

1 9 8 9 - 2

Reg. No. 81454574

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTANDARIZACION DE UN METODO CUANTITATIVO PARA LA
ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y DETERMINACION
DE LOS VALORES NORMALES EN LEUCOCITOS HUMANOS.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MARIO GUTIERREZ PRADO
GUADALAJARA, JALISCO 1990

*" ESTANDARIZACION DE UN METODO CUANTITATIVO
PARA LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA
Y DETERMINACION DE LOS VALORES NORMALES -
EN LEUCOCITOS HUMANOS "*

PRESENTADA POR:

MARIO GUTIERREZ PRADO

DIRIGIDA POR:

M.C. GUILLERMO PEREZ GARCIA

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIO-
QUIMICA IV DE LA DIVISION DE GENETICA DE LA UNI
DAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE ---
IMSS, BAJO LA ASESORIA DE LA Q.F.B. MA. ENRIQUE
TA FRANCO GAMBOA.

Guadalajara, Jal. 1990.

DEDICATORIAS

A MI MADRE

MARIA PRADO DE GUTIERREZ

Por su grán amor, apoyo y proteccíón.

A LA BIOLOGA

NORMA ANGELICA FLORES MERCADO

Por compartír connigo no sólo los buenos sino también los malos momentos durante mi formacíón profesional.

A MIS HERMANOS

HECTOR, JOSE LUIS, LETY, FERNANDO, RICARDO, ERIKA Y TONY

Por creer siempre en mí y alentarme a lograr mis metas.

A LA FAMILIA

OLVERA PRADO

Por su estimacíón y generosa hospitalidad.

A G R A D E C I M I E N T O S

Mi más sincero agradecimiento a:

Q.F.B. Ma. Enriqueta Franco Gamboa.

M.C. Guillermo Pérez García.

Dr. José Maria Cantú

Dr. José Sanchez Corona.

Q.F.B. Bertha Ibarra

M.C. Gerardo Vaca

Q.F.B. Claudina Medina

Biol. Beatríz Angeles Granados.

Biol. Caridad Leal Cortéz.

Q.F.B. Ma. del Carmen Carrillo Pérez.

Biol. Javier Perea

Dr. Augusto Rojas

Fam. Mercado Mercado.

Lic. Mat. Eduardo Berrospe Yamas.

Q.F.B. Rosa Maria Dominguez.

por su amistad y apoyo que tan enormemente contribuyeron no sólo en mi formación academica sino también en mi calidad humana.

C O N T E N I D O

	PAGINA
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	6
ACTIVIDAD DE LAS ISOENZIMAS DE SOD EN NEOPLASIAS .	8
JUSTIFICACION	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
REACCIONES EN QUE SE BASAN ALGUNOS METODOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE SOD	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y EQUIPO	14
REACTIVOS	15
METODOS	16
A.- OBTENCION DE EXTRACTOS DE TEJIDO	16
B.- DETERMINACION ENZIMATICA	18
RESULTADOS	22
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	50

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad se acepta la teoría de -- que los primeros organismos existentes en la tierra fueron heterótrofos, unicelulares, anaeróbicos, que utilizaron los compuestos orgánicos del océano primitivo como -- fuente de energía y de unidades estructurales. Poco a poco el mar se fué empobreciendo de compuestos orgánicos de bido al crecimiento y proliferación de estas células. Só lo las células que fueron capaces de utilizar compuestos sencillos, principalmente dióxido de carbono y luz solar (como fuente de carbono y de energía, respectivamente) -- sobrevivieron; surgiendo así las primeras células fotosin téticas (hace unos 3,000 millones de años). Probablemente, estas células al principio no liberaban oxígeno y quizás utilizaron el sulfuro de hidrógeno en lugar de agua, luego, hicieron su aparición las células antecesoras de las cianoficias modernas, liberando oxígeno a la atmósfera -- donde se empezó a acumular muy lentamente. Más tarde surgieron los primeros organismos heterótrofos que empezaron a emplear activamente el oxígeno atmosférico (hace aproximadamente unos 1,500 millones de años) (1, 2).

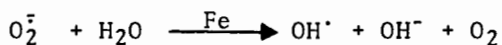
Esta condición evolutiva implicaba además, una adaptación a otras condiciones de riesgo, ya que estos organismos tendrían que desarrollar un mecanismo para

eliminar los productos derivados de la reducción parcial - del oxígeno, principalmente radicales, los cuales son fuertemente oxidantes para muchas moléculas (3).

Cualquier molécula o átomo que tenga uno o más electrones desapareados, es un radical. El hidrógeno, el oxígeno, el cloro o moléculas como sulfatos, nitratos, carbonatos o iones complejos de metales de transición, pueden ser radicales; se caracterizan por tener una vida media muy corta y son muy activos químicamente (4).

Para la célula es muy importante que la molécula de oxígeno (O_2) sea reducida completamente a dos moléculas de agua (H_2O) aceptando cuatro electrones. Si esta molécula es reducida parcialmente aceptando sólo dos electrones, se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Si la molécula de oxígeno acepta sólo un electrón, el producto es el radical superóxido (O_2^-) (5).

El peróxido de hidrógeno y el superóxido -- son extremadamente tóxicos debido a que atacan ácidos grasos insaturados que forman parte de los lípidos de la membrana, dañando así la estructura de ésta (6), sin embargo, su reactividad no es tan grande en soluciones acuosas pero su acción combinada puede llevar a la formación de un producto altamente reactivo --el radical hidroxilo-- (OH^\cdot) a través de la siguiente reacción :



(Reacción de Haber Weiss)

Esta reacción es muy lenta pero procede rápidamente en presencia de metales.

Los radicales hidroxílo tienen una reactividad tan grande que reaccionan casi con cualquier molécula vecina (azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases y ácidos del ADN, etc.) produciendo radicales secundarios de reactividad variable (7).

El superóxido se produce en una gran variedad de reacciones como son: la autoxidación de la hemoglobina, mioglobina, citocromo c reducido, ferredoxinas reducidas, leucoflavinas, tetrahydropterinas, catecolaminas y fenoles polihídricos.

Algunas enzimas como la Xantina-Oxidasa, Dihidroorotico Deshidrogenasa y una variedad de Flavín Deshidrogenasas, también producen superóxido durante sus ciclos catalíticos (8).

Actualmente, los organismos aeróbicos cuentan con mecanismos que los protegen del daño que pueden causar los intermediarios metabólicos del oxígeno, mediante enzimas que los transforman catalíticamente.

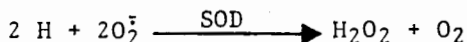
Las unidades funcionales del metabolismo celular son las enzimas, proteínas que catalizan cientos de reacciones químicas específicas, mediante las cuales se --

desdoblan moléculas nutritivas, se conserva y se transforma la energía química, y se ensamblan moléculas a partir de precursores simples.

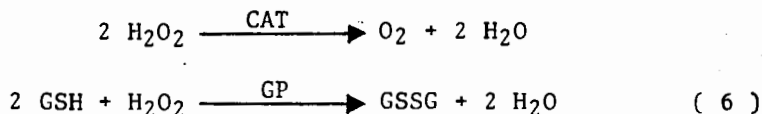
Algunas enzimas están constituidas únicamente por polipéptidos, pero otras requieren un componente químico adicional llamado *cofactor* para su actividad. El cofactor puede ser de origen inorgánico como: iones de Hierro (Fe^{2+}), Magnesio (Mn^{2+}) o Zinc (Zn^{2+}); o puede ser una molécula orgánica compleja llamada *coenzima*. Algunas enzimas requieren tanto de una coenzima como de uno o dos iones metálicos para su actividad.

Muchas enzimas aparecen en más de una forma molecular en una misma especie, órgano, tejido o incluso en una misma célula. En tales casos, las distintas formas de la enzima catalizan la misma reacción, pero difieren en propiedades cinéticas y en composición o secuencia de aminoácido. A tales formas múltiples de una misma enzima se les llama *isoenzimas* (9).

Entre las enzimas que detoxifican de los intermediarios metabólicos del oxígeno se encuentran: la *superóxido dismutasa* (SOD), que cataliza la dismutación del superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno:



La catalasa y la glutatión peroxidasa, que a su vez reducen el peróxido de hidrógeno produciendo agua:



Se han encontrado cuatro formas distintas de SOD, de las cuales sólo dos de estas isoenzimas están presentes en células eucarióticas (SOD₁ y SOD₂).

La SOD₁ es un dímero de subunidades idénticas con un peso molecular de 31,400 que contiene un átomo de Cobre y otro de Zinc en cada subunidad; se encuentra en el citosól y en el espacio intermembranal de la mitocondria, su estructura está codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 21 (21-q22), es sensible al cianuro y al peróxido de hidrógeno.

La SOD₂ es un tetrámero de subunidades iguales que contienen Manganeso (cuatro átomos en la especie humana). Tiene un peso molecular de 84,100 y su localización cromosómica corresponde al cromosoma 6 (6-q21), esta isoenzima se encuentra en la matriz mitocondrial (3).

A N T E C E D E N T E S

Durante los procesos neoplásicos la actividad de superóxido dismutasa presenta diversas alteraciones, ya que se ha reportado que en células neoplásicas de Plasmocitoma PC6, Leucemia Linfocítica P388, Carcinoma de Lewis, Carcinoma de vejiga, Tumor Ascítico de Ehrlich, Tumor Ascítico de Yoshida y Epitelioma W256, la actividad total de esta enzima se encuentra disminuída (10, 11).

La actividad de las isoenzimas, también ha sido frecuentemente reportada alterada en ciertos tipos de tumores como: Tumor Ascítico de Ehrlich, Neuroblastoma, Hepatoma H6, Leucemia 12-10, Melanoma S91, Carcinoma Murino CSH (12, 13, 14) estudiados en modelos experimentales así como en Leucemias humanas (15), en las cuales la actividad de SOD_2 se encuentra en un estado de deficiencia total. Esta isoenzima también tiene una actividad deficiente en fibroblastos humanos WI-38 transformados con SV-40 (14) y en tumores de crecimiento rápido del Hepatoma de Morris (16).

En células neoplásicas de ratón con Hepatoma Novikkof y en células leucemicas humanas se reporta disminuída la actividad de SOD_1 (15), mientras que la actividad de ambas isoenzimas se ha encontrado muy parecida a la normal en diversos tumores sólidos humanos (17).

Por otra parte, también se han reportado alteraciones de las isoenzimas en células sanas de organismos portadores de tumores como son: disminución de la actividad de SOD_2 en hígado, bazo y riñón de ratones con tumor Ascítico de Ehrlich (18) y, elevación de la actividad de SOD_1 en eritrocitos (la única isoenzima de estas células - debido a que carecen de mitocondrias) pero normal en hígado y pulmón de ratones con Carcinoma de Lewis (19).

En el laboratorio donde se realizó este trabajo se hicieron estudios sobre la actividad de esta enzima en ratones con Linfoma L-5178Y implantado en cavidad peritoneal, encontrándose: disminuída la actividad de pulmón y cerebro, pero normal en hígado y elevada en eritrocitos (20); así mismo, en pacientes con diversas neoplásias -- tanto de origen hematológico como en tumores sólidos, la actividad de superóxido dismutasa eritrocitaria (SOD_E) - se encuentra elevada, observando un incremento mayor en pacientes sin tratamiento (21, 22). La tabla 1. Resume algunas de las alteraciones en la actividad de las isoenzimas en las neoplásias citadas arriba.

NEOPLASIA CELULAS ACTIVIDAD DE SOD

Plasmocitoma PC6*	Neoplásicas	Disminución de SOD total
Leucemia Linfocítica P388*	"	" " "
Carcinoma de Lewis*	"	" " "
Carcinoma de vejiga*	"	" " "
Tumor Ascítico de Ehrlich*	"	" " "
Tumor Ascítico de Yoshida*	"	" " "
Epitelioma W256*	"	" " "
Tumor Ascítico de Ehrlich*	"	Deficiencia total de SOD ₂
Neuroblastoma*	"	" " " "
Hepatoma H6*	"	" " " "
Leucemia 12-10*	"	" " " "
Melanoma S91*	"	" " " "
Carcinoma Murino CSH*	"	" " " "
Leucemia**	"	" " " "
Cels. transformadas con SV-40***	Fibroblastos WI-38	Deficiencia parcial de SOD ₂ y aumento de SOD ₁
Hepatoma Novikkof*	Neoplásicas	Deficiencia parcial de SOD ₁
Tumores sólidos**	"	Similar a la normal de ambas isoenzimas.
Tumor Ascítico de Ehrlich*	sanas de hígado, bazo y riñón	Disminución de SOD ₂
Carcinoma de Lewis*	sanas de hígado y pulmón	Normal
Carcinoma de Lewis*	Eritrocitos sanos	Aumento de SOD total
Linfoma L-5178Y*	sanas de pulmón y cerebro	Disminución de SOD total
Linfoma L-5178Y*	sanas de hígado	Normal
Linfoma L-5178Y*	Eritrocitos sanos	Aumento de SOD total
Neoplásias hematológicas**	Neoplásicas	Aumento de SOD total

Tabla 1. La actividad de las isoenzimas de SOD presenta diversas alteraciones tanto en células sanas como neoplásicas de organismos con tumores.

* Estudios en animales de experimentación, ** Estudios en humanos, *** Estudios en células en cultivo.

J U S T I F I C A C I O N

La gran variedad de alteraciones en la actividad de SOD tanto en células neoplásicas como en células "sanas" de organismos con tumores, aún no han sido explicadas y su significado es desconocido; sin embargo, -- SOD es una enzima protectora y sus alteraciones pudieran llevar a diversos disturbios metabólicos. Actualmente se reconoce el papel que juegan los radicales libres en el daño al ADN (6) y algunos autores han hipotetizado que la deficiencia de SOD₂ podría ser un factor determinante en la iniciación y progresión de un tumor (23).

Con el fin de conocer más acerca de estas alteraciones en la actividad de SOD, consideramos importante realizar estudios de la actividad de esta enzima en tejidos que no están afectados por un tumor directamente y en el que se encuentren las dos isoenzimas (SOD₁ y -- SOD₂). Por esta razón los leucocitos son el tejido de elección, ya que contienen ambas isoenzimas y además, resultan de especial interés debido a que una gran parte de estas células participan en el proceso de fagocitosis, mecanismo inmunitario en el cuál se produce una fuente importante de superóxido, a través de la NADPH-Oxidasa unida a membrana, jugando un papel muy importante en el aniquilamiento de bacterias fagocitadas (8).

P L A N T E A M I E N T O
D E L P R O B L E M A

A partir del descubrimiento de la SOD en 1969 por McCord y Fridovich (24) se han desarrollado diversos métodos para medir la actividad de esta enzima. La mayoría de estos métodos se basan en determinaciones indirectas, donde la enzima inhibe alguna reacción mediada -- por el superóxido; ya que para la medición directa de la actividad se usa equipo especial con el que no se cuenta comunmente en el laboratorio. Algunos métodos para medir la actividad de SOD se basan en las reacciones que se esquematizan en la Tabla 2. Estos métodos pueden usar sistemas enzimáticos o no enzimáticos para generar el superóxido y luego se completan con técnicas luminimétricas, colorimétricas o polarográficas. El problema con estos métodos es que han sido diseñados para hacer la cuantificación utilizando cantidades considerables de tejido, por lo que, aunque estos métodos sean confiables y eficientes en la medición, es difícil obtener leucocitos en las cantidades requeridas (20 ml o más) de un mismo individuo para determinar SOD.

Ensayos preliminares para determinar la actividad de SOD en leucocitos humanos, efectuados en el laboratorio donde se realizó este trabajo, siguiendo los métodos del pirogalól y la adrenalina, presentaron los siguientes problemas:

- 1) La necesidad de una gran cantidad de muestra.
- 2) La imposibilidad de diferenciar la actividad individual de las isoenzimas.

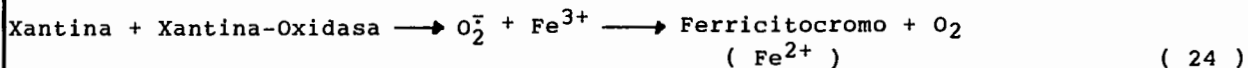
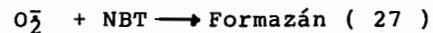
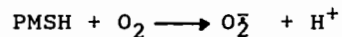
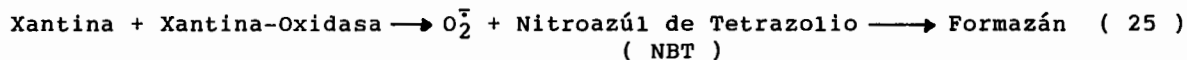


Tabla 2.- Algunos métodos indirectos para medir la actividad de SOD se basan en las reacciones esquematizadas arriba.

O B J E T I V O S

- 1.- Lograr la estandarización de un método que permita la determinación sensitiva y confiable de la actividad enzimática en extractos de tejido con bajos niveles de SOD y que además permita la diferenciación de la actividad individual de las isoenzimas.

- 2.- Determinar los valores normales de la actividad de SOD en leucocitos humanos, siguiendo el método estandarizado.

M A T E R I A L E S Y E Q U I P O

- 1.- Centrífuga (hasta 16,000 RPM)
- 2.- Espectrofotómetro
- 3.- Cubetas de cuarzo
- 4.- Micropipetas (de 5 a 100 μ l)
- 5.- Mezclador eléctrico
- 6.- Agitador magnético
- 7.- Medidor de pH (potenciómetro)

R E A C T I V O S

- 1.- ACD (3.0:1.0:3.0 de D-Glucosa 0.02M, Acido cítrico 0.006M, Citrato de Sodio 0.01M, en Cloruro de Sodio 0.9%).
- 2.- Dextrán 6% (PM= 200,000-300,000) en Cloruro de Sodio - 0.9%.
- 3.- D-Glucosa 5% en Cloruro de Sodio 0.9%.
- 4.- Cloruro de Sodio 3.6%.
- 5.- Sacarosa 0.25M.
- 6.- Cloruro de Sodio 0.9%.
- 7.- Tritón X-100 (v/v) 10%.
- 8.- Buffer Trietanolamina 0.1M; a un pH de 7.4-7.5 ajustado con HCl.
- 9.- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido (NADH) (Sal Disódica) 7.5 mM.
- 10.-Acido Etilendiaminotetracético (EDTA) 0.2M, ajustado a un pH de 7.0 con NaOH 1M.
- 11.-Cloruro Manganoso ($MnCl_2$) 0.1M.
- 12.-EDTA/ $MnCl_2$ (v/v) 100 mM/50 mM: Mezclando los reactivos 10 y 11 en proporción de 1:1 se obtiene el reactivo 12 (Esta mezcla debe hacerse justo antes de usarse)
- 13.- β -Mercaptoetanol 0.01M
- 14.-SOD₁ de eritrocitos de carnero.

NOTA: Todos los reactivos fueron disueltos en agua desionizada para su preparación.

M E T O D O S

O B T E N C I O N D E E X T R A C T O S D E T E J I D O

EXTRACTO DE HIGADO DE RATON:

Este extracto se obtuvo a partir de 5g de hígado de ratón, lavado con solución salina fisiológica (0.9%) y homogenizando en frío con 2.0 ml de buffer de fosfatos 0.1M pH 8.0. El homogenizado se sometió a congelación y descongelación con hielo seco-acetona (aproximadamente 5 veces) y luego se centrifugó a 4,000 RPM/ 15 min, el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 16,000 RPM/ 30 min. Una vez obtenido el sobrenadante se usó para las determinaciones enzimáticas (29).

EXTRACTO DE ERITROCITOS HUMANOS:

La obtención de este extracto se hizo a partir de 3 ml de sangre periférica heparinizada, lavados 3 veces con solución salina fisiológica, descartando el sobrenadante y la capa de leucocitos. Se mezclaron 0.5 ml de agua más 0.5 ml de eritrocitos lavados para lisarlos por congelación y descongelación con hielo seco-acetona; se egregaron 7.0 ml de agua fría, luego 2.0 ml de etanol frío y finalmente -

1.2 ml de cloroformo frío, agitando durante 1 min. Se centrifugó a 4,500 RPM/ 15 min, obteniendo un extracto libre de hemoglobina que se utilizó para las determinaciones enzimáticas (30).

EXTRACTO DE LEUCOCITOS HUMANOS:

A partir de 10 ml de sangre total heparinizada se obtuvo este extracto, separando los eritrocitos por sedimentación con un volumen igual (10 ml) de una solución 3.0:1.0:3.0 de ACD-Dextran 6.0%-Dextrosa 5.0% -- (ver reactivos) a temperatura ambiente por un período de 15 a 45 min. Se recuperó el sobrenadante por aspiración y se centrifugó en frío a 1,500 RPM/ 15 min. Después de eliminar el sobrenadante, el paquete de células se limpia de eritrocitos contaminantes por lisis con agua (90 seg), estabilizando con solución salina 3.6% y centrifugando a 2,000 RPM/ 10 min, repitiendo la lisis varias veces hasta obtener un paquete celular libre de eritrocitos. Se resuspendió el paquete en 1.0 ml de sacarosa 0.25M --- fría y 10.0 μ l de una solución de Tritón X-100 al 10%, la suspensión obtenida es congelada y descongelada en hielo seco-acetona 7 veces y finalmente se centrifugó a 4,000 RPM/ 15 min a 4°C. El sobrenadante se usó en las determinaciones enzimáticas (31).

D E T E R M I N A C I O N E N Z I M A T I C A

El método seleccionado para cumplir con nu estros objetivos es espectrofotométrico y se basa en el principio de que el NADH se oxida en presencia de concentraciones mínimas de EDTA, Manganeso²⁺ y β -Mercaptoetanol a través de una cadena de reacciones de radicales libres que involucra la oxidación del nucleótido por radicales -Tiól, las cuales se derivan de la interacción de grupos -Tioles con el complejo EDTA-Mn²⁺. El superóxido se genera por la reacción del oxígeno con radicales Tióles o Disulfuro (32).

Esta cadena de racciones resulta ideal para evaluar la actividad de SOD en base a su capacidad para inhibir la oxidación del complejo EDTA-Mn²⁺ debida al superóxido y por consecuencia previene la oxidación del NADH. Las reacciones globales de este principio se esquemmatizan en la Fig.1.

El ensayo para la determinación enzimática consiste en una mezcla de reacciones puramente química, - la cual se logra adicionando a una celdilla los siguientes reactivos:

0.800 ml de Buffer Trietanolamina 0.1M

0.040 ml de NADH 7.5mM

0.025 ml de Solución stock de EDTA/ $MnCl_2$ 100 mM/ 50mM. -
0.0-0.200 ml de muestra (SOD pura o extracto de tejido).
El volúmen de todas las cubetas de reacción se ajustan a
1.165 ml (volúmen final) con Buffer Trietanolamina 0.1M.

Se mezclan muy bién los tubos y se monito-
rean sus lecturas basales a 340 nm. El registro de lectu-
ras basales estables es la garantía de que en las mezclas
de reacción no ocurre oxidación inespecífica del dinucleó-
tido por actividad de NADH-Oxidasa o de cualquier otra -
enzima que pudiera estar presente en el extracto ya que
la reacción específica (descrita en este trabajo) sólo
se inicia al poner 0.100 ml de β -Mercaptoetanol 0.01M a -
cada celdilla (como se describió anteriormente).

Una vez iniciada la reacción, se registran
los decrementos en absorsbancia minuto a minuto. El de--
cremento del rango de oxidación, medido por el decremento
en Densidad Optica (DO), está en función de la concentra-
ción de la enzima.

La actividad de cada muestra en particular
se expresa en unidades enzimáticas por miligramo de pro--
teína (U/mgP) para extractos de tejido y SOD pura. La -
cantidad de enzima necesaria para inhibír la oxidación --
del dinucleótido en un 50% se considera como una unidad -
enzimática.

La determinación de la cantidad de proteí-
na (mg/ml) en los extractos de tejido se efectuó siguien-

do el método de Lowry (34).

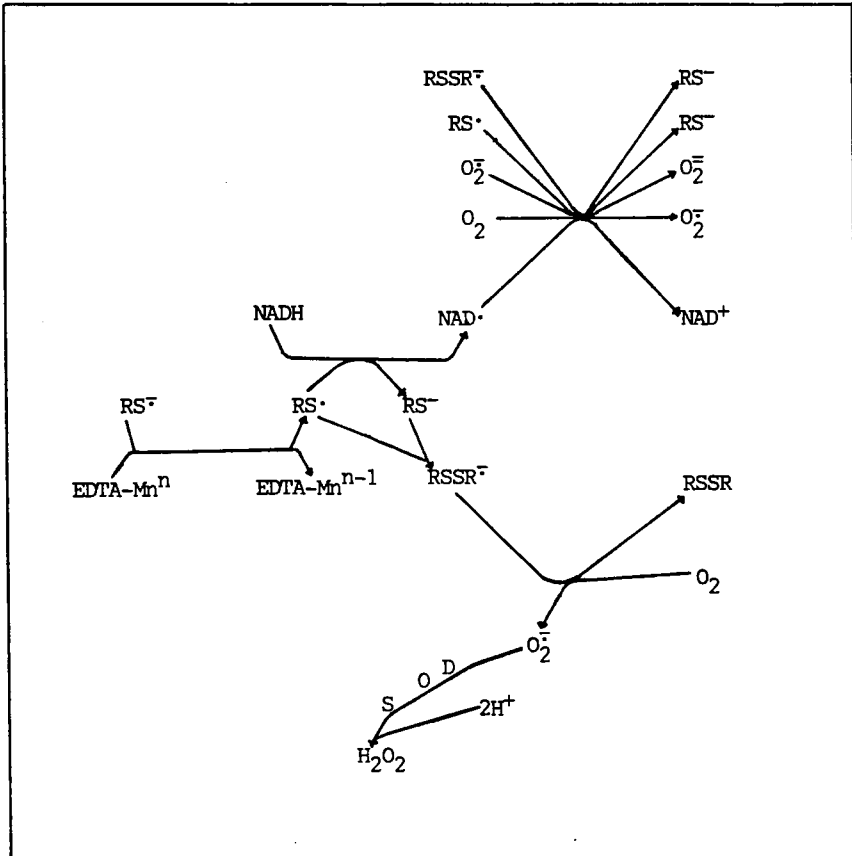


Fig. 1 Cadena de reacciones en que se basa el método espectrofotométrico para medir la actividad de SOD.

R E S U L T A D O S.

La estandarización de esta metodología se inició utilizando superóxido dismutasa pura de eritrocitos de carnero con el fin de asegurar se reproducibilidad bajo nuestras condiciones. En las primeras determinaciones se observó que las tasas de oxidación del NADH en los controles (sin enzima) de estos ensayos, eran muy variables entre sí; además de una relación no decreciente de la oxidación de las alicuotas de menor a mayor cantidad de enzima, ya que lo esperado era que al aumentar la cantidad de enzima la oxidación disminuyese. Pensamos que la inestabilidad de alguno de los reactivos involucrados pudiera ser la causa de estos problemas, por lo que iniciamos probando la efectividad de la reacción a distintos tiempos de almacenamiento de los reactivos o bien, bajo distintas condiciones de preparación. Esta etapa, como es de suponerse, requirió de mucho tiempo de experimentación. En la tabla 3, se esquematizan los resultados de estas pruebas y las diferencias encontradas con respecto al método de referencia (33).

Las modificaciones realizadas a este método sirvieron para obtener una mejor correlación de decremento de oxidación entre las distintas alicuotas de un mismo ensayo, sin embargo, las tasas de oxidación en los

controles continuaban variando de ensayo a ensayo; un ejemplo de estas variaciones se muestra en la tabla 2. No obstante, se observó un fenómeno muy peculiar al graficar cada uno de estos ensayos, todos tenían un comportamiento muy similar (Fig. 2). Dada esta similitud gráfica decidimos expresar los decrementos de DO por minuto (DO/min) como un porcentaje de su control cuya oxidación se considera el 100%; de esta manera, el comportamiento de las curvas de titulación de todos los ensayos fué casi idéntico (Fig. 3). Al analizar las gráficas se observa que la oxidación no es directamente proporcional a la cantidad de enzima, sino que sigue una *función exponencial*. Utilizando el análisis de regresión lineal para obtener el mejor acoplamiento de la curva a una recta, por transformación de los valores de SOD y de los porcentajes de oxidación a logaritmos, aproximadamente la misma cantidad de enzima rinde una unidad enzimática en todos los ensayos (tabla 4), (Fig. 4). Si el análisis de regresión lineal se aplica sin expresar los decrementos de oxidación como un porcentaje del control, se obtiene una unidad enzimática con cantidades muy variables de enzima en todos los ensayos (tabla 4) (Fig. 5).

El promedio de 10 determinaciones usando SOD pura fué de 19.36 ± 1.5 U/mgP (51.9 ± 3.98 ng por unidad enzimática). En la figura 6 se muestra la cinética de oxidación del NADH en ausencia y en presencia de dis

tintas cantidades de enzima (50, 100, 250, 500, 1,000, y 2,000 ng). Después de iniciarse la reacción con β -Mercaptoetanol se registran los decrementos en absorbancia por 12 minutos a 340 nm, la oxidación es baja al principio pero después de 3 o 4 minutos aumenta progresivamente.

Por otra parte, en las determinaciones realizadas con enzima pura calentada a 100°C durante dos minutos con el objeto de desnaturalizar las proteínas, ninguna de las diferentes alicuotas de enzima utilizadas registraron decrementos en la oxidación (Fig. 7).

Para confirmar la reproducibilidad del método y averiguar si la cinética de oxidación tenía un comportamiento similar al observado con SOD pura, se hicieron determinaciones enzimáticas en extractos de eritrocitos humanos y de hígado de ratón; encontrándose que efectivamente, la tasa de oxidación del NADH utilizando distintas cantidades de estos extractos fue igual a la observada con SOD pura (Fig 8a, 9b), de igual forma el comportamiento gráfico de estas determinaciones es de tipo exponencial y no aritmético (Fig 9a, 10b) y se acopla a una recta por transformación logarítmica de las cantidades de extracto y sus valores de oxidación (Fig 10a, 11d.).

Una vez garantizada la reproducibilidad del método en estos tejidos el trabajo se encaminó al -

cumplimiento del segundo objetivo: la determinación de los valores normales de SOD en extractos de leucocitos humanos.

Las figuras 11a, 11b, y 11c muestran -- que la tasa de oxidación del NADH, el comportamiento - exponencial de los puntos en una gráfica y su acopla-- miento a una recta por análisis de regresión lineal, - mantienen en este tejido el mismo comportamiento que - el observado en los tejidos probados anteriormente.

La actividad de SOD total, en 21 individuos normales tiene un promedio de 7.68 ± 1.49 U/mgP, - cuantificada por este método donde los valores fluc--- túan entre 5.8 y 10.35 U/mgP (Fig. 12).

Para la diferenciación de la actividad individual de las isoenzimas se utilizó Cianuro de Potasio (KCN). Las pruebas con KCN 50.0 uM fallaron en la inhibición de la actividad de SOD₁, lográndose únicamente con KCN 1.0 mM. Utilizando dicho inhibidor se estudiaron 5 individuos normales encontrándose un promedio de actividad total de SOD de 6.88 ± 1.35 U/mgP y 4.32 ± 0.82 U/mgP de actividad de SOD₁, mientras que a SOD₂ le corresponde una actividad de 2.57 ± 0.59 U/mgP (Tabla 5), lo que significa que el 62.7% de la actividad total esta dada por SOD₁ y SOD₂ contribuye con - el 37.3% (Fig.13) .

REACTIVO	METODO A	METODO B
BUFFER	Trietanolamina 0.1M/Dietanolamina 0.1M, estable por semanas.	Trietanolamina 0.1M, estable por semanas
NADH	Estable por 3 días a 4°C y por semanas a 20°C. Disuelto en agua	Requiere preparación diaria. Disuelto en buffer trietanolamina.
EDTA	Muy estable a temperatura ambiente	Estable por 30 días a temperatura ambiente, inestable a 4°C
B-Mercaptoetanol	Muy estable a temperatura ambiente	Requiere preparación diaria

Tabla 3. Condiciones de preparación y tiempos de estabilidad de los reactivos según el método de Paoletti (Método A) y según nuestro laboratorio (método B).

ENZIMA (ng)	ENSAYO I		ENSAYO II	
	A	B	A	B
	DO/min	%	DO/min	%
00	0.0140	100	0.0220	100
50	0.0070	50	0.0180	49
100	0.0063	45	0.0099	45
250	0.0044	31	0.0073	33
500	0.0036	26	0.0055	25
1,000	0.0028	20	0.0044	20
2,000	0.0025	18	0.0040	18
	ng/U	ng/U	ng/U	ng/U
	<u>*56.8</u>	<u>**56.2</u>	<u>*60.3</u>	<u>**56.7</u>
	U/mgP	U/mgP	U/mgP	U/mgP
	<u>17.6</u>	<u>17.8</u>	<u>16.6</u>	<u>17.6</u>

Tabla 4. Los decrementos en Densidad Optica por minuto (DO/min) son distintos en dos ensayos con SOD pura (A), pero si se expresan estos decrementos como un porcentaje de su respectivo control, se obtiene una unidad enzimatica con la misma cantidad de enzima pura en ambos ensayos (**).(B).

Figura. 2 CURVAS DE TITULACION PARA DOS ENSAYOS CON SOD PURA:
ENSAYO I (o--o) , ENSAYO II (Δ — Δ).

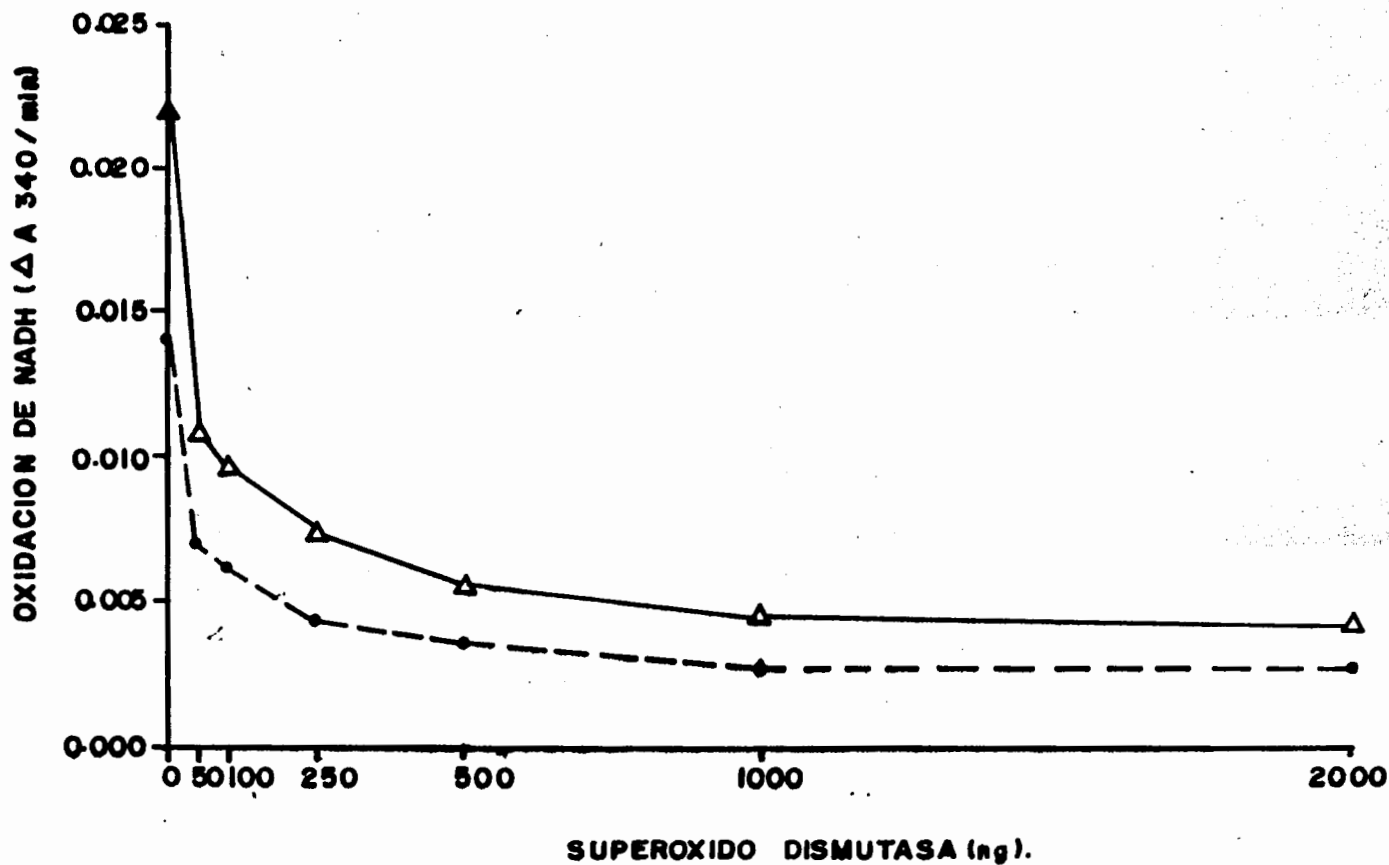


Figura 3. CURVAS DE TITULACION PARA DOS ENSAYOS CON SOD PURA REPRESENTANDO LA OXIDACION OBTENIDA CON 50,100,250,500,1000 Y 2000 ng DE ENZIMA COMO UN PORCENTAJE DE CONTROL(100%). ENSAYO I (o), ENSAYO II (Δ).

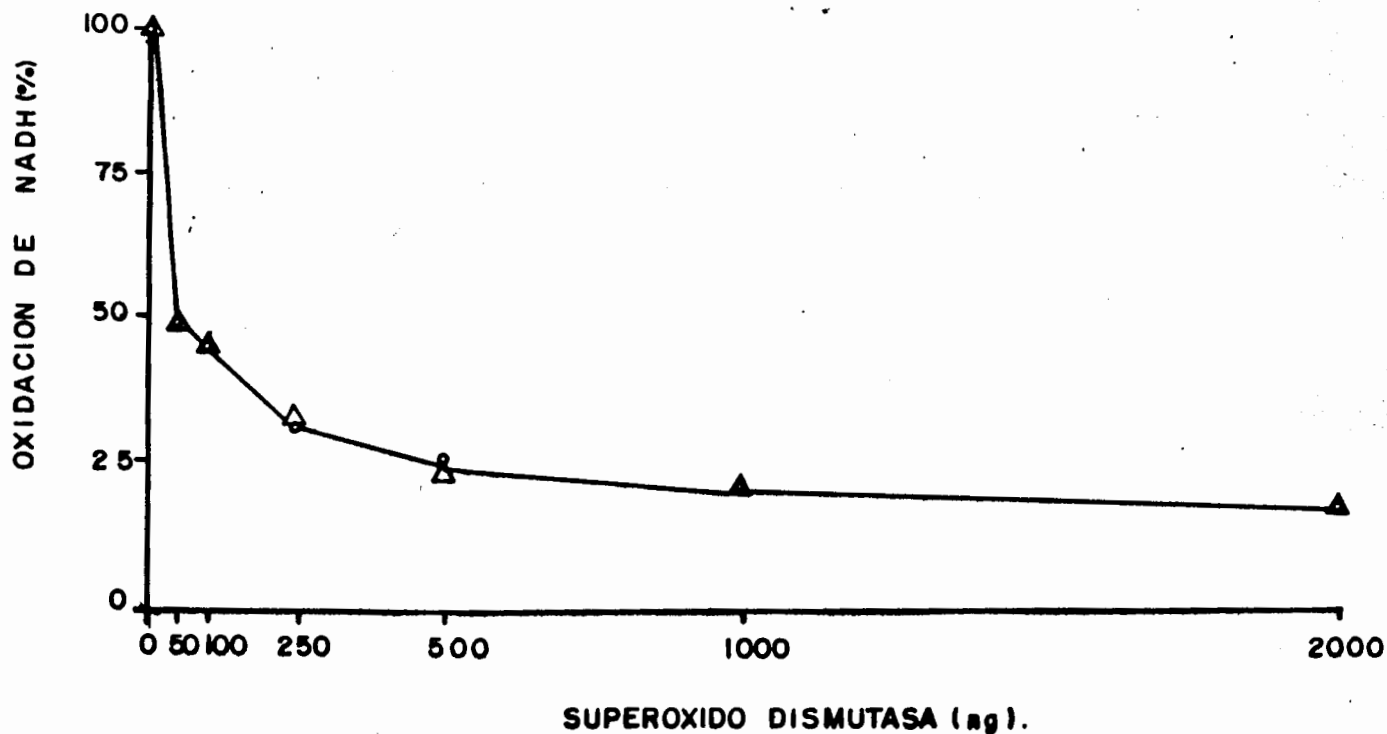
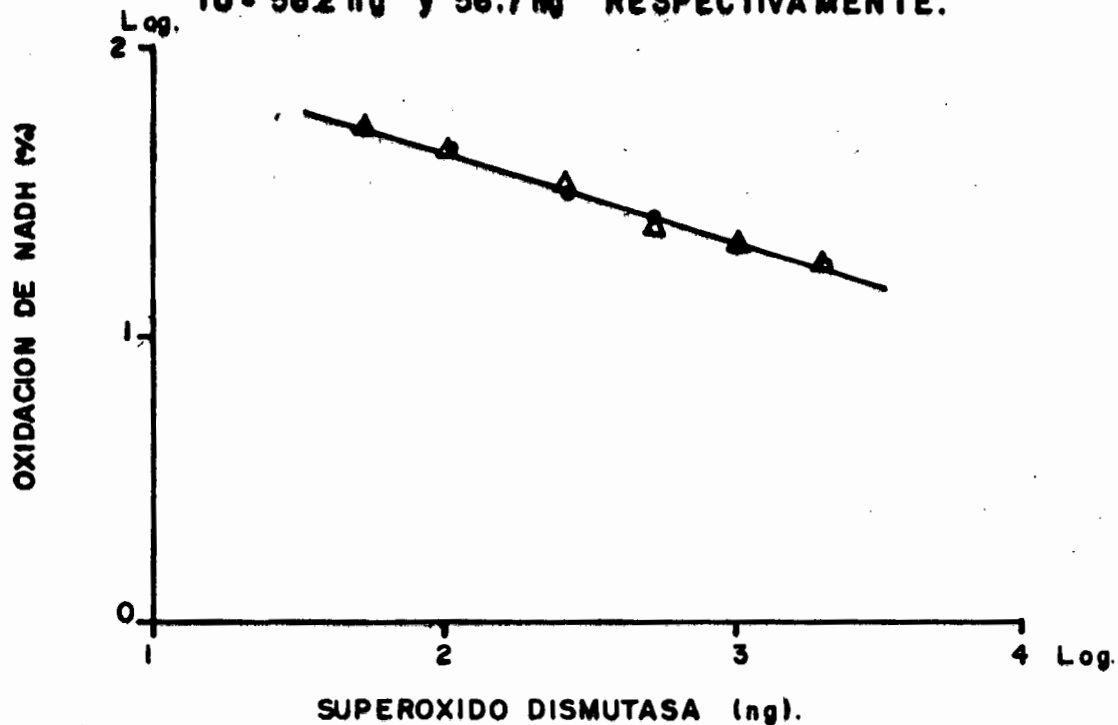


Figura 4. CURVA DE TITULACION LOGARITMICA PARA DOS ENSAYOS CON SOD PURA REPRESENTANDO LA OXIDACION OBTENIDA COMO PORCENTAJES DEL CONTROL. ENSAYO I (o): $\text{Log } y = -0.29(\text{Log } x) + 2.2$; ENSAYO II (Δ): $\text{Log } y = -0.30(\text{Log } x) + 2.2$; DONDE IU = 56.2 ng y 56.7 ng RESPECTIVAMENTE.



X	Y	
	Δ	o
1.6989	1.6902	1.6989
2.0000	1.6532	1.6532
2.3079	1.5185	1.4913
2.6989	1.3979	1.4149
3.0000	1.3010	1.3010
3.5010	1.2882	1.2882

Figura. 5 CURVA DE TITULACION LOGARITMICA PARA DOS ENSAYOS CON SOD PURA. ENSAYO I (o--o): $\text{Log } y = -0.314(\text{Log } x) + 1.37$, DONDE IU = 56.8 ng.; ENSAYO II: $\text{Log } y = -0.312(\text{Log } x) + 1.59$, DONDE IU = 60.36 ng.

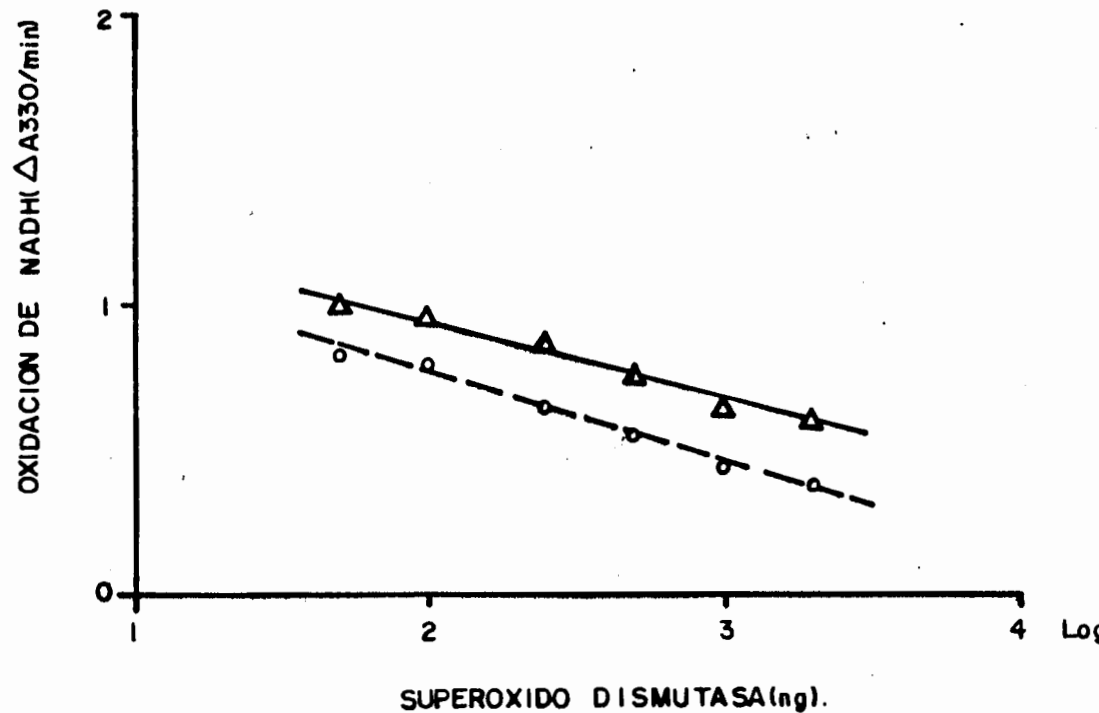


Figura 6 EFECTO DE SOD PURA EN LA TASA DE OXIDACION DEL NADH.

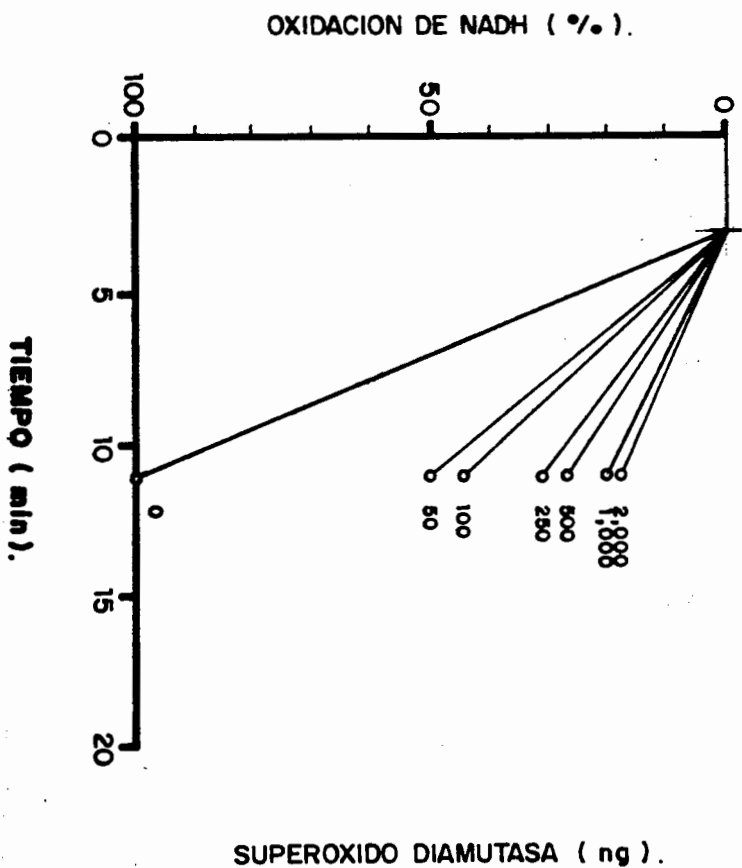


Figura. 7 CURVA DE TITULACION PARA SUPEROXIDO DISMUTASA PURA EN DONDE LAS ALICUOTAS CON ENZIMA CALENTADA NO REGISTRARON DECREMENTOS DE OXIDACION (•)

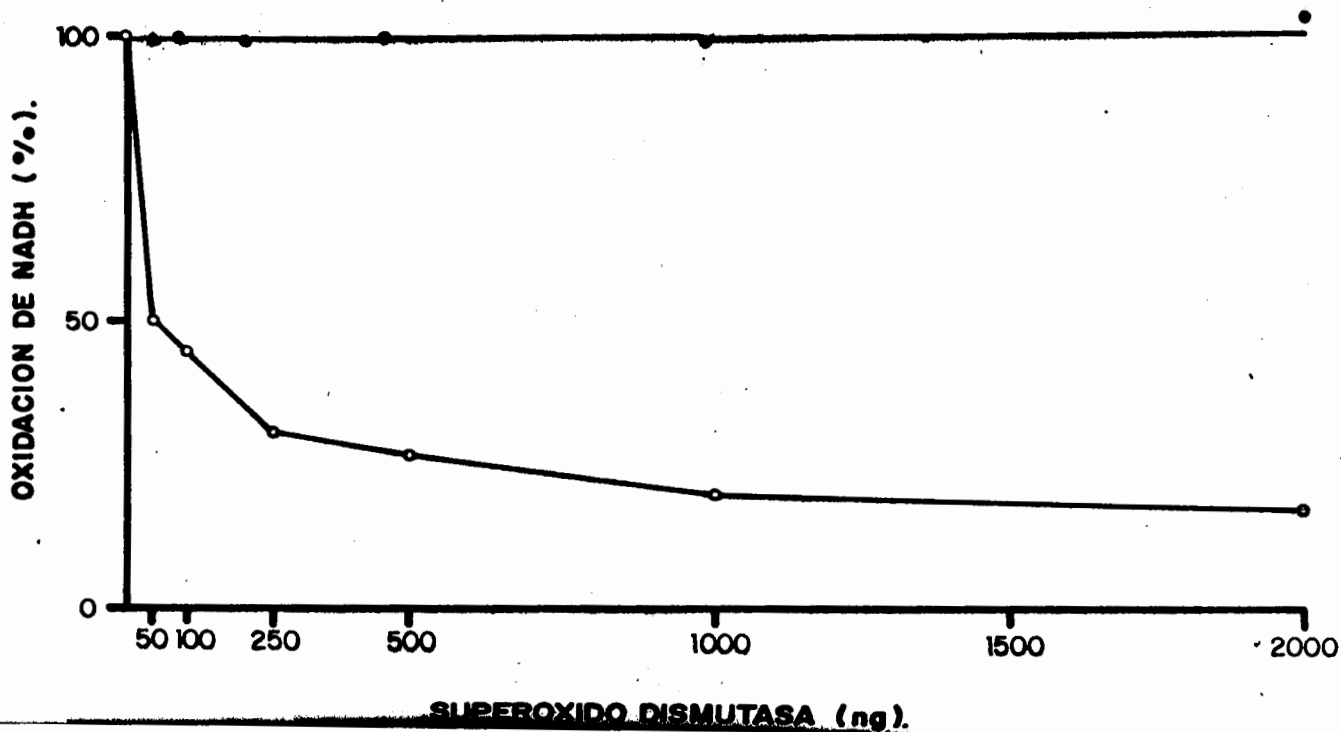


Figura.9b. EFECTO DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA DE EXTRACTO DE HIGADO DE RATON EN LA TASA DE OXIDACION DEL NADH.

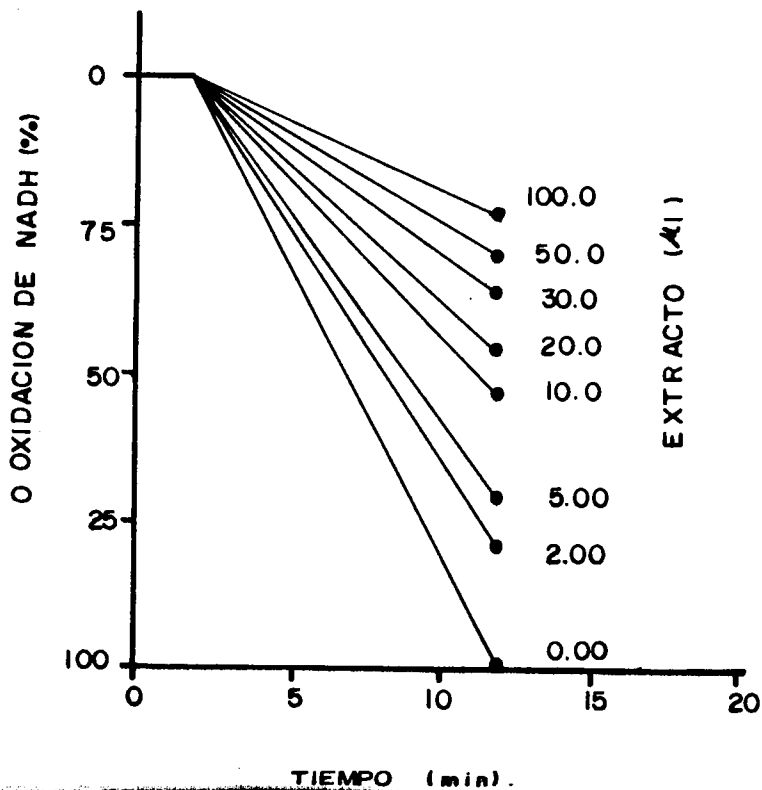


Figura. 9a. CURVA DE TITULACION PARA SUPEROXIDO DISMUTASA EN EXTRACTO DE ERITROCITOS HUMANOS.

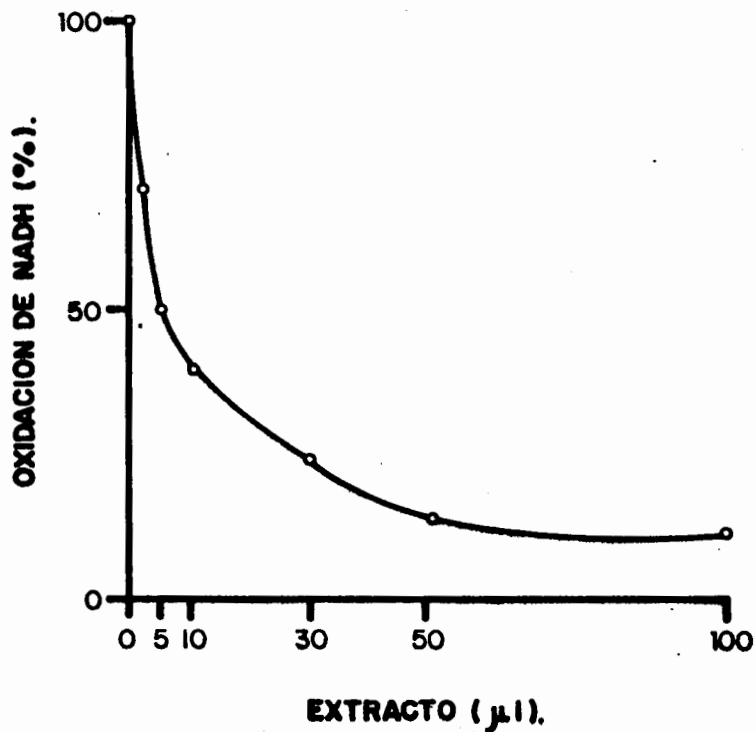
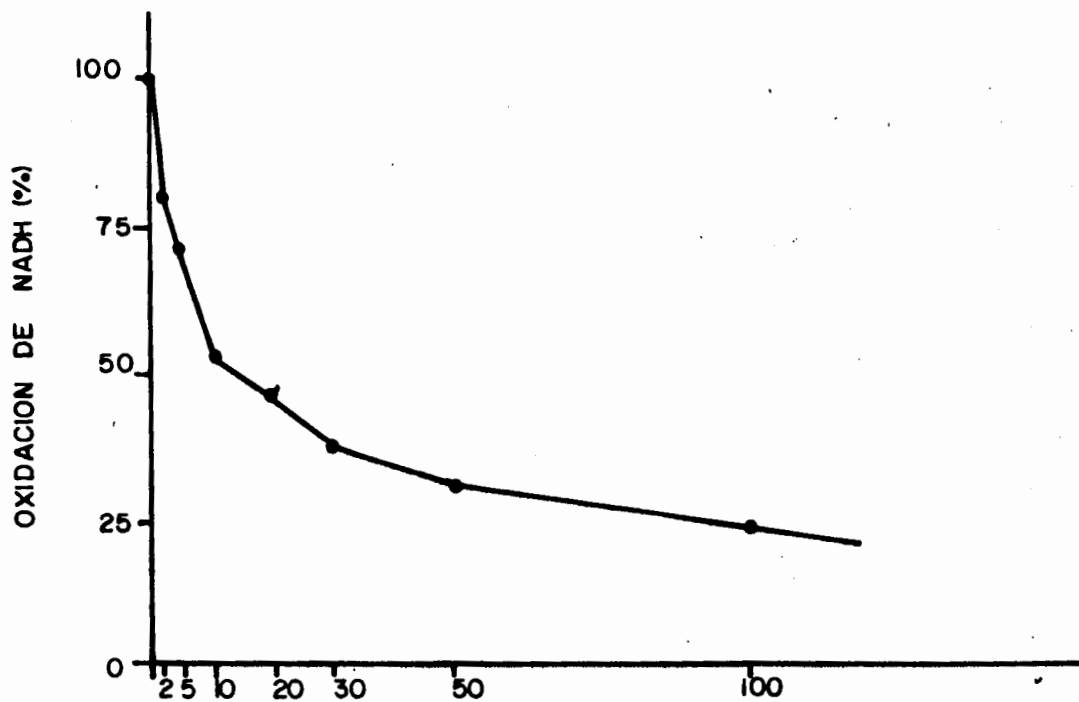


Figura 10b. CURVA DE TITULACION PARA SUPEROXIDO
DISMUTASA DE EXTRACTO DE HIGADO DE
RATON.



**Figura.10 a. CURVA DE TITULACION LOGARITMICA
PARA SUPEROXIDO DISMUTASA EN EXTRACTO DE ERITROCITOS
HUMANOS : $\text{Log } y = (-0.47)(\text{Log } x) + 2.02$**

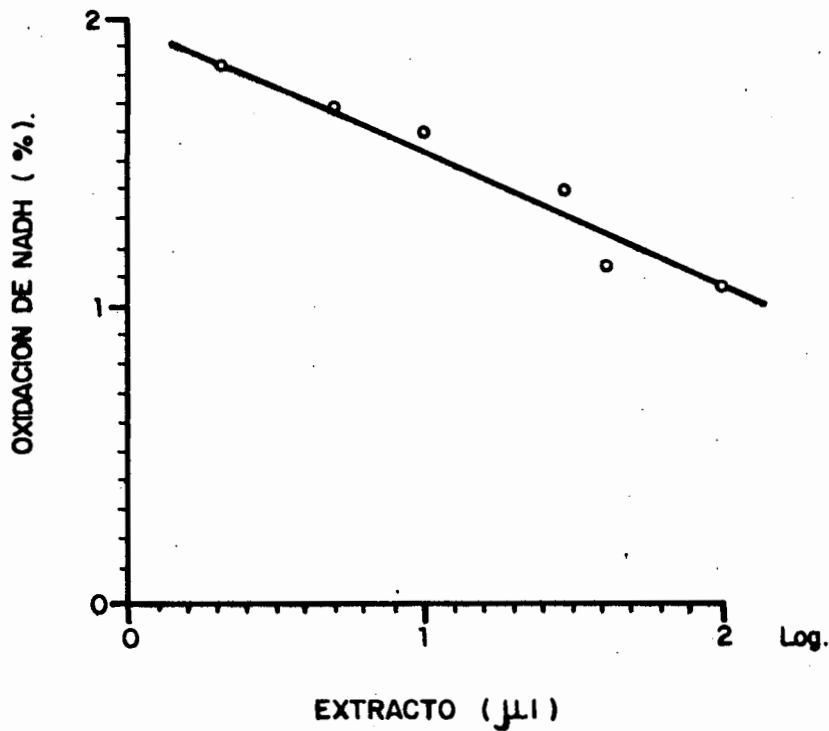


Fig. II d CURVA DE TITULACION LOGARITMICA PARA SUPEROXIDO
DISMUTASA DE EXTRACTO DE HIGADO DE RATON:

$$\text{Log } y = -0.371 (\text{Log } x) + 2.04.$$

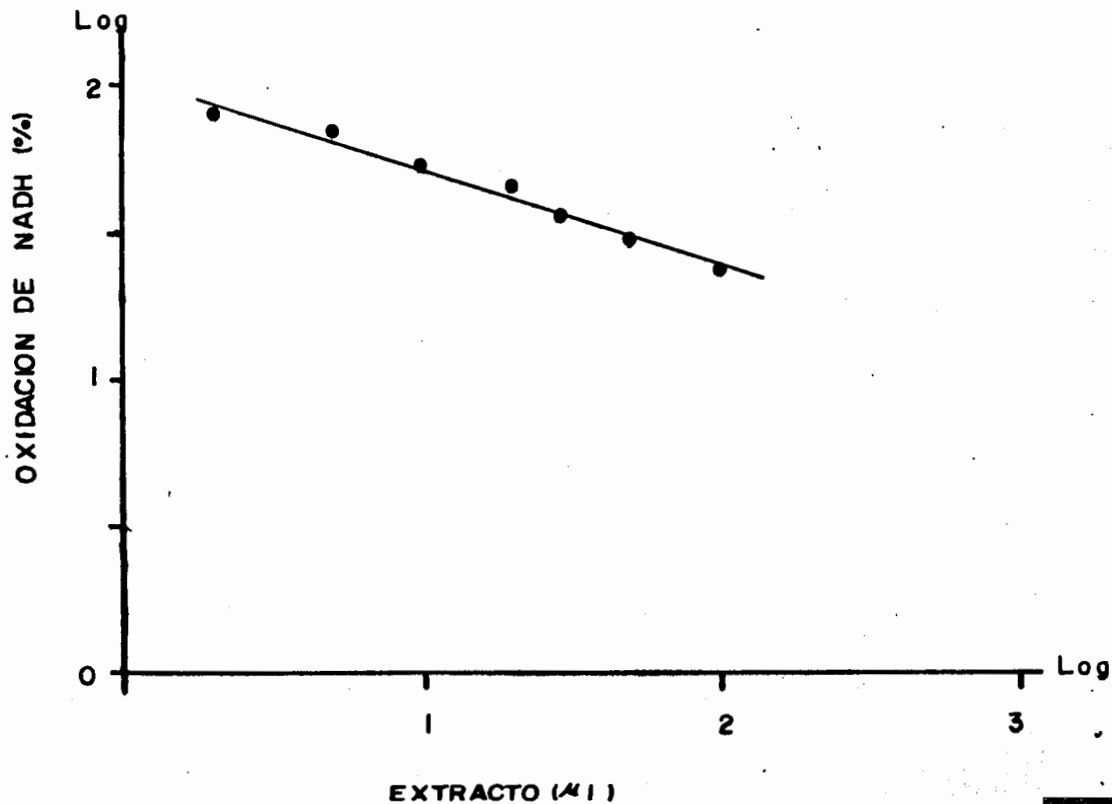


Figura 11a. EFECTO DE LA SOD LEUCOCITARIA HUMANA
SOBRE LA TASA DE OXIDACION DEL NADH.

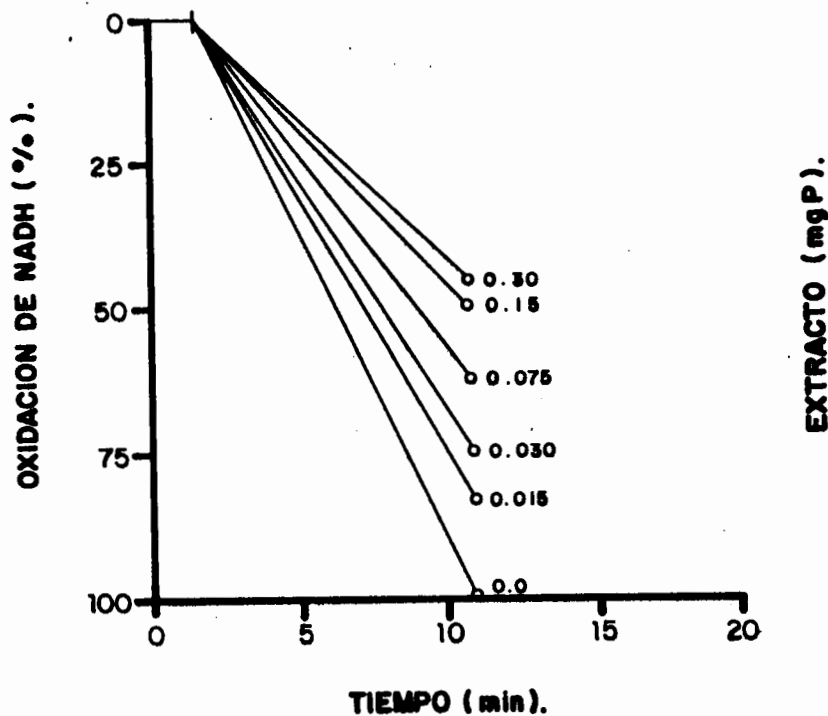


Figura.11 b. CURVA DE TITULACION PARA SUPEROXIDO DISMUTASA DE LEUCOCITOS HUMANOS

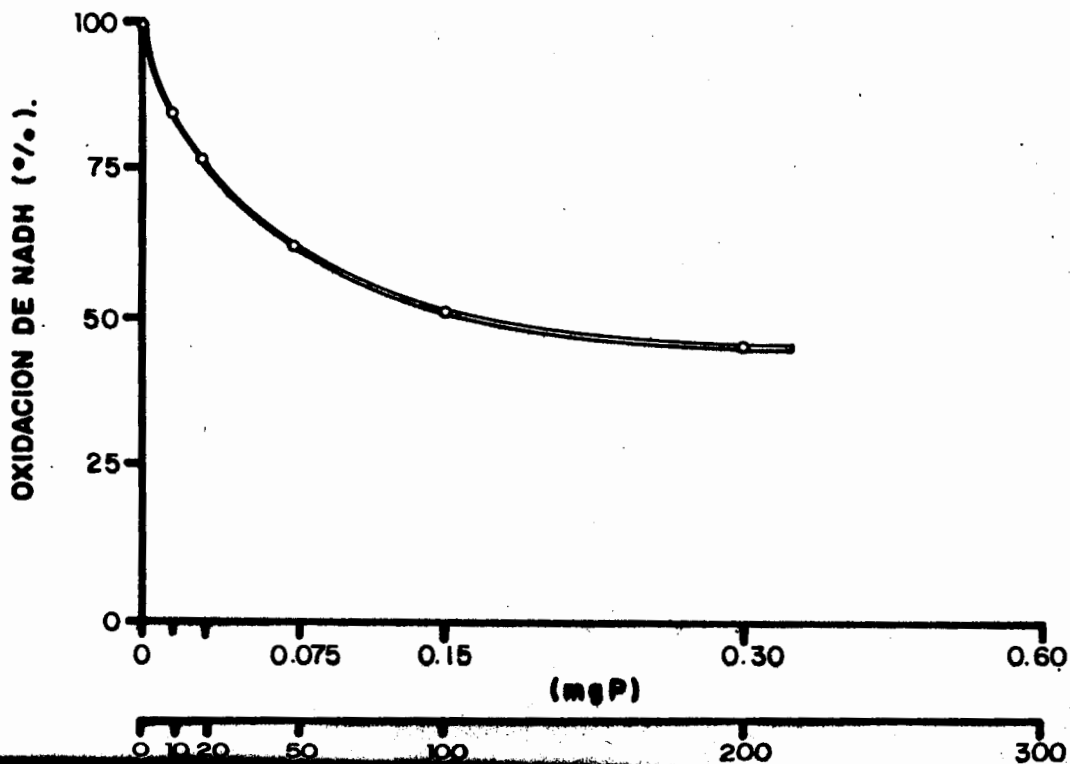


Figura.1c CURVA DE TITULACION LOGARITMICA
PARA SOD LEUCOCITARIA HUMANA: $\text{Log } y = (-0.24)(\text{Log } x) + 2.2$

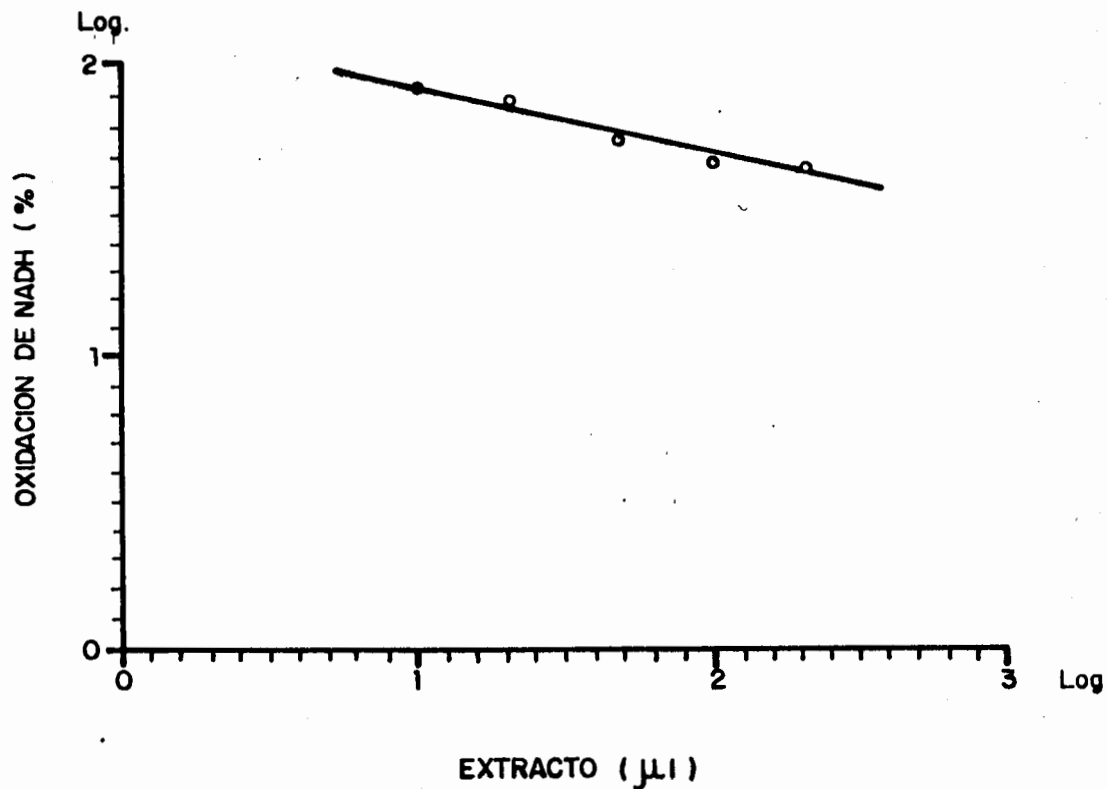


Figura. 12.- ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN 21 SUJETOS NORMALES

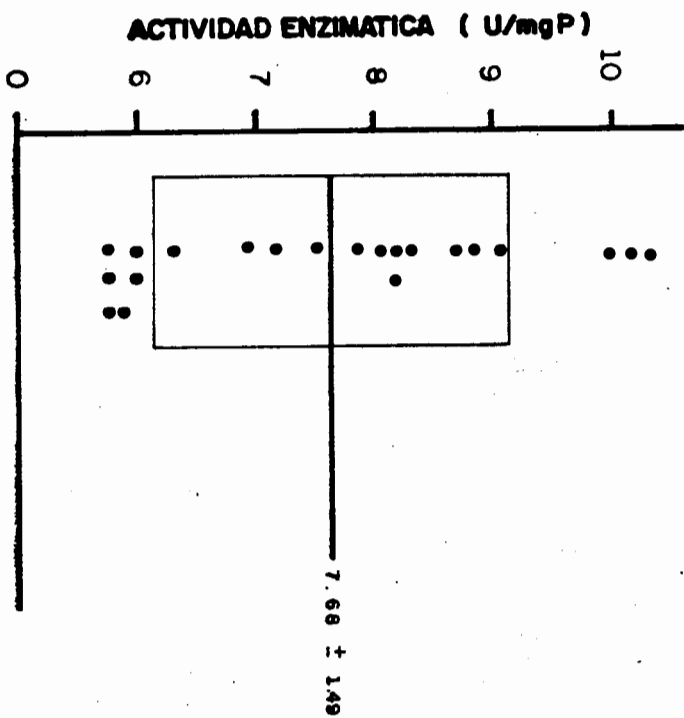
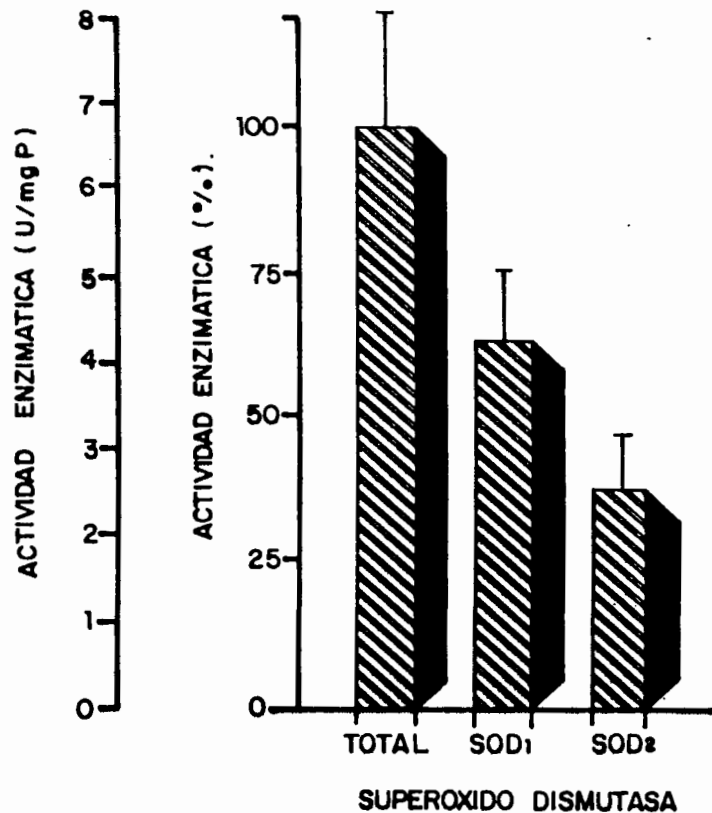


Figura. 13 ACTIVIDAD DE LAS ISOENZIMAS DE SUPEROXIDO DISMUTASA LEUCOCITARIA EN 5 SUJETOS NORMALES.



	n	ACTIVIDAD ENZIMATICA (U/mgP)	%
S O D _T	5	6.88 ± 1.35	100.0
S O D ₁	5	4.32 ± 0.82	62.7
S O D ₂	5	2.57 ± 0.59	37.3

Tabla 5.- Actividad de las isoenzimas de Superóxido Dismutasa (SOD₁ y SOD₂) en 5 sujetos normales, representadas como unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg P) y el porcentaje que representan de la actividad total.

D I S C U S I O N

La medición directa de la actividad de -- SOD requiere de aparatos especiales que no se encuentran comunmente en los laboratorios típicos, sin embargo se - puede hacer la medición indirecta tomando como base cualquier reacción que pueda ser inhibida por la enzima y -- que para su detección no requiera de equipo sofisticado. Actualmente existen varios métodos indirectos los cuales difieren entre sí únicamente en reproducibilidad y sensibilidad.

El método descrito por Paoletti et al. -- tiene como base la capacidad de la SOD para inhibír la - oxidación del NADH, a través de una secuencia de reacciones puramente químicas, resultando particularmente confiable para realizar la medición de SOD en extractos de tejido, especialmente en aquellos en los que los niveles - de esta enzima son bajos.

En la estandarización de dicho método fué necesario modificar las condiciones de preparación y tiempo de almacenamiento de los reactivos para obtener una buena correlación de las oxidaciones ocurridas en las -- distintas alicuotas de enzima con respecto a su control. Es posible que estas diferencias en reproducibilidad se deban a que los reactivos utilizados por Paoletti y los

utilizados por nosotros tengan distinto grado de pureza ya que mientras más sensible es un método, requiere de mayor pureza en los reactivos que involucra.

Una unidad enzimática se obtuvo con 51.9 nanogramos en las determinaciones realizadas con la enzima pura, mientras que Paoletti reportó que fué obtenida con 15 nanogramos. Esto podría ser ocasionado por una disminución de la actividad de la enzima utilizada en nuestros ensayos dado el largo periodo de tiempo en que estuvo almacenada (10 años aproximadamente).

Con otros métodos se requieren cantidades mucho mayores de enzima pura para obtener una unidad enzimática, como en el caso del método de Xantina-Oxidasa: Citocromo c Reducido que emplea 200 ng (24) ó el de -- NADH- Diaforasa: Hidroxilamina que necesita 626 ng (34) y 630 el de Xantina-Oxidasa: Nitroazúl de Tetrazolio --- (25).

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los métodos indirectos para medir la actividad total de SOD utilizan cantidades considerables de tejido en la -- cuantificación y su sensibilidad no alcanza a determinar los niveles de la enzima en extractos que se obtienen a partir de poco tejido y, por consiguiente, tampoco permiten la diferenciación de la actividad individual de las isoenzimas aún en extractos con altos contenidos de la enzima. Esto significa que la estandarización de esta --

metodología representa un doble logro ya que no sólo permite la determinación de la actividad de SOD total, sino que además, se puede diferenciar la actividad de SOD₂ de la de SOD₁, inhibiendo esta última -- con Cianuro de Potasio (KCN).

Existen reportes en los que se menciona que tal inhibición se logra con concentraciones - de 50 µM de KCN, sin embargo en nuestros ensayos sólo fué posible con KCN 1.0 mM.

Por otra parte, los valores normales de la SOD leucocitaria en sujetos sanos mostraron poca dispersión (7.69 ± 1.49 U/mgP), representando a proximadamente el 63% para SOD₁ y el 37% para SOD₂.

La importancia de la SOD ha sido revisada ampliamente en los antecedentes y estos resultados son los pasos preliminares para un mayor conocimiento del papel que juega esta enzima en organismos sanos así como en aquellos afectados por neoplasias.

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

- 1.- Se logró la estandarización de un método espectrofotométrico que permite la determinación sensitiva y confiable de la actividad de superóxido dismutasa en extractos de tejido que contienen bajos niveles de la enzima, lo que evita el problema de tener que utilizar grandes cantidades de muestra como se requiere en la mayoría de los métodos comunes.

- 2.- Con la metodología estandarizada se determinaron los valores normales de actividad de SOD en leucocitos humanos, encontrando que el promedio de actividad total es de 7.68 ± 1.49 U/mgP (n=21).

- 3.- Esta metodología además permite la diferenciación de las actividades individuales de las isoenzimas utilizando Cianuro de Potasio (KCN) 1mM en donde el 62.7% de la actividad total está dada por SOD₁ mientras que SOD₂ contribuye con el 37.2% .

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

- 1.- Lehninger L.A.: El origen de la vida. Bioquímica. - 2da.Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1045-1071, 1984.
- 2.- Sehof J.W.: La evolución de las células primitivas. Investigación y Ciencia. 2da.Edición. Editorial Labor, S.A. 4: 49-69, 1982.
- 3.- McCord J.M.: Superoxide dismutase: occurrence, es---tructure, function and evolution. Alan R. Liss; New York. Curren Topics in Biological and Medical Research 3: 1-21, 1979.
- 4.- Masterton W.L., Solwinski E.J.: Química General Superior. 4ta.Edición. Editorial Interamericana, 1979.
- 5.- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Oxygen toxicity, - oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 219: 1-14, 1984.
- 6.- Fridovich I.: Superoxide radical: an endogenous toxicant. Ann Rev Pharmacol Toxicol 23: 239-257, 1983.
- 7.- Troll W., Wisner R.: The role of the oxygen radi---cals as a possible mechanism of tumor promotion. -- Ann Rev Pharmacol Toxicol 25: 509-529, 1985.
- 8.- Petkau A.: Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase. Cancer Treat Rev 13: 17-44, - 1986.

- 9.- Lehninger L.A.: Enzimas: mecanismos, estructura y -
regulación. Bioquímica. 2da.Edición. Ediciones Ome-
ga, S.A. Barcelona. 223-254, 1984.
- 10.-Tisdale M.J., Mahmoun M.B.: Activities of free radi-
cal metabolizing enzymes in tumors. Br J Can 47: --
809-812, 1983.
- 11.-Bozzi A., et al.: Enzyme defense againts reactive -
oxygen derivatives in erythrocytes and tumor cells.
Mol Cel Biochem 10 (1): 11-16, 1976.
- 12.-Sahu S.K., Oberley L.W., Steven R.H., Riley E.F.: -
Brief comunicacion superoxide dismutase activity of
Ehrlich ascites tumor cells. JNCI 58 (4): 1125-1127,
1977.
- 13.-Oberley L.W., et al.: Superoxide dismutase activity
of normal murine liver and H6 hepatoma. JMCI 61 (2):
375-379, 1978.
- 14.-Oberley L.W., Bettner G.R.: Role of superoxide dis-
mutase in cancer: a review. Cancer Res 39: 1141- --
1149, 1979.
- 15.-Yamanaka N., et al.: Increase of superoxide dismuta-
se activity in various human leukemia cells. Phy-
siol Chem Physics 11: 253-256, 1979.
- 16.-Bize I.B., Oberley L.W., Morris H.P.: Superoxide --
dismutase and superoxide radicals in Morris hepato-
ma. Cancer Res 40: 3686-3693, 1980.

- 17.-Westman N.G., Marklud S.L.: Cooper and Zinc containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. Cancer Res 41: 2962-2966, --- 1981.
- 18.-Leuthauser W.C., et al.: Lowered superoxide dismutase activity in distant organs of tumor bearing mice. JNCI 72 (5): 1065-1074, 1984.
- 19.-Capel I.D., Thorneley A.C.: Superoxide dismutase activity, caeruloplasmin activity and lipoperoxide levels in tumor and host tissues of mice bearing the Lewis lung carcinoma. Eur J Can Clin Oncol 18 (5):- 507-513, 1982.
- 20.-Angeles B.G.: Actividad de superóxido dismutasa en tejidos de ratón BALB/C con linfoma L-5178Y implantado en cavidad peritoneal, bajo tratamiento quimioterapico. Resultados finales . XIV Congreso Nacional de Genética humana. Asociación de Genética Humana/ Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc., 18, 1989.
- 21.- Carrillo P.M.C.: Investigación de superóxido dismutasa en pacientes con enfermedades malignas. Tesis Fac. Ciencias Químicas U. de G., 1986.
- 22.-Hernández C.C.: Confirmación de la actividad elevada de superóxido dismutasa eritrocitaria en diferentes neoplasias. Tesis Fac. Ciencias Químicas U. de G., 1989.

- 23.-Oberley L.W.: The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis. J Theor Biol 106: 403-422, 1984.
- 24.-McCord J.M. and Fridovich I.: Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). J Biol Chem 244: 6049-6055, 1969.
- 25.-Beuchamp C., Fridovich I.: Superoxide dismutase. Anal Biochem 44: 276-287, 1971.
- 26.-Misra H.P., Fridovich I.: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay of superoxide dismutase. J Biol Chem 247: 3170-3175, 1972.
- 27.-Henry L.E.A., Halliwell B., Halliwell D.D.: The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new rapid assay technique. FEBS Lett 66: 304-306, 1976.
- 28.-Marklund S.L., Marklund G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47: 649-674, 1974.
- 29.-Hong C.D., Margherita S.B. and Philippe D.: Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. J Neurochem 40 (4): 1003-1007, 1983.

- 30.-Chavez J.A.: Actividad de superóxido dismutasa - eritrocitaria en diversas neoplásias infantiles. Tesis Fac. Ciencias U. de G., 1988.
- 31.-Dulaney T.J., Moser W.H.: Sulfatide lipidosi: - metachromatic leukodistrophy. Sanbury B.J., Myn-gaarden B.J., Fredrickson S.D.: The metabolics - Basis of Inherited Disease. 4th. Edition. 770--809, 1960.
- 32.- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A.: A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal Biochem 154: 536-541, 1986.
- 33.-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Radall R. J.: Protein measurement with a folin reagent. J - Biol Chem 193: 256-275, 1951.
- 34.-Elstner E.S., Youngman R.J. and Obwald W.: Method of enzymatic analysis (Bergmeyer H.U. Ed) 3: -- 293-302, Verlagemie, Weinhein, 1983.

GUADALAJARA, JAL. 22 DE ENERO DE 1990.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.
DE LA U. DE G.
P R E S E N T E .

Sr. Director:

Por medio de la presente informo a Usted que he revisado la tesis titulada "ESTANDARIZACION DE UN METODO CUANTITATIVO PARA LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y DETERMINACION DE LOS VALORES NORMALES EN LEUCOCITOS HUMANOS." Presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Biología Sr. Mario Gutiérrez Prado - la cuál se aprueba para que se imprima y se someta a examen puesto que la considero adecuada para ello.

Sin más por el momento me despido de Usted.

ATENTAMENTE.


M.C. Guillermo Pérez García.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente
Número 1173/89

SR. MARIO GUTIERREZ PRADO
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "ESTANDARIZACION DE UN METODO CUAN
TITATIVO PARA LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y DETERMI
NACION DE LOS VALORES NORMALES EN LEUCOCITOS HUMANOS" para -
obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido-
aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Guillermo --
Pérez García.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 29 de 1989
EL DIRECTOR



ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Guillermo Pérez García, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.