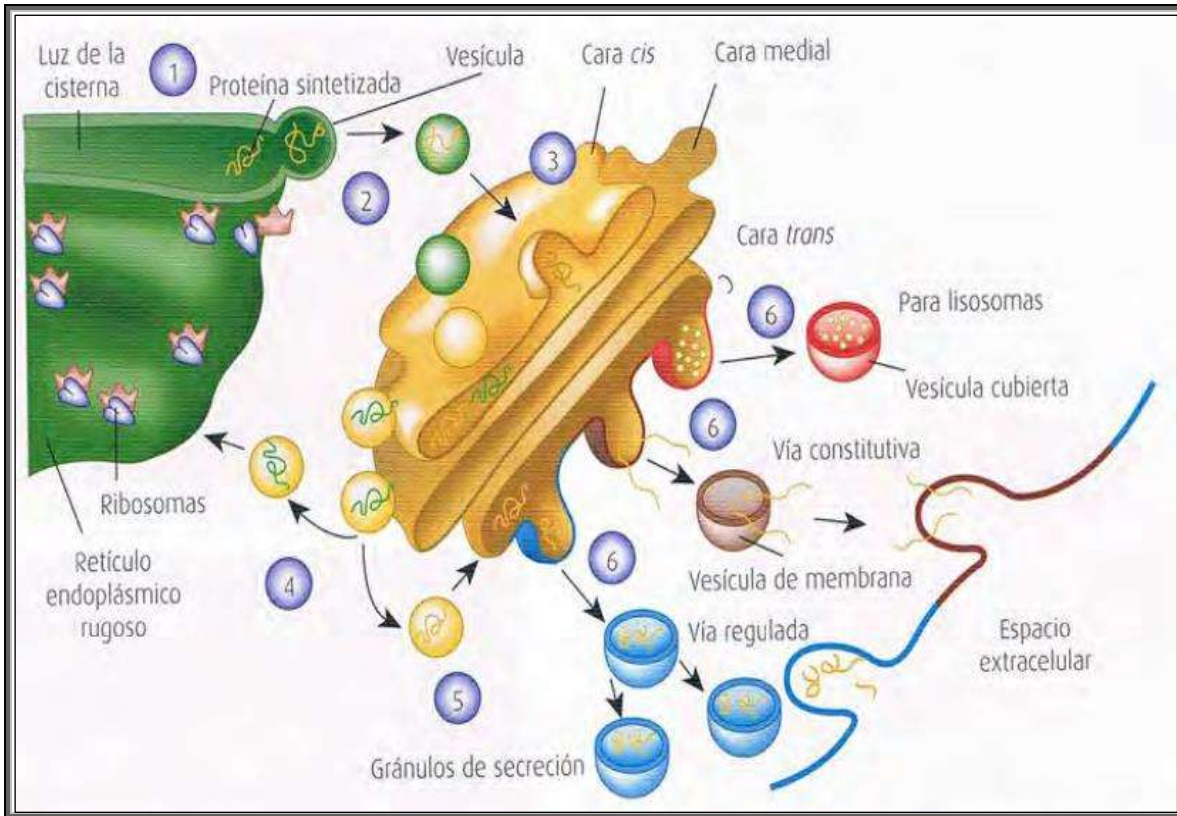
Como ya se mencionó, los lisosomas son los compartimientos catabólicos primarios de las células eucariotas. Descomponen material extracelular que han sido secuestrados por endocitosis y componentes intracelulares a través de la autofagia<sup>22</sup>. Este organelo se forma a partir de la cara trans del aparato de Golgi por medio de vesículas cubiertas de clatrina, que contienen a las enzimas lisosomales inactivas<sup>23</sup>.

Cuando un ARNm inicia la síntesis de una proteína que tiene un péptido de señalización para dirigirse al retículo endoplásmico rugoso, todo el complejo de inicio se dirige y se vincula con la membrana de este organelo. Aquí tiene lugar la síntesis de la proteína naciente. Toda proteína sintetizada en el RER sufre modificaciones postraduccionales como la glucosilación, la conformación tridimensional, su estabilización mediante la formación de enlaces disulfuro, y el establecimiento de interacciones hidrofóbicas y otros enlaces débiles. Por último, mediante una señal específica en la cadena polipeptídica, las proteínas se recolectan en una región del retículo endoplásmico rugoso en donde se forma una yema y luego una vesícula para enviarlas al aparato de Golgi<sup>23</sup>.

Los pasos iniciales en la biosíntesis de enzimas lisosómicas solubles se comparten con proteínas secretoras: inserción en el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER), escisión de secuencia señal, glicosilación de núcleos de restos de asparagina seleccionados sobre la proteína naciente con un oligosacárido preformado (tres glucosas, nueve manosas y dos residuos de N-acetilglucosamina) y la eliminación de los residuos de glucosa y una manosa del

oligosacárido. La primera reacción única para la síntesis de enzimas lisosómicas, la adquisición del marcador de reconocimiento manosa-6-fosfato, parece ocurrir poco después de la exportación desde el RER hacia el aparato de Golgi<sup>25</sup>.

El aparato de Golgi está constituido por una serie de sacos membranosos o cisternas apiladas. Se distinguen dos polos: la cara *cis*, orientada hacia el núcleo celular y con una cisterna con forma convexa, y la cara *trans*, que se orienta hacia la pared apical de la célula y tiene una cisterna en forma cóncava. El aparato de Golgi recibe, clasifica a través de las modificaciones postraduccionales y envía a diferentes destinos a las proteínas sintetizadas en el RER. La cara *cis* del aparato de Golgi, recibe vesículas provenientes del RER y ahí continúan las modificaciones postraduccionales, tales como el marcado con manosa-6-fosfato (en el caso de proteínas que estén destinadas a ser enzimas lisosomales)<sup>25</sup>, la glicosilación que contribuye a formar las señales que deben tener las proteínas destinadas hacia los lisosomas, y en general a agregar moléculas de carbohidratos a las proteínas. Estas moléculas de carbohidratos incrementan la solubilidad de las proteínas en medio acuoso. Del aparato de Golgi parten tres vesículas diferentes, una de ellas contiene una señalización especial, que las dirige hacia los lisosomas; estas son las enzimas lisosomales<sup>23</sup>.



**Figura 2.** Esquema que muestra los pasos de la vía secretora<sup>23</sup>.

1. Las proteínas son sintetizadas en el RER y comienzan a sufrir modificaciones postraduccionales. 2. Se forma una yema y posteriormente una vesícula que transporta las proteínas del RER al aparato de Golgi. 3. Las vesículas se fusionan en la cara cis del aparato de Golgi, continúan las modificaciones postraduccionales en las proteínas. 4. Las proteínas marcadas de forma errónea o con alteraciones en su configuración son enviadas de regreso al RER. 5. Las vesículas continúan avanzando a la cara medial y posteriormente a la cara trans. 6. En la cara trans las proteínas se clasifican y se envían en vesículas a diferentes destinos como la vía constitutiva, vía regulada o a otros organelos como los lisosomas.

#### **2.4. Acción lisosomal en el proceso de degradación.**

Los lisosomas tienen, además de la membrana que los limita, una cubierta adicional de una proteína conocida como clatrina. Las vesículas que contienen a las enzimas hidrolasas están inactivas, ya que requieren de un medio ambiente interno ácido, a un pH de  $\leq 5$ , para que las enzimas sean activadas. Por lo tanto, cuando reciben del plasmalema pequeñas vesículas con material endocitado, que degradarán los lisosomas, obtienen de la membrana de estas vesículas un sistema de bomba de protones, que está integrado en la membrana de la vesícula endocítica y que tiene la función de disminuir el pH interno de los lisosomas al bombear protones hacia el interior del organelo; de esta forma se activan las enzimas para que sean funcionales y puedan llevar a cabo la degradación de otras moléculas<sup>23</sup>. Este medio ácido de los lisosomas (pH  $\leq 5$ ) es mantenido por una ATPasa vacuolar que bombea protones desde el citoplasma hacia el lumen lisosomal. Estas proteínas, tales como LAMP1 y LAMP2, están fuertemente glicosiladas y, por tanto, resisten la digestión, protegiendo la membrana lisosomal frente a las hidrolasas y agentes que pueden dañar el lisosoma. Las proteínas de la membrana lisosómica también regulan el movimiento lisosómico, la distribución celular y la exocitosis<sup>24</sup>.

Dos clases de proteínas son esenciales para la función de los lisosomas: las hidrolasas lisosómicas solubles y las proteínas de la membrana lisosomal integral (LAMPs). Además de la degradación a granel y el procesamiento de proproteínas, las hidrolasas lisosómicas están implicadas en el procesamiento del antígeno, la degradación de la matriz extracelular y el inicio de la apoptosis<sup>22</sup>.

La vía endocítica degradativa comienza en la membrana plasmática y termina en lisosomas. Entre estas dos “estaciones”, la carga endocitada pasa a través de una serie de intermedios endosómicos que se distinguen por su contenido, composición molecular, morfología y pH (tabla 1). Un intercambio de membranas entrantes y salientes y múltiples eventos de fusión, dan lugar a la remodelación gradual de un intermediario endosómico en un endosoma de última etapa, un proceso llamado maduración. La distinción ampliamente utilizada entre endosomas tempranos (EEs) y endosomas tardíos (LEs) se basa en características funcionales y biológicas, pero simplifica excesivamente la complejidad de la vía endocítica<sup>22</sup>.

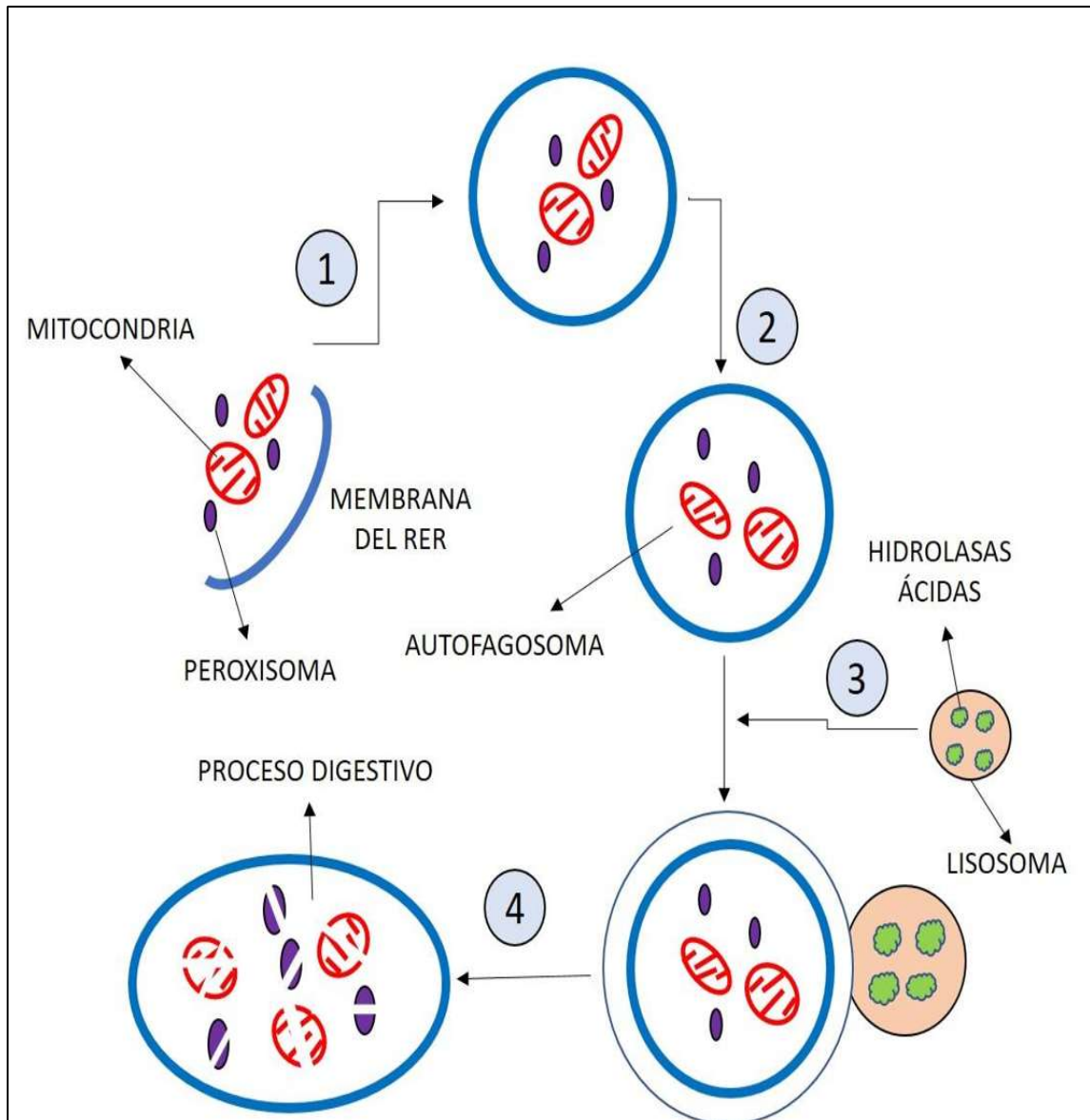
Observaciones en la constitución de los endosomas tempranos y tardíos indican que los intermedios funcionalmente diferentes de EEs y LEs se pueden distinguir y que la transición entre EEs y LEs es gradual. Por lo tanto, la vía endocítica se considera mejor como un continuo espaciotemporal de intermedios, que intercambian continuamente su contenido mientras se someten a remodelación molecular y estructural gradual y transformación funcional (tabla 1)<sup>22</sup>.

Como ya se ha repetido un par de veces, los lisosomas son organelos ubicuos que constituyen los compartimentos degradativos de la célula. Reciben sus sustratos a través de endocitosis, fagocitosis o autofagia.

Una manera de que los lisosomas obtengan sustrato es la autofagia, donde a partir de áreas del citoplasma en donde se agrupan organelos envejecidos, que se degradan para su recambio; estos se encierran en una membrana que proviene del RER y se forma una vesícula que se conoce como autofagosoma. Dicha

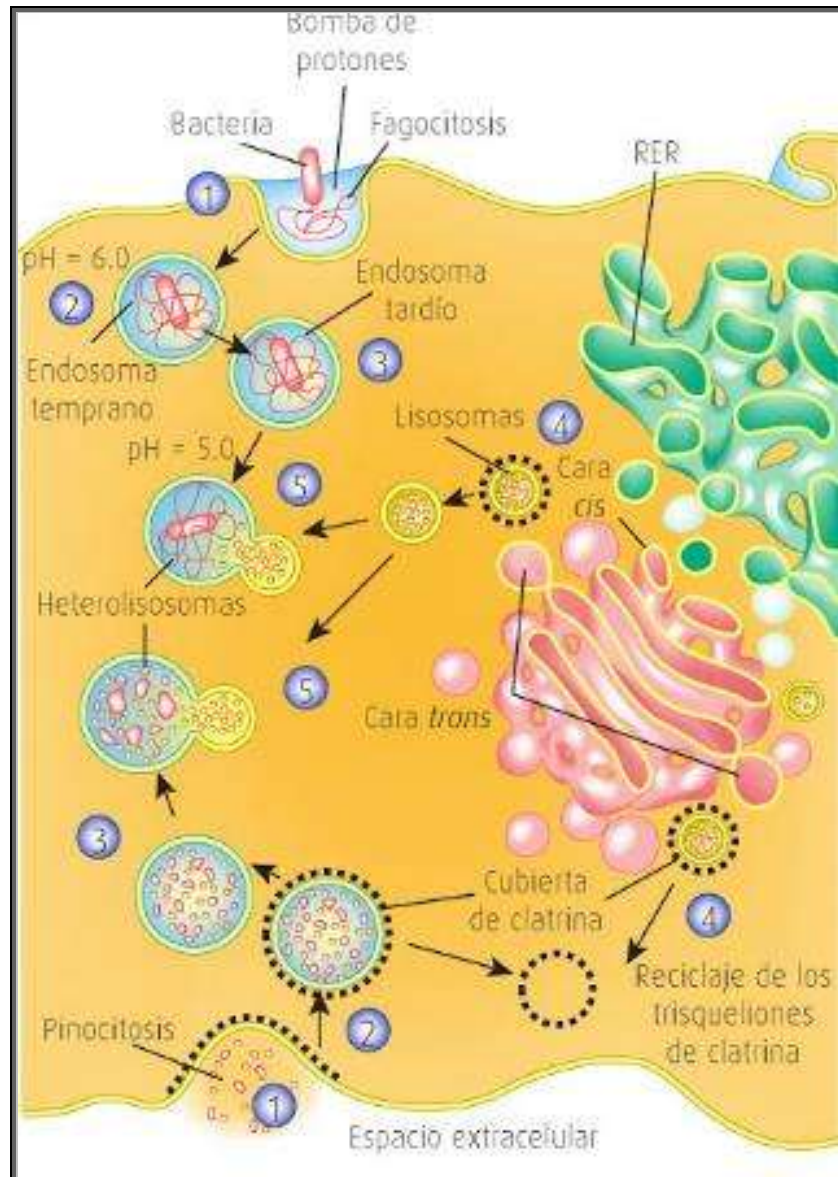


vesícula se funde con los lisosomas, que descargan su contenido enzimático e incorporan las bombas de protones, hasta iniciar así el proceso de degradación (Figura 3). Otra fuente de origen es a partir de la formación de vesículas provenientes del plasmalema. Éstas pueden originarse en material particulado, por ejemplo, microorganismos o fragmentos de células, en el proceso llamado fagocitosis, o bien que endocitan hasta moléculas en suspensión en el proceso llamado pinocitosis. En ambos procesos, las vesículas pasan inicialmente a una estructura sacular llamada endosoma temprano y ahí se inicia la acidificación del contenido, mediante la actividad de las bombas de protones membranales, y se transforma en endosoma tardío, que posteriormente recibe la descarga de vesículas lisosomales, que liberan a las enzimas hidrolasas necesarias para la degradación del contenido. Así se forman los heterolisosomas (figura 4)<sup>23</sup>.



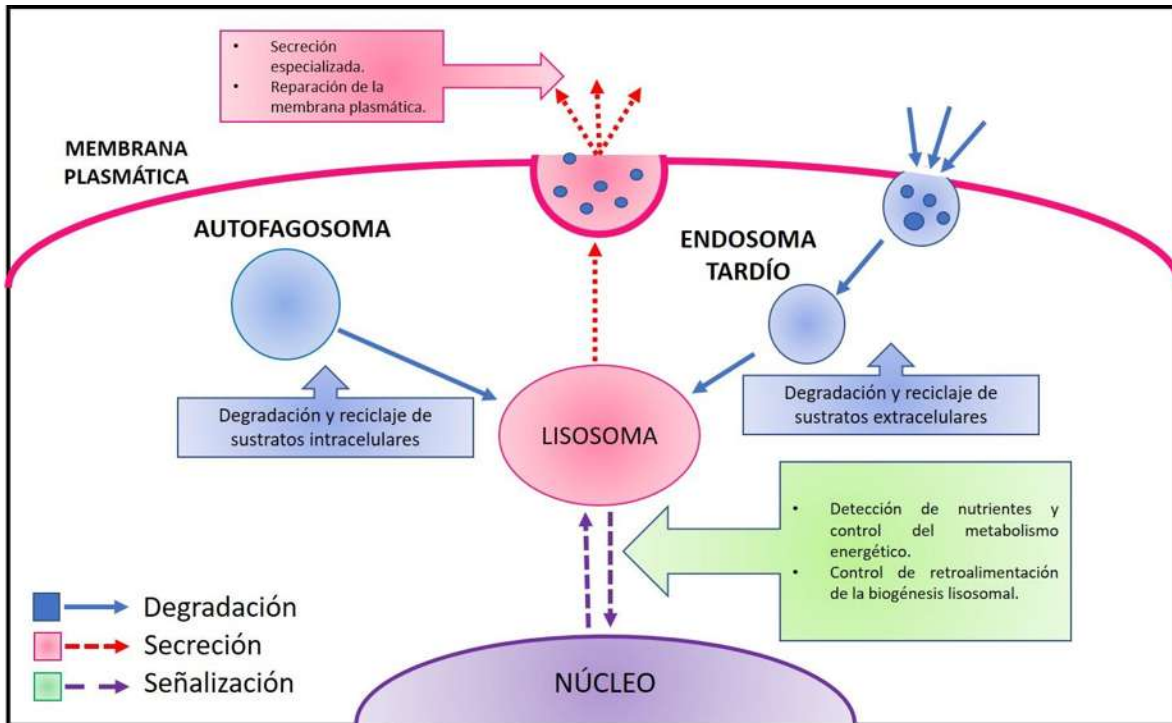
**Figura 3.** Esquema que ilustra y describe los pasos del proceso de autofagocitosis.

1. Los organelos senescentes que van a ser degradados son rodeados por una membrana proveniente del RER. 2. La vesícula que se forma se conoce como autofagosoma. 3. El autofagosoma se fusiona con los lisosomas que contienen las hidrolasas ácidas y bomba de protones. 4. El contenido del autofagosoma se mezcla con las hidrolasas ácidas e inicia el proceso digestivo.



**Figura 4.** Esquema que ilustra y describe los pasos del proceso de digestión de material endocitado por fagocitosis y pinocitosis<sup>23</sup>.

1. La célula fagocita o pinocita y forma vesículas llamadas fagosomas o pinosomas que pueden o no estar cubiertas de clatrina. 2. En el citoplasma la vesícula endocítica pierde su cubierta que es reciclada y forma un endosoma temprano, que por efecto de las bombas de protones en su membrana empieza a acidificar su contenido. 3. La vesícula ahora se llama endosoma tardío. 4. Las vesículas cubiertas de clatrina provenientes de la cara *trans* del aparato de Golgi transportan hidrolasas ácidas inactivas. 5. Estas vesículas pierden su cubierta y se fusionan con los endosomas tardíos para formar los heterolisosomas.



**Figura 5.** Principales funciones de los lisosomas y su relación con los procesos clave de la célula.

Los lisosomas están implicados en la degradación y el reciclado del material intracelular (vía autofagia) y el material extracelular (vía endocitosis). En estos procesos, los lisosomas se fusionan con los autofagosomas y con los endosomas tardíos, respectivamente. Los productos de descomposición resultantes se utilizan para generar nuevos componentes celulares y energía en respuesta a las necesidades nutricionales de la célula. Los lisosomas también experimentan exocitosis regulada con  $\text{Ca}^{2+}$  para secretar su contenido en el espacio extracelular y reparar las membranas plasmáticas dañadas. Tras la lesión de la membrana plasmática, los lisosomas migran rápidamente al sitio dañado y se fusionan con la membrana plasmática para permitir un resellado eficiente. Más recientemente, los lisosomas se han identificado como organelos de señalización que pueden detectar la disponibilidad de nutrientes y activar una vía de señalización lisosoma a núcleo que media la respuesta de hambre y regula el metabolismo energético.

**Tabla 1.** Propiedades de los endo lisosomas intermedios<sup>22</sup>.

	<b>Endosomas tempranos</b>	<b>Endosomas tardíos</b>	<b>Lisosomas</b>
<b>Funciones de transporte y clasificación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recibir vesículas endocíticas entrantes.</li> <li>• Clasificar las proteínas para su reciclaje y degradación.</li> <li>• Reciben proteínas endolisosómicas recién sintetizadas.</li> <li>• Iniciar la formación de ILVs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reciben proteínas endo-lisosómicas recién sintetizadas del TGN.</li> <li>• Recicla las proteínas al TGN.</li> <li>• Continuar la formación de ILVs y clasificar las proteínas entre la membrana limitante y los ILVs.</li> </ul>	<p>Recibe la carga de los endosomas tardíos.</p>
<b>Carga presente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niveles elevados de proteínas de reciclaje endocitados.</li> <li>• Proteínas endocitadas destinadas para la degradación.</li> <li>• Proteínas que reciclan al TGN (por ejemplo, M6PRs).</li> <li>• Niveles bajos de LAMPs sintetizados en ruta a lisosomas (por ejemplo, LAMP-1 y LAMP-2).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niveles bajos de proteínas de reciclaje endocitados.</li> <li>• Niveles concentrados de proteínas endocitadas destinadas a la degradación.</li> <li>• Proteínas que reciclan al TGN.</li> <li>• LMPs recién sintetizados en ruta a lisosomas.</li> <li>• Niveles elevados de hidrolasas lisosómicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas endocitadas destinadas para la degradación.</li> <li>• Altos niveles de LAMPs.</li> <li>• Altos niveles de hidrolasas lisosómicas.</li> </ul>
<b>Morfología</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuola de electrones alineada con una bicapa de clatrina y unido a una elaborada red de túbulos de electrones.</li> <li>• Contiene de 0-8 ILVs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuola globular forrada con una bicapa de clatrina y con unos pocos túbulos densos de electrones unidos.</li> <li>• Contiene más de 9 ILVs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuola de forma heterogénea (a menudo globular, pero puede ser tubular) que tiene un lumen denso de electrones con contenido irregular y a menudo hojas de membrana.</li> <li>• Algunos ILVs pueden estar presentes.</li> </ul>
<b>pH</b>	~6	5-6	4.5-5
<b>Principales compartimentos interactivos</b>	Membrana plasmática, reciclaje de endosomas y endosomas tardíos.	TGN, endosomas tardíos, lisosomas y membrana plasmática.	Endosomas tardíos, membrana plasmática, autofagosomas y fagosomas.

ILV, vesícula intraluminal; LAMP, Glicoproteína de membrana asociada a lisosomas; LMPs, proteína de membrana lisosomal; M6PR, receptor de Manosa-6-fosfato; TGN, red trans-Golgi.

## **2.5. La estructura de los lisosomas.**

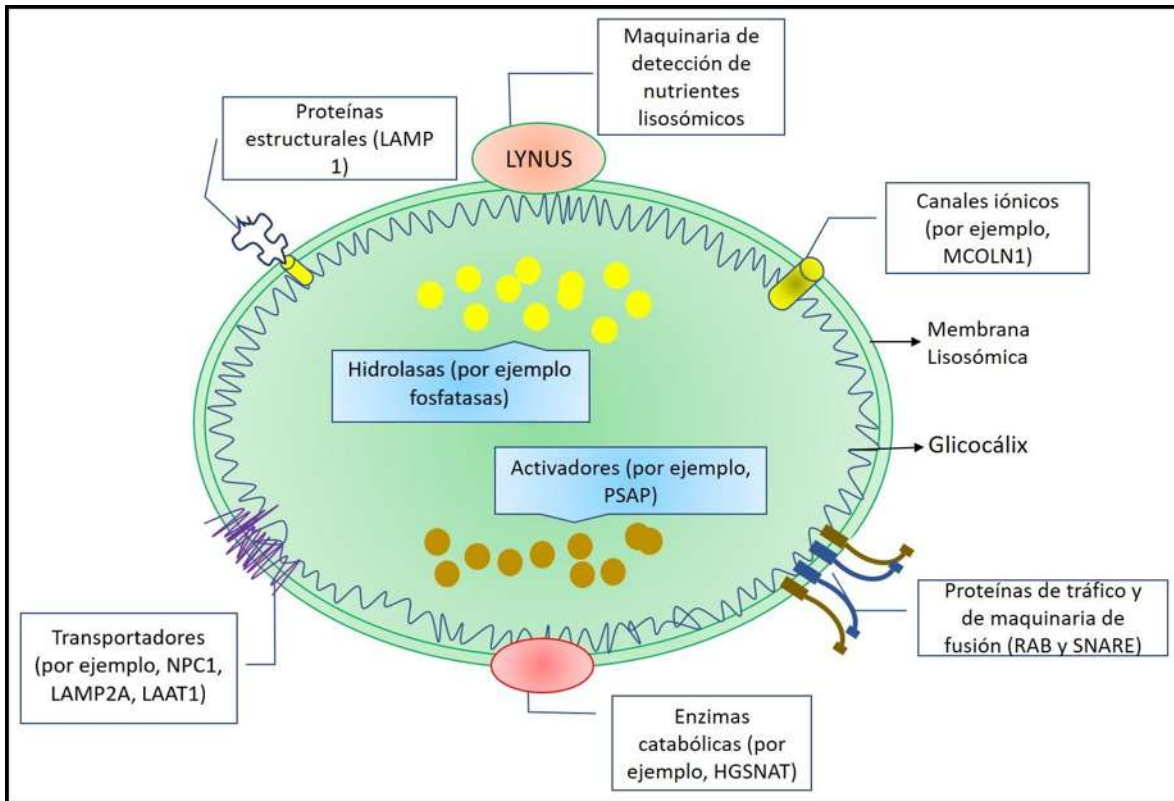
Los lisosomas tienen una membrana limitante, que está compuesta por una bicapa de un sólo lípido y proteínas integrales y periféricas, y una luz ácida que contiene enzimas hidrolíticas y activadores solubles<sup>26,27</sup>. Un glicocálix recubre el perímetro lisosomal interno, protegiendo la membrana del ambiente ácido de la luz. Las enzimas solubles están directamente implicadas en la degradación de los metabolitos, mientras que la membrana lisosómica segrega este potencial catalítico y también participa activamente en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática, el establecimiento del pH ácido de la luz lisosomal, el metabolismo y el transporte de iones, catálisis<sup>28</sup>.

Las proteínas de tráfico y de maquinaria de fusión comprenden SNARE y RAB. Las proteínas estructurales incluyen la proteína de membrana 1 asociada a los lisosomas (LAMP1), que es la proteína de membrana lisosomal más abundante que representa el 50 % de la proteína total en esta membrana. LAMP1 está principalmente involucrado en el tráfico lisosómico mediando la unión de los lisosomas a la maquinaria de transporte<sup>22, 29</sup>.

La maquinaria de detección de nutrientes lisosómicos (LYNUS) incluye varios complejos proteicos que interactúan en la superficie lisosomal, y su función es detectar el contenido de nutrientes del lisosoma y señalar la información al núcleo. Un componente importante de la maquinaria LYNUS es la ATPasa vacuolar (v-ATPasa), un gran canal multimérico que utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para transportar protones a través de la membrana lisosomal a fin de generar el pH ácido del lumen lisosomal<sup>30</sup>.

El receptor potencial transitorio (TRP), miembro de la familia de las mucolipinas1 (MCOLN1), es un canal catiónico no selectivo que participa en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fusión lisosómica con otras membranas, como la membrana plasmática y los autofagosomas. Los transportadores en la membrana lisosómica incluyen LAMP2A, que media la autofagia mediada por chaperonas uniendo sustratos de proteína citosólica en la membrana lisosomal para que puedan ser internalizados y degradados<sup>28</sup>.

Niemann-Pick C1 proteína 1 (NPC1), es una proteína de membrana lisosómica implicada en la exportación de colesterol del compartimiento endolisosomal. El recientemente identificado transportador de aminoácidos lisosómicos 1 (LAAT1) está implicado en el transporte de lisina y arginina a través de la membrana lisosómica y en el lisosoma, y tiene un papel crucial en la homeostasis de los aminoácidos celulares. Las enzimas en la membrana lisosómica incluyen heparano- $\alpha$  glucosaminidasa-N-acetiltransferasa (HGSNAT). Esta enzima participa en la degradación escalonada del sulfato de heparán, y la mutación de esta proteína causa mucopolisacaridosis tipo IIIC. PSAP, fosfatasa ácida específica de la próstata<sup>28</sup>.



**Figura 6.** Algunas categorías funcionales clave de las proteínas de la membrana lisosómica.

Glicocálix, el revestimiento a base de polisacáridos en el lado interno de una membrana lisosómica que protege este organelo de la digestión por enzimas lisosomales.

## 2.6. Las catepsinas.

Las catepsinas son enzimas proteolíticas que son importantes en las funciones celulares tales como la descomposición, la maduración y la modulación de la bioactividad de las proteínas. Tres grupos principales de catepsinas se han identificado: serina (A y G), aspártico (D y E), y catepsinas de cisteína<sup>31</sup>. Las catepsinas de cisteína, son miembros de la familia de la papaína cisteína como proteasas, son la familia más grande de cateterismo en los seres humanos que se compone de 11 proteasas (la catepsina B, C, F, H, K, L, O, S, V, X y W). Aunque se cree que estas enzimas están implicadas principalmente en la degradación de la proteína intralisosomal, los respectivos knockouts de genes han revelado que



algunas de ellas son también esenciales para una serie de otros procesos celulares importantes<sup>32</sup>. Estas enzimas, que son estables en ambientes ácidos, se encuentran principalmente en los lisosomas y endosomas. Sin embargo, las formas activas y variantes se pueden encontrar en el compartimento extracelular, citosólico, mitocondrial y nuclear<sup>33</sup>.

Las catepsinas lisosómicas se sintetizan como preproenzimas. La escisión del péptido señal N terminal ocurre durante el paso al retículo endoplásmico rugoso en paralelo con la glicosilación unida a N. Después de la eliminación del péptido señal, el propéptido ayuda al plegado apropiado de la enzima y dirigiéndose a los endosomas/lisosomas usando una vía específica del receptor de manosa-6-fosfato (M6PR), actuando simultáneamente como un inhibidor para prevenir cualquier actividad proteolítica inapropiada del zimógeno<sup>22,39</sup>. La disociación del M6PR inmaduro ligado se produce en el ambiente ligeramente ácido de los endosomas<sup>40</sup>.

Las catepsinas B y L son algunas de las proteasas lisosomales más abundantes<sup>32</sup>. Tanto catepsina B y L son endopeptidasas, sin embargo, la catepsina B contiene un bucle de oclusión que bloquea el sitio activo y previene la actividad endopeptidasa a bajos niveles de pH. A un pH menos ácido, se abre el bucle, lo que permite la actividad endopeptidasa de la catepsina B. Tanto catepsina B y L se expresan abundantemente dentro de la expresión renal<sup>34</sup>.

Las catepsinas de cisteína son ópticamente activas a un pH ligeramente ácido y son en su mayoría inestables a pH neutro. Cuando las catepsinas están fuera de los lisosomas o extracelularmente, pueden ser inactivadas relativamente rápido e irreversiblemente a un pH neutro a excepción de la catepsina S<sup>35</sup>.

La localización extracelular de las catepsinas a menudo coincide con su mayor expresión y/o actividad, lo que indica que el pH no es el único factor responsable de su actividad. Hace veinte años se demostró que la catepsina B, a partir de tejidos normales o tumorales, degradaba los componentes de la matriz extracelular purificada y el colágeno tipo IV<sup>36</sup>. Las catepsinas de cisteína presentan una especificidad amplia, escindiendo así sus sustratos preferentemente después de residuos básicos o hidrófobos. Esto es cierto no sólo para sintéticos, sino también para los sustratos de proteínas y coherente con sus funciones en la degradación de proteínas intracelulares<sup>37</sup>.

Se cree que las cisteínas proteasas lisosómicas están implicadas principalmente en la degradación de la proteína intracelular. Bajo condiciones especiales, se han encontrado fuera de los lisosomas, dando como resultado condiciones patológicas. Con el descubrimiento de una serie de nuevas catepsinas con distribuciones tisulares restringidas, se ha puesto de manifiesto que estas enzimas deben estar involucradas en una serie de tareas celulares específicas mucho más amplias que las simples enzimas domésticas<sup>37</sup>.

## **2.7. N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAGasa).**

N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa es una enzima lisosómica ampliamente distribuida, localizada predominantemente en los túbulos proximales renales<sup>41</sup>. Se ha establecido que la actividad de la NAGasa en la orina aumenta con el daño renal, y se considera un índice sensible de la enfermedad renal<sup>40</sup>, una advertencia temprana de rechazo después del trasplante renal y un signo de enfermedad de

nefrotoxicidad de algunos fármacos en humanos<sup>43</sup>. Las aplicaciones clínicas del ensayo de NAGasa a la detección de trastornos renales en pacientes con diabetes mellitus o hipertensión y en la detección de niños con enfermedad renal también ha llamado la atención<sup>44</sup>.

La función renal se puede evaluar mediante una serie de métodos. La excreción urinaria de enzimas, en particular la N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa (NAG), se considera un método relativamente simple, barato y no invasivo en la detección y el seguimiento de la función tubular en diversas condiciones. La determinación del NAG urinario proporciona un indicador muy sensible y confiable de daño renal, como lesión o disfunción por diabetes mellitus, síndrome nefrótico, inflamación, reflujo vesicouretral, infección del tracto urinario, hipercalciuria, urolitiasis, nefrocalcinosis, asfisia perinatal, hipoxia, hipertensión, intoxicación por metales pesados, tratamiento con aminoglucósidos, valproato u otros fármacos nefrotóxicos. La actividad urinaria de la NAGasa es una de las enzimas urinarias más frecuentemente evaluadas, ya que es un marcador muy sensible del deterioro tubular renal<sup>45</sup>.

NAGasa es una enzima lisosómica que está abundantemente presente en las células del túbulo proximal del riñón. La NAGasa tiene un peso molecular relativamente alto de 130,000 a 140,000 Da, lo que permite su filtración a través de la membrana basal glomerular. Por lo tanto, su excreción urinaria es relativamente constante con mínimos cambios diurnos. Es estable frente a cambios en el pH y la temperatura. NAGasa consiste en varias isoenzimas. Las dos principales isoenzimas que están presentes en el riñón y el hígado,

respectivamente, son la forma ácida A y la forma básica B, junto con una pequeña cantidad de formas intermedias I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>. En el suero, NAGasa está representado predominantemente por la forma As que es también la única forma de NAG en los líquidos cefalorraquídeo y sinovial. La forma C de NAG está presente en el tejido nervioso. La orina de sujetos humanos sanos contiene una pequeña cantidad de NAG, con una proporción de isoenzima A de isoenzima B de 4:1 a 10:1, mientras que las formas intermedias no son detectables. En los pacientes con insuficiencia renal tubular e intersticial, la actividad total de la NAG urinaria es elevada, en particular su forma B, dando como resultados cambios en la relación A: B. Las formas intermedias de NAGasa también aumentan, pero su actividad rara vez supera el 5 % de la NAGasa urinaria total. En las enfermedades que afectan a la membrana glomerular, la isoenzima As es generalmente detectable en la orina<sup>46,47,48</sup>.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La manifestación más evidente del daño renal lo constituye la proteinuria, la pérdida de proteínas, principalmente albúmina a través de la orina. Sin embargo, existe abundante evidencia de que esta proteinuria por sí misma produce daño en las células renales tubulares, al generar inflamación, estrés oxidativo y la activación de señales intracelulares que eventualmente derivan en atrofia y muerte celular. Más aún, existe evidencia de que el daño en las células tubulares podría preceder el daño a nivel glomerular. Para estudiar el complejo procesamiento de las proteínas en el riñón, se cuenta con modelos de células tubulares proximales

con características definidas como las denominadas HK2. Aun teniendo esta importante herramienta de trabajo, contar con una fracción caracterizada de lisosomas, con la maquinaria enzimática que procesa las proteínas y enfrenta su toxicidad, representa una ventaja metodológica importante en este campo de estudio, debido a que la entrada de proteínas al interior de las células HK2 no compite con la masiva captura de proteínas a nivel de las invaginaciones del borde dentado de las células tubulares reales en el riñón. Hasta este momento, la estrategia de separar lisosomas de las células expuestas a distintas condiciones experimentales y estudiar la acción enzimática lisosomal sobre las proteínas supone un abordaje diferente y original en el estudio del procesamiento de las proteínas en las células tubulares en cultivo.

La extracción de una fracción lisosomal facilitará el estudio de la actividad enzimática que sucede en este modelo, representando en futuros trabajos los cambios enzimáticos, así como los cambios en la degradación de las proteínas que ocurren dentro de las células tubulares proximales de un riñón humano con nefropatía diabética específicamente.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

Es posible obtener y caracterizar una fracción lisosomal a partir del fraccionamiento de las células tubulares proximales en cultivo de la línea celular HK2 mediante una técnica de centrifugación, aunada a un previo rompimiento de la membrana celular, desarrollada de manera específica para cultivos celulares.

#### **V. OBJETIVO GENERAL.**

Obtener y caracterizar a través de pruebas enzimáticas, una fracción lisosomal semipurificada a través de un esquema desarrollado específicamente para cultivos celulares.

#### **VI. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Sembrar y propagar células tubulares proximales de acuerdo con los lineamientos de bioseguridad hasta obtener las cantidades necesarias para la realización del fraccionamiento celular.
2. Crecer y fraccionar células HK2, implementando un esquema propio con base en los antecedentes descritos en la literatura científica sobre el tema.
3. Probar y caracterizar las fracciones obtenidas utilizando el ensayo enzimático para fosfatasa ácida, catepsina B y N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1. Las células tubulares proximales.**

#### **7.1.1. Línea celular.**

Células tubulares proximales (CTPs) HK2 (ATCC CRL-2190) derivadas de tejido renal íntegro con características definidas, derivadas de una sola célula, caracterizadas genéticamente e inmortalizadas por transducción viral. Caracterización ATCC. Positividad para fosfatasa alcalina, gama glutamil transpeptidasa, leucina aminopeptidasa, fosfatasa ácida, citoqueratina, integrinas alfa 3 y beta 1 y fibronectina. Negatividad para antígeno asociado a factor VIII, antígeno 6.19 y metalo endopeptidasa CALLA (neprilisina). Las células HK2 retienen las características funcionales de las células tubulares como el transporte de glucosa  $\text{Na}^{+2}$  dependiente sensible a florzin y a adenilato ciclasa. Las células HK2 pueden reproducir los resultados obtenidos con células primarias aisladas de epitelio tubular.

#### **7.1.2. Cultivo.**

Medio de crecimiento completo. El medio base se suministra por Invitrogen (GIBCO) como parte de un kit conteniendo medio K-SFM (Cat. 17005-042). Aditivos complementarios para crecer la línea celular: extracto bovino pituitario (EBP) y factor de crecimiento epidermoide recombinante (FCER). El medio se completa de la siguiente forma:

1. 0.05 mg/mL EBP.
2. 5 ng/mL FCER.

No se filtra el medio completo.

### **7.1.3. Subcultivo.**

Las células no serán llevadas a total confluencia y tienen que ser resemebradas cuando alcancen 80 % de confluencia. El protocolo general del subcultivo es el siguiente:

1. Se desecha el medio de cultivo y se procede a lavar con la solución de tripsina (0.5 % en 0.53 mM de EDTA).
2. Observar la dispersión bajo el microscopio invertido hasta que la monocapa se disperse totalmente, lo que deberá ocurrir entre 5 y 15 minutos después de adicionar la tripsina. Se procura mantener las células sin movimiento para evitar que se agreguen.
3. Adicionar 7 mL de medio completo y se aspira el paquete celular con suavidad. Se centrifuga la suspensión a aproximadamente 2,500 rpm por espacio de 7 minutos. Se deshecha el sobrenadante y se re suspenden las células en medio nuevo. Se hacen los subcultivos apropiados con la suspensión para crecimiento en placa.
4. Cultivar a 37 °C en atmósfera de 95 % aire y 5 % de CO<sub>2</sub>.
5. Renovar con periodicidad de 2 a 3 días. No permitir el crecimiento a confluencia 100 %.





**Figura 7.** Fotografía de uno de los cultivos de células tubulares proximales HK2 visto bajo el microscopio de contraste de fases.

#### **7.1.4. Bioseguridad y normas de trabajo en los laboratorios de cultivos celulares.**

En el presente protocolo se observan las normas a seguir para el trabajo con cultivos celulares, con el objetivo de proteger al investigador, al medio ambiente y a los recursos utilizados.

1. El cultivo se llevará a cabo según las buenas prácticas para manejo de cultivos celulares tomando en cuenta los riesgos y las medidas de prevención; los investigadores con experiencia profesional en el manejo de células en cultivo tendrán la tarea de cuidar que el manejo y cuidado de las buenas prácticas se lleve a cabo.
2. Se adapta el principio de precaución, tratar todos los cultivos que se utilizan por primera vez como potencialmente infecciosos. Trabajar siempre dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (protege a la muestra, al trabajador y al ambiente), hasta que se demuestre que los cultivos están libres de bacterias, virus, micoplasmas u hongos.
3. Se manipularán los cultivos en un nivel de bioseguridad 2 y en una cabina de seguridad biológica tipo II.
4. Se identificará de forma adecuada los cultivos y todo el material biológico.
5. Se obtendrán las células y los cultivos de centros reconocidos que certifiquen el origen, por ejemplo: la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC, (American Type Culture Collection), la Colección Europea de Cultivos Celulares ECACC, (European Collection of Cell Cultures) o de la Colección

Española de Cultivos Tipo CECT. En este caso las células están certificadas y provendrán de ATCC.

6. No se tendrá acceso a ningún otro tipo de cultivo simultáneo o que provenga de fuente desconocida.
7. Se trabajará siempre con material estéril (cristalería, pipetas, etc.). El material estéril sólo podrá abrirse, dentro de una cabina de seguridad biológica. Todo aquello de lo que no se esté seguro al 100 % de su esterilidad ha de ser considerado como no estéril.
8. Se garantiza descontaminar la mesa de trabajo, las cabinas de seguridad biológica y el material reutilizable antes y después de trabajar con material biológico.
9. Se procederá a limpiar inmediatamente cualquier derrame del cultivo.
10. Se procederá a lavarse las manos antes, después y frecuentemente durante el trabajo con cultivos, para evitar contaminaciones en los experimentos, la contaminación del usuario con material biológico y la posible diseminación de éste.
11. Se garantiza descontaminar por agentes químicos o calor todo el material biológico o contaminado con éste antes de ser eliminado.
12. Se garantiza verificar periódicamente las propiedades del cultivo. Llevar a cabo un control de calidad de las células, que demuestre la ausencia de posibles agentes patógenos.
13. Se utilizarán equipos de protección individual: guantes, mascarillas, gafas y ropa de protección.

### **7.1.5. Medio de cultivo.**

El medio F-12K de Ham contiene muchos componentes que no se encuentran en medios basales tradicionales, como putrescina, timidina, hipoxantina y zinc, así como niveles más altos de todos los aminoácidos y piruvato de sodio. Estas adiciones permiten que el medio se suplemente con niveles muy bajos de suero o componentes definidos para algunos tipos de células. Este tipo de medio no contiene proteínas ni factores de crecimiento. Por tanto, con frecuencia se suplementa con factores de crecimiento y suero fetal bovino (SFB). La concentración de SFB se debe optimizar para cada línea celular. El medio F-12K utiliza un sistema de tampones a base de bicarbonato de sodio (2.5 g/L) y, por lo tanto, requiere de un ambiente con un 5-10 % de CO<sub>2</sub> para mantener el pH fisiológico. Su indicador de pH es rojo de fenol. Debe ser almacenado a una temperatura de 2-8 °C protegido de la luz.

### **7.1.6. Manipulación de los cultivos celulares.**

La manipulación de cultivos celulares requiere de instalaciones, equipos y prácticas microbiológicas adecuadas para evitar la contaminación del cultivo, la dispersión de posibles agentes patógenos y para eliminar o reducir al mínimo la exposición. La característica principal que define a un laboratorio de cultivo celular es que ha de ser una instalación aséptica (sala de cultivo limpia, con cabinas de seguridad biológica de tipo II, incubadoras y materiales estériles), debido a que la tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior a la de sus contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas. Por ello,

para el mantenimiento del cultivo es vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo contaminante. El área de trabajo para realizar cultivos celulares debe ser una parte o habitación del laboratorio aislada, alejada de las vías de paso y, si es posible, dedicada exclusivamente al cultivo de células. La utilización de cabinas de seguridad biológica reduce las necesidades de aislamiento, pero, aun así, es recomendable mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior o laboratorio general al interior de las cabinas de seguridad donde se manipularán los cultivos y la incubadora donde se mantendrán. El nivel de bioseguridad necesario para el trabajo en laboratorio con cultivos celulares se decidirá en función de una exhaustiva evaluación de riesgos, en la que se tendrá en cuenta el nivel de riesgo asociado al cultivo y las condiciones de trabajo. Normalmente, el nivel de bioseguridad 2 es el mínimo necesario para el trabajo con cultivos celulares, con el empleo de una cabina de seguridad biológica tipo II.

#### **7.1.7. Nivel de bioseguridad.**

Este protocolo está diseñado para trabajo a un nivel de seguridad 2 (BSL-2). LABORATORIO BÁSICO NIVEL BSL-2. Agentes que presentan un riesgo moderado para el trabajador (la enfermedad resulta de autoinoculaciones, ingestiones o exposiciones de membranas mucosas, o bien debido a inmunodepresión). Su diseminación en el medio ambiente es poco probable y existe tratamiento o medidas preventivas contra la infección generada.

### **7.1.8. Requerimientos del laboratorio BSL-2.**

El personal de laboratorio debe contar con el entrenamiento específico en los procedimientos que se llevan a cabo y deberá ser supervisado por científicos especializados en el área. El acceso al laboratorio se restringirá cuando se esté desarrollando algún trabajo, se debe tomar precauciones extremas con objetos punzocortantes contaminados, así como con los procedimientos en los cuales se pueda crear aerosoles infecciosos o salpicaduras, los cuales deberán ser realizados en una cabina de seguridad biológica (CSB) o en algún otro equipo de contención física. El personal que trabaja en este laboratorio deberá estar entrenado en el manejo de agentes patógenos y el laboratorio deberá ser dirigido por personal experimentado, con entrenamiento específico en el área.

### **7.2. Procedimiento para obtención de las células en cultivos.**

1. Una vez que los cultivos celulares han llegado a un 90 % de confluencia después de aproximadamente 3 días de haber sido sembrados e incubados a 37 °C en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>, se les retira el medio de cultivo dentro de una campana de flujo laminar mediante una bomba de extracción con pipeta pasteur previamente esterilizada. Para realizar este procedimiento toda el área dentro de la campana de extracción fue sanitizada con Benzalcohol 5 % y se emplearon guantes de látex antes de comenzar todo el procedimiento. Al eliminar el medio de cultivo también estamos eliminando todas las células muertas que pudiera haber suspendidas en él.

2. Ya que se extrajo el medio de cultivo, se agregan 3 mL de 0.05 % de Trypsin-EDTA (1X) y con movimientos suaves se distribuye por toda la placa de cultivo para eliminar los restos de medio, así como las células muertas que siguen pegadas a la placa y que no dejarían actuar al Trypsin-EDTA (1X). Inmediatamente se aspira la tripsina tal y como se hizo con el medio de cultivo en el paso anterior.
3. Una vez realizado el lavado anterior, se agregan nuevamente 3 mL de 0.05 % de Trypsin-EDTA (1X) y se incuban durante 15 minutos en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.
4. Mientras pasaban los 15 minutos de incubación, se llenó un tubo estéril con 7 mL de medio de cultivo HAM (deberá llenarse un tubo por cada placa cultivada que se vaya a utilizar y a la cual se le aplicó el Trypsin-EDTA).
5. Una vez pasados los 15 minutos, se revisó al microscopio cada una de las placas de cultivo incubadas para verificar que el Trypsin-EDTA hizo su efecto y las células ya han sido suspendidas en el medio, en muy pocos casos donde al terminar los 15 minutos de incubación aun había células pegadas a la placa de cultivo, se dejaron incubar un par de minutos más.
6. Asegurando de que la gran mayoría de las células han sido suspendidas, se toman los 3 mL de Trypsin-EDTA con una pipeta de 5 o 10 mL y son agregados al tubo estéril previamente llenado con 7 mL de medio de cultivo HAM.
7. Los tubos se llevaron a centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm. Si después de los 10 minutos de centrifugación, el paquete celular sigue suspendido o no

ha sido precipitado del todo, se vuelve a centrifugar igualmente 10 minutos a 2,500 rpm.

8. Ya que el paquete celular ha sido precipitado completamente, se regresan los tubos a la campana de extracción de flujo laminar para aspirar el medio de cultivo con la bomba de extracción y pipeta pasteur. Aquí se debe tener bastante cuidado de no aspirar el paquete celular y dejar la mínima cantidad de medio de cultivo.
9. Se agregan nuevamente 7 mL de medio de cultivo HAM para volver a centrifugar en las mismas condiciones que el paso anterior. Este paso se realiza con la finalidad de eliminar todos los restos de Trypsin-EDTA que quedaron.
10. Se vuelve a aspirar el medio de cultivo de la misma manera que los pasos anteriores cuidando de no aspirar el pellet y dejando la mínima cantidad de medio de cultivo.
11. Por último, el pellet de las células obtenidas se guarda en refrigeración aproximadamente a 5 °C en 1 mL de solución de sacarosa 0.25 M.

Consecuentemente el pH del medio de cultivo de cada una de las placas era revisado mediante el indicador (rojo de fenol) que este mismo contiene cuidando que no llegara a un nivel lo suficientemente ácido (viraje a color amarillo), cuidar la contaminación fue también uno de los problemas a superar ya que con los constantes cambios de medio de cultivo era muy fácil que algún hongo o bacteria se desarrollara dentro de nuestras placas volviendo así inservibles los cultivos con respecto a la medición de la actividad enzimática de sus lisosomas. Así fue como



el pH, la esterilidad del medio de cultivo y el crecimiento de las células (confluencia) se convirtieron en las 3 y más importantes características para obtener unos cultivos representativos, ya que cualquier cambio en alguna de estas características; tanto un pH ácido, una sobrepoblación de células arribas del 90 % o la contaminación por hongos o bacterias pueden estresar los cultivos y modificar la cantidad de enzimas producidas por las células o incluso generar apoptosis.

### **7.3. Procedimiento para la separación de lisosomas.**

1. Del refrigerador se toman los tubos con las células suspendidas en 1 mL de sacarosa 0.25 M y son mantenidos en un contenedor con hielo o una gradilla de congelación. Posteriormente con un sonicador se les dan 5 pulsos de 5 segundos cada uno, cuidando que la acción de este no aumente la temperatura de la suspensión celular. Este paso es importante realizarlo con el tubo que contiene la suspensión celular dentro de una gradilla de congelación o en un contenedor con hielo.

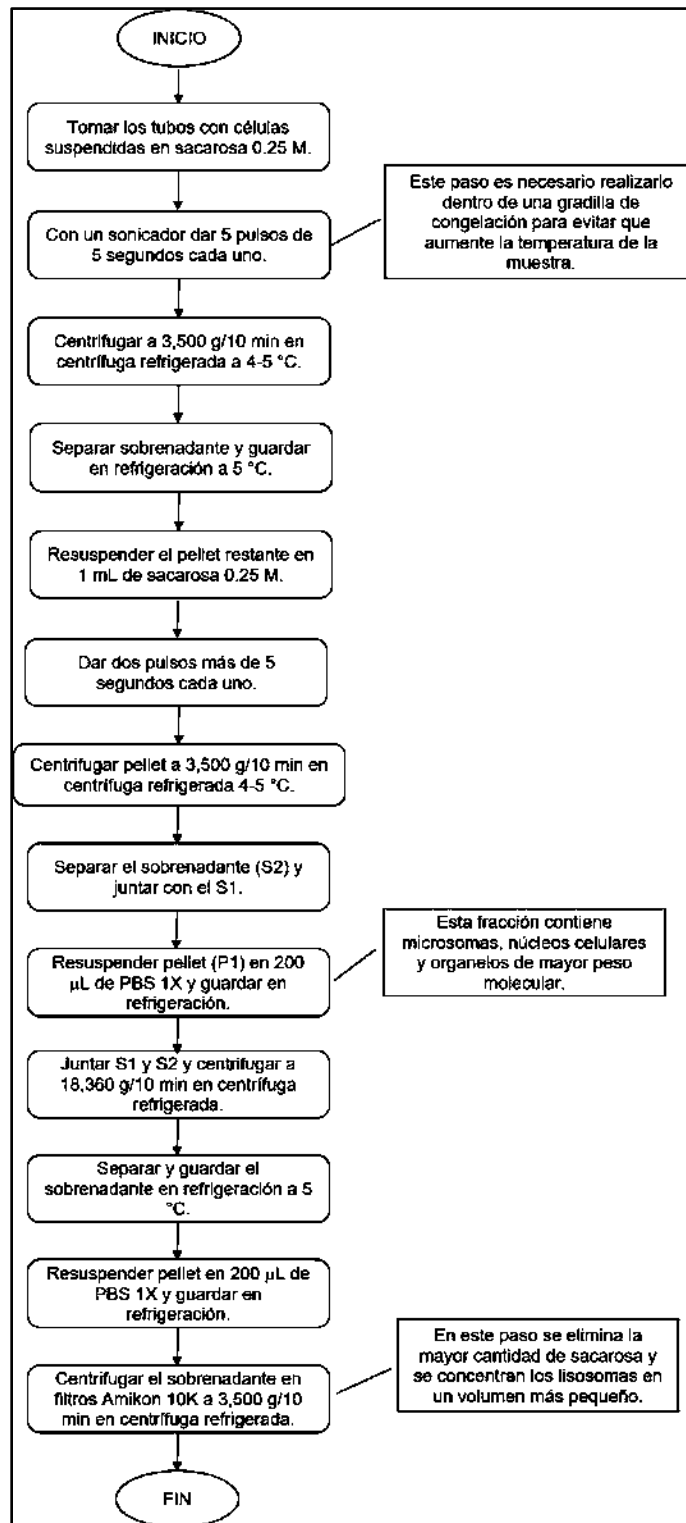
Es importante mencionar que el uso del sonicador fue la manera más efectiva que se encontró para poder romper la membrana celular y obtener de una manera más eficiente los organelos celulares.

2. La suspensión de células en sacarosa se centrifugó a 3,500 g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a 4-5 °C.
3. El sobrenadante (S1) se separa y se guarda en refrigeración a una temperatura lo más cercana a 5 °C para utilizarlo más adelante.

4. El pellet se resuspende en 1 mL de sacarosa 0.25 M previamente refrigerada. Este pellet contiene células a las cuales los pulsos dados anteriormente con el sonicador no rompieron la membrana celular y restos de microsomas.
5. Para obtener una mayor cantidad de lisosomas, es necesario romper la mayor cantidad de células, por esta razón al pellet resuspendido fue sometido a otros 2 pulsos más de 5 segundos cada uno cuidando que no aumente la temperatura repitiendo las mismas condiciones que el paso número 1.
6. El pellet se volvió a centrifugar 10 minutos a 3,500 g en una centrifuga refrigerada a 4-5 °C para volver a suspender en la sacarosa los lisosomas de interés.
7. Se separó el sobrenadante (S2) y se juntó con el sobrenadante previamente guardado (S1), esto para mantener una concentración mayor de lisosomas.
8. El pellet (P1), fue resuspendido en 200 µL de PBS 1X y se guarda en refrigeración a aproximadamente 5 °C. Esta fracción contiene microsomas, núcleos celulares y demás organelos de mayor peso molecular.
9. Los sobrenadantes S1 más S2 se juntaron en un solo tubo y se centrifugaron a 18,360 g durante 10 minutos (velocidad máxima del modelo utilizado) en centrifuga refrigerada a 4-5 °C.
10. Se separó y guardó el sobrenadante en refrigeración a una temperatura lo más cercana a 5 °C.
11. El pellet (P2) fue resuspendido en 200 µL de PBS 1X y guardado en refrigeración a aproximadamente 5 °C.

12. El sobrenadante resultante de la última centrifugación a 18,360 g, se centrifuga en filtros Amikon de 10K durante 10 minutos a 13,500 g en centrífuga refrigerada a 4-5 °C, esto con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de sacarosa 0.25 M y concentrar los lisosomas en un volumen más pequeño.

Estos pasos de fraccionamiento celular están resumidos y esquematizados en la figura 8.



**Figura 8.** Esquema que muestra el método desarrollado para la obtención de los lisosomas y su evaluación enzimática.

#### **7.4. Método para la determinación de fosfatasa ácida.**

La fosfatasa ácida es una de las hidrolasas ácidas que normalmente reside en los lisosomas. Es un marcador clásico para la identificación de lisosomas en fraccionamientos subcelulares.

El kit de ensayos de fosfatasa ácida está diseñado para la detección de la actividad de la fosfatasa ácida en extractos enteros de células y tejidos, fracciones de columna y preparaciones enzimáticas purificadas. Contiene todos los reactivos necesarios para la detección rápida y sencilla de la fosfatasa ácida, una solución estándar y una enzima de control.

##### **7.4.1. Componentes del kit.**

El kit es suficiente para 100 ensayos en tubos o 1,000 ensayos en placas de 96 pocillos.

1. Tabletas de 4-Nitrofenil fosfatasa con número de catálogo N9389 (20 tabletas).
2. Solución tampón de citrato, 0.09 M, pH 4.8. Cloroformo añadido como preservativo. Número de catálogo C2488 (100 mL).
3. Solución estándar, *p*-Nitrofenol, 10 mM con número de catálogo N7660 (1 mL).
4. Enzima control de fosfatasa ácida. Número de catálogo P3248 (0.2 mL).

##### **7.4.2. Reactivo y equipo requerido, pero no proporcionado.**

1. NaOH (Número de catálogo S5881).
2. Solución 0.5 N de NaOH.
3. Espectrofotómetro o lector de ELISA.

4. Cubetas (3 mL, número de catálogo C5291), o placas de 96 pocillos (fondo plano, número de catálogo P7366).

#### **7.4.3. Instrucciones de preparación.**

1. Solución de sustrato: Para 5 ensayos en tubo disolver completamente una tableta de 4-Nitrofenil Fosfato (número de catálogo N9389) en 5 mL de solución de buffer de citrato (número de catálogo C2488). Para 50 ensayos en placa de 96 pocillos, disolver una tableta de 4-Nitrofenil Fosfato en 2.5 mL de solución de buffer de citrato. La solución de sustrato deberá ser preparada en fresco.
2. Solución de parada (no suministrada): Preparar una solución de NaOH 0.5 N disolviendo 2 g de NaOH en 100 mL de agua ultra pura.
3. Solución estándar: Para la preparación de 1 mL de solución estándar, diluir 5  $\mu$ L de la solución estándar *p*-Nitrofenol en 995  $\mu$ L de la solución de parada (0.5 N NaOH). La solución estándar diluida permite obtener resultados cuantitativos al realizar ensayo en placa de 96 pocillos. (1 mL de la solución estándar diluida es suficiente para 3 medidas estándar en una placa de 96 pocillos)

#### **7.4.4. Almacenamiento y estabilidad.**

El kit se envía en hielo seco y se recomienda almacenar a -20 °C.

Solución tampón de citrato. La nubosidad puede desarrollarse debido a cambios en la temperatura y los glóbulos de cloroformo a menudo se asientan. Esto no afecta la calidad del reactivo, pero evita pipetear glóbulos de cloroformo.

#### 7.4.5. Ensayo en placa de 96 pocillos.

Es recomendado realizar los ensayos por triplicado.

1. Equilibra la solución del sustrato a 37 °C.
2. Coloca el lector de placas a 405 nm.
3. Añade los componentes de reacción a la placa de 96 pocillos de acuerdo con el esquema de la tabla 2.

**Tabla 2.** Esquema de reacción para ensayos en placa de 96 pocillos.

	Solución de sustrato	Muestra	Tampón de citrato	Solución estándar
<b>Prueba</b>	50 µL	50 µL de la muestra	-	-
<b>Blanco</b>	50 µL	-	50 µL	-
<b>Estándar</b>	-	-	-	300 µL
<b>Control positivo</b>	50 µL	2 µL de la enzima control	48 µL	-

4. Mezcla usando un agitador horizontal (o pipeteando) e incuba la placa por 5-10 minutos a 37 °C.

Si se sospecha que la actividad de la fosfatasa ácida de la muestra es baja, el tiempo de incubación puede ser extendido a 30 minutos.

Una reacción en blanco (solución de sustrato sin enzima) deberá correrse paralelamente para dar cuenta del fosfato de 4-nitrofenilo que se hidroliza espontáneamente durante el tiempo de incubación.

5. Detén la reacción añadiendo 0.2 mL a los pocillos, excepto los pocillos que contienen la solución estándar. La solución coloreada formada después de la adición del 0.5 N NaOH es estable por varias horas.
6. Medir la absorción a 405 nm.

#### 7.4.6. Cálculo de los resultados.

Calcula la actividad de la muestra de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$Unidades/mL = \frac{(A_{405}[muestra] - A_{405}[blanco]) \times 0.05 \times 0.3 \times DF}{A_{405}[estándar] \times Tiempo \times V_{enz}}$$

Dónde:

- $A_{405}[muestra]$  = La absorbancia de la muestra.
- $A_{405}[blanco]$  = La absorbancia del blanco.
- $A_{405}[estándar]$  = La absorbancia del estándar.
- DF = Factor de dilución de la muestra.
- Tiempo = Tiempo de incubación a 37 °C en minutos.
- $V_{enz}$  = Volumen de la muestra de enzima añadida al ensayo en mL.
- 0.05 = Concentración ( $\mu\text{mol/mL}$ ) de 4-Nitrofenol en la solución estándar.
- 0.3 = 0.3 mL, el total del volumen de los ensayos en placas de 96 pocillos, incluyendo la solución de parada.

### VIII. RESULTADOS.

Se obtuvo la fracción lisosomal mediante la técnica de centrifugación descrita anteriormente, esto incluye los pasos a seguir desde el momento en que las células van a ser separadas de las placas de cultivo para su utilización. Los cultivos no podían ser utilizados si no contaban con un 90 % de confluencia como máximo.

#### 8.1. Actividad enzimática de la Fosfatasa Ácida.

Se utilizó el kit para fosfatasa ácida de Sigma-Aldrich® con número de catálogo CS0740. La evaluación de la actividad enzimática se llevó a cabo justo después



de haber obtenido la fracción lisosomal. Varios métodos que nos permitieran romper las células para obtener los lisosomas fueron probados incluyendo el homogeneizador Potter-Elvehjem, pero el más efectivo fue utilizar un sonicador. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de absorbancia, así como las Unidades/mL de actividad enzimática. Las U/mL fueron calculadas de acuerdo con la fórmula descrita en materiales y métodos sobre la técnica para evaluar la actividad de fosfatasa ácida.

**Tabla 3.** U/mL de actividad enzimática que se obtuvieron para cada una de las evaluaciones realizadas.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Unidades/mL</b>
<b>Pellet 1</b>	185	0.0014
<b>Pellet 2</b>	551	0.0067
<b>Filtrado</b>	98	0.0001
<b>Lisosomas</b>	2429	0.0338
<b>Blanco</b>	88	0
<b>Estándar</b>	691	0
<b>Control positivo</b>	2900	1.0173

Una unidad de fosfatasa ácida hidrolizará 1  $\mu$ mol de 4-nitrofenil fosfato por minuto a pH de 4.8 a 37 °C.

Como se describe en la metodología, durante la separación de los lisosomas se fueron refrigerando pequeñas fracciones de interés por su actividad enzimática remanente, a cada una de estas fracciones se les fue asignando un nombre dependiendo del paso en el cual habían sido separadas; así fue como se obtuvieron 4 muestras incluyendo la fracción lisosomal final.

Es importante mencionar que la fracción final obtenida es solamente una fracción semipurificada en donde puede haber también actividad enzimática de las mitocondrias y los peroxisomas.

El pellet 1, como se esperaba muestra una actividad enzimática muy pobre puesto que durante los pasos de su obtención fue sometido dos veces al sonicador con el propósito de romper la pared celular de la mayor cantidad de células posibles, la primera vez (antes de su obtención) se le dio a la muestra total 5 pulsos de 5 segundos, mientras que la segunda vez fueron solamente 2 pulsos igual de 5 segundos cada uno; por lo tanto, se puede deducir que después de las centrifugaciones llevadas a cabo, en el pellet 1 no quedaron más que restos celulares como pedazos de membrana plasmática y/o algunos de los organelos de mayor tamaño, mientras que en la sacarosa están presentes los lisosomas junto a las mitocondrias que permanecen ambos suspendidos debido a su densidad parecida.

El pellet 2 es el resultado de la centrifugación en conjunto de los sobrenadantes 1 y 2. Se decidió evaluar también su actividad enzimática en cuanto a la fosfatasa ácida para descartar el hecho de que aun con esta nueva centrifugación a mayor velocidad, la cual fue de 18,360 g, los lisosomas no sedimentaran y estar totalmente seguros de que se estaba obteniendo la mayor cantidad de estos últimos en el sobrenadante. La actividad de fosfatasa ácida presente en él es ligeramente superior a la del pellet 1 pero igualmente de un valor despreciable y no significativo.

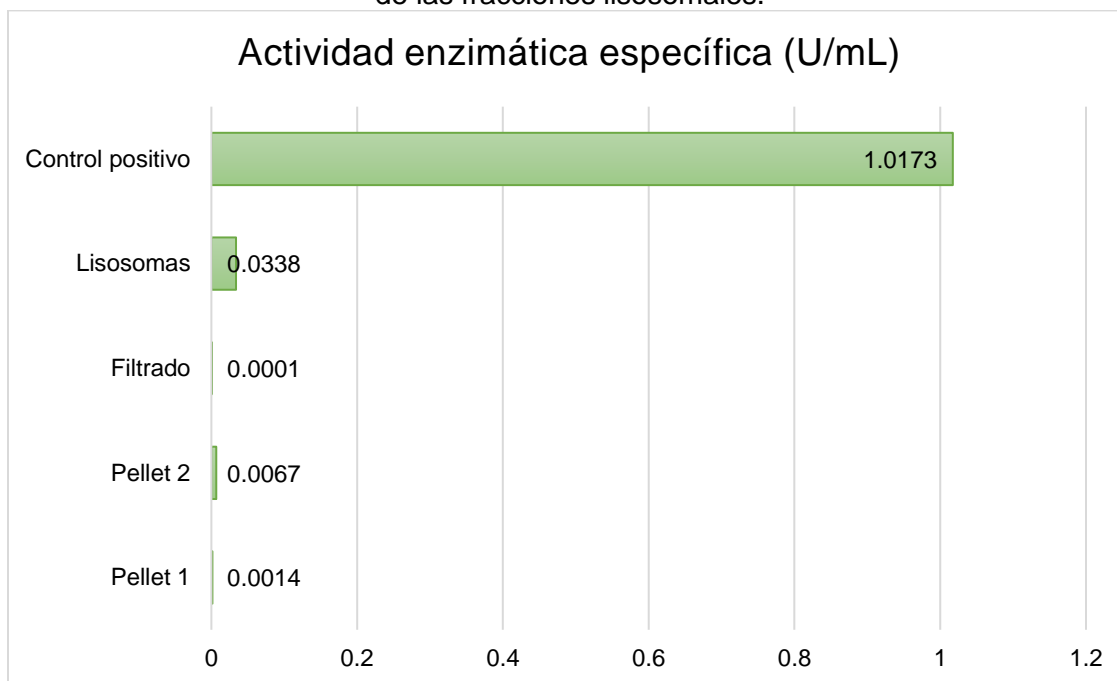
La muestra llamada “filtrado”, es el PBS 1X en el cual se suspendieron los lisosomas después de la última centrifugación a 18,360 g y que durante su paso por los filtros Amikon 10 K para concentrar los lisosomas en un volumen más pequeño, se decidió guardar como una muestra a evaluar su actividad enzimática.

Concentrar los lisosomas no solamente ha servido para tener una actividad enzimática mayor, sino que ayudó a entender que todos los lisosomas, o en su mayoría siguen intactos al no pasar la barrera del filtro Amikon de 10 K, así, la muestra llamada “filtrado” obtiene la menor actividad enzimática.

Como se esperaba, la fracción lisosomal final es la que se queda con la actividad enzimática total, pero si esta es comparada con el control positivo los resultados parecen insignificantes considerando que el control positivo contiene a la fosfatasa ácida pura y para su evaluación solamente se tomaron 2  $\mu\text{L}$  a diferencia de la fracción lisosomal final que no es una fracción pura y para la evaluación se necesitaron de 50  $\mu\text{L}$ .

El método ha resultado efectivo según los datos arrojados, pero todavía quedan algunas cuestiones por resolver, como la cantidad de células que se necesitan para obtener una mayor concentración de lisosomas y una alta tasa de actividad enzimática. Estos resultados se pueden observar en la gráfica 1.

**Gráfica 1.** Comparación de las actividades enzimáticas de fosfatasa ácida para cada una de las fracciones lisosomales.



## 8.2. Evaluación de la actividad de las proteasas (Catepsina B).

La actividad de las catepsinas se basa usualmente en el uso de péptidos fluorogénicos como peptidil-7-amido-4-metilcoumarina (AMC), que se utiliza como sustrato de la enzima. En el caso de la catepsina B, un sustrato conveniente para el ensayo de la actividad enzimática es el compuesto Na-CBZ-Arg-Arg-7-Amido-4-Metilcoumarina. Donde:

CBZ = Carbobenzoxi

Arg-Arg = Arginil-L-arginina

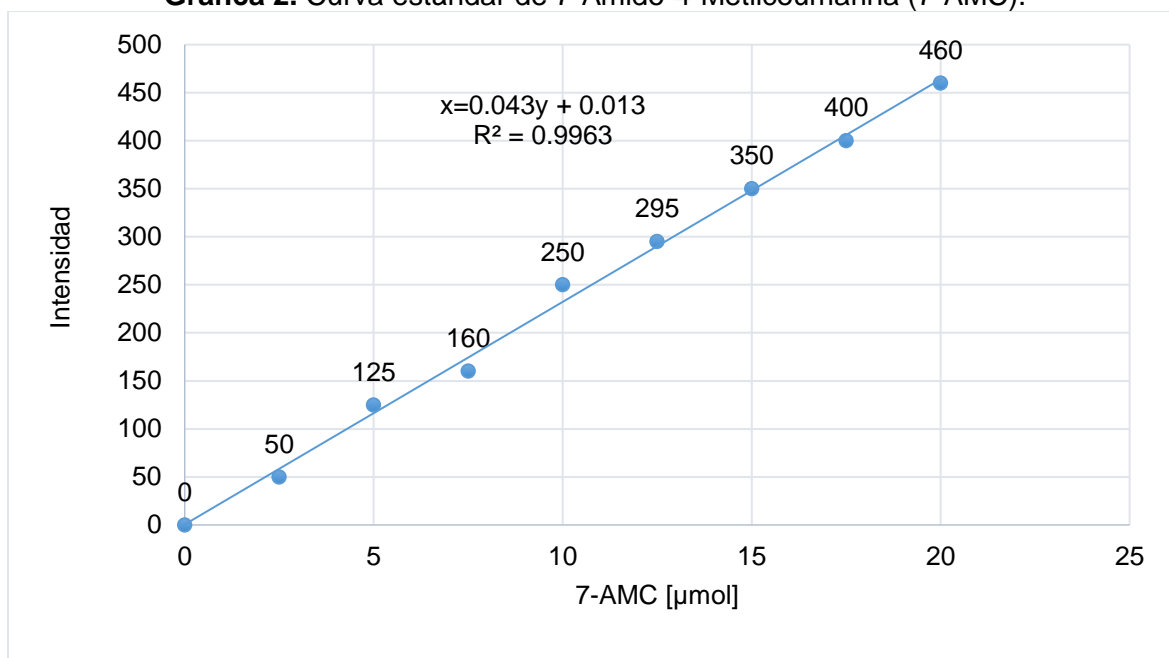
7-AMC = 7-Amido-4-Metilcoumarina

El ensayo se basa en la siguiente reacción:



La concentración del residuo fluorescente (7-AMC), se determinó utilizando una excitación a 360 nm y una emisión de 460 nm en un espectrofotómetro de Fluorescencia Perkin-Elmer LS-40, y utilizando una curva estándar de 7-AMC como la que se muestra en la gráfica 2.

**Gráfica 2.** Curva estándar de 7-Amido-4-Metilcoumarina (7-AMC).



Para calcular la concentración de la muestra se determinaron primero los nmol de 7-amido-4-metilcoumarina liberados durante la reacción, tal como se muestra en la gráfica 2. Los valores se obtuvieron utilizando la ecuación de la recta de la curva estándar de 7-AMC.

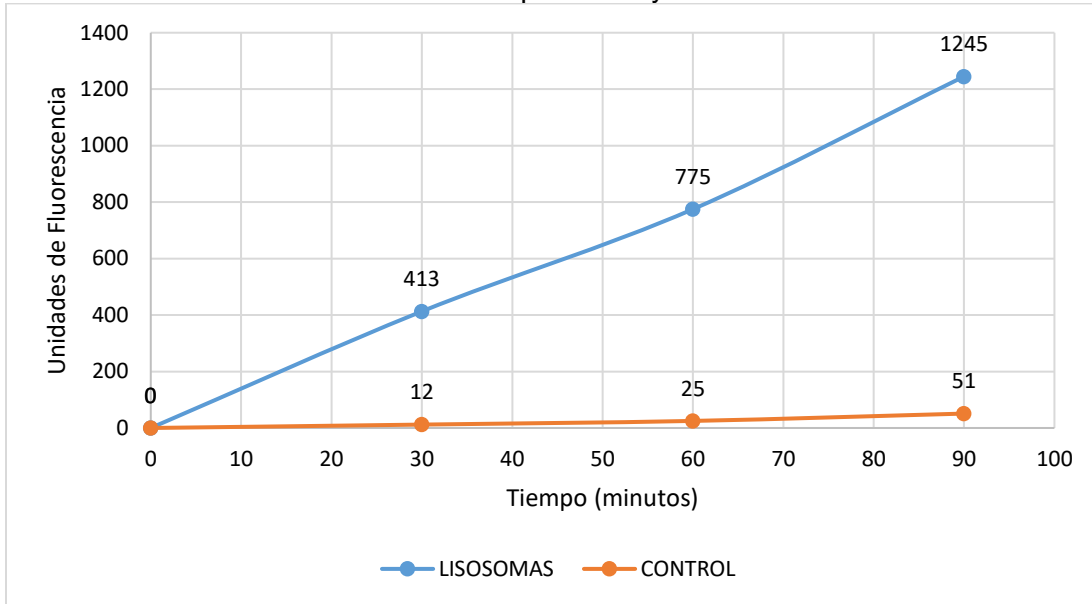
El experimento fue llevado a cabo como lo muestra la tabla 4.

**Tabla 4.** Esquema de reacción para la evaluación enzimática de Catepsina B.

	<b>PBS 1X</b>	<b>SUSTRATO (1 mg/mL)</b>	<b>SOLUCIÓN LISOSOMAL (DILUCIÓN 1:10)</b>
<b>MUESTRA</b>	3 mL	100 µL	200 µL
<b>CONTROL</b>	3.2 mL	100 µL	-

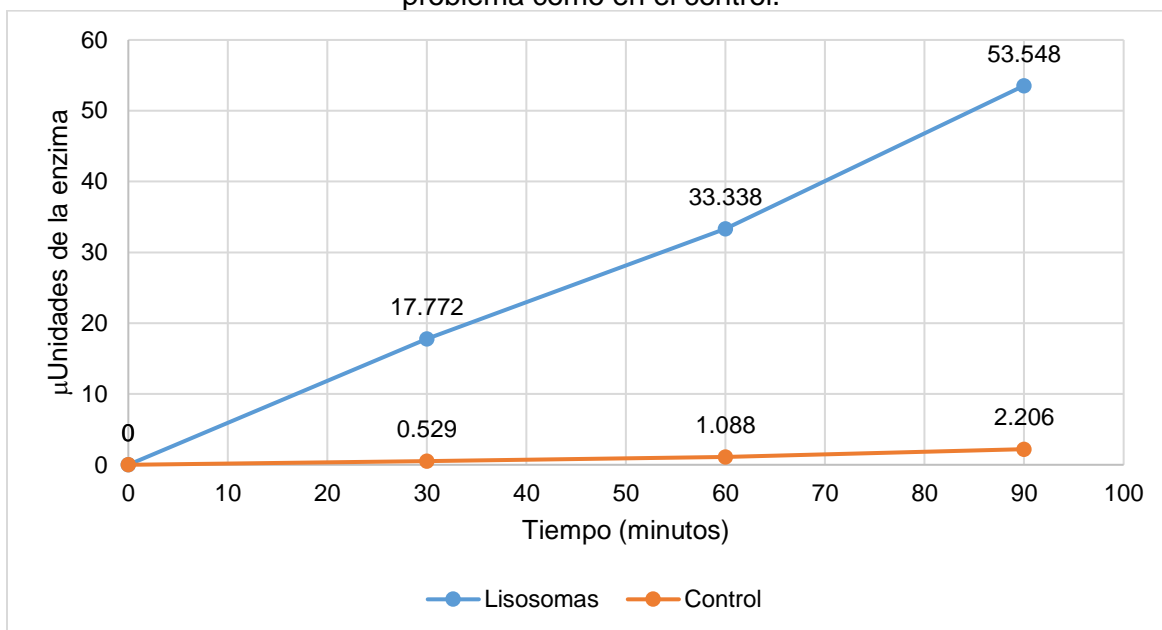
Ambas muestras, el problema y el control, fueron evaluadas a los 0, 30, 60 y 90 minutos mientras que entre cada tiempo muerto la muestra se quedaba en incubación a 37 °C. La gráfica 3 muestra el comportamiento de la actividad de las catepsinas B a través del tiempo sólo en unidades de fluorescencia, la actividad de estas proteasas aumentó proporcionalmente con respecto al tiempo en que la muestra se mantenía en incubación entre cada una de las mediciones. El control, a pesar de solamente contener el sustrato, mantuvo igualmente una actividad mínima pero constante debido a la descomposición natural y espontánea de la fluoresceína.

**Gráfica 3.** Muestra la tendencia en el tiempo de la actividad enzimática de las catepsinas B de la muestra problema y el control.



La gráfica 4 muestra las  $\mu$ Unidades/Tiempo de la enzima en la muestra problema como en el control. Esta gráfica es muy parecida a la 3, aunque si bien la anterior representa sólo las unidades de fluorescencia por tiempo, esta contiene los resultados cuantificados de la actividad enzimática de catepsinas B. Al hablar de  $\mu$ Unidades, nos damos cuenta de que tenemos el mismo problema con la actividad enzimática de la fosfatasa ácida, y es la cantidad de células con las que se obtuvo la fracción lisosomal. La poca actividad mostrada por el control además de ser despreciable se debe a la descomposición espontánea del sustrato y no por la acción de una enzima.

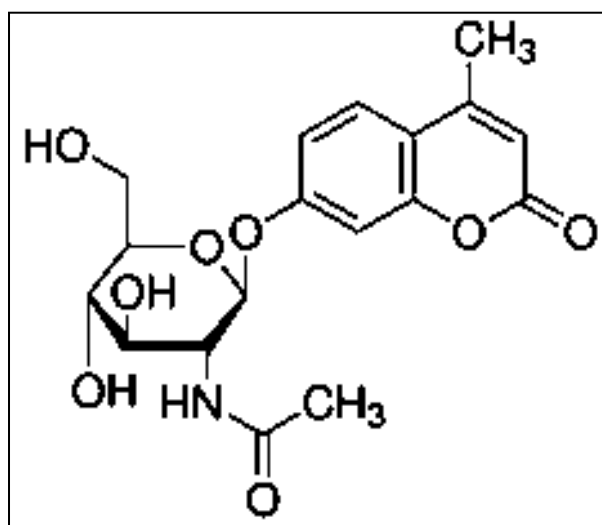
**Gráfica 4.** Muestra las  $\mu$ Unidades/Tiempo de actividad enzimática tanto en la muestra problema como en el control.



Una unidad de la enzima es aquella que puede liberar un nmol de 7-amido-4-metilcoumarina del sustrato Na-CBZ-arginil-L-arginina-7-amido-4-metilcoumarina por minuto a un pH de 6.0 y a 40 °C.

### 8.3. N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa (NAGasa).

La actividad de la enzima se basa en la liberación de 4-Metilumbeliferona (4-MU) a partir del sustrato no fluorogénico 4-Metilumbeliferil-N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminida.

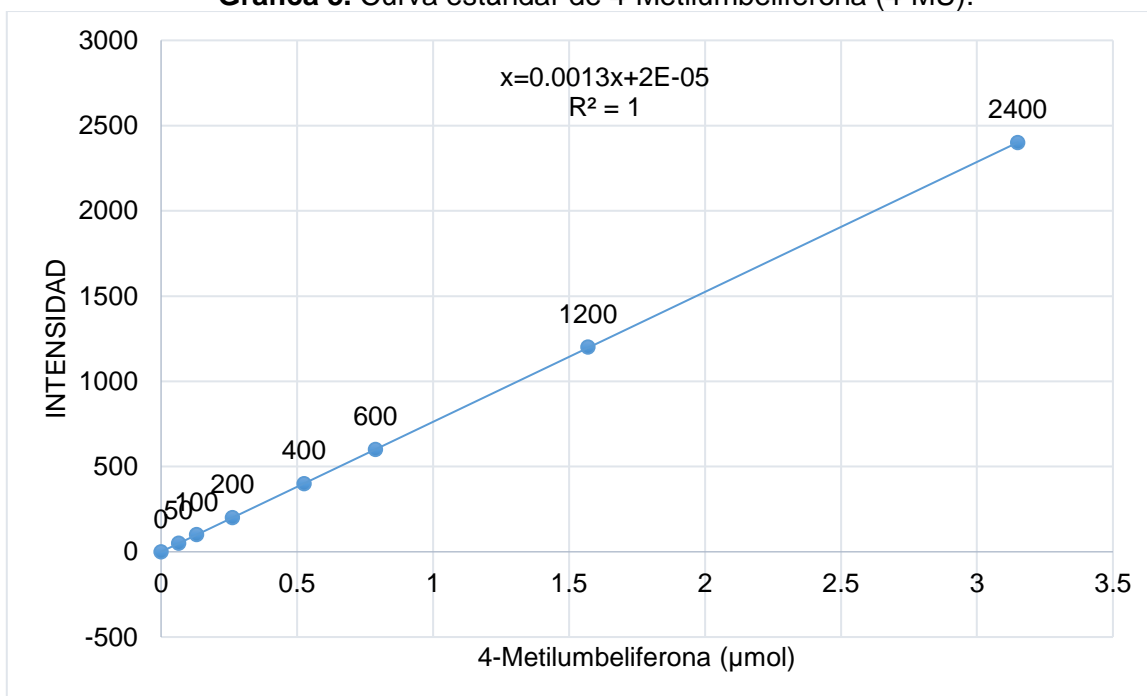


**Figura 9.** Molécula del sustrato 4-Metilumbeliferil-N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminida para la enzima N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidasa.



La concentración del residuo fluorescente 4-Metilumbeliferona (4-MU), se determinó utilizando una excitación a 365 nm y una emisión de 460 nm en un espectrofotómetro de Fluorescencia Perkin-Elmer LS-40, y utilizando una curva estándar de 4-MU como la que se muestra en la gráfica 5.

**Gráfica 5.** Curva estándar de 4-Metilumbeliferona (4-MU).

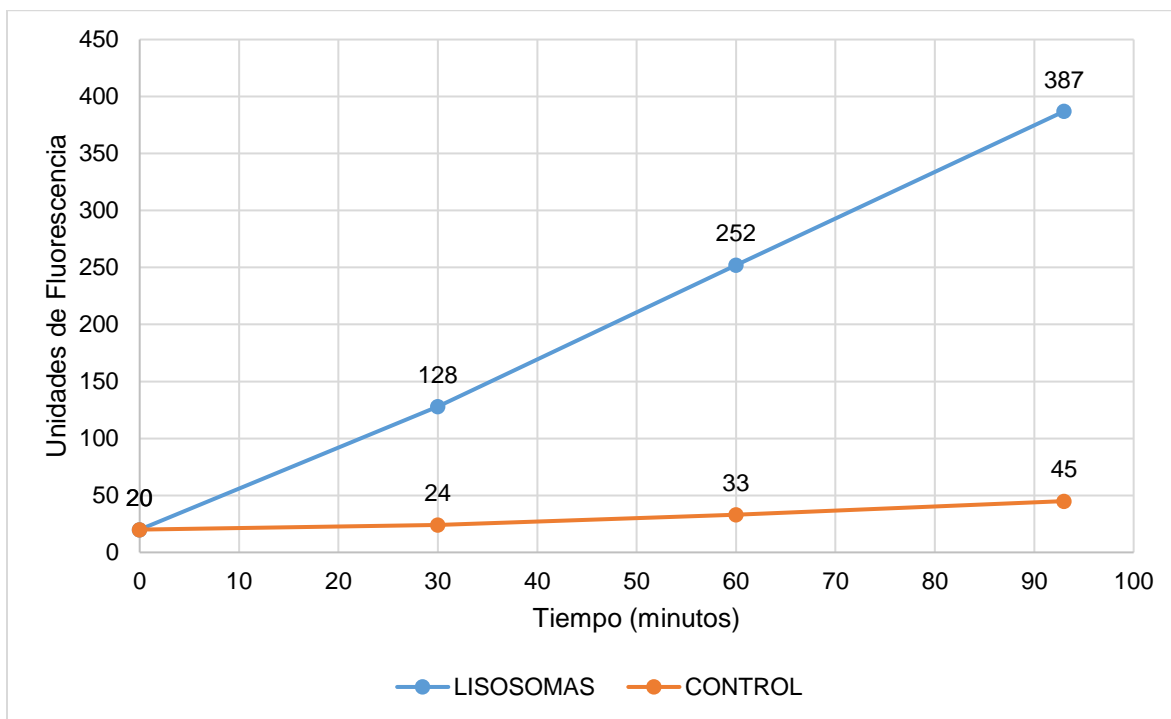


Seguido de incubación in vitro, alícuotas conteniendo una concentración de proteína aproximada de 100 μg, 0.5 % Triton X-100 y el sustrato a razón de 100 μL de una solución conteniendo 1 mg/mL; se incuban en amortiguador de acetato pH 4.5 y el volumen de reacción se ajusta a 500 μL, para luego incubar por espacio de 2 horas a 25 °C. Al final de la reacción se adicionan 2.5 mL de amortiguador de glicina pH 10.4. La concentración final del sustrato es de 0.2 μmol.

La gráfica 6 representa las unidades de fluorescencia obtenidas para la muestra de lisosomas y la muestra control en intervalos de tiempo de 30 minutos entre

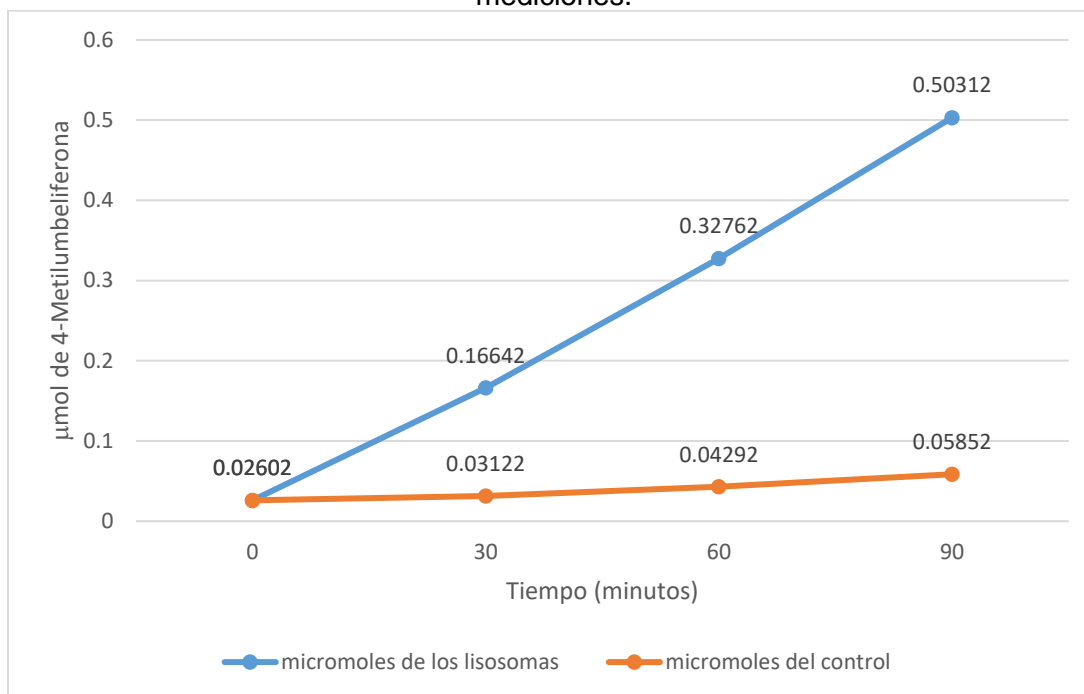
cada uno. El control a tiempo 0 expresó una medida de fluorescencia igual a la de los lisosomas, pero conforme las muestras fueron incubadas, y determinado el avance de la reacción, la muestra de los lisosomas se separó drásticamente de los del control respecto a las unidades de fluorescencia en el mismo tiempo de incubación a las mismas condiciones. Llegado a un tiempo de 90 minutos de incubación, el valor del control apenas si se duplicó, mientras que el de la muestra de lisosomas aumentó exponencialmente.

**Gráfica 6.** Muestra la tendencia en el tiempo de la actividad enzimática de NAGASA en la muestra problema como en el control en unidades de fluorescencia.



La gráfica 7, representa los  $\mu\text{mol}$  obtenidos para cada una de las mediciones en los diferentes tiempos representados en la gráfica 6. Los  $\mu\text{mol}$  fueron calculados de acuerdo con la ecuación de la pendiente de la gráfica 5 y graficados como  $\mu\text{mol}$  de 4-Metilumbeliferona sobre el tiempo transcurrido.

**Gráfica 7.** Muestra los  $\mu\text{mol}$  de 4-Metilumbeliferona liberados para cada una de las mediciones.



Una unidad de la enzima es aquella que puede hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  del sustrato 4-Metilumbeliferil-N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminida para rendir 4-Metilumbeliferona y N-acetil-D-glucosamina por minuto a 25 °C y a un pH de 4.5.

## **IX. DISCUSIÓN.**

Las células HK2 constituyen un modelo confiable y poderoso para el estudio de los eventos que derivan del paso normal de las proteínas por los túbulos proximales del riñón y su procesamiento, en particular los cambios asociados a la diabetes y la nefropatía diabética.

El estrés oxidativo está asociado con la disfunción renal en pacientes con insuficiencia renal y la albúmina plasmática es el blanco de la oxidación masiva en el síndrome nefrótico y la nefropatía diabética. El estrés estructural inducido por la glicación no enzimática o especies reactivas de oxígeno afecta la capacidad antioxidante de la albúmina, un factor asociado con el desarrollo de complicaciones de la diabetes. Cómo este estrés afecta la respuesta antioxidante de la proteína y la estructura molecular de la albúmina durante la nefropatía diabética, no está claro<sup>49</sup>.

El modelo con células HK2, la extracción de la fracción lisosomal con la técnica desarrollada en este trabajo y la utilización de las enzimas lisosomales, permitirán estudiar de manera más específica los cambios que ocurren durante el recambio proteico y en el proceso del metabolismo de la albúmina modificada mediante glicación principalmente en las personas que padecen nefropatía diabética.

Como se ha descrito en los antecedentes, todas las técnicas en las cuales se basa este trabajo para la obtención de lisosomas fueron desarrolladas a partir de hígado o riñón de ratón. Las técnicas desarrolladas por Cristian de Duve mediante técnicas de centrifugación con gradientes de densidad le permitieron obtener fracciones brutas y semi purificadas de lisosomas y otros organelos. Los métodos

que él y sus colaboradores desarrollaron están hechos para utilizarlos sobre órganos de ratón como hígado o riñón, lo cual hizo un poco complicado el adaptarlos a los cultivos celulares. Los resultados obtenidos por ellos a través de varias centrifugaciones con gradientes de densidad de sacarosa han sido bastante parecidos a los obtenidos por la técnica desarrollada en este trabajo aplicada a cultivos de células HK2.

El modelo con ratones utilizado por Cristian de Duve y posteriores investigadores, provee una ventaja en cuanto a la cantidad de tejido obtenido para la extracción de los lisosomas lo que significa trabajar con una cantidad mucho mayor de células, y por lo tanto también se obtiene una mayor concentración de estos organelos en las fracciones finales.

En el artículo *“Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue”* de 1955, Cristian de Duve y colaboradores proponen un método de fraccionamiento celular con hígado de rata como modelo principal<sup>14</sup>. La técnica reportada en este artículo más efectiva para lograr una liberación de enzimas lisosómicas y obtener una mayor actividad enzimática fue el de aplicar vibraciones sónicas a las muestras, esta misma técnica fue la que en el presente trabajo resultó con mayor eficacia ya que permitió romper las células obtenidas de los cultivos en un porcentaje mucho más alto que otros métodos utilizados como fueron el del Potter-Elvehjem y el de hacer pasar la suspensión celular por agujas de muy bajo calibre con el propósito de que la presión pudiera romper la membrana celular, estos dos últimos métodos resultaban en actividades enzimáticas sumamente bajas, casi despreciables. De Duve y sus colaboradores en este artículo obtienen las

siguientes fracciones celulares: extracto citoplasmático, fracción nuclear, fracción mitocondrial pesada, fracción mitocondrial ligera, fracción microsomal y sobrenadante final.

La fracción en la cual obtienen la mayor actividad enzimática de las enzimas de interés para este trabajo como son la fosfatasa ácida y las catepsinas fue en la fracción lisosomal ligera, en la cual no hay otros tipos de restos celulares que contengan una densidad parecida a la de la mitocondria a excepción de los lisosomas. En el presente trabajo tenemos una fracción final centrifugada y concentrada en filtros Amikon 10K, en la cual de acuerdo con los datos obtenidos en las determinaciones enzimáticas de fosfatasa ácida y catepsina B, se obtuvo la mayor concentración de lisosomas. Esta fracción es sumamente parecida a la obtenida por de Duve, puesto que en ambos procedimientos se aseguró el eliminar otros organelos de mayor o menor densidad que no quedaran suspendidos junto a las mitocondrias o a los lisosomas, siendo que las densidades de estos dos últimos organelos son casi idénticas. Sin embargo, también se obtuvieron, pero en cantidad mucho menor, actividades de enzimas lisosomales en las demás fracciones. Cabe mencionar que el patrón de distribución exacto de estas enzimas no se determina sólo por la partición de los gránulos en los que están contenidos, sino también por la forma en que las actividades libres, se distribuyen entre las fracciones como resultado de la adsorción y otros fenómenos.

La actividad enzimática de NAGasa solamente fue determinada en la fracción lisosomal final, filtrada y concentrada con filtros Amikon 10K pues tomando en cuenta la actividad de fosfatasa ácida fue la fracción en donde se encontraban los

lisosomas concentrados y por lo tanto todas sus enzimas lisosomales incluyendo NAGasa.

Una vez que el método de separación de lisosomas sea perfeccionado se podrá estimar las concentraciones de NAGasa que las células del cultivo producen en un ambiente mínimo de estrés y por lo tanto de daño renal, para así tener una referencia más sólida en cuanto a la concentración de enzima que habrá cuando se lleven a cabo pruebas sobre la influencia del daño renal en la producción de las enzimas lisosomales y de esta manera obtener datos más representativos sobre la relación entre el daño de los túbulos renales proximales en la nefropatía diabética con la producción de la enzima NAGasa especialmente la isoenzima B que es la que se ve aumentada cuando existe daño tubular renal.

La importancia de contar con un modelo de células tubulares proximales para determinar el daño renal durante la nefropatía diabética permitirá tener un mayor control sobre las condiciones en las cuales se requiere trabajar, los procesos a los que son sometidas las células orientados a resultados específicos, la temperatura, los nutrientes del medio de cultivo, factores de crecimiento, inocuidad, y otras circunstancias que pueden ser determinadas y controladas de manera más específica a diferencia del trabajo con ratones. Es necesario un modelo que trascienda las barreras que implica el trabajar con organismos vivos y que al mismo tiempo permita una evaluación a nivel celular, es por eso por lo que el modelo desarrollado en este trabajo también concede la facilidad de estudiar el fenómeno presentado como recambio proteico y la importancia que tiene la degradación de las proteínas especialmente la albúmina durante las patologías de

los túbulos renales proximales en especial la nefropatía diabética y de esta manera y a través de los estudios que se puedan derivar de este trabajo, suministrar nuevas herramientas que posibiliten de manera más concreta el entendimiento del daño tubular renal durante la nefropatía diabética y poder actuar en las etapas más tempranas del padecimiento.

## **X. CONCLUSIONES.**

Las técnicas de separación en las cuales está basada la presentada en este trabajo fueron diseñadas para aplicarse a órganos extraídos de ratón tales como hígado o riñón lo que hizo sumamente complicado el poderlas aplicar a cultivos celulares, por lo que se desarrolló una técnica de separación específica para cultivos celulares la cual permitiera obtener una fracción lisosomal que fuera representativa en cuanto a su actividad enzimática.

1. La cantidad de células obtenidas en cada uno de los cultivos para realizar la separación no es la más adecuada, a diferencia del modelo con ratones que proporciona una cantidad de tejido mucho mayor que con el que se cuenta en un cultivo celular. Realizar cultivos celulares en placas más grandes supone un mayor estrés sobre las células cultivadas de acuerdo con el tiempo en que estas tardan en llegar a una confluencia de entre 80 y 90 % y también una mayor probabilidad de contaminación al tener que cambiar el medio de cultivo con mayor frecuencia.
2. La fracción final de lisosomas que fue obtenida y concentrada por filtros Amikon 10K nos sugiere que los lisosomas han sido obtenidos intactos en



general pues la actividad de fosfatasa ácida fue determinada en su mayoría en esa misma fracción a diferencia del resto de las fracciones que arrojaron resultados despreciables. Al ser tan bajos los resultados de fosfatasa ácida en el resto de las fracciones se puede determinar que esta actividad está dada solamente por fenómenos de adsorción de actividad enzimática libre, esto quiere decir que la enzima fosfatasa ácida que estaba fuera de los lisosomas se adhirió a los organelos, pared celular, mitocondrias o peroxisomas que quedaron centrifugados en el resto de las fracciones.

3. Es necesario realizar la determinación de otra enzima a esta fracción lisosomal final para descartar la posible contaminación con otros organelos. La enzima que se sugiere puede ser determinada es la citocromo oxidasa que como bien se sabe pertenece únicamente a las mitocondrias y estos organelos tienen una densidad sumamente parecida a la de los lisosomas por lo cual es muy fácil que ambos se mantengan suspendidos juntos sin realizar antes una separación por gradiente de concentración de sacarosa y que teniendo en cuenta la poca cantidad de células obtenidas del cultivo para trabajar, una separación por gradiente de concentración no es recomendable pues se corre el riesgo de perder los organelos de interés entre los gradientes utilizados.

## **XI. BIBLIOGRAFÍA.**

1. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Natural Cell Biol.* 2005;7(9):847-849.
2. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochem Biophys acta.* 2012;1824(1):68-88.
3. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scot MP, Ziursky SL, Darnell J. *Orgánulos de la célula eucarionte.* En: Freeman WH. *Biología celular y molecular.* Argentina: Médica Panamericana; 2005. p. 165-167.
4. Koolman J, Röhm KH. *Retículo endoplásmico y aparato de Golgi.* En: Facorro L, Medina de Thiele B, editors. *Bioquímica: Texto y Atlas.* España: Editorial Médica Panamericana; 2004. p. 234.
5. Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomes proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):605-614.
6. Carmona-Gutierrez D., et al., The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.009>
7. Stoka, V., et al., Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.010>
8. Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A. *Autophagy in lysosomal storage disorders.* Landes Bioscience. 2012;8(5):719-730.

9. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int* 2004;66(4):1310-1314.
10. Héctor Ramón Martínez Ramírez, Alfonso Martín Cueto Manzano, Enrique Rojas Campos, Laura Cortés Sanabria. Estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica temprana en primer nivel de atención. *El Residente* 2011;6(1): 44-50. [ui9](#)
11. Berthet J, Duve C. The existence of a mitochondria-linked enzymically inactive form of acid phosphatase in rat liver tissue. *Biochem J.* 1951;50(2):174-181.
12. Berthet J, Berthet L, Appelmans F, de Duve C. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1951;50(2):182-189.
13. Appelmans F, de Duve C. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem J.* 1955;59(3):426-433.
14. Appelmans F, Wattiaux R, de Duve C. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J.* 1955;59(3):438-445.
15. Novikoff AB, Podber E, Ryan J, Noe E. Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles isolated from rat liver homogenate. *J Histochem Cytochem.* 1953;1(1):27-46.

16. de Duve C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955;60(4):604-617.
17. Gianetto R, de Duve C. Comparative study of the binding of acid phosphatase, beta-glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem J.* 1955;59(3):433-438.
18. Beaufay H, de Duve C. Enzymic release of bound hydrolases. *Biochem J.* 1959;73:604-609.
19. Beaufay H, Bendall DS, Baudhuin P, Wattiaux R, de Duve C. Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density-gradient centrifuging. *Biochem J.* 1959;73(4):628-637.
20. Beaufay H, Jacques P, Baudhuin P, Sellinger OZ, Berthet J, de Duve C. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of the density equilibration in various gradients. *Biochem J.* 1964;92(1):184-205.
21. Colowick SP, Kaplan NO. *Methods in enzymology: biomembranes, part A.* New York: Academic Press; 1974.
22. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Sep;10(9):623-635.

23. Sepúlveda SJ. La célula. In: de León FJ. Texto atlas de histología, biología celular y tisular. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.; 2012. p. 25-30.
24. Boya P. Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Sept 1;17(5):766-774.
25. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:483-525.
26. Lubke T, Lobel P, Sleat DE. Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):625-635.
27. Sleat DE, Jadot M, Lobel P. Lysosomal proteomics and disease. *Proteomics Clin Appl*. 2007 Sep;1(9):1134-1146.
28. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Mar;14(3):283-296.
29. Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lüllmann-Rauch R, Hartmann D, von Figura K, Saftig P, et al. Normal lysosomal morphology and function in LAMP1 deficient mice. *J Biol Chem*. 1999 Apr 30;274(18):12692-12701.
30. Nishi T, Forgacs M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Feb;3(2):94-103.
31. Brix K. Lysosomal proteases: revival of the sleeping beauty. In: Saftig P, editors. *Lysosomes*. Georgetown, Texas: Springer; 2005. p. 50-59.

32. Rossi A, Deveraux Q, Turk B, Sali A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Bio Chem*. 2004 May;385(5):363-372.
33. Blass G, Levchenko V, Ilatovskaya DV, Staruschenko A. Chronic cathepsin inhibition by E-64 in Dahl salt-sensitive rats. *Physiol Rep*. 2016 Sep;4(17):1-10.
34. Bauer Y, Hess P, Qiu C, Klenk A, Renault B, Wanner D, et al. Identification of cathepsin L as a potential sex-specific biomarker for renal damage. *Hypertension*. 2011 Apr;57(4):795-801.
35. Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995 Apr;376(4):225-230.
36. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsins B from normal and tumour tissues. *Biochem J*. 1992 Feb 15;282(1):273-8.
37. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):98-111.
38. Twining SS. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1994;29(5):315-383.
39. Hasilik A, Wrocklage C, Schröder B. Intracellular trafficking of lysosomal proteins and lysosomes. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47 Suppl 1:18-33.
40. Wiederanders B, Kaulmann G, Schilling K. Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci*. 2003 Oct;4(5):309-326.

41. Conchie J, Findlay J, Levy GA. Mammalian glycosidases; distribution in the body. *Biochem J.* 1959 Feb;71(2):318-325.
42. Dance N, Prince RG, Cattell WR, Lansdell J, Richards B. The excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta-galactosidase by patients with renal disease. *Clin Chim Acta.* 1970 Jan;27(1):87-92.
43. Lockwood TD, Bosmann HB. The use of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in human renal toxicology. II. Elevation in human excretion after aspirin and sodium salicylate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979 Jun 30;49(2):337-345.
44. Kunin CM, Chesney RW, Craig WA, England AC, DeAngelis C. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: studies of N-acetyl-beta-glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics.* 1978 Nov;62(5):751-760.
45. Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2005;48(2):75-80.
46. Price RG. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol.* 1992;38 Suppl 1:S14-9.
47. Price RG. Measurement of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and its isoenzymes in urine methods and clinical applications. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992 Oct;30(10):693-705.

48. Tucker SM, Pierce RJ, Price RG. Characterization of human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. Clin Chim Acta. 1980 Mar 14;102(1):29-40.
49. Medina Navarro R., Corona Candelas I., Barajas González S., Díaz Flores M., Durán Reyes G., et al. Albumin antioxidant response to stress in diabetic nephropathy progression. PLoS ONE. 2014; 9(9):e106490.