

1 9 8 8 - 2

Reg. No. 081387702

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA ENZIMA SORBITOL
DESHIDROGENASA DEL ERITROCITO HUMANO (EC. I.I.I.14).

ALEJANDRO MARTINEZ MARTINEZ

GUADALAJARA, JALISCO. 1989

**CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA ENZIMA SORBITOL DESHIDRO-
GENASA DEL ERITROCITO HUMANO (SORD. EC. 1.1.1.14).**

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

**BAJO LA DIRECCIÓN DE
M. EN G.H. MA LOURDES RAMÍREZ DUEÑAS**

**ASESORADA POR
M. EN C. GERARDO VACA PACHECO.**

EN MEMORIA DE

TEODOSIO MARTINEZ

A

FLORENCIO, GLORIA Y FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

M. EN C. GERARDO VACA

POR LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, POR ENSEÑARME UNA MECÁNICA DE PENSAMIENTO CIENTÍFICO Y POR LAS ENSEÑANZAS COMO PERSONA.

M. EN G.H. MA LOURDES RAMÍREZ DUEÑAS

POR LA DIRECCIÓN DE ÉSTA TESIS, SUS ENSEÑANZAS COMO MAESTRA, SU AMISTAD Y PORQUE AL CONFÍAR EN MI COMO PROFESIONISTA ME IMPULSA A SEGUIR ADELANTE.

Q.F.B. CLAUDINA MEDINA LOZANO

POR SU AMISTAD Y ENSEÑANZAS PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO.

Q.F.B. BERTHA IBARRA

BIOL. JAVIER PEREA

POR SU TOTAL APOYO Y ASESORAMIENTO TÉCNICO.

M. EN G.H. LUPITA RAMÍREZ DUEÑAS

POR TODO EL APOYO QUE ME BRINDA COMO AMIGA Y MAESTRA.

BIOL. CAROLINA ENRIQUEZ SANDOVAL

POR COMPARTIR CONMIGO LA INTENSIDAD DE LA VIDA Y POR EL GRÁN CARIÑO QUE LE PROFESO.

1
The first part of the report deals with the
general situation of the country and the
state of the economy. It is followed by a
description of the various sectors of the
economy and the role of the state in
the development of the country.

INTRODUCCION

The purpose of this report is to provide a
comprehensive overview of the economic
situation of the country. It is intended
for the use of the government and the
public. The report is divided into two
main parts. The first part deals with
the general situation of the country and
the state of the economy. The second
part deals with the various sectors of
the economy and the role of the state
in the development of the country.

LA VÍA DEL SORBITOL DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA CONSTA DE DOS ENZIMAS: LA ALDOSEA REDUCTASA (AR) Y LA SORBITOL DESHIDROGENASA (SORD. EC. 1.1.1.14). LA AR CATALIZA LA CONVERSIÓN DE GLUCOSA Y GALACTOSA A SORBITOL Y GALACTITOL RESPECTIVAMENTE, EN TANTO QUE LA SORD CONVIERTE EL SORBITOL A FRUCTOSA (FIGURA 1).

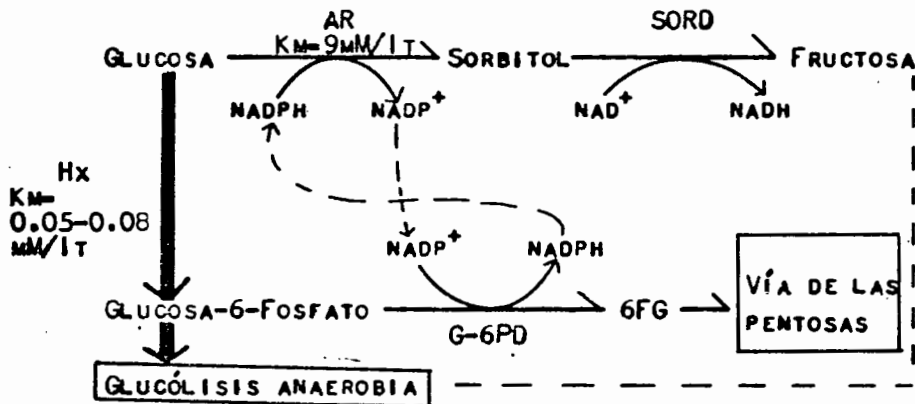


FIGURA 1. POSIBLES RUTAS METABÓLICAS DE LA GLUCOSA EN EL INTERIOR DEL ERITROCITO HUMANO.

PARA QUE LA AR REDUZCA A LA GLUCOSA O A LA GALACTOSA A SU RESPECTIVO ALCOHOL REQUIERE DE NIVELES ELEVADOS DE LA HEXOSA Y SUFICIENTE PODER REDUCTOR EN FORMA DE NADPH; EN EL CRISTALINO LA FUENTE DE NADPH PROVIENE PRINCIPALMENTE DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6PD) (1).

LA IMPORTANCIA DE ESTA VÍA EN LA FORMACIÓN DE CATARATAS DIABÉTICAS O GALACTOSÉMICAS HA SIDO BIEN ESTABLECIDA, YA QUE EL SORBITOL Y EL GALACTITOL ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LAS CATARATAS POR AZÚCAR TANTO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN COMO EN HUMANOS (2). EN LA DIABETES E HIPERGALACTOSEMIA EXPERIMENTALES LAS CATARATAS APARECEN MÁS TEMPRANAMENTE EN LA ÚLTIMA CONDICIÓN (3,4) YA QUE LA SORD TIENE BAJA CAPACIDAD PARA METABOLIZAR EL GALACTITOL. VARIOS ESTUDIOS HAN IMPLICADO LA POSIBLE CONTRIBUCIÓN DEL SORBITOL EN LA PATOGÉNESIS DE OTRAS COMPLICACIONES DIABÉTICAS COMO LA NEUROPATÍA Y LA GLOMERULOESCLEROSIS (5,6,7,8).

EN LA SECCIÓN DE ANTECEDENTES DE LAS TESIS DE LICENCIATURA DE ALVAREZ (9), PEREA (10) Y ALVAREZ (11) SE HIZO UNA REVISIÓN GENERAL SOBRE LA VÍA DEL SORBITOL.

LA BÚSQUEDA DE DIFERENCIAS ENTRE INDIVIDUOS EN LA VÍA DEL SORBITOL GENÉTICAMENTE DETERMINADAS, PUEDE CONTRIBUIR AL CONOCIMIENTO DE LA INFLUENCIA QUE TIENEN LOS FACTORES GENÉTICOS SOBRE LA VARIACIÓN INDIVIDUAL EN EL DESARROLLO DE LAS COMPLICACIONES DIABÉTICAS Y EN LA PATOGÉNESIS DE LAS MISMAS.

EN LA DIVISIÓN DE GENÉTICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE SE INVESTIGA UNA HIPÓTESIS QUE POSTULA QUE UN BLOQUEO METABÓLICO IMPUESTO POR LA DEFICIENCIA DE SORD CONDUCE A LA ACUMULACIÓN DE SORBITOL EN EL CRISTALINO Y EVENTUALMENTE AL DESARROLLO DE CATARATAS (12).

LAS METAS GENERALES DE LA LÍNEA SON:

- 1) INVESTIGAR SI UN BLOQUEO METABÓLICO IMPUESTO POR UNA DEFICIENCIA DE LA SORD ACELERA EL DESARROLLO DE CATARATAS DIABÉTICAS
- 2) INVESTIGAR SI EXISTE ALELISMO MÚLTIPLE EN EL LOCUS DE LA SORD
- 3) CONTRIBUIR AL CONOCIMIENTO DE LA INFLUENCIA QUE TIENEN LOS FACTORES GENÉTICOS SOBRE LA VARIACIÓN INDIVIDUAL EN EL DESARROLLO DE LAS COMPLICACIONES DIABÉTICAS Y EN LA PATOGÉNESIS DE LAS MISMAS.

HEMOS INVESTIGADO LA HIPÓTESIS EN POBLACIONES DE RIESGO: TAMIZANDO PARA LA DEFICIENCIA DE SORD ERITROCITARIA EN PACIENTES CON DIABETES Y/O CATARATAS. NO PUDO DEFINIRSE EN TÉRMINOS DE NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SI EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA HUBO O NO PORTADORES DE ALELOS AMORFOS O HÍPOMORFOS PARA EL LOCUS DE LA SORD (13). SIN EMBARGO, DETECTAMOS UNA FAMILIA CON CATARATAS CONGÉNITAS Y DEFICIENCIA DE SORD ERITROCITARIA (12). SHIN Y COLS (14) REPORTARON UNA SEGUNDA FAMILIA CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS SIMILARES; AUNQUE AÚN NO SE DEFINE UNA CLARA RELACIÓN ETIOPATOGENÉTICA CATARATA-DEFICIENCIA DE SORD, ÉSTOS DATOS SUGUIEREN POLIMORFISMO EN LA ACTIVIDAD DE LA SORD ERITROCITARIA.

CON EL PROPÓSITO DE INVESTIGAR SI HAY ALELISMO MÚLTIPLE EN EL LOCUS DE LA SORD, SE BUSCARON DIFERENCIAS ENTRE INDIVIDUOS EN LAS PROPIEDADES CUALITATIVAS DE LA ENZIMA ERITROCITARIA PARCIALMENTE PURIFICADA. DURANTE ESTA INVESTIGACIÓN ENCONTRAMOS RESULTADOS PRELIMINARES INDICATIVOS DE LA EXISTENCIA DE UNA SORBITOL DESHIDROGENASA UNIDA A LA MEMBRANA DEL ERITROCITO (SORD-m) ADÉMÁS DE LA SORBITOL DESHIDROGENASA SOLUBLE (SORD-s) (11). NO CONOCEMOS ANTECEDENTES EN LA LITERATURA DE LA EXISTENCIA DE UNA SORD ERITROCITARIA MEMBRANAL.

OBJETIVO

1. El presente trabajo tiene como objetivo principal...

2. Se pretende analizar el impacto de las políticas...

3. Asimismo, se busca determinar los factores...

4. En consecuencia, se espera que los resultados...

5. Finalmente, se concluye que...

6. Los datos obtenidos durante el estudio...

7. Se observó una clara tendencia...

8. Esto se debe a la implementación...

9. de las nuevas estrategias...

10. que han permitido mejorar...

11. el nivel de eficiencia...

12. en el proceso de...

13. producción de bienes...

14. y servicios.

OBJETIVO

15. El presente trabajo tiene como objetivo principal...

16. Se pretende analizar el impacto de las políticas...

17. Asimismo, se busca determinar los factores...

18. En consecuencia, se espera que los resultados...

19. Finalmente, se concluye que...

OBJETIVO:

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS TIENE POR OBJETIVO LA EVALUACION DE LAS SIGUIENTES PROPIEDADES DE LA ENZIMA SORD-M DEL ERITROCITO HUMANO:

- 1.- ACTIVIDAD EN DIRECCION SORBITOL \longrightarrow FRUCTOSA
UTILIZANDO NAD^+ Y $NADP^+$ COMO COFACTORES
- 2.- ACTIVIDAD EN DIRECCION FRUCTOSA \longrightarrow SORBITOL
UTILIZANDO $NADH$ Y $NADPH$ COMO COFACTORES
- 3.- AFINIDAD POR FRUCTOSA
- 4.- ACTIVIDAD VERSUS PH
- 5.- ACTIVIDAD CON DIFERENTES POLIALCOHOLES: SORBITOL, GALACTITOL, RIBITOL Y XILITOL
- 6.- RESPUESTA A INHIBIDORES
- 7.- TERMOESTABILIDAD
- 8.- FENOTIPO ELECTROFORÉTICO.

LA PRESENTE TESIS REPORTA LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS ANTERIORES EN LA ENZIMA SORD-M, SIN EMBARGO, CON PROPOSITOS COMPARATIVOS, ESTAS MISMAS DETERMINACIONES SE REALIZARAN EN LA ENZIMA SORD-S.

HIPOTESIS

...

H I P O T E S I S :

LAS ISOENZIMAS DE LA SORBITOL DESHIDROGENASA ERITROCITARIA (SORD-M Y SORD-S) SON DISTINGUIBLES POR SUS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

MATERIAL Y METODOS

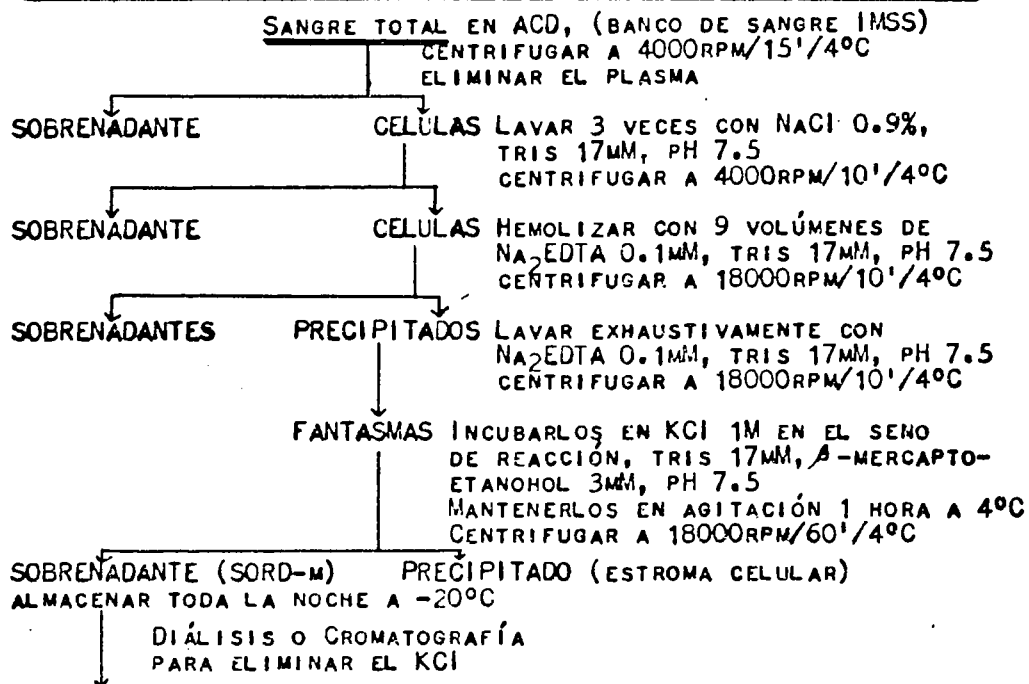
MATERIAL HUMANO:

SE OBTUVO SANGRE TOTAL COLECTADA A SOLUCIÓN ANTICOAGU - LANTE DE ACD (FÓRMULA A) PROVENIENTE DE DONADORES FAMILIARES DEL BANCO DE SANGRE DEL CENTRO MÉDICO DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. LAS MUESTRAS DE SANGRE FUERON PROCESADAS AL DÍA SIGUIENTE DE SU OBTENCIÓN.

PREPARACION DE FANTASMAS COMO FUENTE DE SORD-M :

PARA LA PREPARACIÓN DE FANTASMAS SE UTILIZÓ EL PROCEDIMIENTO DE DE Y KIRTLEY (15) QUE BÁSICAMENTE CONSISTE EN LAVAR UN HEMOLIZADO EXHAUSTIVAMENTE HASTA ELIMINAR TODA LA HEMOGLOBINA. LA SORD UNIDA A LA MEMBRANA SE LIBERA TRATANDO A LOS FANTASMAS CON KCl (VER ESQUEMA 1); LA UTILIZACIÓN DE KCl PARA LIBERAR LA SORD-M SERÁ ANALIZADA POSTERIORMENTE - EN LA DISCUSIÓN.

ESQUEMA 1 METODOLOGIA PARA LA OBTENCIÓN DE FANTASMAS DEL ERITROCITO HUMANO, MODIFICADO DE DE Y KIRTLEY (15).



MUESTRA DE SORD-M UTILIZADA PARA HACER LAS PRUEBAS PROGRAMADAS.

EVALUACION DE LAS DIFERENTES PROPIEDADES DE LA SORD-M :

1.- LA ACTIVIDAD DE LA SORD-M EN LA DIRECCIÓN OXIDATIVA SE CUANTIFICÓ EN UNA MEZCLA DE REACCIÓN CUYA COMPOSICIÓN ES LA SIGUIENTE: TRIS-HCl 100MM, PH 8.0., $MgCl_2$ 20MM., NICOTINAMIDA 5MM, NAD^+ (ó $NADP^+$) 5MM, SORBITOL 100MM.

2.- LA COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN EN DIRECCIÓN REDUCTIVA FUÉ: BUFFER FOSFÁTOS 20MM, PH 6.9., NICOTINAMIDA 2.5MM., FRUCTOSA 100MM., $NADH$ (ó $NADPH$) 1.0MM.

EN AMBOS CASOS LA ACTIVIDAD SE CUANTIFICÓ POR ESPECTROFOTOMETRÍA A 37°C DE ACUERDO AL MÉTODO DE BARRETTO Y BEUTLER (16).

3.- PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CON DIFERENTES - POLIALCOHOLES: SORBITOL, GALACTITOL, RIBITOL Y XILITOL EN DIRECCIÓN OXIDATIVA, ÉSTOS SE UTILIZARON A UNA CONCENTRACION DE 100MM.

4.- EL PH ÓPTIMO DE LA ENZIMA SE INVESTGÓ EN UN RANGO DE 6 A 11 A INTERVALOS DE 0.5; EL CLORURO DE MAGNESIO SE OMITIÓ DEL SISTEMA DE ENSAYO, DEBIDO A SU PRECIPITACIÓN A PH ELEVADOS. EL BUFFER UTILIZADO FUÉ TRIS-GLICINA-FOSFÁTO MONOSÓDICO.

5.- EN LA PRUEBA DE TERMOESTABILIDAD LA FUENTE DE ENZIMA SE INCUBÓ A 50°C, TOMANDOSE ALÍCUOTAS A LOS 10 Y 20 MINUTOS DE INCUBACIÓN, ENFRIANDOSE RÁPIDAMENTE A 4°C Y TOMANDO COMO EL 100% DE ACTIVIDAD UN CONTROL DE ENZIMA SIN INCUBAR A 50°C; LA ACTIVIDAD SE CUANTIFICÓ EN LA DIRECCIÓN SORBITOL FRUCTOSA CON NAD^+ COMO COFACTOR.

6.- PARA DETERMINAR LA AFINIDAD POR FRUCTOSA SE UTILIZARON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE 5 A 100 MM DEL SUSTRATO.

7.- LAS ELECTROFORÉISIS SE REALIZARON DE ACUERDO AL PROCEDIMIENTO DE ALVAREZ (9).

8.- LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SE REALIZÓ DE ACUERDO - AL PROCEDIMIENTO DE READ Y NARTHCOOTE (17) (ENSAYO DE UNIÓN DEL COLORANTE AZUL DE COOMASSIE).

RESULTADOS

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

EN EL TRABAJO DE TESIS DE ALVAREZ (11) SE EVALUARON LAS SIGUIENTES CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE LA SORD-M ERL TROCITARIA:

- A) TRITÓN X-100 AL 1%
- B) TRITÓN X-100 AL 1% + KCl 100mM
- C) TRITÓN X-100 AL 1% + D-SORBITOL 100mM
- D) TRITÓN X-100 AL 1% + KCl 100mM + D-SORBITOL 100mM.

LAS ANTERIORES CONDICIONES FUERON SELECCIONADAS TOMANDO COMO BASE QUE LA SORD DE MEMBRANA DE GLUCONOBACTER SUBOXIDANS VAR. α , SE LIBERA CON TRITÓN X-100 AL 1% + KCl 100mM + D-SORBITOL 100mM (18).

LOS MEJORES RESULTADOS SE OBTUVIERON CON TRITÓN X-100 AL 1% + KCl 100mM (11).

POSTERIORMENTE, DURANTE EL DESARROLLO DE ÉSTE TRABAJO DE TESIS SE INVESTIGÓ:

- A) SI LA SORD-M SE LIBERA SOLO CON TRITÓN X-100 AL 1%
- B) SI LA SORD-M SE LIBERA SOLO CON KCl.

ENCONTRAMOS QUE LA ENZIMA SORD-M NO ES LIBERADA SOLO CON TRITÓN X-100 AL 1% Y QUE SIN EMBARGO, LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AUMENTA A MEDIDA QUE SE INCREMENTA LA CONCENTRACIÓN DE KCl. ¿ESTE AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE SORD-M SE DEBE A UNA MAYOR LIBERACIÓN DE LA ENZIMA Y/O A UNA ACTIVACIÓN?

PARA DAR RESPUESTA A LA PREGUNTA ANTERIOR SE HICIERON DOS EXPERIMENTOS:

1.- MEDIR LA ACTIVIDAD DE SORD-S EN EL SOBRENADANTE DE 105000xg PROVENIENTE DE UN HEMOLIZADO CRUDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KCl. LOS RESULTADOS MUESTRAN UN INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE KCl:

CONCENTRACIÓN DE KCl (EN MOLES)	ACTIVIDAD EN %
0.00 (CONTROL)	100
0.26	172
0.53	212
0.79	241
1.06	253
1.32	272

2.- UNA PREPARACIÓN DE FANTASMAS FUÉ TRATADA CON KCl 1M PARA LIBERAR LA SORD-M. EL SOBRENADANTE DE ESTA PREPARACIÓN SE CROMATOGRAFÍO EN SEPHADEX G-25 PARA RETENER EL KCl; EL PICO DE PROTEÍNA SE USÓ COMO FUENTE DE SORD-M, MIDIENDO SU ACTIVIDAD EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KCl. NUEVAMENTE OBSERVAMOS UN INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE KCl:

CONCENTRACIÓN DE KCl (MOLES)	ACTIVIDAD EN %
0.00 (CONTROL)	100
0.25	230
0.50	330
0.75	430
1.00	390

CON LO ANTERIOR SE CONCLUYE QUE EL KCl ACTIVA A LA SORD-S Y, LIBERA Y ACTIVA A LA SORD-M.

ACTIVIDAD EN DIRECCION SORBITOL-FRUCTOSA Y FRUCTOSA-SORBITOL DE LA SORD-MI

COMO PUEDE OBSERVARSE EN LA TABLA 1, LA ACTIVIDAD EN LA DIRECCIÓN SORBITOL-FRUCTOSA UTILIZANDO $NADP^+$ COMO COFACTOR ES APROXIMADAMENTE 9 VECES MENOR QUE LA ACTIVIDAD CON NAD^+ , MIENTRAS QUE LA ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL ES DE 13 VECES MENOR CON $NADPH$ EN RELACIÓN CON $NADH$. TAMBIÉN PUEDE OBSERVARSE QUE LA REACCIÓN EN LA DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL ES APROXIMADAMENTE 25% MAYOR QUE EN LA DIRECCIÓN SORBITOL-FRUCTOSA.

**TABLA 1 PORCIENTO DE ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN
SORBITOL-FRUCTOSA Y FRUCTOSA-SORBITOL, DE SORD-m**

SUSTRATO	COFACTOR	EXPERIMENTO No.		
		1°	2°	\bar{x}
SORBITOL	NAD ⁺	100	100	100
SORBITOL	NADP ⁺	11	11	11
FRUCTOSA	NADH	100	100	100
FRUCTOSA	NADPH	8	7.	7.5
SORBITOL	NAD ⁺	100	100	100
FRUCTOSA	NADH	106	146	126

* POR DUPLICADO

EN LA PREPARACIÓN DE SORD ERITROCITARIA, BARRETTO Y BEUTLER SEÑALAN QUE LA ENZIMA PRESENTA UN SOLO PICO POR ELECTROENFOQUE, CON UN PI DE 8.96 Y UNA ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL DE SOLO 30% EN RELACIÓN A LA DIRECCIÓN OPUESTA; ASUMIENDO QUE LA ENZIMA PURIFICADA POR BARRETTO Y BEUTLER CORRESPONDE A LA SORD-S, YA QUE LA OBTIENEN A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE 13000XG DE UN HEMOLIZADO CRUDO, EN TONCES, ESTE ÚLTIMO RESULTADO CONTRASTA MARCADAMENTE CON LA SORD-S RESPECTO A LA ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL. SE SABE QUE LA SORD DE CRISTALINO HUMANO TIENE UNA ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL 7 VECES MAYOR QUE EN LA DIRECCIÓN SORBITOL-FRUCTOSA (19).

AFINIDAD POR FRUCTOSA:

LA KM POR FRUCTOSA DE LA SORD-M ERITROCITARIA ES DE 133 MM (FIGURA 2). OTROS AUTORES HAN REPORTADO LAS SIGUIENTES AFINIDADES POR FRUCTOSA PARA LA SORD DE DIFERENTES TEJIDOS DE MAMÍFEROS:

	KM (MM)
CRISTALINO HUMANO (19)	40
HÍGADO DE RATA (20)	110
HÍGADO DE RATÓN (21)	154
HÍGADO HUMANO (22)	200 SORD-1 240 SORD-2
CEREBRO HUMANO (23)	690

SE PUEDE OBSERVAR QUE LA SORD DE LAS DIFERENTES FUENTES TIENE UNA POBRE AFINIDAD POR FRUCTOSA Y PUEDE ASUMIRSE QUE EL RANGO DE CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS DE FRUCTOSA ESTÁ MUY POR DEBAJO DE ESTOS VALORES DE KM.

CURVA DE ACTIVIDAD VERSUS PH:

LA SORD-M ERITROCITARIA MOSTRÓ UN PH ÓPTIMO DE 9.5 (FIGURA 3). EL PH ÓPTIMO DE LA SORD DE OTRAS FUENTES ES EL SIGUIENTE:

FUENTE DE SORD	PH OPTIMO
ERITROCITOS (SORD-s) (16)	9.5
CRISTALINO HUMANO (19)	8.0 - 9.5
HÍGADO DE RATÓN (21)	9.0
HÍGADO DE RATA (20)	8.1 - 8.5
CEREBRO HUMANO (23)	7.5 - 9.0

COMO SE PUEDE OBSERVAR, LA SORD ERITROCITARIA SOLUBLE Y MEMBRANAL NO DIFIEREN EN SU PH ÓPTIMO.

FIGURA 2 VELOCIDAD DE LA REACCION VS CONCENTRACION DE FRUCTOSA

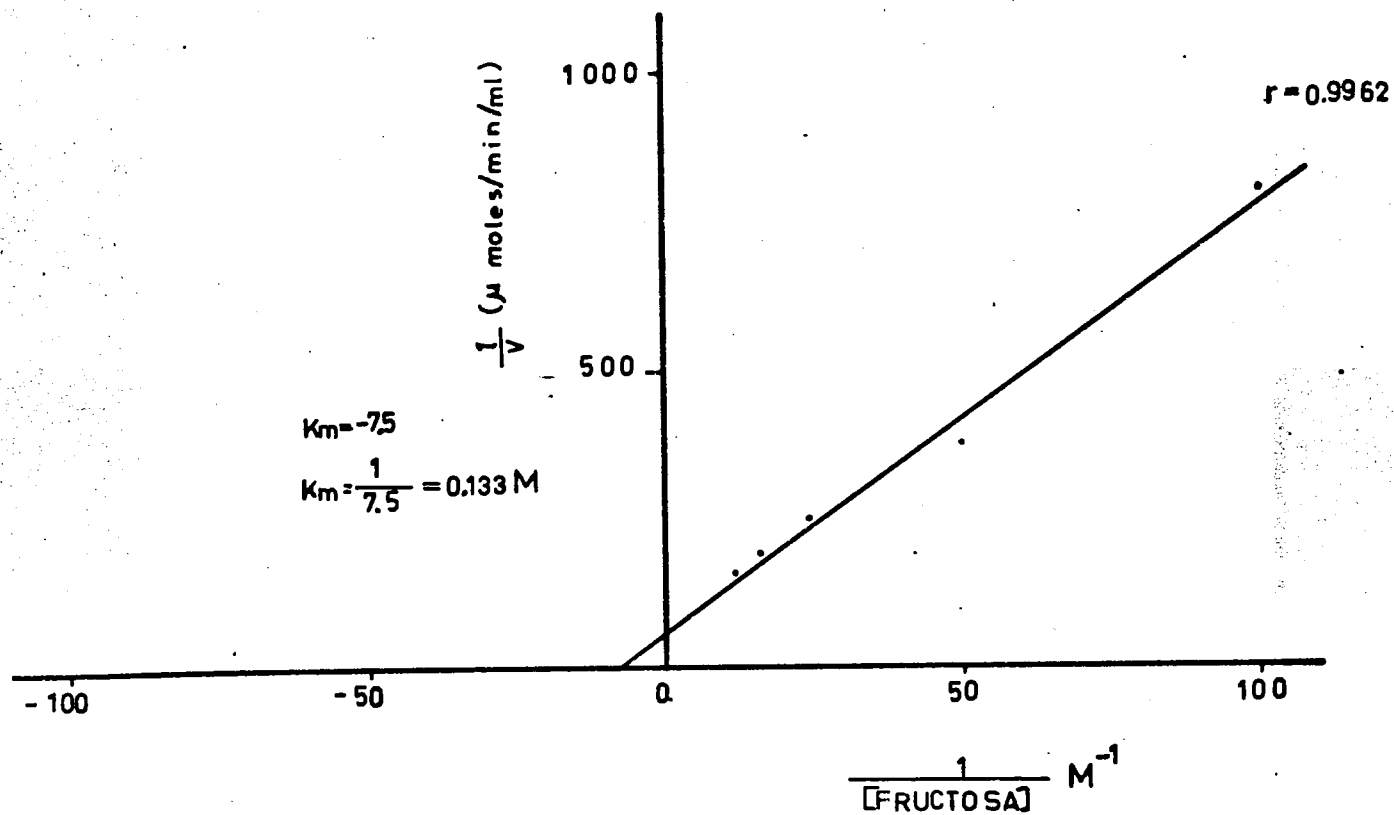
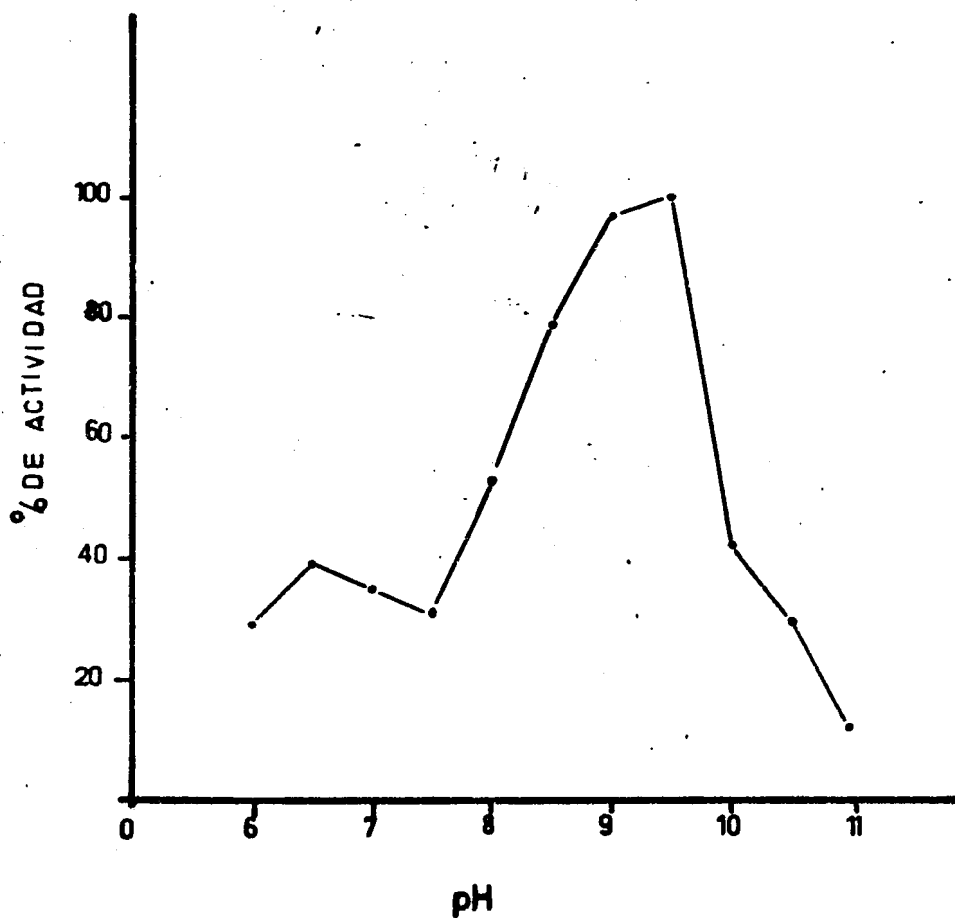


FIGURA 3 CURVA DE ACTIVIDAD VS pH.



TERMOESTABILIDAD:

LA SORD-M PIERDE 1/3 Y 2/3 DE ACTIVIDAD A LOS 10 Y 20 MINUTOS DE INCUBACIÓN A 50°C RESPECTIVAMENTE, A DIFERENCIA DE LA SORD-S, LA CUAL SOLO PIERDE 1/3 DE ACTIVIDAD A LOS 60 MINUTOS DE INCUBACIÓN A 50°C (16) (TABLA 3).

TABLA 3 PORCIENTO DE ACTIVIDAD RESIDUAL DESPUES DE LA PRUEBA DE TERMOESTABILIDAD

	EXPERIMENTO No.		
	1'	2'	\bar{x}
CONTROL	100	100	100
50°C/10MIN.	59	68	63.5
50°C/20MIN.	32	30	31

*POR DUPLICADO

EN RESUMEN:

LA SORD-M DIFIERE DE LA SORD-S (PREPARACIÓN DE BARRETTO Y BEUTLER) EN DOS PROPIEDADES:

- 1) ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL VERSUS DIRECCIÓN SORBITOL-FRUCTOSA
- 2) LABILIDAD AL CALOR.

LA MAYOR TERMOLABILIDAD DE LA ENZIMA SORD-M PUEDE EXPLICARSE POR LA EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA DE SU MICROAMBIENTE EN LA MEMBRANA, DE TAL FORMA QUE ESTRICTAMENTE HABLANDO, NO SON COMPARABLES AMBAS ENZIMAS (SORD-S Y SORD-M) RESPECTO A

ÉSTA PROPIEDAD.

NO HEMOS INVESTIGADO SI LAS PROPIEDADES CUALITATIVAS DE LA SORD ERITROCITARIA DIFIEREN EN PRECENCIA DE KCl.

ADEMÁS, COMO YA SE MENCIONÓ EN LA INTRODUCCIÓN, SERÍA INTERESANTE INVESTIGAR SI EXISTE ALELISMO MÚLTIPLE EN EL LOCUS DE LA SORD BUSCANDO DIFERENCIAS ENTRE INDIVIDUOS EN LAS PROPIEDADES CUALITATIVAS DE LA SORD-S Y LA SORD-M.

SE HA SUGERIDO QUE EL NADH PRODUCIDO DURANTE LA CONVERSIÓN DE SORBITOL A FRUCTOSA POR LA SORD ES UTILIZADO PARA LA REDUCCIÓN DE LA METAHEMOGLOBINA A HEMOGLOBINA, PROCESO QUE SE LLEVA A CABO EN EL CITOPLASMA Y QUE ES METABOLIZADO POR LA ENZIMA METAHEMOGLOBINA REDUCTASA (24). ¿CUÁL ES LA FUNCIÓN DE LA SORD-M ERITROCITARIA?

TAMPOCO HEMOS INVESTIGADO SI LA ENZIMA SE ENCUENTRA UNIDA A LA CARA INTERNA O EXTERNA DE LA MEMBRANA, NI SI LA PRIMERA ENZIMA DE LA VÍA DEL SORBITOL, LA ALDOSA REDUCTASA EXISTE EN DOS FORMAS, UNA SOLUBLE Y OTRA UNIDA A LA MEMBRANA.

RECIENTEMENTE SE DEMOSTRÓ LA EXISTENCIA DE UNA METAHEMOGLOBINA REDUCTASA FUERTEMENTE UNIDA A LA CARA INTERNA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO, SE DEMOSTRÓ QUE AMBAS ENZIMAS SON SIMILARES ANTIGÉNICAMENTE Y QUE ESTÁN CODIFICADAS POR EL MISMO GEN. SE HA SUGERIDO QUE LA METAHEMOGLOBINA REDUCTASA UNIDA A LA MEMBRANA ES EL PRODUCTO PRIMARIO DEL GEN Y POR UNA PROTEÓLISIS PARCIAL POSTSINTÉTICA SE LIBERA LA ENZIMA SOLUBLE AL CITOPLASMA. (25).

NEALON Y COLS (22) ENCONTRARON EVIDENCIAS CROMATOGRÁFICAS, ELECTROFORÉTICAS, CINÉTICAS E INMUNOQUÍMICAS INDICATIVAS DE QUE LA SORD DE HÍGADO HUMANO EXISTE EN DOS FORMAS. LOS AUTORES NO ESPECULAN SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE AMBAS FORMAS NI SI SON PRODUCTO DE UNO Ó DOS GENES.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

- 1) EL KCI INCREMENTA LA ACTIVIDAD DE LA SORD ERITROCITARIA
- 2) HEMOS ENCONTRADO LA EVIDENCIA DE UNA DIFERENCIA BIOQUÍMICA (ACTIVIDAD EN DIRECCIÓN FRUCTOSA-SORBITOL) ENTRE AMBAS ISOENZIMAS (LA SORD-S Y LA SORD-M) DEL ERITROCITO HUMANO, LO CUAL APOYA A LA HIPÓTESIS DE ÉSTA TÉSIS.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

- 1) CHYLACK LT, CHENG HM, SUGAR METABOLISM IN THE CRYSTALLINE LENS. SURV. OPHTHALMOL; 23: 26, 1978.
- 2) VAN HEYNINGEN R., THE LENS: METABOLISM AND CATARACT. EN: EYE. DAVSON H. (ED), 2A. ED. ACADEMIC PRESS, NEW YORK, PP. 381-400.
- 3) DVORNIK D, SIMMARD-DUQUESNE N, KRAMI M, SESTANG K, GABBAY KH, KINOSHITA JH, VARMA SD, MEROLA LO., POLYOL ACCUMULATION IN GALACTOSEMIC AND DIABETIC RATS: CONTROL BY AN ALDOSE REDUCTASE INHIBITOR. SCIENCE 182: 1146-1148, 1973.
- 4) VARMA SD, MIZUNO A, KINOSHITA JH, DIABETIC CATARACTS AND FLAVONOIDS. SCIENCE 195: 205-206, 1977.
- 5) GABBAY KH, THE SORBITOL PATHWAY AND THE COMPLICATION OF DIABETES. N. ENGL. J. MED., 288: 831, 1973.
- 6) GABBAY KH, MEROLA LO, FIELD RA, SORBITOL PATHWAY: PRESENCE IN NERVE AND CORD WITH SUBSTRATE ACCUMULATION IN DIABETES. SCIENCE, 151: 209, 1966.
- 7) GABBAY KH, HYPERGLYCEMIA, POLIOL METABOLISM AND COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS. ANNU. REV. MED., 26: 521 1975.
- 8) CORDER CN, BRAUGHLER JM, CULP PA, QUANTITATIVE HISTOCHEMISTRY OF THE SORBITOL PATHWAY IN GLOMERULI AND SMALL ARTERIES OF HUMAN DIABETIC KIDNEY. FOLIA HISTOCHEM. CYTOCHEM. (KRAKOW), 17: 137, 1979.
- 9) 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.

- 10) PEREA J, ESTUDIO DEL FENOTIPO ELECTROFORÉTICO DE LA ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA (EC. 1.1.1.14) EN ERITROCITOS HUMANOS., TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LIC. EN BIOLOGÍA., FACULTAD DE CIENCIA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, REG. No. 082104356, 1987.
- 11) ALVAREZ BA, "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA SORBITOL DESHIDROGENASA (EC. 1.1.1.14) ERI--TROCITARIA"., TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LIC. EN BIOLOGÍA., FACULTAD DE CIENCIA., UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA., REG. No. 080301138, 1988.
- 12) VACA G, IBARRA B, BRACAMONTES M, GARCÍA-CRUZ D, SÁNCHEZ-CORONA J, MEDINA C, GONZÁLEZ-QUIROGA G, CANTÚ JM., RED BLOOD CELL SORBITOL DEHYDROGENASE DEFICIENCY IN A FAMILY WITH CATARACTS., HUM. GENET, 61: 338, 1982.
- 13) MEDINA C, VACA G, RIOS J, CHÁVEZ-ANAYA T, OCAMPO R, GARCÍA-MARAVILLA S, ARREOLA R, CANTÚ JM., SCREENING FOR RED BLOOD CELL SORBITOL DEHYDROGENASE DEFICIENCY IN PATIENTS WITH DIABETES OR CATARACTS. OPHTHALMIC PAEDIATRICS AND GENETICS 8(3): 197-202, 1987.
- 14) SHIN YS, RIETH M, ENDRES W, HAAS P., SORBITOL DEHYDROGENASE-DEFICIENCY IN A FAMILY WITH CONGENITAL CATARACTS. J. INHER. METAB. DIS. 7 (SUPPL.2): 151, 1984.
- 15) DE BK, KIRTLEY ME, INTERACTION OF PHOSPHOGLYCERATE KINASE WITH HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., 252: 6715, 1977.
- 16) BARRETTO OOO, BEUTLER E., THE SORBITOL-OXIDIZING ENZYME

OF RED BLOOD CELL. J. LAB. CLIN. MED., 85:645, 1975.

- 17) READ SM, NORTHCOLE DH., MINIMIZATION OF VARIATION IN THE RESPONSE TO DIFFERENT PROTEINS OF THE COOMASSIE BLUE G DYE-BINDING ASSAY FOR PROTEIN. ANAL. BIOCHEM., 116: 53, 1981.
- 18) SHINGAWA E, MATSUSHITA K, ADACHI O, AMEYAMA M., PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF D-SORBITOL DEHYDROGENASE FROM MEMBRANE OF GLUCONOBACTER SUBOXIDANS VAR. AGRIC. BIOL. CHEM., 46: 135, 1982.
- 19) JEDZINIAK JA, CHYLACK LT, CHENG HM, GILLIS MK, KALUSTIAN AA, TUNG WH., THE SORBITOL PATHWAY IN THE HUMAN LENS: ALDOSE REDUCTASE AND POLYOL DEHYDROGENASE, INVEST. OPHTHALMOL. VIS. SCI., 20: 314, 1981.
- 20) NANCY LEISSING AND EUGENE T. GUINNESS., RAPID AFFINITY PURIFICATION AND PROPERTIES OF RAT LIVER SORBITOL DEHYDROGENASE., BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 524, 245-261, 1978.
- 21) BURNELL JN, HOLMES RS., PURIFICATION AND PROPERTIES OF SORBITOL DEHYDROGENASE FROM MOUSE LIVER. INT. J. BIOCHEM., 15: 507, 1983.
- 22) NEALON DA AND REJ R., HUMAN LIVER SORBITOL DEHYDROGENASE: EVIDENCE FOR TWO FORMS. SELECTED TOPICS IN CLINICAL ENZYMOLOGY, 2: 535, 1984.
- 23) O'BRIEN MM, SCHOFIELD PJ AND EDWARDS MR., POLYOL PATHWAY ENZYMES OF HUMAN BRAIN. BIOCHEM. J. 211: 81, 1983.
- 24) TRAVIS SF, MORRISON AD, CLEMENTS RS, WINEGRAD AI, OSKI FA., THE ROLE OF POLYOL PATHWAY IN METHAEMOGLOBIN REDUCTION IN HUMAN RED CELLS. BRIT. J. HAEMATOL., 27: 597, 1974.

- 25) DANIELE CHOURY, ALENA LEROUX AND JEAN-CLAUDE KAPLAN.,
MEMBRANE-BOUND CYTOCHROME B₅ REDUCTASE (METHEMOGLOBIN
REDUCTASE) IN HUMAN ERYTHROCYTES., J. CLIN. INVEST. 67:
149-155, 1981.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 605/89

SR. ALEJANDRO MARTINEZ MARTINEZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE _
LA ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA DEL ERITROCITO HUMANO ----
(SORD EC 1.1.1.14)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptada como Directora de dicha Tesis la Dra. Ma. de Lour__
des Ramírez Dueñas.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Junio 7 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. La Dra. Ma. de Lourdes Ramírez Dueñas, Directora de -
Tesis.-Pte.

c.c.p. El expediente del alumno.

Al contestar este correo diga fecha y número

Guadalajara, Jal; 4 de Julio 1989.

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas.

Director de la Facultad de Ciencias.

Universidad de Guadalajara.

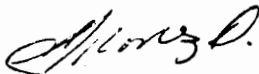
P r e s e n t e.

Estimado Ing. Espinoza:

Por medio de la presente tengo a bien informarle que en mi calidad de Directora de Tesis del pasante en Biología ALEJANDRO MARTINEZ - MARTINEZ, supervisé el desarrollo de su trabajo de Tesis titulado: "CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA DEL ERITROCITO HUMANO (SORD. EC. 1.1.1.14)".

Al mismo tiempo informo a Usted que después de haber revisado el - manuscrito final no tengo inconveniente alguno para dar mi visto -- bueno a la impresión de la Tesis.

A t e n t a m e n t e,



Dra. Ma. de Lourdes Ramírez Dueñas.
Directora de Tesis.