

1 9 8 7 - 2

Reg. No. 80301138

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA
SORBITOL DESHIDROGENASA (EC 1.1.1.14) ERITROCITARIA”**

BERTHA ADRIANA ALVAREZ RODRIGUEZ

GUADALAJARA, JALISCO. 1988

TESIS

"CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA SORBITOL DESHIDRO-
GENASA (EC. 1.1.1.14) ERITROCITARIA"

PRESENTADA POR:

BERTHA ADRIANA ALVAREZ RODRIGUEZ

DIRIGIDA POR:

DR. SERGIO AGUILAR BENAVIDES

DEDICATORIAS

MADRE

Por la superación de la raza humana y la mía propia, elabore este trabajo con la finalidad principal de reconocer el esfuerzo realizado por - aquella mujer que ha sabido darme protección, cariño y seguridad en la vida.

ABUELITA

Gracias por permitir, el poder existir al darle la vida a mi madre, por lo que deseo que reciba el respeto, cariño y amor por su dedicación a todos lo que formamos nuestra gran familia.

AGRADECIMIENTOS

M. EN C. GERARDO YACA PACHECO.

Ante la inquietud latente de poder alcanzar la perfección y rebelde ante la mediocridad me veo inmersa en el hecho de lograr un IDEAL, gracias Gerardo por tu apoyo, orientación y guía para alcanzar mis objetivos propuestos.

DR. SERGIO AGUILAR BENAVIDES.

Las vivencias del ser humano proporcionan las experiencias que nos permiten lograr los objetivos trazados durante el pasado, en el presente y a futuro, sobre todo por personas como usted que se entregan en aras de la superación profesional de aquellos que hemos tenido la fortuna de compartir sus conocimientos.

DR. JOSE MARIA CANTU.

A usted mi respeto y reconocimiento a su labor directriz de un centro de investigación como lo es la División de Genética, donde pude alcanzar una serie de metas y objetivos inmersos en mi tesis profesional.

Q.F.B. CLAUDINA MEDINA LOZANO.

El hombre que desarrolla la función de pensar y la aplica en beneficio de la humanidad, merece el reconocimiento de todos los que le rodeamos, a tí por tu constancia y dedicación en pro de la ciencia.

Q.F.B. BERTHA IBARRA.

Fundamentalmente la transmisión de los conocimientos se dan princi-

palmente mediante la práctica, cosa que recibí con tu apoyo, orientación y dedicación al trabajo.

BIOLOGO FRANCISCO JAVIER PEREA.

Ya que la ciencia es factor medular para alcanzar los principios de - veracidad, a ti que eres partícipe de esto con tu actividad experimental que desarrollas.

BIOLOGO LUPITA RAMIREZ DUEÑAS.

La ética profesional, la obtenemos mediante el convencimiento personal de poder servir y darle a los demás lo que requieren, tanto físico - como moral y mental, recibe mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES	5
III.	OBJETIVO	14
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
V.	HIPOTESIS	16
VI.	MATERIAL Y METODOS	
	-Purificación parcial de la SURD proveniente de un precipitado 50-55% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	17
	-Preparación de fantasmas de eritrocitos libres de hemoglobina para ser usados como fuente de SURD unida a membrana.	20
	-Cuantificación de la Actividad de SURD.	22
	-Determinación de la afinidad por sorbitol y NAD^+ .	23
	-Electroforesis de SURD.	23
	-Cuantificación de proteína.	24
	-Utilización de Ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.	24
	-Cuantificación de la actividad de Aldosa Reductasa.	24

VII. RESULTADOS	25
VIII. DISCUSION	30
IX. CONCLUSIONES	38
X. BIBLIUGRAFIA	56
Constacia de aceptación del Tema de Tesis	64
Constancia de Supervisión del director de tesis	65

INTRODUCCION

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

La vía del sorbitol del metabolismo de la glucosa consiste de dos enzimas: la aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SORD). La AR cataliza la conversión de glucosa y galactosa a sorbitol y galactitol respectivamente, en tanto que la SORD convierte al sorbitol en fructosa (Fig. 1).

La enzima AR muestra una amplia especificidad para varias aldosas y se caracteriza por su baja afinidad (K_m 70-200 mM) por glucosa y galactosa (1). 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 la constituye la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) (2). Las características cinéticas de la AR de cristalino humano sugieren que esta enzima no opera a velocidad máxima in situ (3).

La SORD también muestra amplia especificidad por sustrato y cataliza la oxidación de varios alcoholes de azúcares (por ejemplo, sorbitol, xilitol, ribitol); sin embargo, tiene una capacidad muy limitada para metabolizar galactitol (4,5). El cristalino humano tiene una elevada capacidad para convertir sorbitol en fructosa y viceversa en virtud de su elevado nivel de actividad de SORD relativo a AR y debido a que contiene in situ niveles adecuados de sustrato y cofactor para la actividad máxima (3).

La vía del sorbitol ha sido identificada en múltiples tejidos de mamí-

feros. Inicialmente fue descrita en líquido de vesículas seminales (6). La fructosa es el azúcar que está presente en mayores concentraciones - en el plasma seminal humano así como en el de otros mamíferos (7). En los mamíferos, el espermatozoide en el semen eyaculado depende fundamentalmente de la energía derivada de la degradación de la fructosa a piruvato (7). Se considera que el papel fisiológico de la vía del sorbitol en vesículas seminales consiste en la formación de fructosa para ser -- utilizada como sustrato energético del espermatozoide eyaculado.

Se han descrito varios estudios de la vía del sorbitol en el eritrocito humano. Cuando los eritrocitos son incubados en presencia de concentraciones crecientes de glucosa, se incrementa la concentración intracelular de sorbitol y fructosa. A concentraciones fisiológicas de glucosa, aproximadamente 3% de la glucosa transportada al interior de la célula es metabolizada por la vía del sorbitol, cifra que aumenta a 11% cuando la concentración de glucosa en el medio es de 50mM. En estas condiciones disminuye la relación NAD/NADH y esto a su vez produce un incremento en los niveles de triosa fosfato y fructosa, 1-6 difosfato y un decremento en el nivel de 2,3-difosfoglicerato (8,9). Además se ha sugerido que el NADH producido por la vía del sorbitol proporciona el poder reductor necesario para la conversión de la metahemoglobina a hemoglobina, mediada por la enzima metahemoglobina reductasa (10). Se desconoce la función fisiológica de la vía del sorbitol en otros tejidos.

VIA DEL SORBITOL Y COMPLICACIONES DIABETICAS.

La vía del sorbitol está relacionada bioquímica y patofisiológicamente con la diabetes: el sorbitol y el galactitol están involucrados en la

patogénesis de las cataratas diabéticas y de las cataratas galactosemicas ("cataratas por azúcar") tanto en humanos como en animales de experimentación (11, 12). Varios estudios han implicado la posible contribución del sorbitol en la patogénesis de otras complicaciones diabéticas como la neuropatía y la glomeruloesclerosis (5, 13, 14, 15).

El desarrollo de cataratas diabéticas o de cataratas galactosémicas tiene un mecanismo común. Concentraciones sanguíneas elevadas de glucosa o galactosa conducen a la formación de cataratas en animales experimentales, en cristalinos incubados in vitro y en pacientes con diabetes mellitus o con galactosemia debida a errores congénitos del metabolismo de la galactosa (16-19).

En condiciones normales hay poco flujo a través de la vía del sorbitol en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, en condiciones de hiperglicemia o hipergalactosemia, aumenta considerablemente el flujo originándose concentraciones intracelulares elevadas de sorbitol y galactitol respectivamente. Las membranas celulares son impermeables a estos alcoholes de azúcares, lo cual da por resultado que éstos se acumulen intracelularmente provocando una hipertonicidad en el citoplasma de las células; en estas condiciones se establece un imbalance osmótico que termina produciendo una serie de alteraciones patológicas en varios tejidos.

En el cristalino, la acumulación de alcoholes de azúcares es responsable para el desarrollo de cataratas hiperglicémicas o hipergalactosémicas; esto no es debido a que los alcoholes de azúcares sean tóxicos per se, sino a la hipertonicidad resultante de su acumulación (2, 5, 11).

Un bloqueo metabólico impuesto por: a) una deficiencia de la AR, tal -

como ocurre en una cepa de ratones con hiperglicemia congénita o, b) - una inhibición de la AR por medio de inhibidores específicos, previene o retarda el desarrollo de las "cataratas por azúcar" (12, 20-22). Las disminuciones en la velocidad de conducción nerviosa motora, en el transporte axonal y en la percepción sensorial, comunmente asociadas con la neuropatía diabética pueden ser revertidas en animales y en situaciones clínicas a través de la administración de un inhibidor de la AR (21,23).

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

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

La búsqueda de diferencias (genéticamente determinadas) entre individuos en vías metabólicas particulares relacionadas bioquímica y patofisiológicamente con la diabetes es una área de trabajo poco estudiada. Estos estudios pueden 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.

El grado de control de los niveles de glucosa sanguínea puede modificar grandemente la progresión de las principales complicaciones de la diabetes, entre ellas, el desarrollo de cataratas. Es válido suponer que alteraciones en la actividad de las enzimas involucradas en la formación y en el metabolismo del sorbitol pudieran ser un factor importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. El nivel de actividad de estas enzimas puede ser modificado por mutaciones genéticas y aquellas mutaciones que resulten en una disminución o ausencia de actividad enzimática afectarían la función de tales enzimas. En los individuos con defectos genéticos que afectarían la actividad de la SORD, la hiperglicemia constituiría un factor de riesgo. Si bien la normoglicemia no excluiría la posibilidad de que se desarrollaran alteraciones fenotípicas a largo plazo por un fenómeno acumulativo. En cambio, la deficiencia de la AR, primera enzima de la vía "protegería" del desarrollo de dichas alteraciones; el mismo efecto tendría la deficiencia de G-6-PD, enzima que proporciona el NADPH, cofactor de la AR. Previamente no se han descrito en la literatura errores congénitos del metabolismo en la vía del sorbitol. Recientemente nuestro grupo formuló y fundamentó dos hipótesis de traba-

jo en relación a la vía del sorbitol (24, 25):

- 1.- La deficiencia de G-6-PD, a través de reducir los niveles de NADPH, bloquearía la formación de alcoholes de azúcares en el cristalino y por lo tanto prevendría o retardaría el inicio de las "cataratas - por azúcar".
- 2.- La deficiencia de SORD conduciría a la acumulación de sorbitol en el cristalino y eventualmente al desarrollo de cataratas.

Las hipótesis fueron investigadas en población de riesgo: pacientes con diabetes y/o cataratas.

Se decidió tamizar para las deficiencias de SORD y de G-6-PD en los eritrocitos por dos razones:

- a).- Las deficiencias de galactokinasa y de galactosa-1-fosfato uridil-transferasa, las cuales son responsables del desarrollo de las cataratas galactosémicas, se expresan en los eritrocitos (26) y,
- b).- Los individuos con deficiencia de G-6-PD eritrocitaria también -- muestran niveles bajos de actividad en el cristalino (27).

En relación a la hipótesis 2, hasta la fecha los resultados más relevantes son los siguientes:

- 1.- En un pequeño grupo de pacientes con diabetes y/o cataratas identificamos una familia en la cual 4 de 5 hermanos y su padre mostraron cataratas nucleares bilaterales congénitas. El caso índice en esta familia fué captado por tener cataratas y por dar positividad en una prueba cualitativa para la detección de la deficiencia de SORD. La deficiencia fue confirmada: a) por métodos enzimáticos cuantitativos, radioiso

tópicos y espectrofotométricos llevados a cabo en hemolizados, y b) en eritrocitos intactos (24, 28). El procedimiento usado para confirmar el defecto enzimático en eritrocitos intactos consistió en tratar a las células con NaNO_2 para convertir la hemoglobina en metahemoglobina. -- Posteriormente los eritrocitos se incubaron en presencia de sorbitol. -- Una vez translocado al interior de la célula, la oxidación del sorbitol mediada por la SORD genera NADH, el cual es usado como reductante de la metahemoglobina en una reacción catalizada por la enzima metahemoglobina reductasa. La cuantificación de los niveles de metahemoglobina antes y después de la incubación en presencia de sorbitol proporciona una estimación de la actividad de SORD. Los resultados de este experimento correlacionados con la actividad de SORD medida en el hemolizado indican que la reducción de metahemoglobina por eritrocitos incubados en presencia de sorbitol es un indicador de la actividad de SORD.

No se encontraron diferencias en movilidad electroforética de la SORD entre los controles y los individuos con la deficiencia enzimática. -- Mezclas de hemolizados en diferentes proporciones, de un individuo con 21% de actividad enzimática y un control con actividad normal dieron los valores aditivos esperados.

La variación observada en esta familia en la actividad de SORD, puede ser debida a alteraciones en la síntesis o degradación de la enzima, o bien, a la formación de una enzima con propiedades catalíticas defectuosas o modificadas. Esta variación no puede ser atribuida a efectores intracelulares de la enzima y no es distinguible por electroforesis. -- Polimorfismo electroforético de la SORD en humanos solamente ha sido de

mostrado en plasma seminal (29).

Es necesario realizar estudios bioquímicos y genealógicos adicionales - tanto en poblaciones abiertas como en poblaciones seleccionadas para de terminar si la variación de la actividad de SORD puede ser atribuida a alelismo múltiple en el locus de la SORD.

Si bien el carácter familiar tanto de la deficiencia de SORD como de las cataratas congénitas presentes en la familia estudiada es bien claro, no hay una relación causa-efecto evidente, por lo tanto, no puede invocarse el mecanismo para la formación de "cataratas por azúcar" para explicar - el desarrollo de cataratas en esta familia.

Posteriormente Shin et. al. (30) identificaron una segunda familia con - características bioquímicas y clínicas similares. Sin embargo, aún no - se define una clara relación etiopatogénica catarata-deficiencia de SORD.

2.- Con el propósito de encontrar un modelo animal con deficiencia de - SORD que eventualmente pudiera ser usado en diabetes experimental cuanti ficamos la actividad de SORD por medio de un procedimiento fluorométrico (31) en eritrocitos de más de 200 animales de 12 especies diferentes.

Se observó una amplia variabilidad inter-especies en la actividad de -- SORD con una deficiencia virtualmente completa en cerdos. En la cuanti ficación de las actividades de AR y SORD en 12 diferentes tejidos del -- cerdo se encontró que la AR estuvo presente en todos los tejidos estudia dos en tanto que se observó órgano-especificidad para SORD.

La actividad de SORD no fué detectable en el cristalino, entre otros te-

cidos, de tal forma, que el cerdo es un modelo potencial para estudios en diabetes experimental, particularmente para la investigación de la deficiencia de SORD como un factor de riesgo en el desarrollo de cataratas y de otras complicaciones diabéticas (32).

3.- En un segundo estudio de tamizaje para la deficiencia de SORD eritrocitaria en una población más numerosa de pacientes con diabetes y/o cataratas encontramos los siguientes resultados (33).

- a) Una gran variabilidad en la actividad de SORD en los pacientes y en los controles, sugiriendo la existencia de polimorfismo en la actividad; dicho polimorfismo pudiera ser relevante en el estudio de -- las complicaciones diabéticas;
- b) Las diferencias en la actividad de SORD entre los pacientes diabéticos con y sin cataratas no fueron significativas;
- c) No se pudo definir en términos de actividad enzimática si en la población estudiada hubo o no individuos portadores de alelos amorfos o hipomorfos del locus de SORD. Por lo tanto, permanece por determinarse si la homocigocidad para un alelo amorfo o hipomorfo conduciría al desarrollo de "cataratas por azúcar", lo cual dependerá de la detección y caracterización, sin ambigüedades, de tales alelos.

4.- En un estudio de tamizaje para variantes de SORD eritrocitaria termosensibles, termoresistentes y electroforéticas, en donadores de sangre se encontraron los siguientes resultados (34, 35):

- a) Se observaron 4 fenotipos electroforéticos: I) tres bandas denominadas a, b y c, con movilidad catódica en 78.36% de la población estu--

diada; II) dos bandas a y c en 12.02%, III) dos bandas b y c en 6.73%, y, IV) una banda c en 2.88%.

No se observaron variantes electroforéticas. Los resultados de los estudios de caracterización de las tres bandas sugieren que ellas son isoenzimas del mismo locus y que ocurre un fenómeno normal de intercambio de las bandas.

b) 7(2.5%) de 274 individuos mostraron actividades de SORD (en las muestras no calentadas), 3 desviaciones standard arriba del promedio; estos individuos pueden ser portadores de variantes en actividad de SORD. Estos resultados así como las dos familias con deficiencia de SORD previamente reportadas (24, 30) sugieren que existe polimorfismo en la actividad de SORD. Dicho polimorfismo pudiera ser relevante para el estudio de las complicaciones diabéticas.

Una estrategia para investigar si la variación en la actividad de SORD eritrocitaria puede ser atribuida a alelismo múltiple, consiste en buscar diferencias entre individuos con diferentes niveles de actividad en las propiedades cualitativas de la enzima, (tales como termoestabilidad, afinidad por substratos, respuestas a inhibidores, movilidad electroforética en gel de poliacrilamida, etc.) en preparaciones purificadas parcialmente. Por ejemplo, los pacientes con deficiencia de SORD y cataratas reportados por Shin et al (30) mostraron valores de Km para sorbitol mayores que los controles, surgiendo una alteración estructural de la enzima.

Los requerimientos metodológicos para la estrategia anterior (búsqueda -

de inhibidores de SORD, estandarización de un método electroforético en gel de poliacrilamida y purificación parcial de la enzima, ya han sido satisfechos) (36-38). Durante la implementación de la metodología anterior se obtuvieron resultados preliminares que sugieren la existencia de una SORD soluble y otra unida a la membrana del eritrocito.

A continuación se presenta un resumen de tales resultados:

a) La SORD eritrocitaria precipita en la fracción 50-55% de sulfato de amonio. Por cromatografía de esta fracción en Sephadex G-200 se observaron dos picos con actividad de SORD: uno de exclusión rápida (pico rápido) (purificación 7-27 veces) y otro de exclusión lenta (pico lento) (purificación 350-500 veces). El pico rápido y el pico lento eluyen antes y después que el azul dextrán ($PM=2 \times 10^6$) respectivamente. La actividad específica de la SORD de pico lento es 12 veces mayor que la de pico rápido. (Fig. 2, Tabla 1). Este comportamiento de elución se observó en más de 10 experimentos.

Este esquema de purificación de SORD se realizó de acuerdo al procedimiento de Barretto et al (39). Sin embargo, estos autores no especifican en su publicación cuántos picos con actividad de SORD se obtienen.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida la SORD de pico lento y de pico rápido mostraron dos bandas: una lenta y la otra rápida, ambas con migración catódica. En el pico rápido predomina la banda lenta y en el pico lento la banda rápida (Fig. 3).

La SORD de pico rápido corresponde a una isoenzima asociada a restos -

de estroma celular y/o proteínas de membrana formando un complejo soluble de peso molecular elevado?

¿La SORD de pico lento corresponde a una isoenzima soluble?

b) Se estudió el efecto del tritón X-100 (detergente no iónico que solubiliza proteínas unida a membrana) sobre el comportamiento en Sephadex G-200 de la fracción 50-55% de sulfato de amonio. Dicha fracción fue incubada a -20°C en presencia de Tritón X-100 durante varias horas y posteriormente fue aplicada a una columna de Sephadex G-200. Se observó un enriquecimiento de la SORD de pico lento a expensas de la SORD de pico rápido (Fig. 4). La actividad específica de pico lento es 64 veces mayor que la de pico rápido. En el inciso a) se mencionó que la actividad específica de pico lento es 12 veces mayor que la de pico rápido pero en este caso la fracción 50-55% de sulfato de amonio no fue pretratada con Tritón X-100.

En electroforesis de pico lento se observó una considerable disminución en la intensidad de la banda con movilidad lenta en tanto que la electroforesis de pico rápido mostró un incremento en la intensidad de la banda con movilidad rápida (Fig. 3).

c) Con el propósito de investigar de un modo más directo si existe actividad de SORD asociada al estroma del eritrocito se preparó un hemolizado por lisis con hielo seco-acetona. El hemolizado fue centrifugado a 80 000 xg. y el precipitado fue lavado exhaustivamente hasta eliminar la hemoglobina; posteriormente los estromas lavados fueron tratados con Tritón X-100 y esta fracción solubilizada fue aplicada a una columna de

Sephadex G-200. Se observaron el pico rápido (purificación 4 veces) y el pico lento (purificación 407 veces). La actividad específica de pico lento es 98 veces mayor que la de pico rápido (Fig. 5).

Lo esperado en este experimento sería solamente el pico lento; sin embargo, es posible que la liberación de SORD del "complejo soluble de peso molecular elevado" fue incompleta y esto explicaría la presencia de pico rápido.

La actividad específica de SORD en la fracción sobrenadante proveniente de la ultracentrifugación del hemolizado fué de 31% en relación a la actividad en el hemolizado crudo.

OBJETIVOS

OBJETIVO

El objetivo primario consiste en estudiar comparativamente las propiedades bioquímicas de las isoenzimas de la SORD eritrocitaria (soluble y unida a membrana).

PLANTEAMIENTO

DEL

PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos señalados en los incisos a), b) y c), de los Antecedentes sugieren que en los eritrocitos existen 2 isoenzimas de SORD: una soluble y otra unida a la membrana. Ambas pudieran ser producto del mismo gene estructural o de dos genes diferentes.

Hasta la fecha se conoce la existencia de un solo gene estructural de SORD, el cual ha sido mapeado en el cromosoma 15 en la región pter→q-21 (40).

No conocemos antecedentes en la literatura de la existencia de SORD eritrocitaria unida a membrana.

La caracterización de las propiedades bioquímicas de ambas isoenzimas puede proporcionar información respecto a sus semejanzas y/o diferencias. Dicha información a su vez, puede ofrecer elementos para postular si ambas son productos de uno o de dos genes.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Las propiedades bioquímicas de la SORD unida a membrana del eritrocito son diferentes a las propiedades de la enzima soluble.

MATERIAL

Y

METODOS

MATERIAL Y METODOS

Material humano.-

Se obtuvo sangre total colectada en solución anticoagulante 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 dentro de la primera hora después de su obtención.

A.- PURIFICACION PARCIAL DE LA SORD PROVENIENTE DE UN PRECIPITADO 50-55% DE $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

1.- Preparación del Hemolizado Crudo.

La muestra de sangre (50-100 ml) se lava 3 veces con solución de NaCl 0.9% centrifugando durante 5 minutos a 3 000 rpm (centrífuga clínica). Después de cada lavado se elimina la capa de leucocitos.

El paquete de eritrocitos lavados se resuspende en 9 volúmenes de agua destilada fría y se somete a congelación en un baño con hielo seco-acetona. Posteriormente se descongela en agua a temperatura ambiente. - Esta preparación constituye el hemolizado crudo, se toma una alícuota para cuantificación de actividad de SORD, de proteína y para electroforesis.

2.- Precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

a) Agregar al hemolizado crudo la cantidad necesaria de $(\text{NH}_4)_2$ --

SO_4 (lentamente y con agitación) para lograr una saturación de 25%. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 12,100 x g (Centrífuga RC2-B, Sorvall) durante 20 minutos a 4°C. Separar cuidadosamente el sobrenadante del precipitado. Descartar el precipitado.

b) Agregar $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al sobrenadante hasta una saturación de 45%. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar y separar el sobrenadante.

c) Agregar $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al sobrenadante hasta una saturación de 50%. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar y separar sobrenadante.

d) Agregar $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al sobrenadante hasta una saturación de 55%. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en Buffer Tris-HCl 10 mM + β -mercaptoetanol 3 mM, pH 7.7 (Solución estabilizadora).

En esta fracción (50-55% de saturación) precipita la SORD.

Almacenar a -20°C el precipitado resuspendido en solución estabilizadora (toda la noche). Centrifugar. Descartar el precipitado; tomar - alícuota del sobrenadante para cuantificación de actividad de SORD, proteína y electroforesis.

Dializar el sobrenadante que contiene la enzima.

3.- Dialisis en Sephadex G-25.

Con el propósito de eliminar el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del sobrenadante anterior, se dializa en una columna de Sephadex G-25 (1.5 x 26 cm.), previamente equilibrada con Solución estabilizadora.

Una vez que la muestra penetra en el gel, se eluye con solución estabilizadora, colectando 20 fracciones de 2 ml. cada una.

Medir absorbancia a 280 nm, a cada una de las fracciones para monitorear en cuáles eluye proteína. (Las proteínas en solución muestran un pico máximo de absorbancia a 280 nm. debido a los aminoácidos aromáticos -Tirosina, Triptófano y Fenilalanina- de tal forma que la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm. constituye un medio conveniente y extremadamente rápido para cuantificar proteínas).

Mezclar en un sólo tubo todas las fracciones que contengan proteína. Tomar alícuota para cuantificar actividad de SORD, proteína y para electroforesis.

Cromatografiar en DEAE- Sepharosa.

Durante el proceso de purificación de SORD eritrocitaria tuvimos acceso a un artículo del grupo del Dr. Nealon sobre el comportamiento cromatográfico en DEAE-Sepharosa de la SORD de hígado humano (41). Los resultados de dicho artículo serán analizados en Discusión. Basados en este antecedente decidimos investigar el comportamiento cromatográfico en DEAE-Sepharosa de la SORD eritrocitaria.

4.- Cromatografía en DEAE-Sepharosa (intercambiador aniónico).

(De acuerdo al Método de Nealon et. al. (41).

La muestra dializada en Sephadex G-25, se aplica a una columna de DEAE-Sepharosa (1.5 x 26 cm.), previamente equilibrada con buffer Tris-HCl - 20mM, pH 7.5. Una vez que la muestra penetró en el gel, se eluyen con el mismo buffer las proteínas que no se unieron a la DEAE-Sepharosa. - Colectar 22 fracciones de 5 ml. Monitorear D.O. a 280 nm. y actividad de SORD en cada una de las fracciones.

Mezclar en un sólo tubo aquellas fracciones que tengan actividad de SORD (PICO-1).

Tomar alícuota de la mezcla de fracciones que constituyen el pico-1 para cuantificar actividad de SORD, proteína y para electroforesis.

Enseguida eluir las proteínas que se unieron a la DEAE-Sepharosa con buffer Tris-HCl 20mM + KCl 1.5 M, pH 7.5.

Colectar 14 fracciones de 5ml. cada una. Monitorear D.O. 280 nm. y actividad de SORD. Mezclar en un sólo tubo todas las fracciones que tengan actividad de SORD (PICO-2).

Tomar alícuota de la mezcla de fracciones que constituyen el Pico-2 para cuantificar actividad de SORD, proteína y para electroforesis.

Los PICOS 1 y 2 se almacenan a -20°C y se usan como fuente de enzima - para el estudio de las propiedades bioquímicas de SORD.

Todas las operaciones se llevan a cabo a 4°C .

B.- PREPARACION DE FANTASMAS DE ERITROCITOS LIBRES DE HEMOGLOBINA PARA SER USADOS COMO FUENTE DE SORD UNIDA A MEMBRANA.

Para la preparación de los fantasmas de utilizó el procedimiento -

de De y Kirtley (42) el cual básicamente consiste en lo siguiente:

Los eritrocitos provenientes de 100ml. de sangre, se lavan con una solución isotónica de NaCl y Tris 17 mM, pH 7.5 y se centrifugan a 4 000 rpm. durante 15 minutos a 4°C (Centrifuga RC2-B Sorvall). Se remueven el sobrenadante y la capa de leucocitos y se descartan. El procedimiento de lavado se repite hasta que el sobrenadante sea transparente, usualmente tres veces.

Posteriormente el paquete de eritrocitos se hemoliza con 9 volúmenes de solución hipotónica de Na₂EDTA 0.1 mM + Tris 17 mM, pH 7.5, fría.

Los fantasmas se centrifugan a 18 000 rpm. durante 1 hora a 4°C, (Centrifuga RC2-B Sorvall) y son sometidos a 5-6 lavados adicionales con el mismo buffer. Finalmente los fantasmas se resuspenden en 5 ml. del mismo buffer.

Todas las operaciones se llevan a cabo a 4°C.

Tomar una alícuota de la preparación de fantasmas para: observación microscópica, electroforesis y para cuantificación de actividad de SORD y proteína.

ELUCION DE SORD

La SORD unida a la membrana de la bacteria Gluconobacter suboxydans var. α es eluida en presencia de Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM y D-Sorbitol 100 mM (43).

Con estos antecedentes, se realizó un experimento piloto para la elución de SORD unida a los fantasmas de eritrocitos en presencia de: a) Tritón

X-100 al 1%; b) Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM; c) Tritón X-100 al 1% + D-Sorbitol 100 mM y d) Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM + D-Sorbitol 100 mM.

Los mejores resultados se obtuvieron con Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM.

Básicamente, el procedimiento de elución consiste en:

incubar a los fantasmas en presencia de Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM durante 2 horas a 4°C y con agitación. Centrifugar a 18 000 rpm. durante una hora a 4°C. Descartar el precipitado y almacenar el sobrenadante a -20°C toda la noche.

Al día siguiente volver a centrifugar a 15 000 rpm. durante 20 minutos a 4°C. Descartar el precipitado y tomar una alícuota del sobrenadante para cuantificar proteína, actividad de SORD y para electroforesis.

Aplicar el sobrenadante a una columna de Sephadex G-200 (1.5 x 42 cm.). Eluir con solución estabilizadora, colectando 25 fracciones de 4 ml. cada una. Monitorear D.O. 280 nm. y actividad de SORD en cada fracción. Mezclar en un tubo todas las fracciones con actividad de SORD. Tomar una alícuota para cuantificar proteína, actividad de SORD y para electroforesis.

La mezcla de fracciones con actividad de SORD se usa como fuente de enzima para el estudio de sus propiedades bioquímicas.

C.- CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE SORD.

La composición de la mezcla de reacción es la siguiente:

Tris 20 mM, pH 8.0; MgCl₂ 10mM; NAD⁺ 2.5 mM; D-Sorbitol 50 mM y un volu

men apropiado de fuente de enzima; el volumen total de la mezcla de incubación es de 100 μ l.

El sistema blanco contiene todos los ingredientes de la mezcla de reacción, excepto sorbitol. Además se incluye un standard de NADH de concentración conocida.

Las mezclas de reacción se incuban a 37°C durante 60 minutos.

La reacción se detiene diluyendo una alícuota de 20 a 50 μ l de la mezcla de incubación con 4 ml. de buffer fosfatos 10 mM pH 7.4.

Leer las fluorescencias de las mezclas de incubación diluidas en un Fluorómetro de filtros (Turner modelo 110; filtro primario 110-811 y filtro secundario 110-817).

D.- DETERMINACION DE LA AFINIDAD POR SORBITOL Y NAD⁺.

Se usaron como fuente de enzima, los picos 1 y 2 de DEAE-Sepharosa - (previamente concentrados por ultrafiltración en Amicón) y el pico de Sephadex G-200. Ver tablas 2 y 3 para esquemas de trabajo.

La velocidad de reacción fue monitoreada a 340 nm. en un Espectrofotómetro (PMQ-3, Zeiss) con compartimiento de cuvetas regulado a 37°C.

Los datos de velocidades iniciales, fueron sometidos a un análisis de regresión lineal.

E.- ELECTROFORESIS DE SORD.

Se realizó de acuerdo al procedimiento de Alvarez (44).

Los estudios electroforéticos, se llevaron a cabo en el laboratorio de - Bioquímica II a cargo de la Dra. Bertha Ibarra.

F.- CUANTIFICACION DE PROTEINA.

(Ensayo de unión del colorante Azul de Coomassie)

Se siguió el procedimiento de Read y Northcote (45).

G.- UTILIZACION DE FERRICIANURO DE POTASIO COMO ACEPTOR DE ELECTRONES.

Teniendo como antecedente el dato de que la SORD de membrana de Gluconobacter suboxydans var α utiliza ferricianuro como aceptor de electrones (43) se decidió investigar si la SORD de membrana de eritrocitos se comporta igual.

Para la realización de esta prueba se siguió el procedimiento usado con la enzima de Gluconobacter (43).

H.- CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE ALDOSA REDUCTASA.

Se hizo de acuerdo al método de Hayman et al. (1).

RESULTADOS

RESULTADOS

A. PURIFICACION PARCIAL DE LA SORD PROVENIENTE DEL PRECIPITADO 50-55% - DE $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

El comportamiento de elución de SORD en DEAE-Sepharosa se muestra en la Figura 6.

Se obtuvieron dos componentes con actividad de SORD:

el pico uno que no se une a la DEAE-Sepharosa y que es eluido con el mismo buffer con el cual fue equilibrada la columna.

El segundo componente (pico dos) sí se une a la DEAE-Sepharosa y es eluido en presencia de KCl en el buffer. Este comportamiento de elución se observó en más de 10 experimentos.

Los datos de la purificación aparecen en la Tabla 4.

Para el pico uno con actividad de SORD se logró una purificación de 451 veces (actividad específica "AE", igual 1642 umoles de producto formado/hora/g. de proteína) y para el pico dos de sólo 7.75 veces (AE= 28 umoles de producto formado/hora/g. de proteína).

En pico dos de DEAE-Sepharosa también eluyó la Hemoglobina; esto explica la pobre purificación de la SORD que eluye en este pico.

B. PREPARACION DE FANTASMAS DE ERITROCITOS LIBRES DE HEMOGLOBINA PARA SER USADOS COMO FUENTE DE SORD, UNIDA A MEMBRANA.

El procedimiento de obtención de los fantasmas es adecuado, ya que por observación microscópica (40X); se observó un marcado predominio de eritrocitos libres de Hemoglobina ("fantasmas blancos"); no se observa--

ron células rotas o restos celulares. Como se mencionó en material y métodos, en un experimento piloto se probaron varias condiciones para la elución de la SORD de membrana y los mejores resultados se obtuvieron con Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM.

El sobrenadante de la preparación de fantasmas tratados con Tritón X-100 + KCl y cromatografiados en Sephadex G-200, mostró un sólo pico de actividad y de proteína, como se muestra en la Figura 7. El pico de actividad y de proteína es muy ancho, probablemente porque el volumen de muestra aplicado a la columna fue muy grande (25-30 ml).

La actividad específica de SORD:

a) En los fantasmas; b) en el sobrenadante de los fantasmas tratados con Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM y c) en el pico con actividad de SORD eluído en Sephadex G-200, se muestran en la Tabla 5.

En los datos de la Tabla 5; se puede observar que el número de unidades totales en el sobrenadante de los fantasmas tratados con Tritón X-100 al 1% más KCl 100 mM es 4 veces menor que en los fantasmas. Así mismo el número de unidades totales en el pico de Sephadex G-200, es 2 veces menor que en el sobrenadante de los fantasmas. Estas diferencias no son explicables por una disminución proporcional en la cantidad de proteína, probablemente se deben a labilidad de la enzima liberada de los fantasmas.

C. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES CUALITATIVAS DE SORD.

1. MOVILIDAD ELECTROFORETICA

En la Figura 8 se muestran los resultados para la enzima eluída de DEAE-Sepharosa y para la enzima proveniente de fantasmas de eritrocitos.

El hemolizado crudo muestra 3 bandas; con movilidad catódica: lenta (3-4 mm.), intermedia (13-14 mm.) y rápida (17-18 mm.).

La SORD de pico 1 DEAE-Sepharosa sólo muestra la banda con movilidad -- electroforética rápida en tanto que la SORD de pico 2 de DEAE-Sepharosa, muestra la banda con movilidad lenta (un sólo experimento).

Los fantasmas de eritrocitos presentaron 3 patrones: (resultados de 3 ex perimentos):

- a) las bandas lenta, intermedia y rápida;
- b) las bandas lenta y rápida
- c) la banda intermedia.

Los fantasmas tratados con Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM mostrarán dos patrones (resultados de dos experimentos):

- a) las bandas intermedia y rápida
- b) la banda rápida.

La enzima solubilizada proveniente de fantasmas y cromatografiada en Sephadex G-200, solamente mostró la banda rápida (Un experimento).

2. AFINIDAD POR SORBITOL Y NAD^+

(Fuente de enzima: picos 1 y 2 DEAE-Sepharosa provenientes del precipitado 50-55% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y pico de Sephadex G-200 proveniente de fantasmas).

Los resultados de las afinidades por sorbitol y por NAD^+ aparecen en la

Tabla 6.

En las figuras 9 y 10, se muestran curvas representativas de la velocidad de reacción versus concentración de Sorbitol y NAD^+ respectivamente.

La K_m (constante de Michaelis, expresada en mM) por Sorbitol fue de 2.25, 1.57 y 2.98 para la SORD de pico 1 y 2 DEAE-Sepharosa y pico Sephadex G-200 respectivamente.

La K_m para NAD^+ fue de 0.176, 0.14 y 0.143 para pico 1 y 2 de DEAE-Sepharosa y pico Sephadex G-200 respectivamente.

Los resultados de las afinidades por Sorbitol y NAD^+ de la SORD que eluye en el pico 2 de DEAE-Sepharosa, son producto de un sólo experimento. Esto es debido a que en el pico 2 también eluye la hemoglobina, de tal forma que se obtienen absorbancias (a 340 nm.) basales muy elevadas, lo cual dificulta la medición de incrementos discretos en absorbancia durante la medición de la velocidad de la reacción.

Los coeficientes de correlación (r) de los datos experimentales de $1/v$ versus $1/\text{Sorbitol}$ ó $1/\text{NAD}^+$ estuvieron comprendidos en el rango de 0.90 a 0.99, excepto para el pico 2 de DEAE-Sepharosa donde para Sorbitol, $r = 0.84$ y para NAD^+ $r = 0.49$.

3. UTILIZACION DE OTRO ACEPTOR DE ELECTRONES.

Se realizó un sólo experimento para investigar si la SORD unida a membrana utiliza ferricianuro de Potasio como aceptor de electrones. Los resultados fueron negativos.

D. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE ALDOSA REDUCTASA.

La cuantificación de la actividad de aldosa reductasa se realizó en fantasmas de eritrocitos tratados con Tritón X-100 al 1% + KCl 100 mM y - eluidos en Sephadex G-200.

Se realizó un sólo experimento y los resultados fueron negativos.

DISCUSSION

DISCUSION

El comportamiento cromatográfico en DEAE-Sepharosa de la SORD eritrocitaria (Figura 6) es similar al que exhibe la SORD de hígado humano (41). Nealon et al. encontraron que por cromatografía en DEAE-Sepharosa un sobrenadante proveniente de un homogenado de hígado muestra dos componentes con actividad de SORD: uno que no se une a la columna y otro que sí se une. El componente principal está constituido por la SORD que no se une a la DEAE-Sepharosa y muestra una sola banda electroforética con movilidad catódica. El componente que se une a la DEAE-Sepharosa es eluido de la columna con KCl y muestra una sola banda con movilidad electroforética anódica (41). El comportamiento electroforético de la SORD eritrocitaria eluida en DEAE-Sepharosa también es similar al de la enzima de hígado: El pico 1 de DEAE-Sepharosa muestra una sola banda con movilidad catódica rápida y el pico 2 una sola banda, con movilidad catódica lenta.

Como se mencionó en antecedentes, la SORD que precipita en la fracción 50-55% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, cromatografiada en Sephadex G-200, muestra dos picos con actividad de SORD: uno de exclusión rápida y otro de exclusión lenta. El pico rápido y el pico lento eluyen antes y después que el -- Azul Dextran ($\text{PM. } 2 \times 10^6$) respectivamente. Este fue el primer antecedente que nos hizo sospechar la existencia de una SORD unida a membrana (pico de elución rápida) además de la SORD soluble (pico de elución lenta). También se mencionó en antecedentes que por electroforesis en gel de poliacrilamida la SORD de pico lento y de pico rápido muestran 2 ban

das con migración catódica: la lenta y la rápida. Además las absorban-
cias a 280 nm. del pico rápido y del pico lento de Sephadex G-200 son -
muy elevadas y muy bajas respectivamente (D₀.280 nm. máxima => 2 para -
el pico rápido y <0.4 para el pico lento).

En el pico rápido (SORD unida a membrana) predomina la banda lenta y en
el pico lento (SORD soluble) predomina la banda rápida.

Como puede observarse en la Figura 8 la SORD del pico 1 que no se une a
la DEAE-Sepharosa muestra la banda electroforética rápida, por lo que -
se infiere que esta SORD corresponde a la SORD eluída en pico lento de
Sephadex G-200. La D₀ 280 nm. máxima del pico con actividad de SORD --
que no se une a DEAE-Sepharosa es muy baja (<0.4) (Figura 6). Este da
to también apoya la interpretación de que el pico lento de Sephadex G-
200 es equivalente al pico con actividad de SORD que no se une a la --
DEAE-Sepharosa. (SORD soluble)

La SORD que se une a la DEAE-Sepharosa, sólo muestra la banda con movi-
lidad electroforética lenta y sería equivalente a la SORD eluída en el
pico rápido de Sephadex G-200.

La SORD que no se une a la DEAE-Sepharosa probablemente tiene una carga
eléctrica neta positiva lo cual explicaría su rápida migración electro-
forética en dirección catódica. La SORD que se une a la DEAE-Sepharosa
tiene una carga eléctrica neta negativa y por lo tanto su migración --
electroforética en dirección catódica es lenta.

También se mencionó en antecedentes que por electroforesis de un hemo-
lizado crudo se observan de 1 a 3 bandas con actividad de SORD con mo-

vilidad lenta, intermedia y rápida las cuales son interconvertibles.

A semejanza del hemolizado crudo, la preparación de fantasmas además de la banda lenta también mostró la banda intermedia y la banda rápida en un experimento; en otro experimento mostró las bandas lenta y rápida y en un experimento más sólo mostró la banda intermedia. El tratamiento con Tritón X-100 al 1% más KCl 100 mM resultó en desaparición de la banda lenta en un experimento y desaparición de las bandas intermedia y -- lenta en otro. Para la enzima de membrana eluída en Sephadex G-200 sólo se observó la banda rápida.

Estos resultados sugieren que tanto la SORD de hemolizado crudo como la de fantasmas de eritrocitos pueden existir hasta en 3 formas moleculares diferentes por criterios electroforéticos.

Conocemos el comportamiento electroforético de SORD a nivel puramente - descriptivo. No sabemos, de que depende la interconversión de bandas. Tampoco sabemos que representa cada una de las bandas.

¿Son agregados de diferente peso molecular y carga eléctrica?

¿Son isómeros conformacionales?

Será necesario tener una mayor casuística de corrimientos electroforéticos para definir con exactitud el patrón de bandas de las diferentes preparaciones de SORD. También será necesario diseñar nuevos experimentos para investigar el fenómeno de interconversión de bandas y para definir si son agregados ó isómeros conformacionales.

La agregación y el isomerismo conformacional de enzimas son causas co-

nocidas para la generación de patrones electroforéticos de varias bandas (46).

Como puede observarse en la Tabla 6 las afinidades por Sorbitol y NAD^+ de la SORD soluble (pico 1 DEAE-Sepharosa) y de la SORD proveniente de las membranas de eritrocitos (pico Sephadex G-200) son muy similares.

En 1975 Barretto y Beutler (47) purificaron la SORD de eritrocitos humanos a partir de un hemolizado libre de estroma por cromatografía en CM- Celulosa (carboxi-metil celulosa). El grado de purificación fue de 900 veces y por electroenfoque se obtuvo evidencia de un sólo componente con un punto isoeléctrico de 8.96. Las propiedades bioquímicas de la enzima purificada fueron las siguientes:

- a) pH óptimo = 9.5
- b) Termoeestabilidad: la enzima fue estable a temperatura de 40°C y 45°C pero inestable a 50°C, con una pérdida de 36% de actividad en 60 minutos.
- c) La K_m para Sorbitol = 1.7 mM y la K_m para NAD^+ = 0.2 mM. Estos valores son muy comparables a los encontrados por nosotros.
- d) La actividad de la preparación purificada en catalizar la reducción de Fructosa a sorbitol usando NADH como coenzima, fue aproximadamente de 30% en relación a la oxidación de Sorbitol a Fructosa.

Shin et al. (30) reportaron una K_m para Sorbitol = 2 mM para la SORD de eritrocitos humanos.

La SORD de cristalino humano (3) tiene afinidades por Sorbitol ($K_m = 1.45$ mM) y por NAD^+ ($K_m = 0.05$ mM) similares a la SORD de eritrocitos

humanos.

Respecto a la SORD de hígado humano, Nealon et al. (41) encontraron que la enzima que no se une a la DEAE-Sepharosa (SORD-1) muestra diferencias estadísticamente significativas en la Km por Sorbitol y NAD^+ versus la enzima que sí se une a DEAE-Sepharosa (SORD-2). Además un anticuerpo -- contra la SORD-2 no reaccionó con la SORD-1. El punto isoeléctrico para la SORD-1 fue de 9.5 y para la SORD-2 de 6.2. Nealon et al. concluyen -- que sus datos experimentales proporcionan una fuerte evidencia de que -- SORD-1 y SORD-2 son diferentes formas de la misma enzima. Sin embargo, estos autores no ofrecen ninguna explicación sobre el origen probable de ambas formas de SORD. ¿Las dos formas de SORD son producto de 2 genes -- estructurales diferentes? ¿Las dos formas de SORD son producto del mismo gene estructural pero una de ellas existe en forma soluble y la otra unida a membrana? La unión a la membrana podría modificar las características electroforéticas, cinéticas y los determinantes antigénicos de la SORD.

En la Tabla 7 se enlistan las Km por Sorbitol y por NAD^+ para la SORD de diferentes tejidos animales.

En Drosophila melanogaster, se ha reportado la existencia de compartamentación de SORD: una forma está localizada en el citosol y la otra es mitocondrial (50).

En Gluconobacter suboxidans var. α se ha demostrado la existencia de una SORD soluble (51) y una SORD unida a membrana (43); la enzima membranal usa Ferricianuro de Potasio como aceptor de electrones.

La SORD eritrocitaria unida a membrana no utilizó ferricianuro como aceptor de electrones.

Se ha sugerido que el NADH producido durante la conversión de Sorbitol a Fructosa es utilizado para la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina, proceso que se lleva a cabo en el citoplasma y que es catalizado por la enzima metahemoglobina reductasa (10). Desconocemos cual sería la función de la SORD unida a membrana eritrocitaria. Tampoco sabemos si la primera enzima de la vía del Sorbitol, la Aldosa Reductasa, existe en dos formas. una soluble y otra unida a membrana.

En 1977 Schrier, publicó un catálogo de enzimas de membrana del eritrocito humano. De acuerdo al tratamiento usado para disociar la enzima o proteína de la membrana, las proteínas membranales del eritrocito se clasifican en integrales o periféricas, intrínsecas o extrínsecas; o asociadas a membrana. Si la enzima es removida de la membrana por tratamientos relativamente suaves se dice que la enzima es periférica o extrínseca o asociada a membrana. Si el tratamiento requerido es drástico y conduce a destrucción de la estructura de la membrana, la enzima o proteína es intrínseca o integral. El método de preparación de membranas que tiene un grado de aceptación estandar es el de los fantasmas blancos "libres de hemoglobina" (52).

Schrier divide a las enzimas de membrana en 2 categorías:

1. Enzimas localizadas exclusivamente en la membrana y no en el citosol y
2. Enzimas cuya actividad se encuentra en el citosol y en la membrana.

En este grupo se incluyen, entre otras, 9 enzimas del metabolismo de la glucosa.

Entre las enzimas del grupo 2 la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD), ha sido estudiada más exhaustivamente. La enzima del citosol y la unida a la membrana han sido purificadas y caracterizadas. La determinación del peso molecular, la medición de las constantes cinéticas y la curva de actividad contra pH indican que no hay diferencias medibles entre GAPD del citosol y la membrana. Además, anticuerpos contra la enzima no distinguen entre la citosólica y la membranal (53). Se conoce que la GAPD está localizada en la cara interna de la membrana del eritrocito con los sitios activos orientados hacia el citosol (53). Se han sugerido diversas funciones biológicas para las enzimas de membrana de eritrocitos. Por ejemplo, se ha propuesto que las enzimas glicolíticas secuenciales gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato Kinasa podrían funcionar suministrando ATP en la superficie citosólica de la membrana eritrocitaria (52)'

Finalmente, con los datos presentados en esta tesis podemos decir que la SORD soluble y la SORD de membrana son indistinguibles desde el punto de vista de su afinidad por Sorbitol y por NAD^+ .

Para cumplir el objetivo general consistente en caracterizar las propiedades bioquímicas de la SORD soluble y la SORD membranal será necesario estudiar otras propiedades cualitativas tales como:

- a).- Utilización de diferentes sustratos.
- b).- Respuesta a diferentes inhibidores.
- c).- Termoestabilidad.

d).- Otras.

Respecto a los estudios electroforéticos será necesario:

- a) Definir con mayor precisión los patrones electroforéticos para las diferentes preparaciones enzimáticas provenientes del precipitado - al 55% de Sulfato de amonio y de aquellas provenientes de los fantasma de eritrocitos.
- b) Investigar de qué depende la interconversión de bandas y que representa cada una de ellas.

Además será necesario hacer más experimentos para investigar si la aldosa Reductasa está o no unida a la membrana del eritrocito.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La SORD soluble y la SORD de membrana son indistinguibles desde el punto de vista de su afinidad por sorbitol y por NAD^+ .
2. El comportamiento electroforético de la SORD de membrana es muy similar al que exhibe la SORD proveniente de un hemolizado crudo.
3. El comportamiento cromatográfico en DEAE-Sepharosa de la SORD de eritrocitos humanos es similar al que muestra la SORD de hígado humano.

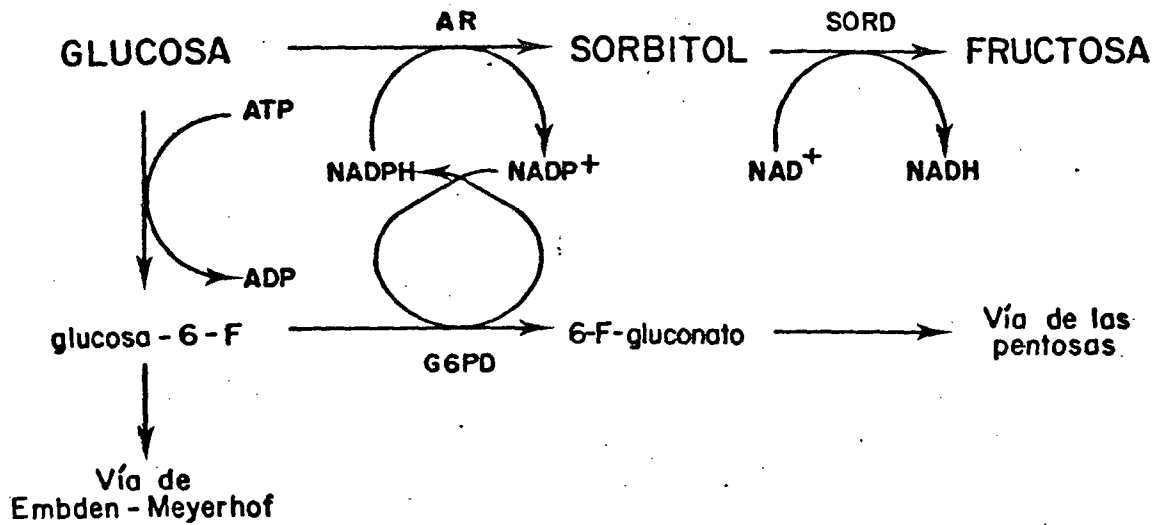


Fig. 1.— Vía del sorbitol y su relación con las vías de Embden - Meyerhof y de las pentosas

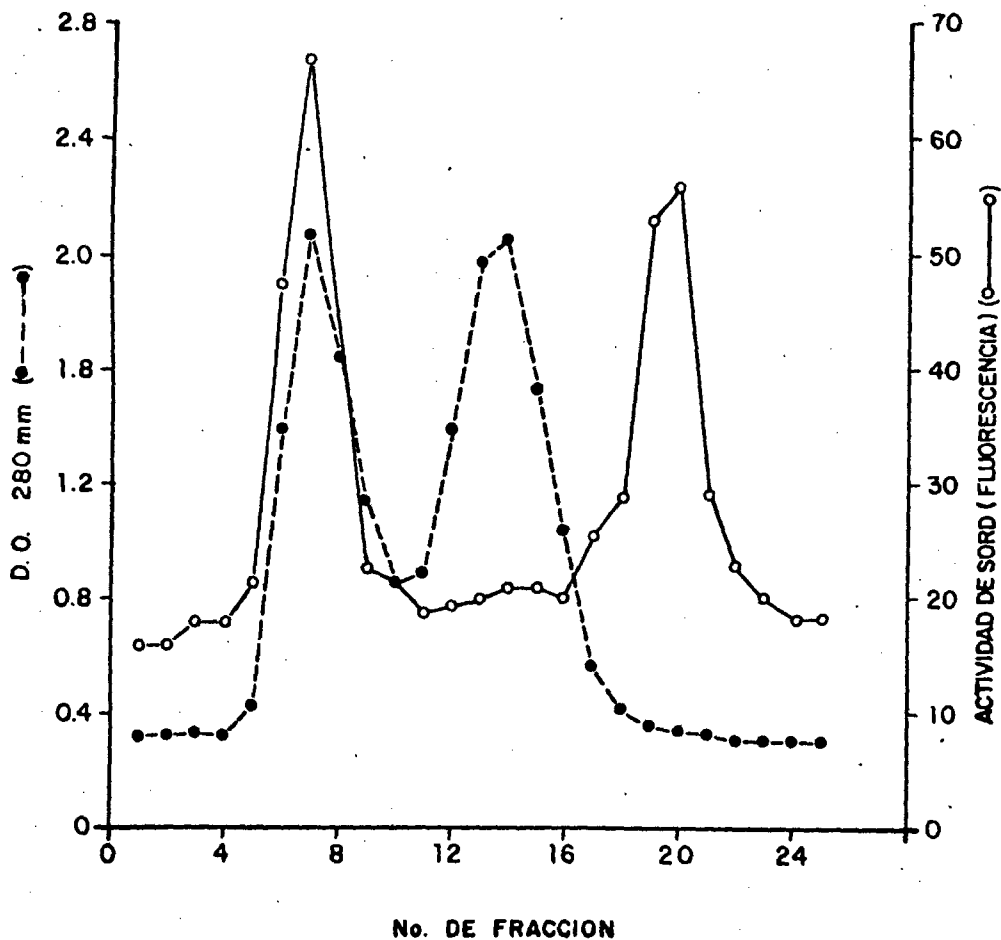
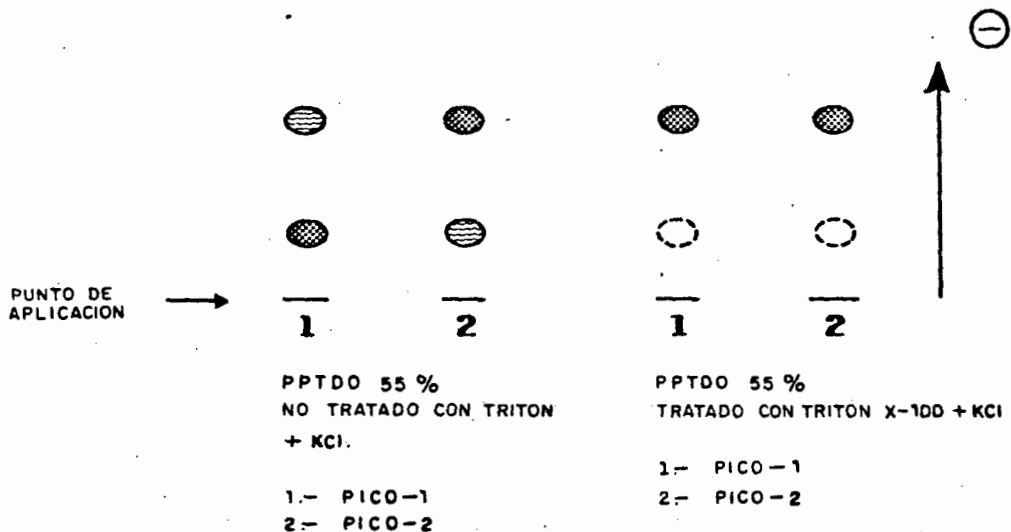


Fig. 2.- Comportamiento de elución en Sephadex G-200 (1.6 x 26cm.) del PPTDO 50-55 %. Fracciones de 2ml.

Fig. 3.- MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE SORD ELUIDA
 EN SEPHADEX G-200 Y PROVENIENTE DEL PPTDO
 55 % DE $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.



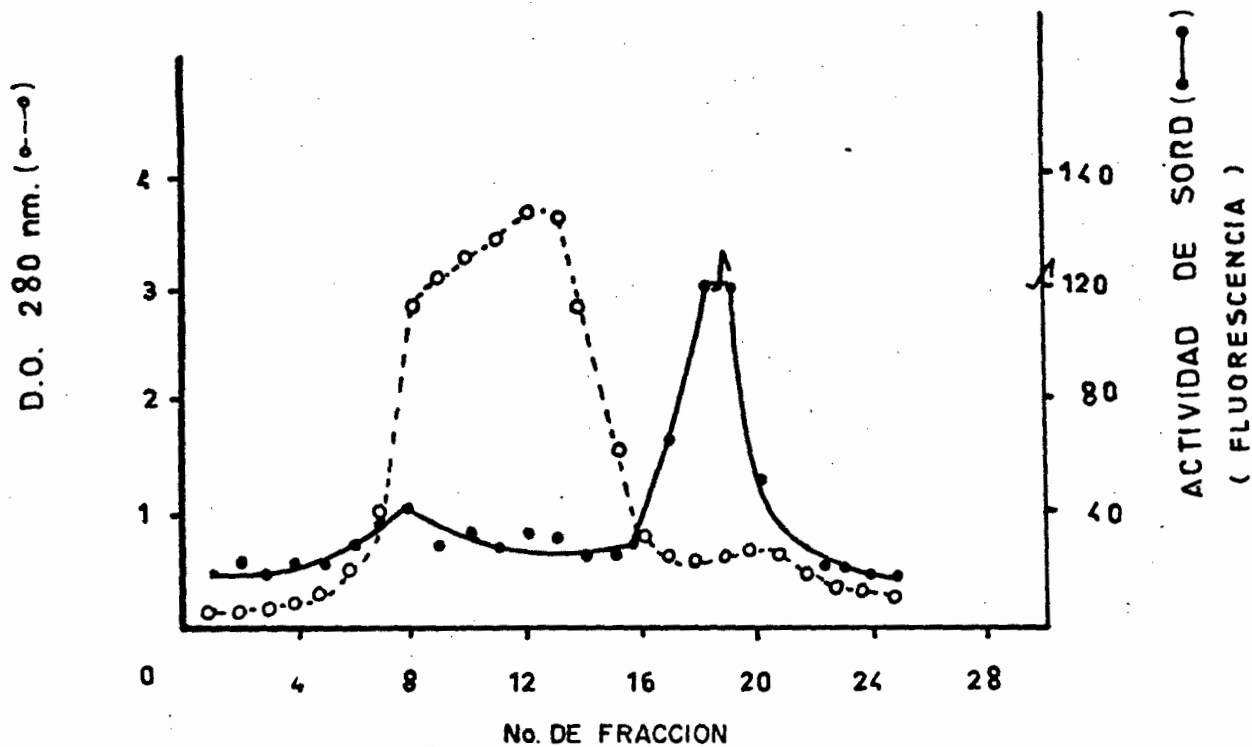


Fig. 4 Comportamiento de elución en Sephadex G-200 (1.6 x 26 cm.) del PPTDO 50-55% tratado con tritón X-100 al 1% y KCl 0.1 M. Fracciones de 2 ml.

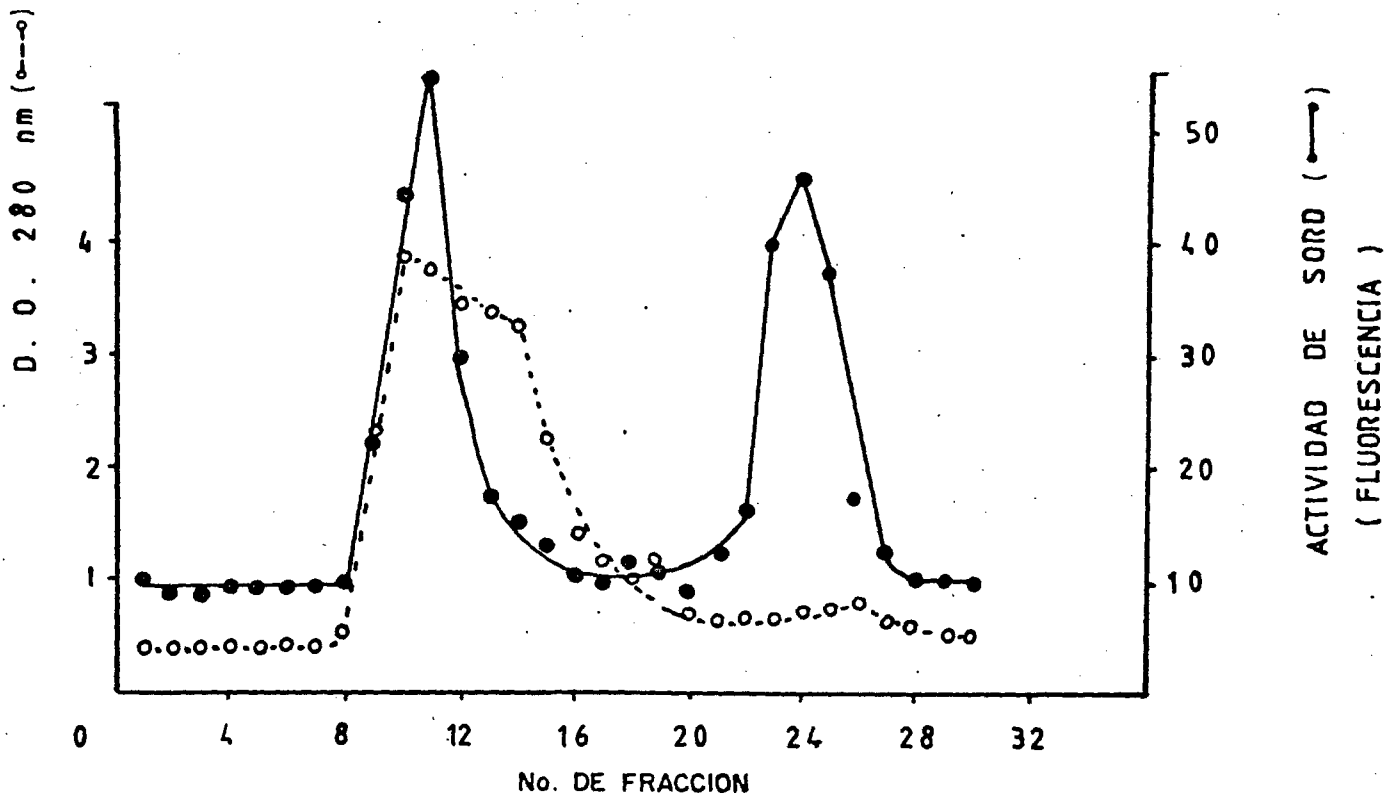


Fig. 5 Comportamiento de elución en Sephadex G-200 (1.6 x 26 cm.) de un so brenadante proveniente del PPTDO. de 80,000 xg solubilizado con tri tón X-100 y KCl. Fracciones de 2 ml.

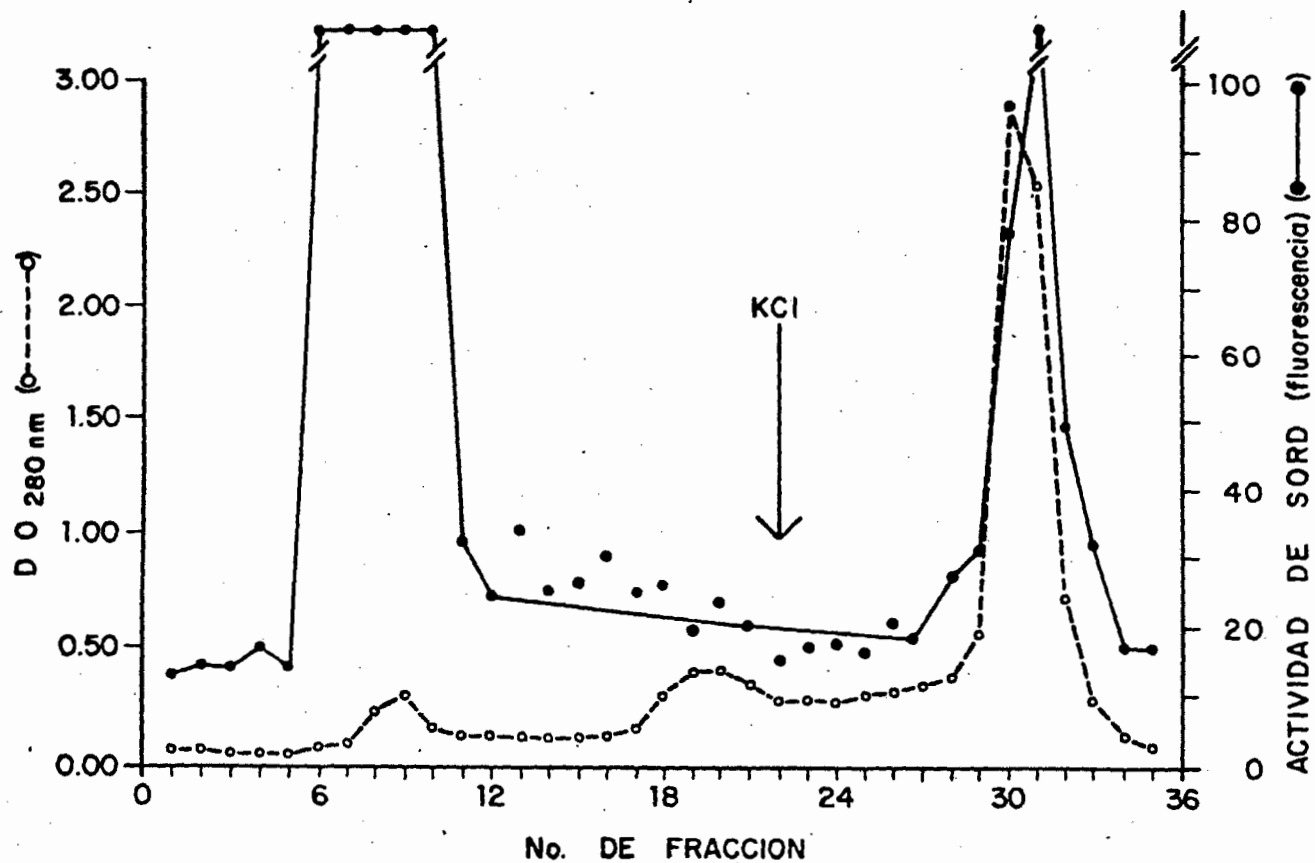


Fig. 6 Comportamiento de elución en DEAE-Sepharosa (1.6 x 26 cm.) del PPTDO 50-55%. Fracciones de 5 ml.

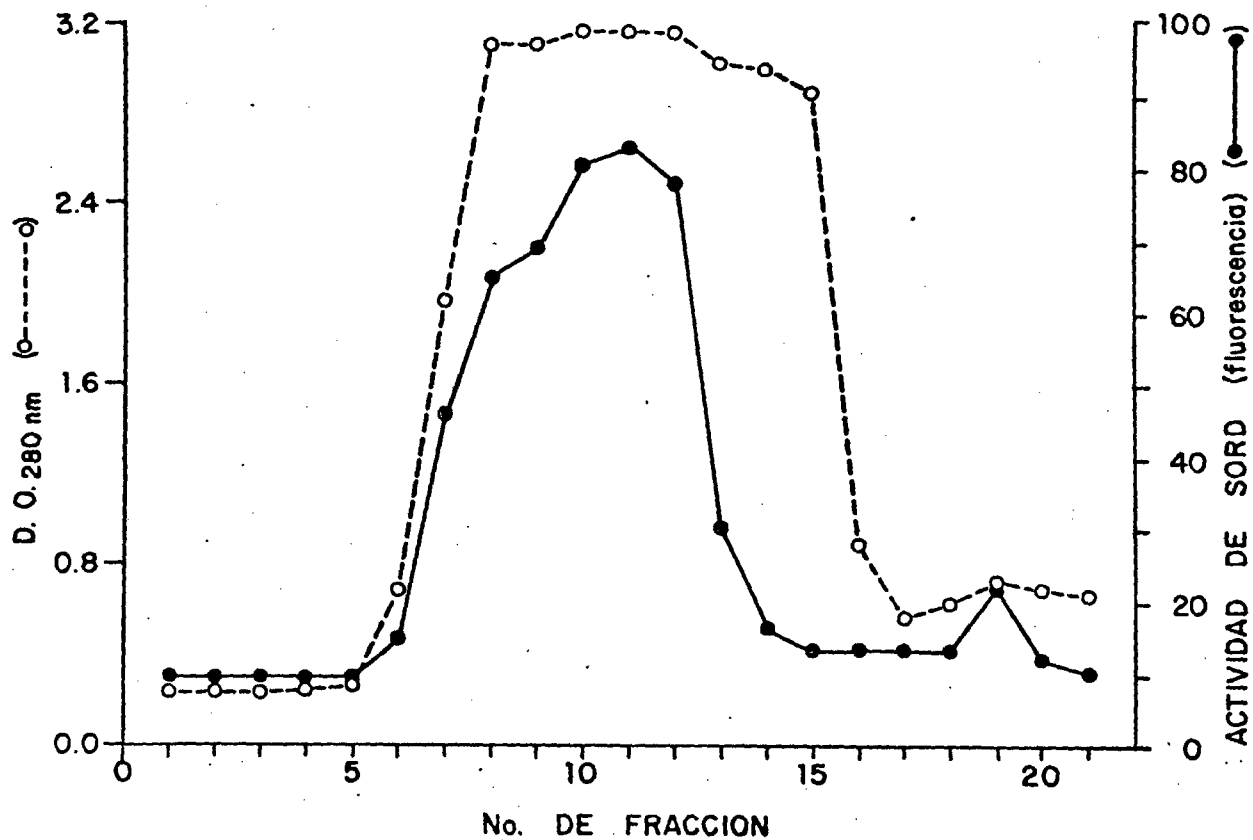


Fig. 7 Comportamiento de elución en Sephadex G-200 (1.6 x 42 cm.) de 1^r fantasmas tratados con tritón X-100 y KCl.
Fracciones de 4 ml.

Fig. 8.- MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE SORD.

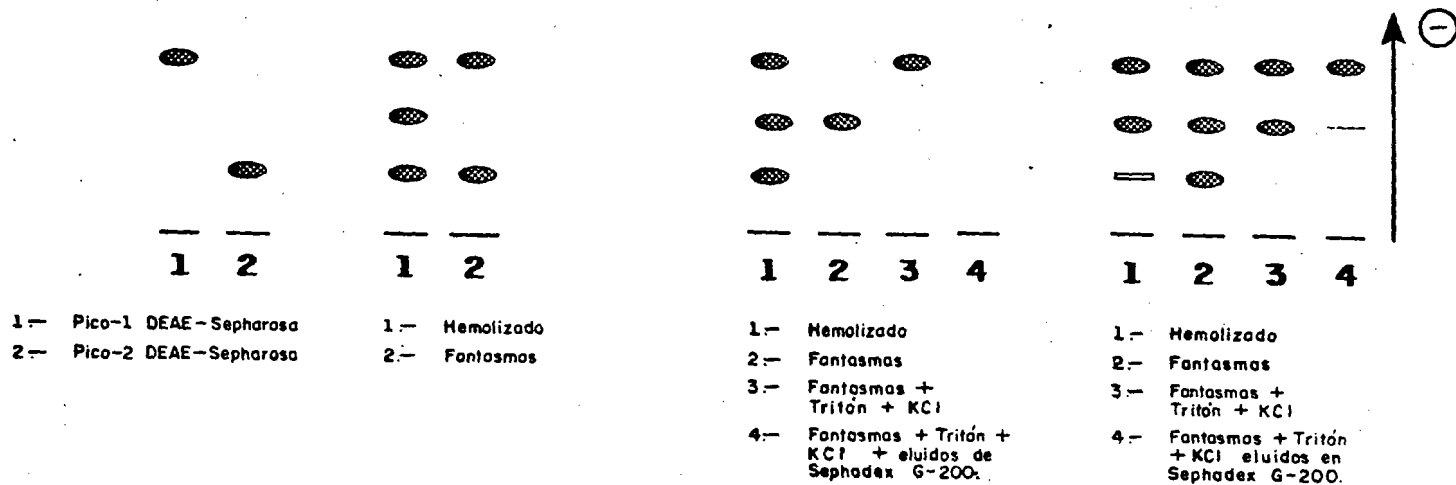


Figura 9- VELOCIDADES DE LA REACCION VS CONCENTRACION DE SORBITOL Y DE NAD⁺ (SORD Soluble).

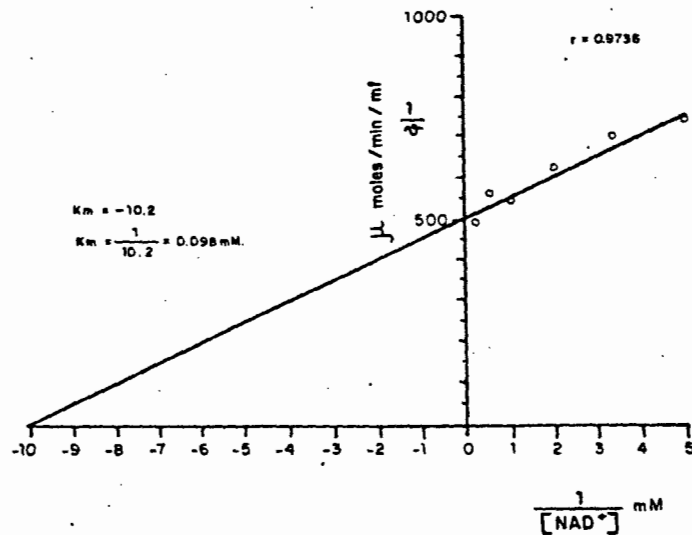
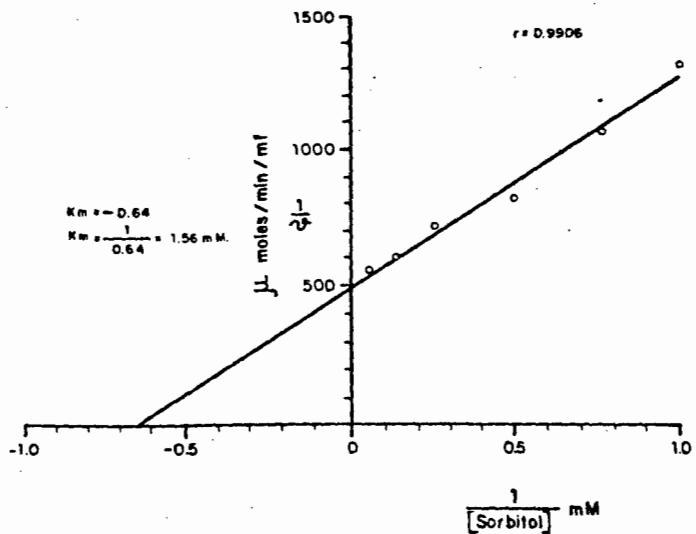


Figura 10— VELOCIDADES DE LA REACCION VS CONCENTRACION DE SORBITOL Y DE NAD⁺ (SORD de Membrana).

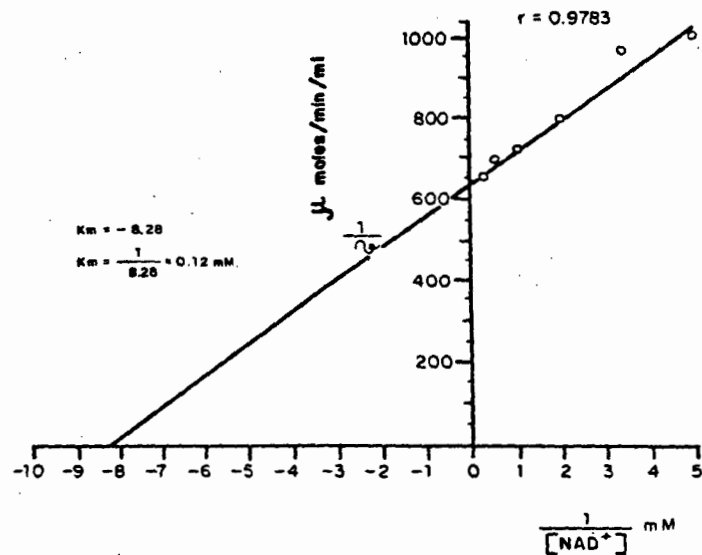
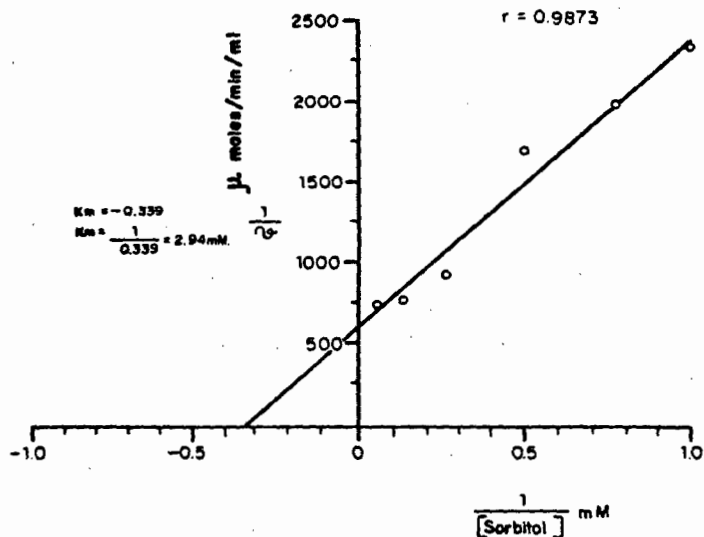


TABLA 1

PURIFICACION DE SORD

FRACCION	UNIDADES TOTALES (U)*	PROTEINA TOTAL (gr.)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (u/gr. prot)	** RENDIMIENTO (%)	*** PURIFICACION
hemolizado crudo (HC)	12.46	4.26	2.91	100	
PPTDO. 50-55% Sephadex G-200	4.11	0.0223	185	33	63
Pico Rápido	0.39	0.004866	80	3	27
Pico Lento	0.30	0.000306	977	2.4	356

* U = μ moles de producto formado/hora

** Rendimiento = $(\text{Unidades totales fracción} \div \text{Unidades totales hemolizado crudo}) \times 100$

*** Purificación = $\text{Actividad específica fracción} \div \text{Actividad específica hemolizado crudo}$.

TABLA 2

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE SORD
VS
CONCENTRACION DE SORBITOL

	1	2	3	4	5	6	7
* COCTEL 1	400	400	400	400	400	400	400 μ l
FUENTE DE ENZIMA	300	300	300	300	300	300	300
H ₂ O	300	200	200	200	200	200	200

Preincubación 37°C/10 min

SORBITOL 10 mM	---	100	---	---	---	---	---
13 mM	---	---	100	---	---	---	---
20 mM	---	---	---	100	---	---	---
40 mM	---	---	---	---	100	---	---
80 mM	---	---	---	---	---	100	---
200 mM	---	---	---	---	---	---	100

Medir incrementos en DU 340 nm cada 5 min durante 30 min.

* COCTEL 1:

Tris-HCl	1 M pH 8	100 μ l
MgCl ₂	200 mM	100
NAD ⁺	50 mM	100
Nicotinamida	50 mM	50
H ₂ O		50
		<u>400</u>

TABLA 3

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE SORD
VS
CONCENTRACION DE NAD⁺

	1	2	3	4	5	6	7
* COCTEL 2	400	400	400	400	400	400	400 μ l
FUENTE DE ENZIMA	300	300	300	300	300	300	300
H ₂ O	300	200	200	200	200	200	200

Preincubación 37°C/10 min

NAD ⁺	2 mM	3 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM
	---	100	---	---	---	---
	---	---	100	---	---	---
	---	---	---	100	---	---
	---	---	---	---	100	---
	---	---	---	---	---	100
	---	---	---	---	---	---
						100

Medir incrementos en DU 340 nm cada 5 min durante 30 min.

* COCTEL 2:	Tris-HCl	1 M pH 8	100 μ l
	MgCl	200 mM	100
	Sorbitol	200 mM	100
	Nicotinamida	50 mM	50
	H ₂ O		50
			<u>400</u>

TABLA 4

PURIFICACION DE SORD

FRACCION	UNIDADES TOTALES	PROTEINA TOTAL (gr)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/g prot.)	RENDIMIENTO (%)	PURIFICACION
Hemolizado Crudo (HC)	30.8	8.45	3.64		
PPTD. 50-55%	12.22	0.0663	184.31	39.67	50.63
Sephadex G-25	9.61	0.0341	281.81	31.20	77.42
DEAE-Sepharosa					
Pico-1	1.33	0.00081	1642	4.31	451
Pico-2	0.666	0.0236	28.22	2.16	7.75

TABLA 5

ACTIVIDAD DE SORD DE MEMBRANA

	* UNIDADES TOTALES	PROT. TOTALES (gr)	U/g Prot.
FANTASMAS	12.57	0.02434	517
SOBRENADANTE DE FANTASMAS (Tritón + KCl)	2.96	0.01828	162
PICO-SEPHADEX G-200	1.55	0.01446	107

* μ moles de producto formado/hora

TABLA 6

AFINIDADES POR SORBITOL Y NAD^+ DE LA SORD SOLUBLE
Y DE LA SORD UNIDA A MEMBRANA

	<u>*SORD PICO-1 DEAE SEPHAROSA</u>		<u>*SORD PICO-2 DEAE-SEPHAROSA</u>		<u>**SORD SEPHADEX G-200</u>	
	Km (mm)		Km (mm)		Km (mm)	
	Sorbitol	NAD^+	Sorbitol	NAD^+	Sorbitol	NAD^+
Experimento 1	3.12	0.113			3.84	0.148
Experimento 2	---	0.152			2.94	0.12
Experimento 3	2.77	0.338	1.57	0.14	2.17	0.163
Experimento 4	1.56	0.18				
Experimento 5	1.56	0.098				
\bar{x}	2.25	0.176	1.57	0.14	2.98	0.143

* Precipitado 50-55% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ dializado en Sephadex G-25 y cromatografiado en DEAE-Sepharosa

** Fantasmas eluidos con Tritón X-100 + KCl y aplicados a Sephadex G-200

TABLA 7

AFINIDADES POR SORBITOL Y POR NAD⁺ DE LA SORD DE DIVERSOS TEJIDOS ANIMALES

TEJIDO	Km (mm)		REFERENCIA
	Sorbitol	NAD ⁺	
Eritrocitos humanos	1.7	0.2	Barretto et al (47)
Eritrocitos humanos	2.0	---	Shin et al (30)
Eritrocitos humanos (soluble)	2.25	0.176	Esta tesis
Eritrocitos humanos (membranal)	2.98	0.143	Esta tesis
Cristalino humano	1.45	0.05	Jedziniak et al (3)
Cerebro humano	0.45	0.011	O'Brian et al (48)
Hígado humano SORD-1	18.2	0.36	Nealon et al (41)
Hígado humano SORD-2	9.6	0.2	Nealon et al (41)
Hígado de ratón	1.54	0.056	Burnell et al (49)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Hayman, S., Kinoshita, J. H.: Isolation and properties of lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.*, 240: 877, 1965.
2. Chylack, L. T., Cheng, H. M.: Sugar metabolism in the crystalline lens. *Surv. Ophthalmol.*, 23: 26, 1978.
3. Jedziniak, J. A., Chylack, L. T., Cheng, H. M., Gillis, M. K., Kalustian, A. A., Tung, W. H.: The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20: 314, 1981.
4. Stewart, M. A., Sherman, W. R., Kurien, M. M.: Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosemia. *J. Neurochem.*, 14: 1057, 1967.
5. Gabbay, K. H.: The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 288: 831, 1973.
6. Hers, H. G.: L'aldose reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, 37: 120, - 1960.
7. Mann, T.: The biochemistry of semen and the male reproductive tract. Wiley, New York, p. 249, 1964.
8. Travis, S. F., Morrison, A. D., Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I., Oski, F. A.: Metabolic alterations in the human erythrocyte produced

- by increases in glucose concentration. The role of the polyol pathway. *J. Clin. Invest.*, 50: 2104, 1971.
9. Morrison, A. D., Clements, R. S. Jr., Travis, S.F., Oski, F., Winegrad, A. I.: Glucose utilization by the polyol pathway in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40:199, 1970.
 10. Travis, S. F., Morrison, A. U., Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I., Oski, F. A.: The role of the polyol pathway in methaemoglobin reduction in human red cells. *Brit. J. Haematol.*, 27: 597, 1974.
 11. van Heyningen, R.: Sugar alcohols in the pathogenesis of galactose and diabetic cataracts. In: *The eye and inborn errors of metabolism. Birth defects*, 12: 295, 1976.
 12. Kinoshita, JH, Fukishi, S., Kador, P., Merola, L.D.: Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism*, 28: 462, 1979.
 13. Gabbay, K.H., Merola, L. O., Field, R. A.: Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*, 151: 209, 1966.
 14. Gabbay, K. H.: hyperglycemia, polyol metabolism and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.*, 26: 521, 1975.
 15. Corder, C. N., Braughler, J. M., Culp, P. A.: Quantitative histochemistry of the sorbitol pathway in glomeruli and small arteries of human diabetic kidney. *Folia Histochem. Cytochem. (Krakow)*, 17: 137,

1979.

16. Kinoshita, J. H.: Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol.*, 4: 786, 1965.
17. Van Heyningen, R.: The lens: Metabolism and cataract. *En: The eye.* Davson, H. (ed.), 2a. ed. Academic Press, New York, pp. 381-400; - 431-444, 1969.
18. Van Heyningen, R.: Galactose cataract: A review. *Exp. Eye Res.*, - 11: 415, 1971.
19. Kinoshita, J. H.: Mechanisms initiating cataract formation. *Invest. Ophthalmol.*, 13: 713, 1974.
20. Kador PF, Akagi Y, Kinoshita JH. The effect of aldose reductase and its inhibition on sugar cataract formation. *Metabolism* 35: 15, 1986
21. Kador PF, Robinson WG Jr., Kinoshita JH. The pharmacology of aldose reductase inhibitors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 691, 1985.
22. De Santis L. New horizons in the medical therapy of cataract: aldose reductase inhibitor and other agents. *Pharmacy Int.* 7: 17, 1986.
23. Kador PF, Kinoshita JH. Role of aldose reductase in the development of diabetes associated complications. *Am. J. Med.* 79 (Suppl. 5A): 8, 1985.

24. Vaca, G., Ibarra, B., Bracamontes, M., García-Cruz, D., Sánchez-Corona, J., Medina, C., Wunsch, C., González-Quiroga, G., Cantú, J.M.: Red blood cell sorbitol dehydrogenase deficiency in a family with cataracts. *Hum. Genet.*, 61: 338, 1982.
25. Vaca, G., Chavez Anaya, E., Mendoza, R., Vargas, E., Ríos, J., Ocampo-Campos, R., Medina, C., Cantú, J.M.: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-PD) Deficiency Prevents or Delays 'Sugar Cataracts': A working Hypothesis. *Acta XXV Concilium Ophthalmologicum. Proceedings of the XXVth. International Congress of ophthalmology, Rome, May 4-10, 1986 pp-735-739, 1987.*
26. Segal, S., Disorder of galactose metabolism. In "The Metabolic basis of inherited disease". Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (editores). Mc GrawHill, New-York, 1978, pág. 174.
27. Zinkham, WH., A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine-sensitive erythrocytes. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 109: 206, 1961.
28. Vaca, G., Sánchez-Corona, J., García-Cruz, D., Medina, C., Wunsch, C., González-Quiroga, G., Ibarra, B., Cantú, J.M.: A fluorescent screening test for red blood cell sorbitol dehydrogenase deficiency *Ann. Génét. (Paris)*, 26(1), 83-64, 1983.
29. Ibarra, B., González-Quiroga, G., Vaca, G., Díaz, M., Rivas, F., Cantú, J.M.: Sorbitol dehydrogenase (EC 1.1.1.14) polymorphism in

human seminal plasma. *Ann. Génét. (Paris)*, 26: 53, 1982.

30. 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.
31. Vaca, G., Zúñiga, P., Medina, C., Alonso, R., González-Quiroga, G., Ortiz-De luna, R. I., Cantú, J.M.: A fluorometric method for red blood cell sorbitol dehydrogenase activity. *J. Clin. Pathol.*, 36: 697, 1983
32. Vaca G, Alonso R, Zúñiga P, González-Quiroga G, Chávez MA, Medina C, Wunsch C, Cantú JM. Sorbitol dehydrogenase of deficiency in several pig tissues: potential implications for studies of experimental diabetes. *Diabetología*, 27: 482, 1984.
33. Medina C, Vaca G, Ríos J, Chávez-Anaya E, 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.
34. Vaca G, Ibarra B, Perea FJ, Rábago M, Alvarez C, Ortiz C, Medina C, Screening for thermostability and electrophoretic red blood cell sorbitol dehydrogenase (RBC-SORD) variants. (Manuscrito en preparación)
35. Perea, J.: Estudio del fenotipo electroforético de la enzima Sorbitol Deshidrogenasa (t.C. 1.1.1.14) en eritrocitos humanos. Tesis pa-

- ra obtener el grado de Lic. en Biología. Facultad de Ciencias. - Universidad de Guadalajara, reg. No. 082104356, 1987.
36. Vaca G, Medina C, Ibarra B, Alvarez C, Moller M, Cantú JM. Estudio de la enzima sorbitol deshidrogenasa (SORD). Avances metodológicos. X Cong. Nac. Genética Humana. Nov. 12-16 de 1985. Oaxaca, Oax. pág. 83.
 37. Alvarez C, Ibarra B, Vaca G, Cantú JM. Diseño y estandarización de un método electroforético en geles de poli(acrilamida) para la enzima sorbitol deshidrogenasa en eritrocitos humanos. XI Cong. Nac. Genética Humana. Nov. 10-15 de 1986. Puebla, Pue. Pág. 107.
 38. Rábago M, Ibarra B, Vaca G, Perea FJ, Alvarez C, Ortiz C, Alvarez A, Medina C, Cantú JM. Características bioquímicas de la enzima sorbitol deshidrogenasa eritrocitaria (SORD-E) semipurificada. XI Cong. Nac. Genética Humana. Nov. 10-15 de 1986. Puebla, Pue. Pág. 103.
 39. Barreto, O.C.O. and Nonoyama, K.: Biochemical characteristics of erythrocyte Sorbitol Dehydrogenase from selected mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B: 387, 1984.
 40. Donald, L. J., Wang, H. S., Hamerton, J. L.: Assignments of the sorbitol dehydrogenase locus to human chromosome 15:pter→q21. *Biochem. Genet.* 18: 425, 1980.

41. Nealon, D.A. and Rej, R.: Human liver Sorbitol Dehydrogenase: evidence for two forms. *Selected Topics in Clinical Enzymology*, 2: 535, 1984.
42. De, B.K. and Kirtley, M.E.: Interaction of Phosphoglycerate Kinase with Human Erythrocyte Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 252: 6715, 1977.
43. Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. and Ameyama, M.: Purification and Characterization of D-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of Gluconobacter suboxydans var. α . *Agric. Biol. Chem.*, 46: 135, 1982.
44. 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. 078 304723, 1986.
45. Read, S.M. and Northcote D.H.: Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 116: 53, 1981.
46. Rothe, M.G.: A survey on the formation and localization of secondary isozymes in Mammalia. *Hum. Genet.* 56: 129, 1980.
47. Barretto, O.C.O. and Beutler, E.: The Sorbitol-oxidizing enzyme of red blood cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 85: 645, 1975.
48. O'Brien, M.M., Schofield, P.J. and Edwards, M.R.: Polyol pathway -

- enzymes of human brain. *Biochem. J.*, 211: 81, 1983.
49. Burnell, J.N. and Holmes, R.S.: Purification and properties of Sorbitol Dehydrogenase from mouse liver. *Int. J. Biochem.*, 15: 507, - 1983.
 50. Bischoff, W.L.: Genetic control of soluble NAD⁺ dependent Sorbitol Dehydrogenase in Drosophila melanogaster. *Biochem. Genet.* 14: 1019, 1976.
 51. Widmer, C., King, T.E. and Cheldelin, V.H., *J. Bacteriol.*, 71: 737, 1957.
 52. Schrier, L.S.: Human erythrocyte membrane enzymes: Current status - and clinical correlates. *Blood.*, 50: 227, 1977.
 53. Schrier, S.L., Ben-Bassat, I., Junga, I., Seeger, M. and Grumet, F. C.: Characterization of erythrocyte membrane associated enzymes - (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Phosphoglyceric kinase). *J. Lab. Clin. Med.*, 85: 797, 1975.



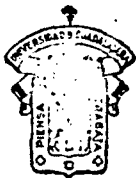
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 018/88

SRITA. BERTHA ADRIANA ALVAREZ RODRIGUEZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado -
el tema de Tesis "CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA -
SORBITOL DESHIDROGENASA (EC. 1.1.1.14) ERITROCITARIA" para obtener la -
Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado --
como Director de dicha Tesis el Dr. Sergio Aguilar Benavides.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Enero 5 de 1988

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El Dr. Sergio Aguilar Benavides, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

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

'mjsd

GUADALAJARA, JAL.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Dr. Carlos Astengo Osuna
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara
PRESENTE.

Estimado Dr. Astengo:

Por medio de la presente tengo a bien informarle que en mi calidad de Director de tesis de la pasante en Biología BERTHA ADRIANA ALVAREZ RODRIGUEZ, supervisé el desarrollo de su trabajo de tesis titulado "Caracterización Bioquímica de las isoenzimas de la Sorbitol Deshidrogenasa eritrocitaria".

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 tesis de la Srta. Alvarez Rodríguez.

Atentamente,

Dr. Sergio Aguilar Benavides.