1985-2 Reg. No. 078521473

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS

"ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA ERITROCITARIA EN DIVERSAS NEOPLASIAS INFANTILES"

JOSE ANGEL CHAVEZ CHAVEZ

" ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA ERITROCITARIA EN DIVERSAS NEOPLASIAS INFANTILES "

PRESENTADA POR:

JOSE ANGEL CHAVEZ CHAVEZ

DIRIGIDA POR:

Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

D E D I C A T O R I A S

A MIS PADRES

FRANCISCO CHAVEZ GARCIA
ELVIRA CHAVEZ PRECIADO

Por darme la vida y su protección indicandome el camino a seguir, para ser de mi un hombre de bien, que dios los -- bendiga.

A MIS HERMANOS

RUBEN, MA. ELENA, EVANGELINA, ROMELIA, ROGELIO, MARIA, --- JORGE Y FRANCISCO.

Por ofrecer lo mejor de ellos, su apoyo y estimación representan un peldaño en mi formación.

* La meta ha sido lograda *

A LA FAMILIA CHAVEZ MURILLO

Por su lealtad y generosa hospitalidad, sinceramente muchas gracias y que dios los bendiga.

A LAS FAMILIAS OSIO NAVARRO Y ALVARADO PINTO

Por su amistad y apoyo, muchas gracias.

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

A LA Q.F.B. MA. ENRIQUETA FRANCO GAMBOA

Quimica de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S.

Por su inmensa ayuda, paciencia, apoyo y dedicación en transmitir sus conocimientos incondicionalmente para realizar esta tesis.

AL Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

Quimico de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S. y maestro de la Facultad de Ciencias

Por su colaboración y apoyo brindado.

AL DR. JOSE MARIA CANTU

Jefe de la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S.

Por darme la oportunidad y apoyo para realizar esta tesis.

AL LIC. JORGE SANCHEZ MARTINEZ

Por su intima amistad y colaboración para lograr metas deseadas.

AL LIC. GENARO MUÑIZ PADILLA

Por ser un ejemplo ante la sociedad y contribuir en la superación de sus semejantes.

A LA LIC. PATRICIA MACIAS HERNANDEZ

Por su amistad, ayuda y colaboración para la superación de quien la rodea.

C O N T E N I D O

PAGINA

INTRODUCCION 1

ANTECEDENTES 2

A.- RADICALES TOXICOS DERIVADOS DEL OXIGENO REDUCIDO 2

B.- SUPEROXIDO DISMUTASAS 7

C.- ALTERACIONES DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN PROCESOS TUMORALES 10

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13

HIPOTESIS 14

OBJETIVOS 15

MATERIAL Y METODOS 16

RESULTADOS 21

DISCUSION 31

CONCLUSIONES 34

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA 35

INTRODUCCION

Se ha informado tanto en animales de experimentación como en humanos, que durante un proceso neoplásico, la superóxido dismutasa (SOD) presenta diversas alteraciones en las células tumorales (10-17). También existen algunos reportes de modificaciones en la actividad de ésta enzima en células sanas de organismos con tumor (19-21, 23-24).

Se desconoce la importancia que ésto representa en el cancer, pero la SOD es una enzima protectora y sus alteraciones pudieran llevar a diversas consecuencias metabólicas (12,18).

El propósito del presente trabajo fué investigar la actividad de SOD en eritrocitos de niños con neoplasia.

ANTECEDENTES

A.- RADICALES TOXICOS DERIVADOS DEL OXIGENO REDUCIDO

Un acontecimiento de máxima trascendencia en la evolución de los organismos, fué el desarrollo del aparato bioquímico de la fotosíntesis. A partir de este momento, el oxígeno liberado como un subproducto se acumuló en la atmósfera y determinó un nuevo ciclo en la adaptación biológica. Los primeros organismos que evolucionaron en respuesta a éste cambio ambiental pudieron tan sólo tolerar el oxígeno; mas tarde (hace aproximadamente 1,500 millones de años) las células consiguieron emplear activamente el oxígeno, obteniendo una mayor eficiencia metabólica (1). Este nuevo cambio bioquímico también incluía un riesgo para la sobrevida de los organismos aeróbicos, debido a que carecían de la "maquinaria" para eliminar los productos derivados de la reducción parcial del oxígeno, que resultaban fuertemente oxidantes para un gran número de moléculas (2).

La reducción completa del oxígeno introduce 4 electrones produciendo agua, una molécula inerte poco reactiva; pero la reducción parcial forma productos -

tóxicos como lo son el radical superóxido (O_2^-), el ión peróxido (O_2^{-2}) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$); que al formarse dentro de un organismo interactuán con componentes celulares como son carbohidratos, proteínas y lípidos provocando la destrucción celular (3).

Un radical puede ser definido como cualquier molécula ó elemento que tiene 1 ó más electrones desapareados. En base a ésta definición ciertos elementos como hidrógeno, metales de transición y la misma molécula de oxígeno son radicales, sólo que el grado de reactividad varía según el lugar donde se encuentre el ó los electrones desapareados (4).

La molécula de oxígeno tiene 2 electrones desapareados con giro paralelo y el mismo número cuántico. Cuando pares de electrones intentan su reducción se presenta un fenómeno llamado restricción de giro, favoreciéndose la reducción univalente que lleva a la formación de un nuevo radical, con sólo un electrón desapareado, denominado superóxido (3) (figura 1).

En el organismo existen diferentes reacciones que llevan a la formación de superóxido:

1.- La oxidación de un gran número de metabolitos como son: tioles, flavinas, dihidroorotato, nitrofurantoína, fenilhidrazina producen superóxido (5).

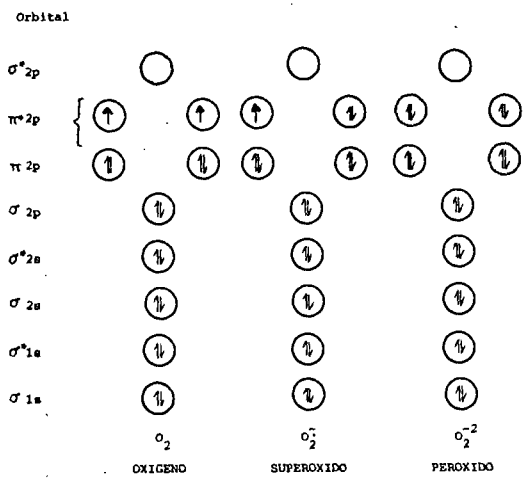


Figura 1.- Oxígeno molecular, radical superóxido, ión peróxido.

2.- Las auto-oxidaciones de moléculas como hemoglobina, mioglobina, citocromo c reducido, ferrodoxinas reducidas,- leucoflavinas, tetrahidropterinas, catecolaminas, fenoles polihídricos y nicotinamida adenina dinucleótido en presencia de deshidrogenasa láctica, frecuentemente generan superóxido (5).

3.- A través de reacciones catalizadas por enzimas específicas como son: Xantina Oxidasa (XO) y Oxidasa NADPH -- dependiente unida a la membrana:

$$\text{Xantina} + O_2 \xrightarrow{XO} \text{Urato} + O_2^-$$

$$2O_2 + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{NADPH Oxidasa}} 2O_2^- + \text{NADP}^+ + H^+$$

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato forma reducida.
NADP = Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato.

Esta última enzima es muy activa en células fagocíticas como neutrófilos, monocitos, eosinófilos y macrófagos cuando son activados por el contacto con partículas extrañas ó con complejos inmunes (5).

4.- En la cadena respiratoria mitocondrial existen 2 sitios donde el flujo de electrones puede ser desviado, formandose superóxido (figura 2). De esta misma manera en el retículo endoplásmico a través de la oxidasa de función mixta microsomal y de la cadena de transporte de electrones del citocromo P-450 el superóxido es producido (5).

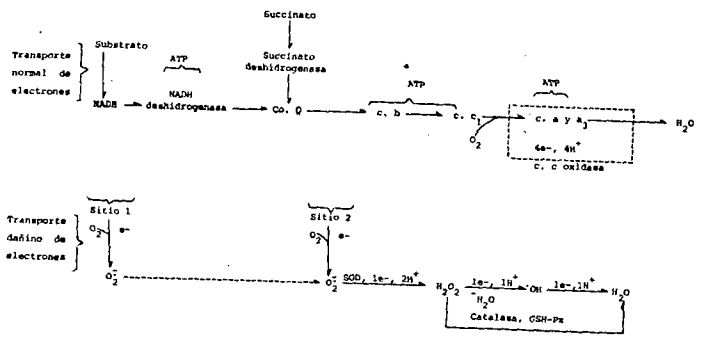


Figura 2.- Cadena respiratoria mitocondrial

Es claro por lo anteriormente expuesto que existen numerosas fuentes potenciales de superóxido, sin embargo no se ha determinado el mecanismo principal de su pro-

ducción en los diferentes tipos celulares, excepto en los granulocitos donde el superóxido es producido a través de la oxidasa NADPH dependiente unida a la membrana (7).

Cuando se agrega un segundo electrón al radical superóxido, el producto formado es el ión peróxido (O_2^{-2}), el cual se protoniza fácilmente formandose peróxido de hidrógeno (H_2O_2, figura 2), que individualmente no es muy dañino en soluciones acuosas, pero al interactuar con el superóxido a través de la reacción denominada de Haber Weiss, lleva a la formación de un producto altamente reactivo, el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$, figura 2). Esta reacción es catalizada por trazas de metales de transición, principalmente el Fe, siendo probable el siguiente mecanismo de reacción (3):

$$Fe^{+3} + O_2^{-} \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

$$O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{Fe} O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^{-} \quad \text{Reacción Neta}$$

Algunos autores han considerado que la mayor toxicidad de estos radicales viene dada por la gran reactividad del radical hidroxilo, ya que puede reaccionar rapidamente con diversos tipos de moléculas como son carbohidratos, lípidos, bases de ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos orgánicos, formando a su vez radicales secundarios de reactividad variable (3); pero la reactividad del superóxido tam-

bién ha sido demostrada en reacciones de protonación, en la peroxidación de lípidos y en la formación de radicales semiquinona (6).

B.- SUPEROXIDO DISMUTASAS

La producción de radicales toxicos derivados del oxígeno reducido en organismos aeróbicos, provocan la formación de un sistema de defensa en contra de éstos productos, el cual en la mayoría de ellos es provisto por enzimas que catalíticamente los degradan.

Las enzimas constituyen la clase de proteinas más amplia y especializada, catalizan los millares de reacciones químicas que, colectivamente, constituyen el metabolismo intermediario de las células.

Las enzimas poseen pesos moleculares que se hallan comprendidos entre 12,000 y un millon. Algunas enzimas estan constituidas solamente por una o más cadenas polipeptídicas, pero otras contienen además, algún otro componente químico, que es necesario para la actividad, y que se denomina cofactor. Puede ser éste un metal como el Fe, Mg, Mn, Zn o Cu.

Muchas enzimas aparecen en más de una forma molecular en una misma especie, tejido o aún dentro de la misma célula. Tales formas multiples se llaman isoenzimas o

isozimas (8).

Los principales mecanismos que dan lugar a la formación de isoenzimas son:

a).- La presencia de varios loci génicos codificando para cadenas estructuralmente diferentes a la enzima.

b).- La presencia de varios alelos (alelismo múltiple) en un sólo locus determinando formas estructurales diferentes a una cadena polipeptídica particular.

c).- Modificaciones post-traduccionales de la estructura enzimática que lleva a la formación de las llamadas "isoenzimas secundarias" (9).

Entre las enzimas protectoras para las destoxificaciones de los radicales producidos por la reducción del O_2 tenemos a las superóxido dismutasas, a la catalasa y a las peroxidasas.

En 1969 McCord y Fridovich reconocieron la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), cuya función es la de destoxificar el radical superóxido en una reacción dismutiva, formando peróxido de hidrógeno:

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

A su vez la catalasa y las peroxidasas reducen el peróxido de hidrógeno para formar agua (2):

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalasa} O_2 + H_2O$$

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Glutatión Peroxidasa}} GSSG + H_2O$$

La dismutación del superóxido puede ocurrir espontáneamente, pero las SOD son catalizadores tan efectivos, que logran velocidades de 2×10^4/M seg a 25 °C (6).

En todas las células eucariotas se tienen dos isoenzimas de la superóxido dismutasa: SOD 1 y SOD 2.

La SOD 1, es un dímero constituido por subunidades idénticas, cada una conteniendo un átomo de cobre y uno de zinc, es sensible a cianuro y H_2O_2 y su peso molecular es de 31,400. El cobre es requerido para llevar a cabo el ciclo de óxido-reducción durante la dismutación del superóxido y el zinc no se involucra en el ciclo redox, pero mantiene la estructura del sitio activo de la isoenzima y facilita el paso oxidativo. La encontramos en el citosol y en el espacio intermembranal de la mitocondria. Está asignada al cromosoma 21 segmento q22 (2).

La SOD 2, es un tetrámero formado por el mismo tipo de subunidad y contiene manganeso (4 átomos para la especie humana). El manganeso al igual que el cobre de la SOD 1 está involucrado en el ciclo catalítico. Tiene un peso molecular de 84,100, y su localización cromosómica corresponde al cromosoma 6 segmento q21. Es resistente al cianuro y al H_2O_2. La encontramos en la matriz mitocondrial y en el ectoplasma bacteriano (2).

GSH: Glutatión reducido.
GSSG: Glutatión oxidado.

C.- ALTERACIONES DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN PROCESOS TUMORALES

Durante el proceso neoplásico las actividades de las dos isoenzimas de SOD presentan diversas alteraciones. Con mayor frecuencia se ha encontrado una deficiencia total de SOD 2 en las células neoplásicas de modelos experimentales como: el Tumor Ascítico de Ehrlich, Hepatoma H6, Melanoma S91 Leucemia 1210, Carcinoma Mamario C3H y en Neuroblastoma (10,11,12). En tanto que en humanos sólo se ha reportado ausencia de SOD 2 en pacientes con leucemia (13); mientras que en Tumores Sólidos de humano la actividad de SOD 1 y SOD 2 son similar a la normal (14).

Además se ha reportado una deficiencia parcial de SOD 2 en Fibroblastos WI-38 transformados con SV-40 (12), y en tumores de crecimiento medio y rápido de el Hepatoma de Morris, pero no en los de crecimiento lento (15).

También existen reportes en donde se menciona una disminución de la actividad de SOD, aunque sin determinar a cual isoenzima corresponde, tal es el caso del Carcinoma de Lewis en pulmón, Plasmocitoma PC6, Leucemia Linfocítica P388, Carcinoma de Vejiga y Epiteloma W 256 (16). Así como también en Tumor Ascítico de Ehrlich, Tumor Ascítico de Yoshida y Tumor Ascítico de Hepatoma Movikoff (17).

Por otra parte se sabe que en Neuroblastoma de

ratón la SOD 1, se encuentra disminuida y elevada en Leucemias de humano y en Fibroblastos WI-38 transformados con SV-40 (12, 13).

Se desconoce la importancia que tengan éstas alteraciones en cancer, pero SOD es una enzima protectora y su ausencia pudiera llevar a diversas consecuencias metabólicas. Oberley L.W. y colaboradores han hipotetizado que la deficiencia de SOD 2 pudiera ser un factor determinante en la iniciación y progresión de un tumor (18).

Por otra parte la actividad de SOD ha sido valorada en "tejidos sanos" de ratones portadores de tumor, encontrando disminuída la actividad de SOD 2 en hígado, bazo y riñón de ratones con tumor ascítico de Ehrlich (19); mientras que en ratones con carcinoma de Lewis no se alteró la actividad enzimática en hígado ni en pulmón, pero en eritrocitos se incrementó (20).

En los eritrocitos, dado que carecen de mitocondrias, sólo se expresa la actividad de SOD 1, que también se ha reportado incrementada en pacientes portadores de neoplasias hematológicas (21); no siendo así en los pacientes portadores de cánceres viserales (21, 22).

En un estudio realizado por nuestro laboratorio en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS, se encontró elevada la actividad de SOD eritrocitaria-

(SOD_E) en pacientes adultos tanto con neoplasias de origen hematológico como con tumores sólidos, observando un incremento mayor en los pacientes sin tratamiento (23, 24).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes anteriores relacionados con la valoración por diferentes autores de los niveles de SOD en tejidos sanos de organismos con tumores, sugieren que la actividad de la enzima se altera de manera secundaria en células que no están afectadas directamente por el proceso maligno y pudieran tener una gran importancia en el deterioro subsecuente de todo el organismo por la neoplasia.

Dado que en la población infantil la incidencia de neoplasias también es elevada; se realizó la determinación de SOD eritrocitaria en diversas neoplasias infantiles, con el objeto de conocer si en esta población la enzima se encuentra alterada.

HIPOTESIS

La actividad de SOD_E de neoplasias infantiles, se encuentra aumentada.

OBJETIVOS

1.- Determinar la actividad de SOD_E en neoplasias infantiles.

2.- Obtener los valores normales de SOD_E en individuos menores de 15 años de nuestra población.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se estudiaron 44 pacientes (23 niñas y 21 niños) con diferentes neoplasias entre las cuales tenemos; 18 con Leucemia Linficítica Aguda (LLA), 7 con Linfoma de Hodgkin (LH), 5 con Linfoma no Hodgkin (LNH), 3 con Nefroblastoma (NFB), 2 con Histiocitosis (H), 2 con Neuroblastoma (NB), 2 con Leucemia Mieloblástica (LM), y uno con Disgerminoma Ovárico (DGO), Adenocarcinoma Intestinal (ACI), Teratocarcinoma Mediastinal (TCM), Leucemia Monoblástica (LMO) y Rabdiomiosarcoma (RMS). Estos pacientes asistían al tratamiento quimioterápico ó estaban internados en los pisos de Oncología y Hematología, del Hospital de Pediatría del Centro Médico de Occidente del IMSS. Sus edades oscilaron entre 3 a 16 años de edad, y se encontraban con diferente tipo y grado de tratamiento, pudiendo ser Quirúrgico, Radiológico ó por Quimioterapía, aplicados individualmente ó en combinación.

TESTIGOS

Los valores normales fueron obtenídos de 17 niños sanos ó por lo menos sin enfermedad aparente, con edad y sexo similar a los pacientes.

EQUIPO

Centrífuga, Congelador a -40 °C, Espectrofotómetro PMQ III y Vortex.

REACTIVOS

-Solución salina fisiológica al 0.85 %.

-Solución Drabkin.

-*Buffer Trisma base 1M, EDTA 5mM ajustado a pH 8.0 con HCl concentrado.

-*Pirogalol 4mM. El pirogalol (Acido Pirogálico) es purificado por sublimación y disuelto en solución ácida (HCl 10mM). Se conserva al abrigo de la luz.

-HCl 0.6 M.

OBTENCION DE LA MUESTRA

A cada niño se le tomó una muestra de 4 ml. de sangre venosa periférica con EDTA como anticoagulante. Se hicieron dos partes de la muestra una para determinar biometría hemática y otra para determinar la actividad de la enzima.

* Estos reactivos fueron preparados en la cantidad necesaria para todas las determinaciones y conservados en alícuotas a -40 °C, para evitar diferencias de preparación.

EDTA = Etilendiamino tetra-acetato disódico.

La biometría hemática se realizó en un contador Coulter modelo S. El resto de la muestra se lavó en 3 ocaciones con solución salina fisiológica 0.15 M, eliminando el sobrenadante y la capa de leucocitos en cada lavado, posteriormente se guardó en congelación a -40 °C hasta el momento de cuantificar la enzima (no mayor de 45 días).

PREPARACION DEL HEMOLIZADO

De las muestras lavadas se tomaron 0.15 ml. y se mezclaron con 0.25 ml. de agua destilada fría para preparar un hemolizado al que se le cuantificó la hemoglobina por el método de Drabkin (25). Enseguida se procedió a la obtención de un extracto libre de hemoglobina ya que interfiere en la cuantificación enzimática.

PREPARACION DEL EXTRACTO

El extracto se preparó con 0.25 ml. de hemolizado, al cual se le adicionó 1.75 ml. de agua destilada fría, 0.5 ml. de etanol, mezclando despues de cada adición y finalmente 0.3 ml. de cloroformo, agitando durante un minuto, los tubos se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos a 3,000 rpm y el sobrenadante claro se utilizó como fuente de SOD.

DETERMINACION ENZIMATICA

La actividad de SOD se determinó de acuerdo al método de Beutler (26), con modificaciones hechas en nuestro laboratorio (24). Este método está basado en la oxidación del pirogalol (solución incolora), produciendo purpurogalina (solución amarilla), a través de una reacción en cadena dependiente de la presencia de radicales superóxido (27). En medio ácido esta reacción procede muy lentamente, mientras que en medio alcalino ocurre rápidamente, pudiéndose determinar los cambios de absorvancia a 420 nm.

La SOD por inhibición competitiva, impide la oxidación del pirogalol y la cantidad de enzima que produce un 50 % de inhibición es definida como una unidad de actividad enzimática.

Los extractos fueron ensayados por duplicado en una mezcla de reacción constituída por un buffer Tris 1 M a pH 8.0 con cantidades variables del extracto: 0, 40, 80, 120, 160 y 200 µl. Se toma la lectura basal en densidad óptica (D. O.) a 420 nm, posteriormente se agregan 100 µl de pirogalol 4 mM y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las modificaciones realizadas consistieron en detener la oxidación a través de acidificar el medio con 200 µl de HCl 0.6 M, procediendo a tomar una segunda lectura en absorvancia y así determinar los incrementos en D. O.

A mayor cantidad de extracto se impide más la oxidación del pirogalol y menor es el incremento en D.O. -- Estos dos parámetros son graficados para obtener una fun--- ción lineal, de la que se determinan los ml. de muestra requeridos para inhibir el 50 % de la oxidación.

Para calcular la actividad enzimática (AE) se utiliza la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{11.2 \times HCM}{(ml\ 50\ \%\ I)(g\ Hb/100\ ml)(100)} = U \times 10^{-8}/cel.$$

Donde:

$$11.2 = \text{Factor de Dilución} = \frac{2.8\ \text{(volumen final del extracto)}}{0.25\ \text{(volumen del hemolizado utilizado para el extracto)}}.$$

HCM = Valor de Hemoglobina Corpuscular Media (picogramos).

EVALUACION DE RESULTADOS

Los resultados de la actividad de SOD_E en niños con neoplasia y sin neoplasia se analizaron mediante la -- prueba "t" de Student para experimentos apareados con curva de distribución normal (28).

La correlación de la actividad enzimática con - varios diferentes parámetros se realizó mediante el calculo del coeficiente de correlación de Pearson (28).

RESULTADOS

Los resultados de la actividad de SOD_E en el grupo de niños testigo fué de 3.86 $\pm$ 0.62 U x 10^{-8}/cel.

La tabla 1 y figura 3 presentan algunos datos individuales y la actividad de SOD_E de los pacientes estudiados. El rango de actividad fué de 3.19 a 7.69 U x 10^{-8}/cel, con un promedio de 4.90 $\pm$ 0.91 U x 10^{-8}/cel; observando un aumento de actividad de 26 % en los pacientes respecto a los testigos, el cual fué estadísticamente significativo con $P < 0.001$ (ver tabla 2).

Al subdividir los pacientes tomando en consideración si recibieron ó no terapia, así como el origen de la neoplasia (hematológica ó tumores sólidos), se observó lo siguiente (ver tabla 2 y figura 4):

a) Mayor actividad en el grupo total de pacientes que no recibieron tratamiento 5.20 $\pm$ 0.85 U x 10^{-8}/cel (33.7 % de incremento), altamente significativa cuando se compararon con los valores normales ($P < 0.001$).

b) Actividades similares en pacientes con tumores sólidos (4.89 $\pm$ 1.18 U x 10^{-8}/cel) y en pacientes con neoplasias hematológicas (4.91 $\pm$ 0.85 U x 10^{-8}/cel), que mostraron diferencias significativas estadísticamente cuando se

compararon con los testigos ($P < 0.01$ y $P < 0.001$ respectivamente).

c) En el grupo con tumores sólidos, resultaron muy evidentes la marcada elevación (45.8 % de incremento) de los niveles de SOD_E en los pacientes sin tratamiento; así como la normalización (solamente 2.6 % de incremento) de la actividad en los pacientes con tratamiento.

d) En el grupo con neoplasias hematológicas no se normalizaron los niveles de actividad enzimática en los pacientes que se encontraban bajo tratamiento (28.2 % de incremento). Además en los que no recibieron tratamiento la actividad incrementó solamente en 16.1 %.

La tabla 3 y figura 5 presentan los resultados de los pacientes clasificados por enfermedad, así como las comparaciones con el grupo testigo. Solamente 4 subgrupos de malignidad fueron consideradas, ya que las otras neoplasias no excedían a 2 casos, encontrando el mayor aumento de la actividad de SOD_E en el Linfoma de Hodgkin con 5.25 ± 0.50 U x 10^{-8}/cel, que representa un 36 % de incremento, enseguida la Leucemia Linfocítica Aguda con 4.86 ± 1.06 U x 10^{-8}/cel (25 %), luego el Linfoma no Hodgkin con 4.69 ± 0.48 U x 10^{-8}/cel (21.5 %) y finalmente el Nefroblastoma con 4.61 ± 1.00 U x 10^{-8}/cel (19.4 %). En las 3 primeras la diferencia con respecto a los testigos fué estadísticamente significativa ($P < 0.001$, $P < 0.01$ y $P < 0.02$ respectivamente); pero no así

el nefroblastoma, que para el análisis estadístico no pudo ser considerado, ya que estaba constituído por 3 pacientes.

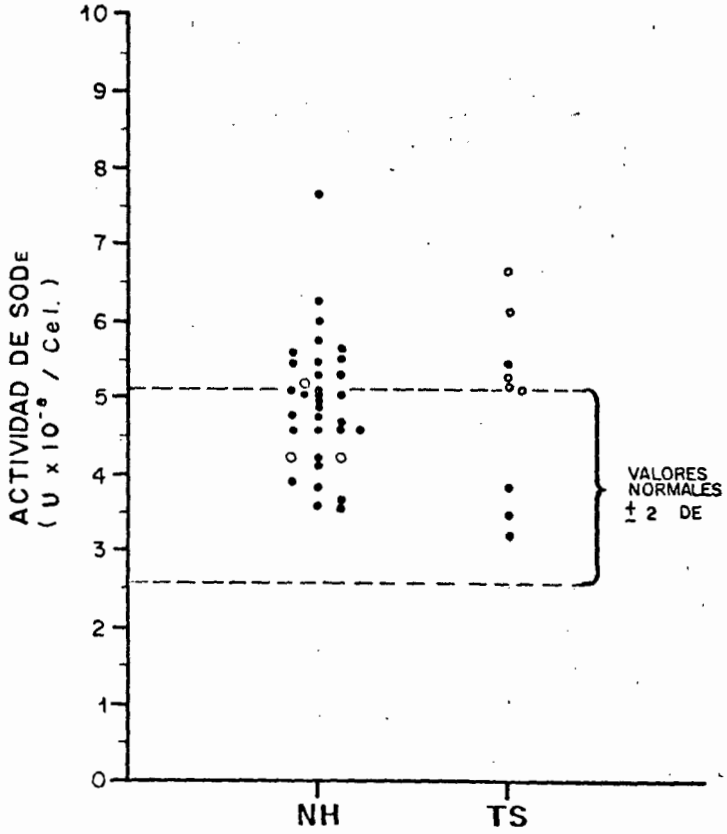
Las correlaciones entre niveles de actividad enzimática versus número de eritrocitos, concentración de hemoglobina, valor de hematocrito; tiempo de tratamiento y edad de los pacientes; tuvieron coeficientes de correlación muy bajos-sin significancia estadística (ver tabla 4).

Tabla 1.- DATOS INDIVIDUALES DE PACIENTES INFANTILES CON NEOPLASIAS.

DIAGNOSTICO	SOD U x 10^{-8}/cel.	MESES DE TRATAMIENTO
LLA	4.84	16
LLA	6.29	5
LLA	4.93	4
LLA	3.81	5
LLA	3.52	1
LLA	4.75	D
LLA	4.59	21
LLA	7.69	16
LLA	5.29	D
LLA	5.09	27
LLA	5.28	5
LLA	3.58	10
LLA	4.11	0
LLA	4.16	5
LLA	5.75	36
LLA	3.62	D
LLA	4.57	1
LLA	5.63	22
LH	4.69	39
LH	6.00	18
LH	5.46	7
LH	5.51	25
LH	4.58	5
LH	5.43	10
LH	5.08	4
LNH	5.01	17
LNH	4.10	5
LNH	5.09	1
LNH	4.23	0
LNH	5.01	11
H	4.79	3
H	5.59	D
LM	4.58	D
LM	3.91	D
LMO	5.14	6
NFB	5.11	0
NFB	5.25	0
NFB	3.46	20
NB	5.41	16
NB	5.07	0
ACI	6.64	0
RMS	6.10	0
TCM	3.80	3
DGO	3.19	D

LLA = Leucemia Linfocítica Aguda, LH = Linfoma de Hodgkin, LNH = Linfoma No Hodgkin, H = Histiocitosis, LM = Leucemia Mieloblástica, -- LMO = Leucemia Monoblástica, NFB = Nefroblastoma, NB = Neuroblastoma- ACI = Adenocarcinoma Intestinal, RMS = Rabdiomiosarcoma, TCM = Teratocarcinoma Mediastinal, DGO = Disgerminoma Ovárico, D = Desconocido.

Fig. 3.- ACTIVIDAD DE SODE EN PACIENTES INFANTILES CON NEOPLASIAS DE ORIGEN HEMATOLOGICOS (NH) Y TUMORES SOLIDOS (TS).



● CON TRATAMIENTO.
O SIN TRATAMIENTO.

Tabla 2.- ACTIVIDAD DE SOD ERITROCITARIA DE NIÑOS NORMALES Y CON NEOPLASIAS.

	n	*SOD_E U x 10^{-8}/cel	INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD EN %	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA**
Neoplasias Totales	44	4.90 ± 0.91	26.0	$P < 0.001$
Sin Tratamiento	8	5.20 ± 0.85	33.7	$P < 0.001$
Con Tratamiento	36	4.83 ± 0.92	24.2	$P < 0.001$
Tumores Solidos	9	4.89 ± 1.18	26.7	$P < 0.01$
Sin Tratamiento	5	5.63 ± 0.70	45.8	N.S.
Con Tratamiento	4	3.96 ± 0.99	2.6	N.S.
Neoplasias Hematologicas	35	4.91 ± 0.85	27.2	$P < 0.001$
Sin Tratamiento	3	4.48 ± 0.53	16.1	N.S.
Con Tratamiento	32	4.95 ± 0.86	28.2	N.S.
Testigos	17	3.86 ± 0.62		

* = Promedio ± desviación estandar.
N.S. = No Significativo.
** = Comparación realizada con respecto a los controles.

Fig. 4.- ACTIVIDAD DE SODE EN PACIENTES ONCO — LOGICOS CON Y SIN TRATAMIENTO.

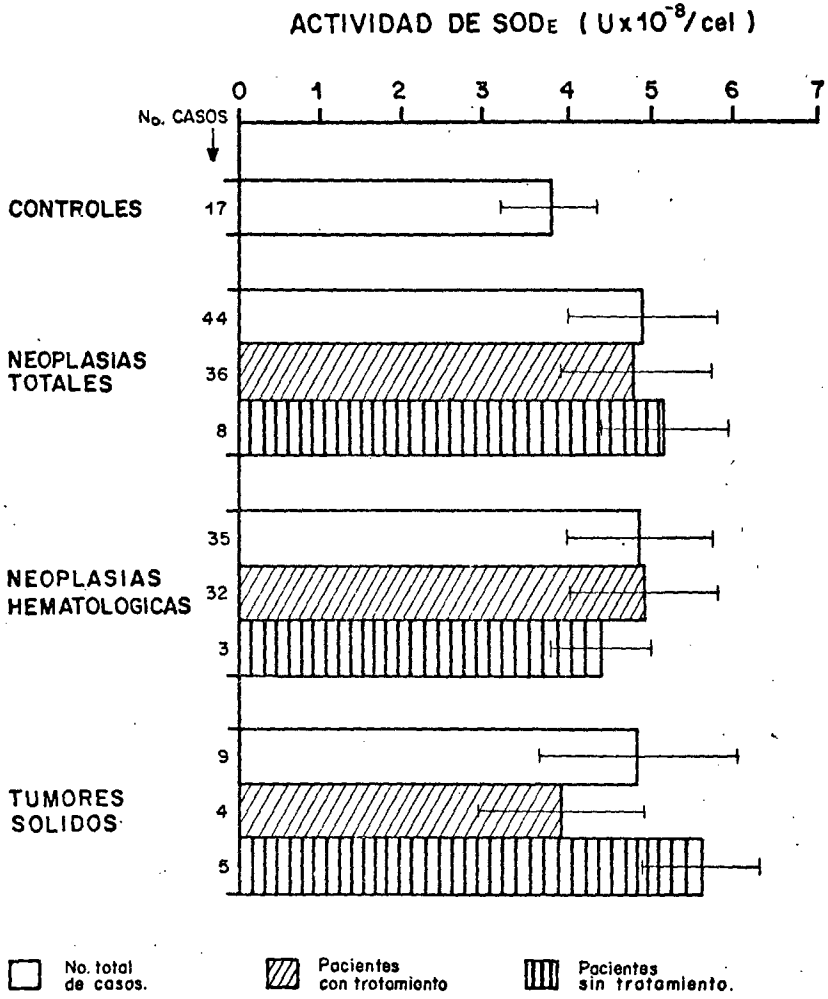


Tabla 3.- ACTIVIDAD DE SOD ERITROCITARIA EN LAS DIFERENTES NEOPLASIAS.

		*SOD_E U x 10^{-8}/cel	INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD EN %	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA**
Linfoma de Hodgkin	7	5.25 ± 0.50	36.0	$P < 0.001$
Leucemia Linfocítica Aguda	18	4.86 ± 1.06	25.9	$P < 0.01$
Linfoma no Hodgkin	5	4.69 ± 0.48	21.5	$P < 0.02$
Nefroblastoma	3	4.61 ± 1.00	19.4	N.S.
Testigos	17	3.86 ± 0.62		

* = Promedio ± desviación estandar.
N.S. = No Significativo.
** = Comparación realizada con respecto a los controles.

Figura 5. ACTIVIDAD DE **SOD**E EN GRUPOS CON DIFERENTES NEOPLASIAS.

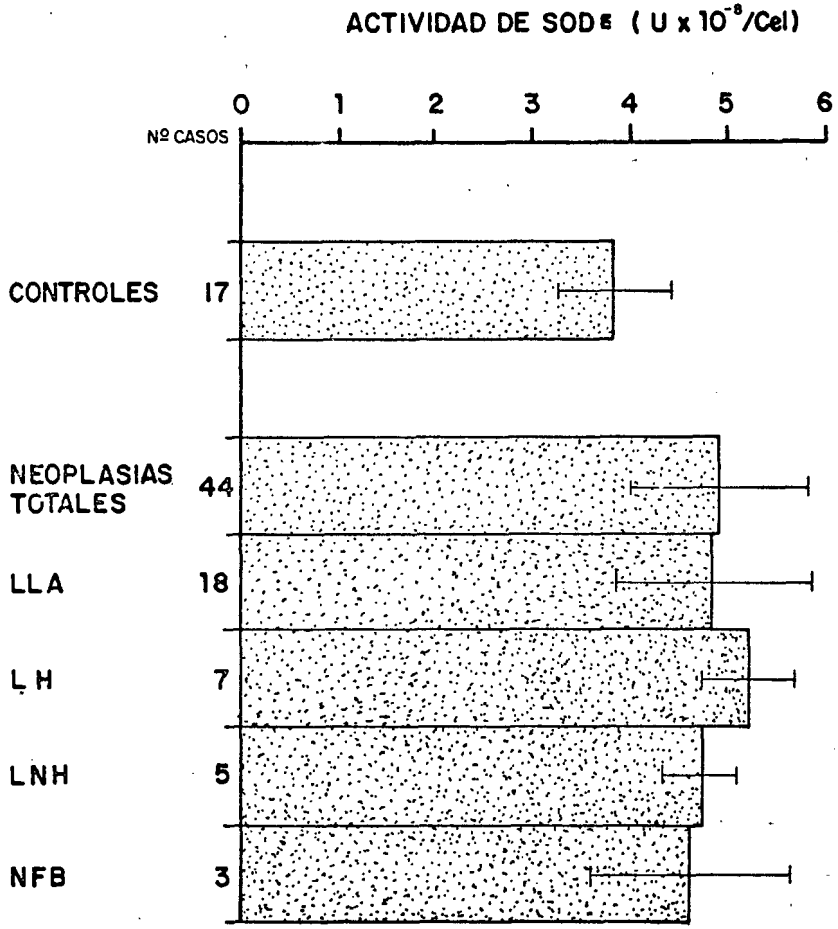


Tabla 4.- CORRELACION DE DIFERENTES PARAMETROS CON LA ACTIVIDAD DE SOD_E

Parametros	E en millones/mm^3	Hb en g/100 ml	Ht en %	Edad en años	Tiempo de tratamiento en meses
No. de Casos	39	39	39	25	37
Coeficiente de Correlación	-0.1008	0.1639	0.1427	0.2138	0.2074
Significancia Estadística	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

E = Eritrocitos
Hb = Hemoglobina
Ht = Hematocrito
N.S. = No Significativo

DISCUSION

En las determinaciones enzimáticas es aconsejable usar métodos donde la reacción de la enzima con el sustrato sea medida directamente, pero para SOD dichos métodos requieren equipo y reactivos costosos e inaccesibles para nosotros. El método de pirogalol es una forma indirecta de cuantificar la enzima, ya que usa un componente generador del radical superóxido y otro componente reaccionando con el radical de una manera medible; sin embargo es reproducible, de fácil implementación y con las modificaciones realizadas, la determinación se obtiene en un tiempo más corto.

La actividad de SOD_E obtenida en el grupo testigo infantil (3.86 ± 0.62 U x 10^{-8}/cel) es menor a los valores anteriormente obtenidos en el grupo testigo de adultos (4.98 ± 0.56 U x 10^{-8}/cel); ambos cuantificados por el método modificado. Los valores previamente reportados por otros autores en recien nacidos, son similares a los de adulto (29,30); no obstante, existe un reporte donde también encuentran menor actividad en niños que en adultos (32).

En las neoplasias infantiles estudiadas encontramos un incremento mayor de la actividad de SOD_E (26.0 %) que el aumento observado en neoplasias adultas (5.0 %). Esta elevación mayor quizás estuviera relacionada con los cambios-

presentados por la enzima con la edad, pero excluímos ésta posibilidad ya que la correlación entre los niveles de actividad y la edad de los pacientes no fué estadisticamente significativa.

En las neoplasias totales sin tratamiento, la actividad enzimática fué mas elevada y esto mismo ocurrió en el subgrupo de tumores sólidos; sin embargo en el subgrupo de neoplasias hematológicas los pacientes sin tratamiento no mostraron mayor incremento, pudiendo ésta discrepancia ser debida al número tan reducido de casos en éste subgrupo. La mayor elevación en los pacientes sin tratamiento nos hace suponer que los niveles de SOD tienden a normalizarse por efecto terapeútico, sin embargo la correlación entre actividad enzimática y tiempo de tratamiento no fué muy alta quizás porque los niveles no descienden más que los valores normales.

La SOD_E se encuentra elevada en el Síndrome de Down (trisomia 21) en un 50 % aproximadamente, por efecto de dosis génica (31), ya que el locus que codifica para SOD 1 está localizado en el cromosoma 21 q22. También ha sido reportada incrementada en patologías donde no existe relación aparente con el cromosoma 21 como son: la Policitemia Vera (22), pacientes con Hemodiálisis (22) y la Fibrosis Quística (32); así como en patologias que se asocian con disturbios hematológicos como individuos con Hb S (33), Hb H (35), B°-talasemia (35, 36) y anemia por deficiencia de hierro (34). Los paci---

entes sufriendo de neoplasias extensivas, frecuentemente presentan anemia normocítica hipocrómica y podría ser que ésta-- alteración hematológica fuera la causa del incremento de SOD_E en las neoplasias; sin embargo nosotros no encontramos correlación estadística significativa entre los niveles de actividad y 3 parámetros hematológicos que fueron: número de eritrocitos, concentración de hemoglobina y valor de hematocrito.

Aunque no son muchos los diferentes grupos de-- neoplasias analizadas; todas ellas mostraron incremento en la actividad de SOD_E y pensamos que la determinación de ésta -- enzima, pudiera servir como una prueba auxiliar en el diagnóstico de una malignidad.

En base a los resultados de este estudio y del realizado previamente en pacientes adultos (24), se observa y se concluye que la SOD_E está elevada en las neoplasias hematológicas y en los tumores sólidos, indicando por las correla-- ciones hechas que el incremento es causado por un efecto di-- recto del tumor. Se ha sugerido que la disminución de SOD 2 - en órganos distantes del tumor, son debidas a un factor como toxohormona que actúa como represor en la síntesis de la isoenzima (19). El incremento de SOD 1 pudiera ser producido por este mismo factor ó por otro factor elaborado por el tumor, - que activa a la enzima o estimula su síntesis; ó bién la deficiencia de SOD 2 provocaría un incremento de SOD 1 como un mecanismo compensatorio, ya que ha sido claramente demostrada - la inducibilidad de los genes de SOD (37).

CONCLUSIONES

1.- Se demostró la elevación de SOD_E en las neoplasias infantiles a semejanza de lo que ocurre en las neoplasias de adultos.

2.- El incremento de SOD_E se observa en las diferentes neoplasias estudiadas.

3.- El tratamiento antineoplásico tiende a normalizar la actividad de SOD_E en los tumores sólidos.

4.- En individuos sanos, la actividad de SOD_E es mayor en adultos que en niños.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1.- Sehopf J.W.: La evolución de las cēlulas primitivas, En Evolución, Libros de investigación y ciencia. 2da. Edición. Editorial Labor S.A., 4: 49-68, 1982.

2.- McCord J.M.: Superoxide dismutases; Ocurrence, structure, function and evolution; Alan R. Liss, Inc., New York, Isozymes: Current Topics in -- Biological and Medical Research, 3: 1-21, 1979.

3.- Halliwell B., Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease: Biochem J, 219:1-14, 1984.

4.- Masterton W.L. y Slowinski E.J.: Quimica general superior. 4ta. Edición Editorial Interamericana, 1979.

5.- Petkau A.: Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase: Cancer Treat Rev, 13: 17-44, 1986.

6.- Fridovich I.: Superoxide radical; An endogenous toxicant: Ann Rev Pharmacol. Toxicol, 23:239-257, 1983.

7.- Babior B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. Parts I- and II N Engl J Med, 298: 659-58, 721-25, 1979.

8.- Lehninger: Curso breve de bioquimica; Ediciones Omega S.A. Cap. 1: pag. 71-88, 1981.

9.- Harris H. and Hopkinson: Handbook of enzyme electrophoresis in human -- genetics: North-Holland Publishing Company, 1:1-12, 1976.

10.- Sahu S.K., Oberley L.W., Steven R.H. and Riley E.F.; Brief comunication Superoxide dismutase activity of Ehrlich ascites tumor cells: JNCI, 58-

(4): 1125-1127, 1977.

11.- Oberley L.W. et al.: Superoxide dismutase activity of normal murine ---- liver, regenerating liver, and H6 hepatoma: JNCI, 61(2): 375-379,1978.

12.- Oberley L.W. and Buettner G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer;- A Rev Can Res, 39:1141-1149, 1979.

13.- Yamanaka N. et al: Increase of superoxide dismutase activity in various- human leukemia cells; Physiol Chem and Physics, 11: 253-256, 1979.

14.- Westman N.G. and Marklund S.L.: Copper and zinc-containing superoxide-- dismutase and manganese containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors; Can Res, 41: 2962-2966, 1981.

15.- Bize I.B., Oberley L.W., and Morris H.P.: Superoxide dismutase and super oxide radical in Morris hepatomas, Can Res, 40: 3686-3693, 1980.

16.- Tisdale M.J. and Mahmoud M.B.: Activities of free radical metabolizing - enzymes in tumours; Br J Can, 47: 809-812, 1983.

17.- Bozzi A. et al: Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. II. - erythrocytes and tumor cells; Mol Cel Biochem, 10(1): 11-16, 1976.

18.- Oberley L.W.: The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis; J Theor Biol, 106: 403-422, 1984.

19.- Leuthauser W.C., et al: Lowered superoxide dismutase activity in distant organs of tumor-bearing mice. JNCI, 72(5): 1065-1074, 1984.

20.- Capel I.D. and Thornley AC.: Superoxide dismutase activity, caeruloplas- min activity and lipoperoxide levels in tumour and host tissues of mice bearing the Lewis lung carcinoma. Eur J Can Clin Oncol, 18(5): 507-513,- 1982.

21.- Gonzalez R. et al: Superoxide dismutase, catalase and glutathiones ----

peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases; -- Can Res, 44: 4137-4139, 1984.

22.- Michelson, A.M., Puget K., and Durosay P. Clinical aspects of the dosage of erythrocuprein. In: A.M. Michelson, J.M. McCord, and I. Fridovich (eds), Superoxide and Superoxide Dismutase: Academic Press, New York; - pags 467-499, 1977.

23.- Investigación de superóxido dismutasa en pacientes con enfermedades malignas; Tesis profesional para obtener el titulo de Quimico Farmacobiologo presentada por Ma. del Carmen Carrillo Perez; Universidad de Guadalajara, Feb. de 1986.

24.- Confirmación de la actividad elevada de superóxido dismutasa eritrocitaria en diferentes neoplasias. Tesis que presentará Clara Hernández Cabrera para obtener el Titulo de Quimico Farmacobiologo, Facultad de --- Ciencias Quimicas, Universidad de Guadalajara.

25.- Bayardo, P.B. En apuntes de analisis clinicos. 5ta. Edición, Editorial-Interamericana: pag. 187-188, 1978.

26.- Beutler, E.M.D. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. - Third edition. Grune and stratton eds. pag 83-84, 1983.

27.- Marklund S. and Marklund G.; Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem, 47: 469-474, 1974.

28.- Ya-lun Chou; Análisis estadístico, Editorial Interamericana 2da. Edición, 1977.

29.- Louise A. Saik, et al: Enzymatic and Immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages: Pediatr Res, 16: 933-937, 1982.

30.- Rotilio G., et al, Determination of red blood cell superoxide dismutase and glutathione peroxidase in newborns in relation to neonatal hemoly-- sis: Clin Chim Acta, 81: 131-134, 1977.

31.- Philip T., Fraisse J., Sinet P.M., Lauras B., Robert J.M., and Freycon-F.; Confirmation of the assignment of the human SODs gene to chromosome 21 q22.; Cytogenet Cell Genet, 22: 521-523, 1978.

32.- Matkovics B., et al, Altered peroxide metabolism in erythrocytes from - children with cystic fibrosis: Clin Chim Acta, 125: 59-62, 1982.

33.- Salil K.D. and Rajagopalan C.N.; Superoxide dismutase, glutathione --- peroxidase, catalase, catalase and lipid peroxidation of normal and -- sickled erithrocytes: Br J Haemat, 44: 87-92, 1980.

34.- Jansson L.T., et al: Red cell superoxide dismutase is increased in iron deficiency anemia: Acta Haemat, 74: 218-221, 1985.

35.- Pyenchitsomanus, Pwasi; Increased erithrocyte superoxide dismutase activities in B°- thalassaemia/haemoglobin E and in haemoglobin H diseases: J Clin Pathol, 36:329-333, 1983.

36.- Concetti A., et al; Superoxide dismutase in red blood cells: Method of assay and enzyme content in normal subjects and in patients with B-thalassemia (major and intermedia): J Lab Clin Med, 87(6): 1057-1064, --- 1976.

37.- Jeffrey B.S. and Ann P.A., Induction of superoxide dismutase by oxygen-in neonatal rat. Lung: J Biol Chem, 252(10): 3509-3514 1977.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 070/88

SR. JOSE ANGEL CHAVEZ CHAVEZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA ERITROCITARIA EN DIVERSAS NEOPLASIAS INFANTILES" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega.

A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Enero 14 de 1988
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdiel.

c.c.p. El Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA. S.R.. TELEFONOS 19-80-54 Y 19-82-92
GUADALAJARA. JAL.

Al contestar este oficio cítese fecha y número

Guadalajara, Jal., Febrero 11 de 1988.

C. DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

Señor Director:

Por la presente informo a usted que he revisado la tesis titulada "ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA ERITROCITARIA EN DIVERSAS NEOPLASIAS INFANTILES", presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Biología, Sr. José Angel Chávez Chávez, la cual apruebo para que se imprima y se someta a exámen, puesto que la considero adecuada para ello.

Sin otro asunto a tratar, me despido de usted

A t e n t a m e n t e.

QFB. ADOLFO CARDENAS ORTEGA