

1986-2

082104356

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO DEL FENOTIPO ELECTROFORETICO DE LA
ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA (EC. 1.1.1.14)
EN ERITROCITOS HUMANOS.

FRANCISCO JAVIER PEREA DIAZ

ESTUDIO DEL FENOTIPO ELECTROFORETICO DE
LA ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA (EC.
1.1.1.14) EN ERITROCITOS HUMANOS.

PRESENTADO POR:

FRANCISCO JAVIER PEREA DIAZ

DIRIGIDA POR:

BIOL. GUILLERMO ZUÑIGA G.

I N D I C E

	Págs.
P R O L O G O	1
D E D I C A T O R I A S	3
A G R A D E C I M I E N T O S	4
I N T R O D U C C I O N	
I.- GENERALIDADES	5
II.- LA VIA METABOLICA DEL SORBITOL.	12
III.- ESTUDIOS DE SORD REALIZADOS EN DIFEREN <u>T</u> TES ESPECIES	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
O B J E T I V O S	22
H I P O T E S I S	23
MATERIAL Y METODOS	24
R E S U L T A D O S	40
D I S C U S I O N	49
C O N C L U S I O N E S	56
B I B L I O G R A F I A	57

P R O L O G O

P R O L O G O

Los métodos electroforéticos se han utilizado para valorar la variabilidad genética de las proteínas en las poblaciones de los seres vivos. Estos métodos permiten por ejemplo separar las formas moleculares múltiples de una enzima y establecer su fenotipo electroforético en un determinado tejido, ofreciendo la posibilidad de comparar los fenotipos de diferentes tejidos de un mismo organismo o de diferentes organismos, con el fin de conocer más acerca de su estructura, su función y su origen génico.

La enzima Sorbitol deshidrogenasa (SORD) se encuentra ampliamente distribuída en muchos organismos, cataliza la transformación del sorbitol a fructosa y junto con la Aldosa reductasa forman la llamada vía del sorbitol, que es una ruta alterna importante para el metabolismo de la glucosa, esta vía se interconecta a la glucólisis mediante los pasos de Hexoquinasa y Fosfofructoquinasa. SORD se ha estudiado en varias especies animales, y en algunas de ellas (B. marinus, S. scrofa, M. musculus) se ha postulado la posibilidad de que existen al menos dos alelos distintos.

El estudio de SORD en H. sapiens ha sido motivado --

por la relación de las vías de sorbitol y glucólisis en estados hiperglucémicos, ya que la deficiencia de esta enzima permitiría la acumulación de sorbitol, el cual puede ser nocivo a la célula. El estudio de las características electroforéticas y bioquímicas de esta enzima en diferentes tejidos humanos permitirá conocer sus patrones de expresión, así como sus implicaciones metabólicas. En la presente tesis se reportan los estudios realizados en eritrocitos.

DEDICATORIAS

DEDICATORIAS

A MIS PADRES...

Que me dieron todo.

A BETTY IBARRA...

Por mostrarme el camino.

A MIS COMPAÑEROS (grupo A)...

Por su amistad y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A MIS HERMANOS:

Araceli, Marisa, Adrián, Ernesto, Omar, Rocio y Antonio;
Por su cariño.

AL BIOLOGO GUILLERMO ZUÑIGA G.:

Por su amistad, apoyo y enseñanzas que me brindó durante mi carrera.

AL DR. JOSE MARIA CANTU:

Jefe de la División de Genética de la U.I.B.O. del I.M.S.S., por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

A todo el personal que labora en la División de Genética de la U.I.B.O., especialmente a QUETA FRANCO, GERARDO VACA, MARU DE LA MORA, JOSE SANCHEZ y EVA OCHOA, por su amistad y apoyo.

A ARMANDO DUARTE S.

Por su entrañable amistad.

A todas las personas que me ofrecieron su amistad, apoyo y confianza durante mi formación.

INTRODUCCION

I.- GENERALIDADES

Las reacciones químicas y los procesos metabólicos de las células vivas, se efectúan por medio de aceleradores o catalizadores proteícos que reciben el nombre de enzimas.

El nombre de las enzimas suele ser el de la sustancia (sustrato) sobre la cual actúan, seguido del sufijo -asa.

La mayoría de las enzimas son altamente específicas para un solo tipo de sustrato, otras no son tan específicas, pero reaccionan sólo con sustratos químicamente relacionados.

Hasta nuestras fechas se han descrito más de mil enzimas diferentes, de las cuales más de un centenar pertenecen a un grupo denominado Isozimas o Isoenzimas.

Una Isoenzima es una enzima que puede adquirir múltiples formas moleculares en un mismo organismo o en distintos organismos de una misma especie, mostrando diferencias en sus propiedades físicas y químicas que permiten diferenciarlas, dichas diferencias pueden ser (1):

- a) En actividad enzimática.
- b) En su fenotipo electroforético.
- c) En su afinidad por sustratos.
- d) En su estabilidad térmica.
- e) En su respuesta a inhibidores y/o activadores.

Rothe (2) agrupa a las Isoenzimas en tres clases diferentes, dependiendo de su origen:

- 1) Isoenzimas primarias. La ocurrencia de estas Isoenzi--mas es debida a la presencia de múltiples loci génicos codificadores de cadenas polipéptidicas estructuralmen--te diferentes de una enzima (Isoenzimas multi-locus).
- 2) Aleloenzimas. Son ocasionadas por múltiples alelos de un solo locus que determinan versiones estructuralmen--te distintas de una cadena polipéptidica particular (Isoenzimas alélicas).
- 3) Isoenzimas secundarias. Son debidas a modificaciones post-traduccionales a una enzima dada por alguno de -- los siguientes mecanismos: agregación y polimerización; oxidación y reducción de grupos thiol; proteolisis li--mitada; contenido de diferentes carbohidratos; desami--nación; enlace de sustratos o cosustratos: temperatu--ra; efectos de pH; e isomerismo conformacional.

La diferencia general entre alelismo múltiple y múltiples loci génicos como causa de la formación de Isoenzimas, es que, en el alelismo múltiple resultan diferencias en el patrón de Isoenzimas de miembros individuales de -- una misma especie, mientras que, los múltiples loci génicos son comunes en general para todos los miembros de una misma especie.

El estudio de las Isoenzimas ha contribuido enormemente al desarrollo de las ciencias biológicas tradicionales creando interfases entre los campos de la Bioquímica, Embriología, Genética y Evolución (3).

El reconocimiento de las Isoenzimas ha revolucionado el campo de la Bioquímica, ya que algunas de las formas moleculares múltiples de una enzima muestran especificidad tisular o celular, y en algunos casos diferente localización topográfica dentro de la célula; esto sugiere que cada Isoenzima tiene un papel metabólico diferente en la fisiología celular. La Malato deshidrogenasa, por ejemplo, presenta una Isoenzima en la mitocondria y otra en el citosol. Ambas formas catalizan la misma reacción, pero por su diferente localización obviamente participan en vías metabólicas distintas y separadas (3).

Las Isoenzimas poseen atributos que son útiles para

estudiar una amplia variedad de procesos embrionarios. - El enfoque de la Biología del Desarrollo es la de determinar que genes controlan y responden a los procesos embrionarios. Las investigaciones con Isoenzimas han ayudado a delinear con más precisión y detalle los patrones sucesivos de la función génica durante la diferenciación celular (3).

En el campo de la Genética, las Isoenzimas han probado ser excelentes marcadores para la actividad génica y permiten la identificación de fenotipos bioquímicos desconocidos. En el hombre han servido para: I) mapeo genético y estudios familiares; II) disección y reconstrucción del genoma humano; III) comprensión de la organización y control del genoma; IV) para la investigación de la evolución del genoma; y V) determinación de la genética de las enfermedades metabólicas (3).

En los estudios de Evolución molecular, las Isoenzimas han hecho posible la cuantificación de la variabilidad genética en poblaciones, ya que es posible medir las proporciones relativas de los alelos, mediante el análisis de los fenotipos electroforéticos de estas enzimas -- (3). Como muchos genes codifican para enzimas, puede inferirse la variabilidad existente en las proteínas producidas por los organismos. Si una proteína determinada es

invariable en los individuos de una población, el gen que codifica dicha proteína también es probablemente invariable; si la proteína es variable, entonces el gen es variable. La variabilidad genética existente en las poblaciones naturales, presenta un interés central para los biólogos, ya que determina en gran medida la flexibilidad evolutiva de una especie.

En una población dada pueden existir varios alelos en un locus, aunque sólo puede haber dos en un individuo. Cuando ambos alelos son idénticos en un mismo individuo, se dice que él es homocigoto para dicho alelo; cuando los alelos son diferentes, se dice que el individuo es heterocigoto.

Los diferentes alelos pueden surgir por distintos tipos de mutaciones que den lugar a una modificación en la síntesis o en la estructura del producto génico.

La mayoría de los alelos mutados son individualmente muy raros, pero algunos son lo suficientemente frecuentes como para mostrar un fenómeno llamado polimorfismo. Este término es utilizado para situaciones en las que es posible clasificar finamente a los miembros de una población nada, por medio de una técnica adecuada, en dos o --

más fenotipos comunes claramente definidos, representados por combinaciones alélicas diferentes (1).

Como un ejemplo podemos considerar que un locus particular se considera polimórfico en una población dada si el alelo más común se encuentra en el 99% o menos de la población, lo que implica que existe al menos un alelo -- con una frecuencia igual o mayor al 1% (1).

La aplicación práctica de las Isoenzimas es muy amplia, puesto que se han empleado para muchos y muy variados propósitos. Por ejemplo, se han utilizado para monitorear el movimiento de las poblaciones marinas de muchas especies. También han servido para determinar el grado de contaminación de un ecosistema, mediante el análisis de enzimogramas de las especies que habitan en dicho lugar (3).

Ocasionalmente se han empleado como marcadores para los productos alimenticios expendidos en carnicerías, ya que la carne de una especie puede ser sustituida o adulterada por carne de otra especie, este tipo de fraudes pueden ser revelados fácilmente mediante un análisis de las Isoenzimas de la carne, como por ejemplo, la Lactato deshidrogenasa (LDH) que exhibe un patrón característico para cada especie, en movilidad electroforética (3).

Desde el punto de vista clínico, las Isoenzimas han tomado una gran importancia, puesto que se han correlacionado los cambios en los patrones de Isoenzimas de algunas enzimas con diversas enfermedades, empleándose éstas para fines de diagnóstico. Por ejemplo, se ha utilizado a la LDH y a la Creatinquinasa para el diagnóstico de ataques al corazón. Otros padecimientos como ciertos cánceres y enfermedades hepáticas imprimen sus patrones isoenzímicos en la sangre, y sirven como indicios para su diagnóstico. (3).

II.- LA VIA METABOLICA DEL SORBITOL

El metabolismo de la glucosa en los seres vivos es realizado fundamentalmente por la glucólisis y por la vía de las pentosas fosfatos. Sin embargo, la figura 1 muestra que también es posible encontrar una vía metabólica - alterna a la glucólisis, y que es conocida como "La vía - del Sorbitol".

La vía metabólica del sorbitol está constituida por dos enzimas: la Aldosa reductasa (AR. EC. 1.1.1.21) que participa en la conversión de glucosa a sorbitol en una - reacción dependiente de NADPH; y por la sorbitol deshidrogenasa (SORD. EC.1.1.1.14) que cataliza la oxidación del sorbitol para producir FRUCTOSA en una reacción dependiente de NAD^+ (4).

Jeffery et al. (4) en un análisis de la interconección de la vía del sorbitol con otras vías metabólicas, -- menciona que la fructosa no es utilizada como sustrato -- por la Glucoquinasa, pero en algunas circunstancias la Hexoquinasa y el ATP pueden convertirla en fructosa 6-fosfato y dirigirla a la Fosfofructoquinasa dentro de la glucólisis; este paso por sorbitol pudiera servir entonces como una función de transhidrogenasa (reducción de NAD^+ y - oxidación de NADPH). Alternativamente, la Fructoquinasa y el ATP pueden convertir la fructosa en fructosa 1-fosfa

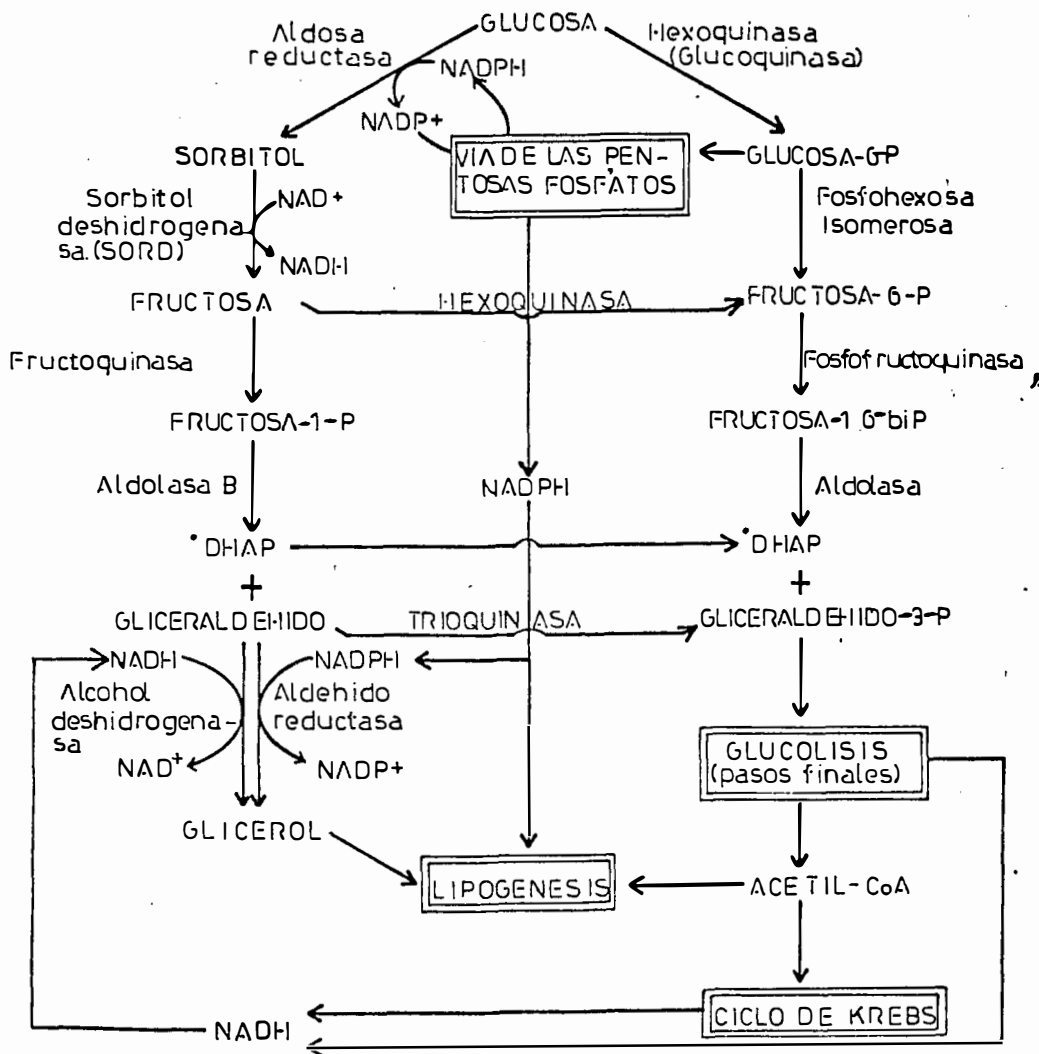
to y ésta puede ser dividida por la Adolasa B en dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehido, estos dos últimos compuestos pueden ser convertidos en gliceraldehido 3-fosfato por la acción de la Triosa fosfato isomerasa y de la Triquinasa, respectivamente, entrando en los pasos finales de la glucólisis. También el gliceraldehido puede -- ser convertido a glicerol por medio de la Alcohol deshi--drogenasa o la Aldehido reductasa, dirigiéndolo a éste hacia la Lipogénesis. (fig. 1). (4).

La vía del sorbitol parece tener implicaciones metabólicas diferentes dependiendo del órgano o tejido en que se analice, así en cerebro y en el sistema reproductor -- masculino la interconexión con la glucólisis parece tener un papel metabólico general, mientras que en la placenta, los componentes del esquema pudieran tener un papel especial (4).

En los órganos sexuales masculinos de muchos mamífe

FIGURA 1.- Representación esquemática de las tres vías para el metabolismo de la glucosa. La vía del sorbitol -- (izq.) se interconecta a la glucólisis mediante los pasos de Hexoquinasa y Fosfofructoquinasa --usualmente considerados como pasos reguladores del metabolismo de la gluco---sa-, y enlazada con la vía de las pentosas y la Lipogénesis --para mayores detalles ver el texto-. (4).

FIGURA 1.



•DHAP → DIHIDROXIL-ACETONA — FOSFATO.

ros está presente la vía del sorbitol, que provee de Sorbitol y fructosa al plasma seminal. El espermatozoide contiene Sorbitol deshidrogenasa (SORD) y utiliza sorbitol para producir fructosa, que la Hexoquinasa la convierte en fructosa 6-fosfato permitiendo el metabolismo por la vía glucolítica clásica (Fig. 1). Posiblemente con esto se evita una factible competencia del espermatozoide con bacterias, levaduras y otras células presentes en el tracto vaginal (y que prefieren glucosa) por la fuente energética.(4).

El cerebro contiene Aldosa reductasa (AR) y SORD, y es una fuente clásica de Aldehído reductasas, la presencia de estas enzimas pudiera ser un reflejo de la existencia de todas las rutas metabólicas secundarias para degradar a la glucosa para satisfacer la constante demanda de energía de las células nerviosas (4).

En la placenta, la glucosa es convertida en fructosa por la vía del sorbitol en muchas especies, incluyendo al hombre. Las altas concentraciones de fructosa en la sangre fetal de Ungulados (v gr., ovejas y cerdos) aparentemente resulta de la no utilización de la fructosa por sus fetos. Dado que la fructosa no es fuente energética fetal importante en esos casos, la derivación pudiera tener un papel osmorregulador o servir como una función de transhidrogenasa parecida a un papel especial que pudiera

ser comparable con el hecho de que, los fetos humanos y - de rata no tienen altas concentraciones de fructosa en la sangre, y que la placenta de estas especies contiene una transhidrogenasa soluble y sensible a estradiol. (4).

En los eritrocitos la posible función de la vía del sorbitol es la producción de NADH, el cual proporciona el poder reductor necesario para la conversión de la metahemoglobina a hemoglobina, siendo esta reacción catalizada - por la enzima Metahemoglobina reductasa (5).

En condiciones normales, la vía del sorbitol tiene poca actividad, pero en estados hiperglucémicos el flujo de glucosa que pasa por esta vía se incrementa considerablemente, por esta razón, la vía del sorbitol adquiere un interés especial en algunos tejidos por los efectos metabólicos adversos acompañantes de la diabetes mellitus.

Por ejemplo, en el cristalino los niveles altos y - sostenidos de glucosa pueden producir concentraciones bas tante elevadas de sorbitol, este polialcohol es impermeable a la membrana celular, lo cual da como resultado que se acumule intracelularmente, provocando una hipertonicidad en el citoplasma de las células, por lo tanto, se establece un imbalance osmótico que termina produciendo cataratas hiperglucémicas (4, 6).

En el nervio ciático, la reducción de glucosa a sorbital, particularmente en las células de Schwann, conduce a la acumulación de sorbitol, causando un daño celular -- que consiste en un proceso de desmielinización segmental. (4).

III.- ESTUDIOS DE SORD REALIZADOS EN DIFERENTES ESPECIES.

La Sorbitol deshidrogenasa (SORD) ha sido descubierta en dos formas diferentes: una soluble y otra mitocondrial, en dos especies diferentes: en Cavia porcellus (cobo) y en Drosophila melanogaster (mosca de la fruta) -- (7, 8). Esta compartimentalización sugiere que existen -- como mínimo dos genes estructuralmente distintos.

Op't Hof analizó electroforéticamente a la SORD soluble de muchos tejidos de Sus scrofa (cerdo) y demostró polimorfismo de la enzima en hígado. En los organismos heterocigotos encontró un patrón electroforético de 5 bandas y en los individuos homocigotos para el alelo normal o para el mutado, un fenotipo de una sola banda (9). También encontró un patrón de 5 bandas en algunas especies -- de vertebrados marinos (10).

En 8 poblaciones australianas de Bufo marinus (sapo marino) se encontraron dos alelos para la SORD hepática -- con diferentes frecuencias en cada una de las poblaciones estudiadas; los alelos fueron designados como SORD-a (alelo de menor migración catódica) y SORD-b (alelo de mayor migración). El heterocigoto SORD-ab da un patrón electroforético de 5 bandas (11).

En Mus musculus (ratón) se describieron tres fenoti

pos electroforéticos diferentes para la SORD de riñón, -- los cuales fueron designados: SORD A (tres bandas), el fenotipo SORD B (con una banda lenta), y el fenotipo SORD AB (con tres bandas). Sugieren que posiblemente en el fenotipo SORD A se formen Isoenzimas secundarias. Además, el gen SORD es heredado como autosómico codominante y está localizado en el cromosoma 2. (12).

En Zenaida auriculata auriculata (paloma dorada) y en Anas platyrhynchos (pato doméstico) se estudió electroforéticamente a la SORD hepática y de riñón en tres etapas del desarrollo. En A. platyrhynchos la enzima mostró una banda en hígado y riñón embrionario y joven, y en estado adulto dos bandas en ambos tejidos. En Z. auriculata auriculata se observó una banda en hígado y riñón embrionario; en los tejidos de joven y adulto se encontró un patrón de tres bandas (13).

La enzima nativa de SORD hepática de Ovis aries (borego), tiene un peso molecular de aproximadamente - - - 140,000, y el de una subunidad es de alrededor de 35,000, por lo tanto, posiblemente tenga una estructura cuaternaria tetramérica. Las pruebas de estabilidad, sensibilidad a inhibidores, y de protección por coenzimas, sugiere que la SORD tiene un residuo de cisteína altamente reactivo, y un ion metálico (Zn) en su sitio activo (14).

El locus que codifica para la SORD en Homo sapiens - (hombre) fue asignado al cromosoma 15 en la región comprendida de pter → q21. (15).

En eritrocitos humanos de 665 individuos, por electroforesis en almidón se observó solamente una banda de SORD, todas con movilidad catódica, excepto en un individuo en el cual la misma banda migró menos catódicamente y se designó como un alelo electroforético (16).

Por medio de estudios cromatográficos, electroforéticos, cinéticos e inmunoquímicos se demostró la existencia de dos formas de SORD en hígado humano. Ambas formas poseen una Km diferente para sorbitol y NAD^+ . La forma mayor (SORD-2) tiene una migración electroforética catódica y representa del 90 al 95% de la actividad total de SORD en el hígado, y posee un punto isoeléctrico de 9.5. La forma menor (SORD-1), es anódica y tiene un punto isoeléctrico de 6.2. Los anticuerpos contra la SORD-2 no tienen reacción cruzada con la SORD-1 (17).

En plasma seminal humano se identificaron tres fenotipos electroforéticos, utilizando acetato de celulosa como medio de soporte; el fenotipo A con una banda lenta; el fenotipo B con una banda rápida; y el fenotipo C con ambas bandas (18).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los resultados obtenidos durante el diseño y estandarización de un método electroforético para la detección de SORD eritrocitaria (19), se obtuvo un patrón de tres bandas en 50 de los 61 individuos estudiados, habiéndose observado variaciones interindividuales en el patrón de expresión, por lo que se plantea si estas variaciones en el patrón electroforético de SORD eritrocitaria (SORD-E) pudieran estar dadas por algún mecanismo genético, como por ejemplo, la presencia de alelos polimórficos, y por lo tanto, ser heredables o que dichas variaciones sean ocasionadas por modificaciones postraduccionales inespecíficas fuera del control genético.

El motivo de esta tesis es determinar si las variaciones observadas son debidas a polimorfismo enzimático o a modificaciones postraduccionales.

OBJETIVOS

O B J E T I V O S

- A.- Determinar si existe polimorfismo electroforético de SORD-E humana.
- B.- Caracterizar las variantes electroforéticas encontradas.

HIPOTESIS

H I P O T E S I S

Existen variantes en el fenotipo elec
troforético de SORD-E humana, algunas
de las cuales están genéticamente de-
terminadas.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

A. BUSQUEDA DE POLIMORFISMO ELECTROFORETICO.

Para la búsqueda de variantes electroforéticas de -- SORD-E, fueron analizadas 208 muestras de sangre de donadores habituales y familiares del Banco de Sangre del Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, 11 de las cuales fueron estudiadas en más de una ocasión.

1.- Preparación del hemolizado:

a) Procedimiento:

- I) Las muestras de sangre se lavaron con solución salina al 0.85% (1 vol. de sangre con 2 vol. - de salina) en 3 ocasiones. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos; después de cada lavada se eliminaron los leucocitos (capa de - - blancos).
- II) El paquete de eritrocitos obtenido se hemolizó en tres ocasiones por congelación en hielo seco-acetona y por descongelación en agua co----rriente.
- III) Se tomaron 100 μ l del hemolizado y se mezclaron

con un volumen igual de sacarosa al 50%, de esta mezcla se aplicaron 30 μ l en los geles de poliacrilamida (cada muestra se aplicó por duplicado).

2.- Preparación de los geles de poliacrilamida:

a) Fundamentos:

La poliacrilamida es preparada para electroforésis por la polimerización de las formas monoméricas de Acrilamida y la metilen-bis-acrilamida para producir un gel de matriz rígida e inerte. El método de la electroforésis en gel resulta útil por el llamado "tamaño del poro", es decir, que el gel actúa como un tamiz en forma directamente relacionada con la concentración de acrilamida, de manera tal que al aumentar la concentración de acrilamida en forma gradual desde un 5% hasta un 12%, el tamaño del poro disminuye y las proteínas se movilizan más lentamente (1).

Los geles son preparados en soluciones de acrilamida y bis-acrilamida, y por la adición de catalizadores que promueven la polimerización. El catalizador más simple es la riboflavina, la cual es efectiva a muy bajas concentraciones (v.gr., en una concentración final en el gel de 0.001% p/v), pero es-

te método requiere de la luz UV para llevarse a cabo la fotodescomposición de la riboflavina para iniciar la polimerización. Una alternativa conveniente es el uso de mezclas de tetrametil-etilendiamina (TEMED) en una concentración final en el gel de 0.05% v/v y de persulfato de amonio a una concentración similar (aprox. de 0.05% a 1% p/v), como catalizadores. La polimerización usualmente ocurre en algunos minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto directo de la solución del gel con el oxígeno atmosférico, el cual inhibe el proceso de polimerización (1).

b) Procedimiento:

- I) La acrilamida (al 7%; 2.13 g) y la bis-acrilamida (al 5%; 108 mg) se disolvieron en 30 ml de buffer Tris (Hidroximetil-aminometano) 75 mM ajustado con HCl a pH 8.6.
- II) De una solución de persulfato de amonio 0.15 mM se tomaron 360 μ l para ponerlos en la solución de acrilamida-bis-acrilamida. Además, se añadieron 120 μ l de TEMED.
- III) La solución de poliacrilamida se pasa a tubos de cristal de 8 mm de diámetro por 80 mm de largo (aprox., 1.5 ml. de solución en cada tu-

bo), la porción libre del tubo se llenó con agua para evitar el contacto con el oxígeno y para prevenir la desecación del gel.

3.- Electroforesis (19):

a) Fundamentos:

Las proteínas son compuestos anfotéricos (polielectrolitos), cuyas cargas dependen del valor del pH del medio circundante, y se pueden separar por la acción de un campo eléctrico. La movilidad de una proteína en un campo eléctrico depende de dos fuerzas, la de atracción y la de resistencia.

La fuerza de atracción está en función del número de cargas por molécula, del signo de la carga neta, el grado de disociación según el pH, la magnitud del campo eléctrico y del tiempo de exposición a dicho campo. La resistencia que se opone a la movilidad de la proteína se relaciona con el tamaño y la forma de la molécula, la solubilidad de la proteína y de las propiedades absorbentes del medio que sirve como vehículo (1).

b) Procedimiento:

I) La electroforesis se realizó catódicamente (con un buffer de sistema Tris HCl 0.15 M a pH 8.6)

durante 4 horas a 4°C con una corriente eléctrica constante de 150 volts, aproximadamente 100 mA por 18 geles.

4.- Revelado:

a) Fundamentos:

La tinción por transferencia de electrones es la técnica más usualmente utilizada para la detección de las Isoenzimas después de la electroforesis. Los colorantes de uso general son: Metil-tiazol-tetrazolio, usualmente conocido como MTT, el cual es un aceptor para reacciones de deshidrogenasas; y la 3-amina-9 etil carbazol, el cual es aceptor de oxidasas y peroxidasas. El MTT es reducido por los electrones producidos en la reacción de deshidrogenación (de un aldehído a una cetosa), para producir formazan insoluble de color azul-púrpura oscuro. La reacción es producida más rápidamente en presencia de Fenazina metesulfato (PMS), el cual actúa como catalizador intermediario (1).

b) Procedimiento:

I) Después de efectuada la electroforesis, los geles se revelaron con una mezcla compuesta de: sorbitol (1.2%; 360 mg); Piruvato de sodio (0.42%; 126.5 mg); NAD^+ (24 mg); MTT (0.015%; 4.5 mg); y PMS (0.01%; 3 mg); disueltos en 32.5

ml de buffer Tris HCl 0.1 M a pH 8.0. (19)

II) Los geles con la mezcla se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

B. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION.

En los estudios de caracterización se analizaron un total de 43 muestras de sangre, estos estudios se realizaron con el fin de encontrar diferencias en el comportamiento de las bandas electroforéticas con actividad de SORD-E, tales pruebas se basaron fundamentalmente en:

1.- Identidad electroforética de cada una de las bandas de SORD-E.

a) Objetivo:

Determinar si las bandas electroforéticas de SORD-E son proteínas distintas.

b) Procedimientos:

I) Se realizó un corrimiento electroforético con dos hemolizados distintos (cada muestra en 5 = geles) durante dos horas.

II) Después de realizada la electroforé³sis se revelaron dos geles de cada muestra, estos servían

como punto de referencia para conocer en donde se localizaban las bandas con actividad de SORD-E.

III) Los geles restantes se cortaron en la posición marcada por los geles revelados, de esta manera se obtenían las bandas por separado para -- ser después colocadas en nuevos geles de poliacrilamida.

IV) Los geles nuevos se sometieron a electroforesis durante dos horas y posteriormente revelados.

2.- Afinidad por otros sustratos y cosustratos:

a) Fundamentos:

La especificidad del sustrato es una característica importante de las enzimas, ya que éstas pueden seleccionar para su transformación a un número limitado de sustancias químicamente relacionadas. Ello se debe a la conformación compleja de la molécula, a las características tan especiales del sitio activo y a la configuración estructural del sustrato.

b) Objetivo:

Observar si las bandas de SORD-E muestran diferen--

cias en la afinidad por otros sustratos y cosustratos (se utilizaron como sustratos: Sorbitol, Xilitol y Dulcitol; y como cosustratos: NAD^+ y NADP^+).

c) Procedimiento:

I) Se realizó un corrimiento electroforético con tres hemolizados (cada muestra en 12 geles).

II) Los sustratos Xilitol y Dulcitol, y el NADP^+ - se añadieron en vez de el Sorbitol y el NAD^+ - en la mezcla de revelado.

III) Los geles de cada muestra se revelaron de la siguiente forma: dos utilizando Sorbitol y NAD^+ ; dos usando Xilitol (o Dulcitol) y NAD^+ ; y los dos restantes con Xilitol (o Dulcitol) y NADP^+ .

3.- Oxidación y reducción de grupos Thiol:

a) Fundamentos:

Algunas enzimas muestran cambios en sus patrones de Isoenzimas cuando las células u homogenados de tejidos son almacenados in vitro. En ciertos casos estos cambios por almacenamiento pueden ser atribuidos a interacciones de los grupos sulfidrilos - - -

(thiol) de los residuos de cisteína con el glutathion oxidado (GSSG), el cual se acumula en los extractos almacenados. El GSSG puede alterar el patrón electroforético en dos formas: alterando la movilidad de todas las Isoenzimas hacia el ánodo; o formando bandas adicionales. La ocurrencia de tales cambios puede ocasionar confusiones en los estudios genéticos cuando se desconoce su ocurrencia. El análisis de tales efectos pudiera ser útil en la caracterización de las Isoenzimas. La velocidad en la que ocurren los cambios varía de una enzima a otra y también de una muestra a otra. (1, 2).

b) Objetivo:

Probar si la incubación con distintos compuestos que reaccionan con grupos thiol (B-mercaptoetanol (B-ME); Dithiotreitol (DTT); Dithioeritriol (DTE); Cistamina; Acido Maleico y GSSG), modifican el patrón electroforético de SORD-E.

b) Procedimiento:

I) Se realizó un experimento piloto con una sola muestra, donde se probaron B-ME, DTT, Cistamina, Acido maleico y GSSG; cada uno por separado, se incubaron por 30 minutos a

37°C, a una concentración de 5 mM.

- II) Un hemolizado (se analizaron 3 muestras para cada reactivo thiol) se dividió en 7 fracciones iguales de 200 μ l cada uno, una de ellas se almacenó en congelación a -40°C.
- III) Tres fracciones se incubaron a 37°C durante dos horas (una sin reactivo thiol; otra con reactivo thiol a una concentración de 10 mM; y la otra también con reactivo thiol a 50 mM).
- IV) Las tres fracciones restantes se incubaron durante 4 horas a 37°C (una sin reactivo; otra con el reactivo a 10 mM; y la última con reactivo a 50 mM).
- V) Después de efectuadas las incubaciones, los hemolizados se almacenaron en congelación a -40°C y la electroforesis se efectuó al siguiente día.

4.- Contenido de diferentes carbohidratos:

a) Fundamentos:

Algunas Isoenzimas secundarias resultan de un ataque diferencial de carbohidratos a una proteína. -

Las formas enzimáticas múltiples de este grupo pueden ser divididas en: Isoenzimas que se pueden aislar por medio de métodos electroforéticos; e Isoenzimas que pueden ser solamente reconocidas como tales por el uso de métodos en cromatografía de afinidad. Dentro del primer grupo están los carbohidratos ácidos o básicos, especialmente el ácido siálico; mientras que en el segundo grupo se encuentran los residuos de azúcares neutros (v gr., glucosa y manosa) (2).

b) Objetivos:

- I) Probar si un tratamiento con neuraminidasa (enzima que libera residuos de ácido siálico unidas a proteínas) modifica el patrón electroforético de SORD-E.

- II) Determinar si la glucosa es responsable de la formación de Isoenzimas secundarias en SORD-E.

c) Procedimiento:

I) Tratamiento con neuraminidasa.

- 1) Un hemolizado (se probaron 2 muestras) se dividió en 9 fracciones de 200 μ l cada una. Una de ellas se mantuvo a -40°C .

- 2) Cuatro fracciones se incubaron a 37°C durante 8 horas, una de ellas sin neuraminidasa y las otras con 3 concentraciones de neuraminidasa (1.5, 0.6 y 0.03 U/ml.).
- 3) Las 4 porciones restantes se incubaron durante 18 horas a 37°C, una sin neuraminidasa y las otras 3 con neuraminidasa (una con cada concentración).
- 4) Después de realizada la incubación de 8 horas, las muestras se guardaron en congelación a -40°C.
- 5) Después de terminada la incubación de 18 horas, las muestras se refrigeraron 30 minutos y posteriormente se aplicaron en los geles de poliacrilamida junto con las demás muestras para ser corridos electroforéticamente.

II) Incubación con glucosa:

- 1) Un hemolizado (se probaron 2 muestras) se dividió en 7 porciones de 400 μ l cada una. Una se almacenó en congelación a -40°C.
- 2) Tres fracciones se incubaron a 37°C durante

8 horas (una sin glucosa; otra con glucosa a una concentración de 80 mg/100 ml; y la otra también con glucosa a una dosis de 200 mg/100 ml).

- 3) Las otras tres se incubaron por 18 horas a -- 37°C, una sin glucosa y las otras dos con glucosa (una con 80 mg/100 ml y la otra con 200 mg/100 ml).
- 4) Después de realizadas las incubaciones se tomaron alicuotas (100 μ l) de cada fracción y se congelaron a -40°C; el resto de las fracciones se dializó durante 8 horas contra un volumen 100 veces mayor de buffer Tris HCl 10 mM, B-ME 3mM a pH 7.7.
- 5) Al término de la diálisis, las muestras se -- guardaron en congelación, para ser sometidas a electroforesis al día siguiente.

5.- Enlace de cosustratos:

a) Fundamentos:

En algunos casos de ciertas deshidrogenasas que requieren NAD^+ o NADP^+ , pueden ser observados diferentes componentes electroforéticos de acuerdo al gra-

do de saturación de la enzima con la coenzima? Cuando solamente está parcialmente saturada, ciertas bandas pueden representar la misma Isoenzima con 0, 1, 2, etc., moléculas de coenzimas unidas. Se puede obtener un patrón electroforético consistente cuando las Isoenzimas son saturadas con la coenzima por inclusión o como constituyente del buffer electroforético. La saturación con coenzima puede incrementar la estabilidad de la enzima durante la electroforesis (1, 2).

b) Objetivo:

Probar si el NAD^+ modifica el patrón electroforético de la SORD-E.

c) Procedimiento:

I) Incubación de la muestra con NAD^+ .

- 1) Un hemolizado se dividió en 7 fracciones de 200 μl cada una. Una se mantuvo en congelación a -40°C .

- 2) Las otras 6 se incubaron a 37°C por 30 minutos (una sin NAD^+ ; y las restantes con distintas concentraciones de NAD^+ (0.002; 0.004 0.02; 0.04 y 0.2 mg/ml)).

3) Después de la incubación se efectúa la electroforé^{ti}sis.

II) Características del buffer de corrimiento:

1) Se realizaron dos corrimientos electroforé^{ti}cos con las mismas muestras (cuatro); uno -- sin NAD^+ y el otro con NAD^+ en el buffer de corrimiento (40 mg/l.).

6.- Isomerismo conformacional:

a) Fundamentos:

El isomerismo conformacional ha sido sugerido como una posible causa para la formación de Isoenzimas - secundarias. En este caso en particular, las formas moleculares múltiples de una enzima pudieran tener la misma estructura primaria, pero ser diferentes en su estructura terciaria o cuaternaria, porque su cadena polipeptídica puede existir en más de una configuración estable. Así, diversas formas moleculares múltiples son representadas por conformómeros, y se puede esperar que una sola forma de los miembros de esas Isoenzimas genere el juego completo (1,2).

b) Objetivo:

Observar si la temperatura de la congelación o de

la descongelación origina alguna modificación en el patrón electroforético de SORD-E.

c) Procedimiento:

- I) Un paquete de eritrocitos se dividió en 4 fracciones de 200 μ l cada una.
- II) Dos fracciones se congelaron a -70°C y se descongelaron en agua; una a 18°C y la otra a 37°C .
- III) Las otras dos se congelaron a -30°C y se descongelaron en agua (una a 18°C y la otra a 37°C).

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

A. BUSQUEDA DE POLIMORFISMO ELECTROFORETICO.

El estudio electroforético de SORD-E en 208 individuos analizados, permitió la identificación de 4 fenotipos (fig 2): El fenotipo I con 3 bandas: la banda a con una movilidad electroforética (catódica) promedio de 2.68 mm, la banda b de 13.7 mm, y la banda c de 21.46 mm; el fenotipo II con las bandas a y c ; el fenotipo III con las bandas b y c; y el fenotipo IV con la banda c. Estos 4 fenotipos se observaron con frecuencias de 78.36%, 12.02%, 6.73% y 2.88% respectivamente (fig. 3).

Durante el estudio de los 208 individuos, 11 de ellos fueron incluidos en el estudio más de una vez (Tabla I), lo que permitió confirmar que en un solo individuo se puede observar más de uno de los fenotipos descritos.

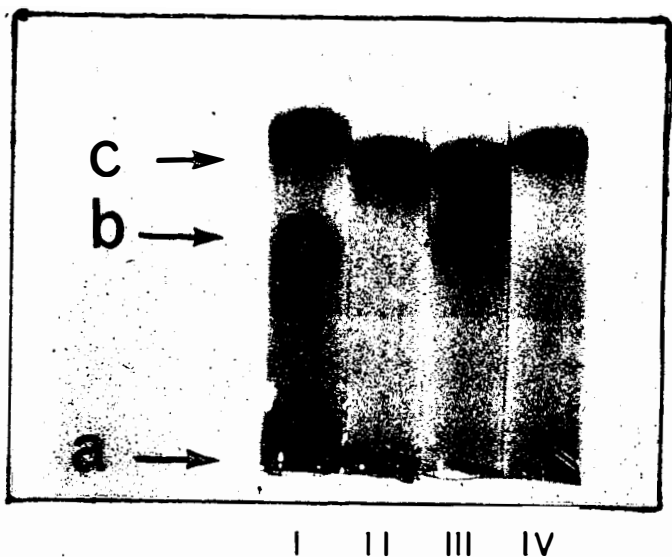


FIG. 2.- Fotografía de los fenotipos electroforéticos de SORD-E observados en 208 individuos. El fenotipo I con 3 bandas (a, b y c); el fenotipo II con 2 bandas (a y c); el fenotipo III con 2 bandas - (b y c); y el fenotipo IV con una sola banda (c).

FENOTIPO.

BANDAS.

FRECUENCIA OBSERVADA.

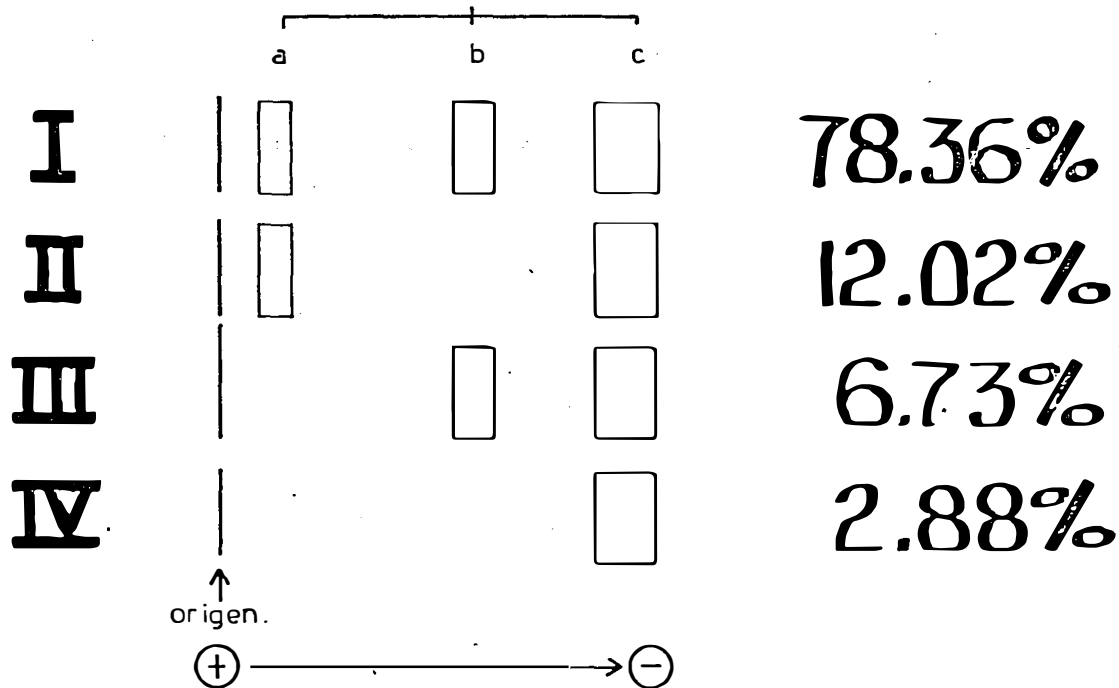


FIG: 3.- Fenotipos electroforéticos de SORD-E observados en 208 individuos. El fenotipo I con las bandas a, b y c; el fenotipo II con las bandas a y c; el fenotipo III con las bandas b y c; y el fenotipo IV con las bandas c. El promedio de migración ($\bar{x} \pm DE$) es de 2.68 ± 1.59 mm para la banda a; 13.7 ± 3.11 mm para b y 21.5 ± 3.3 mm para la c

TABLA I

Individuos analizados más de una vez en el estudio electroforético de SORD-E

INDIVIDUO	No. DE VECES ESTUDIADO	FENOTIPOS OBSERVADOS
1	2	I y II
2	2	I y II
3	2	I y II
4	2	I
5	2	I
6	2	I y II
7	2	I y III
8	3	I, II y II
9	3	I, II y IV
10	5	I, I, II, III y IV
11	5	I, I, II, III y III

B. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION.

Los estudios de caracterización realizados con el fin de obtener una mayor información sobre la identidad y el comportamiento de cada una de las bandas de SORD-E, mostraron los siguientes resultados:

1.- Identidad electroforética de cada una de las bandas de SORD-E.

Los resultados de la reelectroforesis de 10 bandas a 9 bandas b y 9 bandas c (Tabla II) mostraron que las bandas a y b pueden transformarse en cualquiera de las tres - bandas y pueden originar los fenotipos electroforéticos -- descritos (fig. 4).

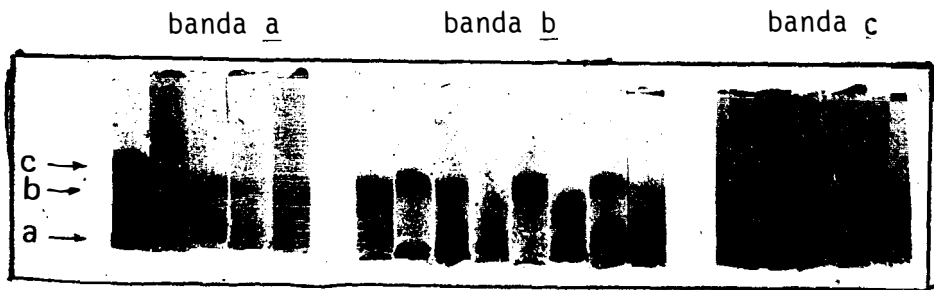


FIG. 4.- Resultados de la reelectroforesis de las bandas a, b y c.

TABLA II

Resultados de la reelectroforésis de cada una de las bandas de SORD-E

BANDAS	F E N O T I P O S	FRECUENCIA
<u>a</u>	I	20 %
	II	30 %
	IV	10 %
	negativos	40 %
<u>b</u>	I	11.11%
	II	44.44%
	III	22.22%
	IV	22.22%
<u>c</u>	II	11.11%
	IV	88.88%

2.- Afinidad por otros sustratos y cosustratos:

Las bandas a, b y c de SORD-E mostraron una afinidad semejante por sorbitol y xilitol, con NAD^+ como cosustratos; mientras que al utilizar dulcitol con NAD^+ o NADP^+ no se observó ninguna de las bandas (Tabla III).

TABLA III

Resultados obtenidos en las pruebas con otros sustratos y cosustratos para SORD-E

S U S T R A T O	C O S U S T R A T O	R E S U L T A D O		
		<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
Sorbitol	NAD^+	++	++	+++
"	NADP^+	-	-	-
Xilitol	NAD^+	++	++	+++
"	NADP^+	-	-	-
Dulcitol	NAD^+	-	-	-
"	NADP^+	-	-	-

3.- Oxidación y reducción de grupos thiol.

La prueba piloto realizada con B-ME, DTT, Cistamina, Acido Maleico y GSSG, no mostró modificaciones en el patrón electroforético de SORD-E, pero si se observó un efecto de inhibición (fig. 5). Por lo que las pruebas realizadas posteriormente con esos reactivos y añadiendo además el DTE, fueron con el objeto de determinar si alguno de estos reactivos tenían un efecto preferencial por alguna de las bandas. Los resultados están resumidos en la tabla IV. En donde se puede apreciar que el GSSG tiene inhibición -- preferencial por las bandas b y c, los demás reactivos mostraron un efecto inhibitorio sobre todas las bandas.

4, 5 y 6.- Los resultados de estos experimentos están resumidos en la tabla V.

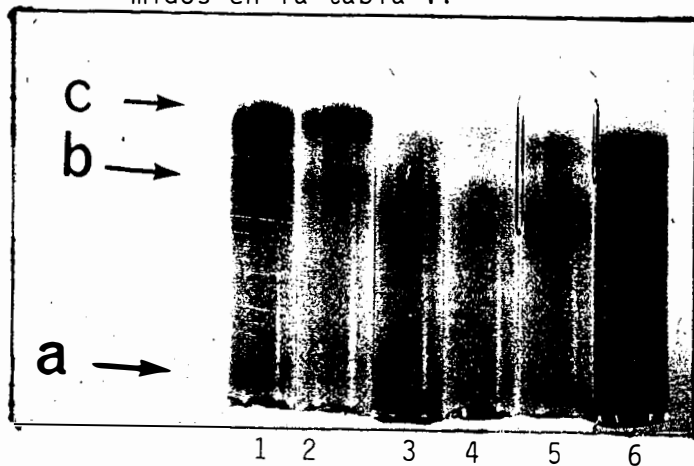


FIG. 5.- Resultados observados en la prueba piloto (incubación a 30 min.) realizada con varios reactivos thiol (a 5 mM). 1 hemolizado control; 2 con B-ME; 3 con GSSG; 4 con Cistamina; 5 con Acido Maleico; y 6 con DTT.

TABLA IV

Resultados de las pruebas con reactivos thiol, en SORD-E.

INHIBIDOR	CONCENTRACION UTILIZADA	EFECTO EN LAS BANDAS <u>a</u> , <u>b</u> , y <u>c</u> .					
		A 2 horas			A 4 horas		
		<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
B-ME	control	++	++	+++	++	+	++
	10 mM	++	+	++	++	+	++
	50 mM	+	-	+	-	-	-
DTT	control	++	++	+++	+	+	++
	10 mM	++	++	+++	+	+	++
	50 mM	+	+	++	+	+	+
DTE	control	++	++	+++	+	+	++
	10 mM	++	++	+++	+	+	++
	50 mM	+	+	+	-	-	-
CISTAMINA	control	++	++	+++	++	++	++
	10 mM	+	+	++	-	-	-
	50 mM	+	+	+	-	-	-
ACIDO MALEICO	control	++	++	+++	++	++	+++
	10 mM	+	+	++	+	+	++
	50 mM	+	+	+	+	+	+
GSSG	control	++	++	+++	+	+	+
	10 mM	++	+	++	+	-	-
	50 mM	+	-	-	-	-	-

TABLA V

Resultados de las pruebas para la formación de Isoenzimas secundarias en SORD-E.

EXPERIMENTO	PRUEBA	EFFECTO EN EL PATRON DE SORD
4. Contenido de diferentes carbohidratos.	NEURAMINIDASA-GLUCOSA	No se observaron cambios en el patrón electroforético de SORD-E.
5. Enlace de cosustratos.	NAD^+	En la banda <u>c</u> se incrementó la intensidad, mientras que en las bandas <u>a</u> y <u>b</u> disminuyó. Este efecto fue más evidente cuando el buffer de corrimiento contenía NAD^+ , que cuando la coenzima estaba sólo en la muestra.
6. Isomerismo conformativo.	CONGELACION-DESCONGELACION	No se apreciaron modificaciones en el patrón electroforético de SORD-E.

D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

A. BUSQUEDA DE POLIMORFISMO ELECTROFORETICO.

Los estudios encaminados a la búsqueda de variantes electroforéticas en frecuencias polimórficas, permitieron la identificación de 4 fenotipos (fig. 2), cuyo origen genético no está claramente definido. Basándonos en la frecuencia del fenotipo I (fig. 3) y en que los 11 individuos que fueron estudiados en más de una ocasión (Tabla I)... se observó siempre el fenotipo I, podemos considerar a éste como el fenotipo más común de SORD-E humana. Los fenotipos II, III y IV pueden ser explicados por problemas metodológicos atribuibles a la muestra ó a la preparación de los geles, sin embargo, en base a los resultados de los experimentos de la identidad electroforética de cada una de las bandas de SORD-E una posible explicación es que en el fenotipo II, la banda b se encuentra completamente transformada en las bandas a y c; en el fenotipo - III, la banda a se encuentra convertida en las bandas b y c; mientras que en el fenotipo IV, las bandas a y b se encuentran transformadas en la banda c; lo que pudiera interpretarse como que el fenómeno que da lugar a las transformaciones que originan los fenotipos II, III y IV ocurren con una frecuencia que va en orden decreciente en los fenotipos II, III y IV. Adicionalmente, en los 4 fenotipos se observó una amplia variabilidad en la intensi-

dad de las bandas (Tabla VI), lo que apoya la capacidad de transformación de las bandas a y b. Este análisis sugiere que no podemos considerar las frecuencias de 78.36 %, -- 12.02%, 6.73% y 2.88 % para los fenotipos I, II, III y IV respectivamente, como representativos de la existencia de alelos electroforéticamente distintos con frecuencias polimórficas, y que es más probable que SORD-E humana, sea el producto de un gen con la capacidad de formar 3 Isoenzimas representadas por las bandas a, b y c. Estudios previos - en eritrocitos humanos realizados con métodos distintos no han mostrado la existencia de polimorfismo electroforético de esta enzima (16, 20). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que SORD-E posea alelos polimórficos y que estos no puedan ser detectados por métodos electroforéticos, ya que se ha calculado que cerca del 75% de todas las sustituciones sencillas de un aminoácido por otro en una proteína dada, son electroforéticamente indetectables (3).

TABLA VI

Sub-fenotipos de SORD-E considerando la intensidad de cada una de las bandas

FENOTIPO	S U B - F E N O T I P O	FRECUENCIA (%)
I	$\underline{a} = \underline{b} < \underline{c}$	36.06
	$\underline{a} = \underline{b} = \underline{c}$	11.53
	$\underline{c} > \underline{a} > \underline{b}$	9.13
	$\underline{a} = \underline{c} > \underline{b}$	7.21
	$\underline{a} < \underline{b} < \underline{c}$	6.73
	$\underline{a} < \underline{b} = \underline{c}$	5.28
	$\underline{a} > \underline{b} = \underline{c}$	1.92
	$\underline{a} = \underline{b} > \underline{c}$	0.48
II	$\underline{a} = \underline{c}$	11.06
	$\underline{a} < \underline{c}$	0.96
III	$\underline{b} < \underline{c}$	3.85
	$\underline{b} = \underline{c}$	2.88
IV	\underline{c}	2.88

B. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION

La reelectroforesis de las bandas de SORD-E mostró - que las bandas a y b pueden interconvertirse en las formas a, b ó c; mientras que la banda c no es fácilmente transformada en las bandas a ó b. Esta interconversión podría estar dada por la presencia de un factor (o factores) fácilmente dissociable que modifica la migración de SORD-E y sea el (ó los) causantes de la formación de isoenzimas secundarias de esta enzima. Posiblemente, la banda a sea la isoenzima primaria, la banda c una forma secundaria irreversible, y la banda b una isoenzima transitoria. La formación de isoenzimas secundarias de SORD en riñón de ratón (12) y en plasma seminal humano (18) ha sido descrita, no obstante, las causas o mecanismos responsables no han sido dilucidadas.

Las tres bandas muestran una afinidad semejante por sorbitol y xilitol con NAD^+ como cosustrato, y no tienen - afinidad observable por dulcitol, además, no tienen afinidad por NADP^+ como cosustrato. Barretto et al. (21, 22) - reportan que SORD-E de varias especies, incluyendo al hombre, muestra una amplia aceptación por otros sustratos, especialmente los L-iditol, y que la actividad de SORD-E humana con xilitol y dulcitol es de 95% y 5% respectivamente, tomando como 100% la actividad presentada por sorbitol.

B-ME, DTT, Cistamina, Acido Maleico y GSSG fueron utilizados a una concentración de 5 mM en un experimento piloto con el fin de buscar modificaciones en la movilidad electroforética de las 3 isoenzimas de SORD-E: B-ME y DTT - actúan como reductores de puentes disulfuro de la molécula; Cistamina y GSSG como formadores de puentes disulfuro con grupos sulfhidrilo (SH^-) libres, durante este proceso, el primero adiciona una carga positiva y el segundo una carga negativa; el Acido Maleico modifica la molécula por alquilación de un SH^- , adicionando 2 cargas negativas. En este experimento no se apreciaron modificaciones en la movilidad electroforética de las bandas, pero sí un efecto inhibitorio leve (Fig. 5). Estos compuestos, más DTE en los experimentos de 2 y 4 hrs de incubación a 10 y 50 mM - (Tabla IV) mostraron, para B-ME, DTT y DTE a 10 mM en los dos tiempos de incubación un efecto protector debido probablemente a que estos compuestos evitan la oxidación de los grupos SH^- ; y a 50 mM una inhibición parcial de las 3 isoenzimas con dos horas de incubación, la cual se acentúa a las 4 horas, este efecto es probablemente ocasionado por un bloqueo del sitio activo de la enzima; estos resultados son similares a los de Jeffery et al. (14), realizados en SORD hepática semipurificada de borrego. Con la Cistamina se observó una inhibición parcial de las 3 bandas de 10 mM y casi total a 50 mM, con 2 horas de incubación, a 4 horas el efecto fue total con las 2 dosis. El efecto del Acido

Maleico sobre la enzima fue moderado. El GSSG mostró inhibición preferencial de las bandas b y c a 10 mM con dos horas de incubación, y a 50 mM una inhibición total de las isoenzimas b y c. Estos resultados confirman que existe al menos un grupo SH^- altamente reactivo en el sitio activo de la enzima que no participa en la carga neta de la molécula y además sugieren que no existen otros grupos SH^- relacionados con la carga eléctrica de SORD-E.

La variabilidad que representan los 4 fenotipos y los 12 subfenotipos observados no está dada por un contenido diferencial de ácido siálico o de glucosa, ni por la presencia de isomerismo conformacional ocasionado por la reconstitución de la enzima a diferentes temperaturas, si bien, en los experimentos con NAD^+ se observaron modificaciones en el patrón electroforético de SORD-E, los fenotipos y subfenotipos no pueden ser explicados por diferentes grados de saturación de la enzima con la coenzima, debido a que las concentraciones experimentales de NAD^+ son mayores que las concentraciones fisiológicas de esta coenzima en el eritrocito. Por lo tanto, las pruebas realizadas en este trabajo no muestran resultados concluyentes sobre los factores que modifican la expresión de las 3 isoenzimas de SORD-E.

En resumen, los estudios de SORD-E humana realizados

en el presente trabajo muestran que de los 4 fenotipos observados (fig. 2), el fenotipo I es el más común, por lo tanto, puede ser considerado como el fenotipo normal; mientras que los estudios de caracterización sugieren que las 3 formas isoenzímicas son el producto de un solo gen. Además, estos resultados generan las siguientes interrogantes: ¿Cuál es el mecanismo que origina la variabilidad electroforética de SORD-E? ¿Este mecanismo es intrínseco de la muestra?, las respuestas a estas interrogantes son desconocidas, las estrategias estarían encaminadas a la investigación de otros mecanismos que originen la formación de isoenzimas secundarias.

C O N C L U S I O N E S

C O N C L U S I O N E S

- I.- El fenotipo electroforético más común de SORD-E humana es de tres bandas, en geles de poliacrilamida.
- II.- No existe polimorfismo electroforético de SORD-E humana en la población estudiada.
- III.- La variabilidad electroforética de SORD-E no está controlada genéticamente.
- IV.- La variabilidad electroforética de SORD-E humana no es debida a :
- 1) Oxidación o reducción de grupos SH^- .
 - 2) Contenido de ácido siálico o glucosa.
 - 3) Diferentes grados de saturación con NAD^+
 - 4) Isomerismo conformacional por la reconstitución a distintas temperaturas.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Harris, H. and Hopkinson, D.A.: Hand-book of Enzymes - Electrophoresis in Human Genetics. North Holland, - Amsterdam, 1976.
- 2.- Rothe, G.M.: A survey on the formation and localization of secondary isozymes in mammalia. Hum Genet 56 : 129-55, 1980.
- 3.- Markert, C.L.: Isozymes: The development of a concept and its application. En Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Ratazzi, M.C., - Scandalios, J.G., Whitt, G.S. (Eds). Vol. I Alan R. Liss New York, 1977.
- 4.- Jeffery, J. and Jörnvall, H.: Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. Proc Natl --- Acad Sci USA 80 : 901-5, 1983.
- 5.- Travis, S.F., Morrison, A.D., Clements, R.S., Wine----grad, A.I. and Oski, F.A.: The role of the polyol pa thway in methaemoglobin reduction in human red cells. Brit J Haematol 27 : 597-605, 1974.

- 6.- Jedziniak, J.A., Chylack, L.T., Cheng, H.M., Gillis, - M.K., Kalustian, A.A. and Tung, W.H.: The sorbitol - pathway in the human lens: Aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 20: 314-26, 1981.
- 7.- Arsenis, C. and Touster, O.: Nicotiamide adenine dinucleotide phosphate-linked Xylitol dehydrogenase in guinea pig liver cytosol. *J Biol Chem* 244: 3895-9, 1969.
- 8.- Bischoff, W.L.: Genetic control of soluble NAD dependent Sorbitol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. *Biochem Genet* 14: 1019-34, 1976.
- 9.- Op'T Hof, J.: Isoenzymes and population genetics of -- Sorbitol dehydrogenase (EC. 1.1.1.14) in swine (Sus scrofa). *Humangenetik* 7: 258-9, 1969.
10. Op'T Hof, J., Wolf, U. and Krone, W.: Studies on isozymes of Sorbitol dehydrogenase in some vertebrate species. *Humangenetik* 8: 178-82, 1969.
11. Sabath, M.D.: Geographical patterns of genetic variability in introduced Australian populations of the marine toad, Bufo marinus: Sorbitol dehydrogenase, Sdh.

Biochem Genet 19: 347-53, 1981.

12. Andrews, S.J. and Peters, J.: Linkage analysis and biochemical genetics of Sorbitol dehydrogenase-1 (Sdh-1) in the mouse. Biochem Genet 21: 809-17, 1983.
13. Fabro, S.P. de, Goldemberg, A.L. and Speroni, N.B. de,: Sorbitol dehydrogenase in Anas platyrhynchos and Zenaidura macroura auriculata auriculata during development. Experientia 31: 1405-7, 1975.
14. Jeffery, J., Cummins, L., Carlquist, M. and Jörnvall, H.: Properties of Sorbitol dehydrogenase and characterization of a reactive cysteine residue reveal -- unexpected similarities to Alcohol dehydrogenase. -- Eur J Biochem 120: 229-34, 1981.
15. Donald, L.J., Wang, H.S. and Hamerton, L.J.: Assignment of the Sorbitol dehydrogenase locus to human chromosome 15pter --- q21. Biochem Genet 18: 425-31, 1980.
16. Charlesworth, D.: Starch gel electrophoresis of four -- isozymes from human red blood cell: Glycerinaldehyde - 3-phosphate dehydrogenase, Fructoaldolase, Glyoxalase II and Sorbitol dehydrogenase. Ann Genet 35:477-84, 1972.

17. Nealon, D.A., and Rej, R.: Human liver Sorbitol dehydrogenase: evidence for two forms. *Selectec Topics in Clinical Enzymology* 2: 533-44, 1984.
18. Ibarra, B., González-Quiroga, G., Vaca, G., Díaz, M., Rivas, F. and Cantú, J.M.: Sorbitol dehydrogenase -- (EC. 1.1.1.14) polymorphism in human seminal plasma. *Ann Genet* 25: 53-5, 1982.
19. Alvarez, C.: Diseño y estandarización de un método electroforético en geles de poliacrilamida para la enzima Sorbitol deshidrogenasa (SORD). Tesis para obtener el grado de Lic. en Biología. Facultad de Ciencias (Universidad de Guadalajara), reg. No. - - 078304723, 1986.
20. Jin, K.Y., Kim, J.S. and Yang, S.Y.: Molecular genetic studies of Korean populations: I.- Genetic structure and gene frequencies of oxidoreductases. *Korean J - Genet* 7: 143-51, 1985 (resumen).
21. Barretto, O.C.O. and Beutler, E.: The sorbitol-oxidizing enzyme of red blood cells. *J Lab Clin Med* - - 85: 645-9, 1975.

22. Barretto, O.C.O. and Nonoyama, K.: Biochemical characteristics of erythrocyte Sorbitol dehydrogenase from selected mammals. *Comp Biochem Physiol* 77B: 387-9, 1984.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 504/86

Sr. Francisco Javier Perea Díaz
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Estudio del fenotipo electroforético de la enzima sorbitol deshidrogenasa (EC. 1.1.1.14) en eritrocitos humanos para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Biol. Guillermo Zúñiga González.

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Mayo 27 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El Biol. Guillermo Zúñiga González, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd