

1985-2

REG. No. 078304723

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

FACULTAD DE CIENCIAS

Título

**Diseño y Estandarización de un Método Electroforético en Geles
de Poliacrilamida para la Enzima Sorbitol Deshidrogenasa
(SORD)**

Nombre: CARLOS ALVAREZ MOYA

DISEÑO Y ESTANDARIZACION DE UN METODO
ELECTROFORETICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA
PARA LA ENZIMA SORBITOL DESHIDROGENASA
(SORD)

AGRADECIMIENTOS

Q.F.B. BERTHA IBARRA, por tu colaboración, asesoramiento y amistad, gracias.

M. EN C. GERARDO VACA PACHECO, por tu ayuda, asesoramiento y amistad, gracias.

M. en C. JUAN MORA GALINDO, por su colaboración y apoyo brindado, gracias.

A LA DIVISION DE GENETICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE (U.I.B.O.), DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, agradezco profundamente a todos los que colaboraron para la realización de esta tesis.

A MI FAMILIA:

MADRE: ERNESTINA MOYA LARIOS

PADRE: CARLOS ALVAREZ CAMARENA

HERMANOS: CRISTINA, ANTONIO, MARGARITA y FERNANDO.

De una forma especial a mi novia:

LOURDES AVILA HERNANDEZ, por su apoyo y cariño.

I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
- Vía del Sorbitol	2
- Función de la Vía del Sorbitol	3
- Vía del Sorbitol y Complicaciones Diabéticas	4
- Polimorfismo de la SORD	5
- Electroforesis	9
III. MATERIAL Y METODOS	13
IV. RESULTADOS	18
V. DISCUSION	28
VI. CONCLUSIONES	31
VII. BIBLIOGRAFIA	32

I. INTRODUCCION.

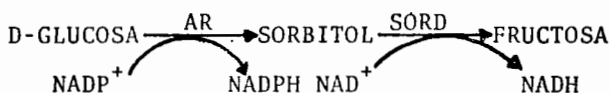
La enzima sorbitol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.14) participa en la vía metabólica del sorbitol que convierte los azúcares en sus alcoholes (por la aldosa reductasa) y éstos en sus cetosas (por la sorbitol deshidrogenasa), a esta vía se le han atribuído funciones específicas, en plasma seminal como fuente de fructosa y NADH y en el eritrocito como productor de NADH. Estados deficientes de la enzima pueden producir acumulación del sustrato y favorecer complicaciones en un tejido determinado (cristalino, riñón, etc.).

Con el fin de obtener un mejor conocimiento de la enzima se ha investigado la presencia de polimorfismo (por diferencias en su actividad enzimática, en su movilidad electroforética, etc.). En el eritrocito humano, los estudios electroforéticos en almidón mostraron una sola banda y en acetato de celulosa tres, sin embargo estos sistemas electroforéticos han mostrado sensibilidad y reproducibilidad inadecuada, por lo que hubo necesidad de diseñar y estandarizar un método electroforético diferente que permitiese el estudio de sorbitol deshidrogenasa eritrocitaria, motivo de la presente tesis.

II. ANTECEDENTES

I. VIA DEL SORBITOL.

La enzima sorbitol deshidrogenasa (SORD) participa en la vía metabólica responsable de convertir los azúcares como glucosa y galactosa a sus respectivos alcoholes y cetosas. En esta vía intervienen dos enzimas, la aldosa reductasa (AR) - que cataliza la conversión de glucosa y galactosa a sorbitol- y galactitol respectivamente, y la SORD que cataliza la conversión de sorbitol a fructosa;



SORD tiene baja afinidad por galactitol, sin embargo tiene afinidad por pentitales como xilitol y ribitol, que son convertidos a D-xilulosa y D-ribulosa respectivamente, lo que pone de manifiesto que la enzima posee una amplia especificidad por sustrato (I).

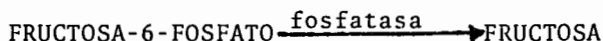
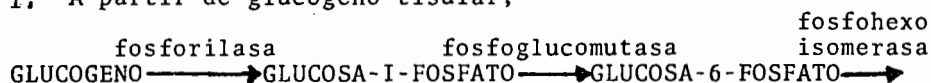
2. FUNCION DE LA VIA DEL SORBITOL EN PLASMA SEMINAL (A) Y EN ERITROCITOS (B).

A) En plasma seminal (2)

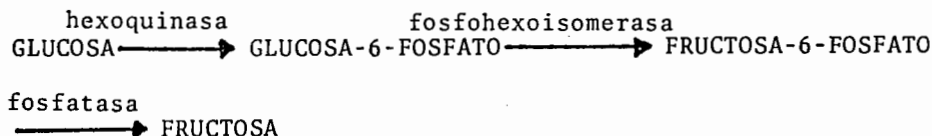
En plasma seminal de mamíferos normalmente se encuentra sorbitol, y la fructosa es el azúcar principal. Hay marcadas diferencias entre especies y aún entre individuos de la misma especie respecto a la concentración de sorbitol y fructosa en plasma seminal; en el hombre el nivel de fructosa es de 200 a 300 mg/dl, en el toro y la cabra es de - - - 500 mg/dl, y en el cerdo es menor de 50 mg/dl.

Por estudios realizados en vesículas seminales de hombre, toro, cerdo y borrego, así como en glándulas de coagulación de rata, se han postulado tres posibles vías enzimáticas para la formación de fructosa:

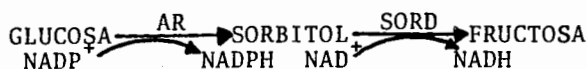
1. A partir de glucógeno tisular;



2. A partir de glucosa sanguínea;



3. A través de la vía sorbitol;



Pero no hay evidencia suficiente que permita decidir cuál de las tres vías es más importante en relación a la biosíntesis global de fructosa.

Se ha sugerido que el papel de la vía del sorbitol consiste en la producción de fructosa para ser utilizada como sustrato energético del espermatozoide y además esta vía puede suministrar NADH para ser utilizado como fuente de energía en la mitocondria.

B) En el eritrocito humano la función de la vía sorbitol parece ser la producción de NADH el cual proporciona el poder reductor necesario para la conversión de la metahemoglobina a hemoglobina mediada por la enzima metahemoglobina reductasa (3).

Se desconoce la función fisiológica de la vía del sorbitol en otros tejidos.

3. VIA DEL SORBITOL Y COMPLICACIONES DIABETICAS (1,4-9).

En condiciones normales la vía del sorbitol opera a muy baja velocidad, sin embargo en condiciones de hiperglicemia o estados galactosémicos se incrementa considerablemente el flujo por esta vía, lo que conduce a la acumulación de sorbi

tol o galactitol intracelularmente; estos polialcoholes son pobremente permeables a las membranas celulares y provocan una hipertonicidad en el citoplasma de las células (4).

Se ha encontrado que concentraciones elevadas de glucosa o galactosa conducen a la acumulación de sorbitol o galactitol y a la formación de cataratas en animales experimentales, cristalinos incubados in vitro y en pacientes con diabetes mellitus o galactosemia debida a errores congénitos del metabolismo.

Otras complicaciones diabéticas en las que se ha implicado la participación de la vía del sorbitol son la neuropatía y la nefropatía por el mismo mecanismo que opera en el desarrollo de cataratas (4).

Teóricamente una deficiencia de SORD causada por una mutación en el locus que codifica para esta enzima conduciría a la acumulación de sorbitol y eventualmente al desarrollo de cataratas (10).

4. POLIMORFISMO DE LA SORD

Se denominan isoenzimas a las múltiples formas moleculares de una enzima particular que se presentan en un mismo individuo o en diferentes miembros de una misma especie y que catalizan la misma reacción, aún teniendo diferencias en sus propiedades (11, 12).

La presencia de isoenzimas puede estar dada por: a) múl-

tiples loci que codifican diferentes cadenas polipeptídicas; b) múltiples alelos de un mismo locus; c) isoenzimas secundarias que se producen por modificaciones post-traduccionales de la cadena polipeptídica original y d) por mecanismos aún no determinados (12).

Se dice que una enzima es polimórfica cuando la frecuencia del alelo más común es menor de 99% (12). Las isoenzimas pueden ser detectadas por diferencias; a) en su actividad enzimática; b) en su fenotipo electroforético; c) en su afinidad por sustrato; d) en su respuesta a inhibidores o activadores y e) en su termoestabilidad.

Los estudios a partir de los cuales se puede inferir que existen diferencias entre individuos en las propiedades cualitativas de SORD son los siguientes:

En 1969 Op't Hof estudió electroforéticamente a la SORD en múltiples tejidos de cerdo y demostró la existencia de polimorfismo de la enzima en hígado. En los individuos heterocigotos encontró un patrón electroforético de cinco bandas y - en los homocigotos para el alelo normal o para el alelo mutado encontró un patrón de una sola banda. Estos resultados - sugieren una estructura tetramérica para la SORD (13).

Op't Hof (14) también encontró fenotipos electroforéticos de cinco bandas en el hígado de algunas especies de vertebrados marinos.

En eritrocitos humanos de 665 individuos, Charlesworth en 1972 (15) observó una sola banda de SORD con movilidad catódica, excepto en un individuo en el cual la misma banda migró menos catódicamente y lo designó como un alelo electroforético.

En estudios tendientes a determinar la localización cromosómica del locus que codifica para SORD, Donald estudió electroforéticamente a la enzima en células somáticas de humano y de hamster y en híbrido de ambas. En el híbrido encontró un fenotipo electroforético de tres bandas incompatible con la estructura tetramérica propuesta por Op't Hof y compatible con una estructura dimérica. El locus que codifica para SORD en humanos se designó al cromosoma 15 en la región -pter → q21(16).

En 1982 Ibarra et. al. determinaron el fenotipo electroforético de la SORD en muestras de plasma seminal humano en acetato de celulosa habiéndose observado individuos con una banda lenta, otros con una banda rápida y otros con dos bandas, lo que se interpretó por la presencia de dos alelos o por la formación de isoenzimas secundarias (17).

Bajo la hipótesis de que una deficiencia de SORD podría conducir a la acumulación de sorbitol en el cristalino, y eventualmente al desarrollo de cataratas, Vaca et. al., en 1982 (10) hicieron un estudio con el objeto de encontrar individuos con deficiencia de SORD eritrocitaria; la población

estudiada consistió de pacientes con diabetes y/o cataratas, los hallazgos más relevantes de este estudio fueron:

- a) En una familia con cataratas congénitas se encontró deficiencia de SORD en los eritrocitos. Si bien, los resultados no definieron una clara relación etiopatogénica catarata-deficiencia de SORD, ellos sugirieron la existencia de polimorfismo en la actividad de la enzima. No se encontraron diferencias en la movilidad electroforética de la SORD entre controles y los individuos con la deficiencia enzimática (10).
- b) Se encontró una gran variabilidad en la actividad enzimática de cerca de 450 individuos de diferentes grupos (donadores de sangre pacientes con diabetes mellitus tipo I y II y pacientes con cataratas). Dicha variabilidad puede representar polimorfismo en la actividad, el cual pudiera ser relevante en el estudio de las complicaciones diabéticas, tales como cataratas, neuropatía y glomeruloesclerosis (Vaca et. al., datos no publicados).

Entre otras, las siguientes cuestiones ameritan ser investigadas:

- ¿La variación en la actividad de la SORD puede ser atribuida a alélismo múltiple?
- ¿Los niveles relativos de la SORD eritrocitaria son un reflejo de la SORD EN EL CRISTALINO?

Para abordar estas preguntas se contemplan dos estrategias:

1. Buscar diferencias entre individuos en las propiedades - cualitativas de la SORD en hemolizados crudos y/o en preparaciones semipurificadas.
2. Comparar las características bioquímicas de la SORD eritrocitaria y de cristalino.

En 1984, Nealon (18) realizó estudios cinéticos, cromatográficos e inmunoquímicos de SORD de hígado humano e identificó 2 formas diferentes, una forma principal que representa del 90 al 95% de la actividad total (SORD-2), y una forma menor que se encuentra en una concentración de 5 a 8% (SORD-1).

Los estudios electroforéticos en acetato de celulosa de SORD de los eritrocitos mostraron una sensibilidad inadecuada para iniciar la búsqueda de polimorfismo electroforético - siendo además en la actualidad un método sumamente costoso, - por lo que se planteó la necesidad de diseñar y estandarizar un método de electroforesis en gel de poliacrilamida, motivo de la presente tesis.

5. ELECTROFORESIS (19)

La electroforesis es un método de desplazamiento mediante el cual las moléculas con cargas eléctricas diferentes suspendidas en un medio migran a los electrodos cuando se aplica una corriente eléctrica a través de una solución.

La separación depende de la carga eléctrica de la partícula, del medio de soporte donde se encuentra y de las soluciones amortiguadoras empleadas.

En un campo eléctrico, las moléculas de carga negativa - (aniones) migran al electrodo positivo (ánodo), la rapidez - de migración es relativa a la medida de la carga neta de la - molécula, del campo eléctrico y de la fuerza aplicada a tra - vés de los electrodos. La energía es generada por el pH del bufer y se determina por el voltaje marcado por una fuente - de poder. Las condiciones apropiadas de composición del bu - fer, pH, voltaje interno, duración de la electroforesis, etc. son determinados empíricamente. Para la electroforesis se - utilizan varios tipos de bufer, es difícil generalizar su - composición ya que son varios los requerimientos de una enzi ma particular, su función es neutralizar los cambios de pH - que ocurren en la electroforesis como el ácido producido por el ánodo, y el alcalino generado por el cátodo, para conser - var el pH óptimo para la actividad de la enzima particular.

La refrigeración es un factor importante para reproducir - los resultados de la electroforesis enzimática impidiendo la producción excesiva de calor que puede producir inactivación o distorsión de las isoenzimas. El calor generado es propor - cional al voltaje aplicado, la producción de calor puede ser razonable usando bajo voltaje y bufer con carga iónica. Exis tendiferentes técnicas utilizadas en forma horizontal o ver -

tical en diversos medios de soporte, los más empleados son:- a) gel de almidón; b) gel de agarosa; c) celogel; d) gel de acrilamida. La separación de las isoenzimas depende de: a)- carga neta iónica y su peso molecular (almidón y acrilamida); b) de la diferencia en carga eléctrica de las moléculas (en- agarosa y celogel). Las enzimas son anfolitos que pueden te- ner carga neta positiva o negativa en un pH particular dado- por la ionización de los grupos amino libres de lisina y ar- ginina y de los imidazoles de histidina (cargas positivas) y de los grupos carboxilo libres de ácido aspártico y glutámi- co (carga negativa); el peso molecular depende del número de aminoácidos que contenga la molécula y sus grupos adiciona- les.

Los geles de poliacrilamida se preparan por polimeriza- ción de monómeros formados de acrilamida con metilen bisacri- lamida para proporcionar un medio de soporte inerte y rígido, la concentración del monómero de acrilamida y bisacrilamida- puede variar el tamaño del poro de manera que el tamiz molecu- lar del gel tenga los requerimientos de manejo adecuados. Ge- neralmente tienen una concentración constante de bisacrilami- da (aproximadamente 2.7% de la concentración total de acrilami- da). Se obtienen geles más porosos usando altas concentra- ciones de bisacrilamida. Las soluciones de estos monómeros - son tóxicas, por lo que se debe tener precaución, particular- mente evitar el pipeteo, ya polimerizado resulta inofensivo;- para su polimerización se emplea un catalizador como ribofla- vina, que es efectiva a bajas concentraciones en presencia -

de luz ultravioleta. Una alternativa confiable y conveniente es el uso de una mezcla de tetrametil etilendiamina - - - (TEMED) en una concentración final del gel de 0.05% v/v y - persulfato de amonio en una concentración similar (0.05 a - 0.1%). La polimerización ocurre usualmente en pocos minutos en refrigeración, cuando la solución del gel está en contacto directo con el oxígeno atmosférico se inhibe el proceso. - Los buffers utilizados son similares a los utilizados en electroforesis en gel de almidón. La electroforesis se puede - realizar en pequeños tubos de 5-6 mm de diámetro o en una base de dimensiones de 12 x 20 cms. Los geles usualmente están en un plano vertical y los aparatos son diseñados para - que el buffer del puente esté en contacto directo con el extremo de los geles, también es necesario agregar glicerol o solución de sacarosa a las muestras para hacerlas más densas y que permanezcan abajo del buffer del puente, los tubos son - usados para el análisis de una sola muestra, mientras que la técnica en placa es preferida para estudios de polimorfismos enzimáticos, ya que se facilita la comparación de isoenzimas en diferentes muestras.

III. MATERIAL Y METODOS.

REACTIVOS:

- Trisma base
- HCl
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Persulfato de amonio
- N,N,N',N' Tetrametil etilendiamina, (TEMED)
- Riboflavina
- Sorbitol
- Piruvato de sodio
- Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD)
- Bromuro de dimetil, tiazolil, difeniltetrazolio (MTT)
- Fenazina metosulfato (PMS)
- Sacarosa al 50%

EQUIPO:

- Potenciómetro
- Lámpara de luz ultravioleta
- Cámara de electroforesis en tubos
- Fuente de poder
- Estufa a 37°C

METODOS

Se partió de las condiciones comunmente usadas para elec-

troforesis en poliacrilamida de otras enzimas. Acrilamida - (5 a 7%), bisacrilamida (2.7 a 5%), persulfato de amonio - (0.05 a 0.5%), TEMED (0.05 a 0.5%) y riboflavina 0.001%).

Como bufer de corrimiento se utilizó inicialmente tris---HCl 0.3M pH8.6 descrito para SORD en almidón (17) y finalmente tris-HCl 0.15M pH 8.6. Todos los experimentos se realizaron a 4°C.

Los hemolizados fueron preparados como sigue: los eritrocitos lavados con solución salina 3 veces, fueron sometidos a congelación con una mezcla de acetona y hielo seco y des--congelados con agua corriente, el proceso se repitió tres veces. El hemolizado se diluyó volumen a volumen con sacarosa al 50% y de esta mezcla se aplicaron 30 microlitros.

La enzima se visualizó usando la mezcla de revelado des--crita en acetato de celulosa (18) que consiste de lo siguiente: sorbitol 1.2%, piruvato de sodio 0.42%, NAD^+ 0.08%, MTT - 0.015% y PMS 0.010% en bufer tris-HCl 0.1 M pH 8.0. El piruvato de sodio se utilizó para inhibir lactato deshidrogenasa.

Para obtener una separación electroforética adecuada de -SORD, se diseñaron los experimentos 1 y 2 de la tabla I y de acuerdo con los resultados obtenidos se hicieron las modificaciones pertinentes hasta encontrar las condiciones óptimas logradas en el experimento 20 de la tabla III.

TABLA I

CONDICIONES EXPERIMENTALES UTILIZADAS PARA OBTENER LA SEPARACION
ADECUADA DE SORD EN GELES DE POLIACRILAMIDA

NUMERO DE EXPERIMENTO	1	2	3	4	5	6	7
ACRILAMIDA (%)	7	7	7	7	7	7	5
BISACRILAMIDA (%)	3.4	3.4	3.4 5	3.4 5	5	5	5
PERSULFATO TEMED DE AMONIO (0.375%) (0.388%)	+	-	+	-	+		+
RIBOFLAVINA (0.001%)	-	+	-	+	-		-
BUFFER DEL GEL TRIS-HCl	0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6, 9.0, 9.5, 0.06 M pH 8.6 y 9.5	M/pH 0.3/8.9 0.06/8.9 0.3/9.5 0.06/9.5	M/pH 0.3/8.9 0.06/8.9
BUFFER DE CORRIMIENTO TRIS-HCl	0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6	TRIS-GLI CINA 0.2M pH8.3	
TIEMPO DE CORRIMIENTO (HORAS)	2,4 y 6		6/18		6	6	
VOLTAJE(Volt)	50		100	150	100	100	

TABLA II. (Continuación de la Tabla I)

NUMERO DE EXPERIMENTO	8	9	10	11	12	13	14
ACRILAMIDA (%)	5	4	5	4	5	5	5
BISACRILAMIDA (%)	5	5	5	5	5	5	5
PERSULFATO TEMED DE AMONIO (0.375%) (0.388/)	+			+	+		+
RIBOFLAVINA (0.001%)	-		-		-		-
BUFFER DE GEL TRIS-HCL	M/pH 0.3/8.6 0.06/8.6 0.1/8.6 0.1/8.9	M/pH 0.3/8.6 0.3/8.6	MpH 0.3/8.6 0.3/8.6	M/pH 0.3/8.6 0.3/8.3 0.3/8.0 0.1/8.0	0.3 M pH 8.6,8.5,8.3 0.1 M pH 8.6,8.5,8.3		M/pH 0.2/8.6 0.25/8.6 0.3/8.6
BUFFER DE CORRIMIENTO TRIS-HCL	0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.3		0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6
TIEMPO DE CO- RRIMIENTO EN HORAS.	4		6		18	6	18
VOLTAJE (Volt)	150		150		100		150

TABLA III. (Continúa de la Tabla II)

NUMERO DE EXPERIMENTO	15	16	17	18	19	20
ACRILAMIDA (%)	5/8/9	5	5	5	7	7
BISACRILAMIDA (%)	5	5	5	5	5	5
PERSULFATO TEMED DE AMONIO (0.375%) (0.388%)	+	+	+		+	+
RIBOFLAVINA (0.001%)	-	-	-		-	-
BUFFER DE GEL TRIS_HCL	0.25 M pH 8.6		0.25 M pH 8.6		M/pH 0.25/8.6 0.15/8.6 0.075/8.6	0.075 M pH 8.6
BUFFER DE CORRI- MIENTO (TRIS-HCL)	0.3 M pH 8.6		0.3 M pH 8.6		0.15 M pH 8.6	0.15 M pH 8.6
TIEMPO DE CORRI- MIENTO (Horas)	18	8		4	4	4
VOLTAJE (Volt)	80		150		150	150

IV. RESULTADOS

A continuación y de manera independiente se describen los objetivos y los resultados de cada uno de los experimentos - (Tablas I, II y III) que se realizaron para obtener una buena migración y definición de las bandas con actividad de SORD.

EXPERIMENTOS 1 y 2:

Objetivos: a) Demostrar cuál mezcla de polimerización [per--sulfato de amonio/TEMED (Experimento 1) o riboflavina (Experimento 2)] no afecta la actividad de la enzima; h) buscar - voltaje y tiempo adecuados; c) buscar el vehículo adecuado - para el hemolizado, glicerol al 10% o sacarosa al 50%; d) - buscar la concentración óptima de hemolizado, entre 15, 30 y 60 microlitros.

Resultados: a) Ninguna de las mezclas inhiben la actividad de la enzima; b) la enzima no migró del punto de aplicación, por lo que el voltaje y el tiempo fueron inadecuados; c) no se observaron diferencias en cuanto al uso de sacarosa o glicerol, por lo que se siguió utilizando sacarosa; d) con 30 - microlitros de hemolizado se observó una buena actividad de SORD, dosis utilizada en experimentos subsecuentes.

EXPERIMENTOS 3 y 4:

Objetivos: a) Confirmar la no inactivación de SORD con per--sulfato de amonio/TEMED (Experimento 3) ó riboflavina (Expe-

rimento 4); b) incrementar la concentración de bisacrilamida para favorecer la migración; c) incrementar el voltaje y el tiempo; d) mejorar la actividad de la enzima agregando la co enzima NAD^+ .

Resultados: a) SORD no se inactivó, en adelante se utilizó persulfato de amonio/TEMED; b) no hubo diferencias con bisacrilamida al 3.4 y 5% en cuanto a migración, sin embargo los geles al 5% fueron más manejables; c) a 6 horas 100 volt la banda de actividad de SORD mostró una migración de 5 a 8 mm del punto de aplicación y d) agregar NAD^+ a la muestra no me joró la actividad de SORD.

EXPERIMENTO 5:

Objetivo: a) modificar la molaridad y el pH del bufer del gel; b) demostrar que si se elimina el sustrato de la mezcla de revelado no hay actividad de SORD; c) comparar el fenotipo electroforético de SORD de eritrocito con el de la SORD de hígado humano.

Resultados: a) La mayor migración (7 a 8 mm) se observó a 0.06 M pH 8.6, sin embargo no se observó buena definición de la actividad de SORD; b) sin sustrato no se observó actividad de SORD; c) SORD de hígado fue semejante a SORD de eritrocito.

EXPERIMENTOS 6 y 7:

Objetivos: a) Buscar si un bufer de corrimiento diferente -

(tris-glicina pH 8.6) mejora la migración y resolución de la SORD. En este nuevo sistema se probaron diferentes concentraciones de acrilamida, 7% (experimento 6) y 5% (experimento 7), diferente molaridad del bufer del gel (0.3 y 0.06) y diferente pH (8.9 y 9.5).

Resultados: a) A pH 9.5 (gel) y 5% de acrilamida se observó mayor migración, sin embargo, la definición de las bandas (resolución) no mejoró.

EXPERIMENTOS 8 y 9:

Objetivos: a) Dado que a menor concentración de acrilamida se observó mayor migración (experimento 8), se buscó mejorar la migración y definición con acrilamida al 4 y 5% a una molaridad y pH del bufer del gel que habían mostrado buenos resultados con acrilamida al 7% (experimento 5).

Resultados: a) La disminución de la concentración de la acrilamida mejoró la migración, sin embargo se observó menor resolución, por lo que es claro que si se baja la concentración de acrilamida, no se debe bajar la molaridad del bufer.

EXPERIMENTOS 10 y 11:

Objetivo: a) Probar condiciones ya utilizadas de molaridad del bufer del gel y concentración de acrilamida (5%, experimento 10 y 4% experimento 11), pero con un bufer de corriente a un pH menor (8.3).

Resultados: a) Se confirma que a menor concentración de acrilamida existe mayor migración (4%), la disminución del pH - del bufer de corrimiento no mejoró la calidad de las bandas - con actividad de SORD.

EXPERIMENTO 12:

Objetivo: Probar un tiempo de corrimiento y un voltaje mayor en condiciones diferentes de molaridad y pH del bufer - del gel.

Resultados: A 18 horas de corrimiento la actividad de SORD - se pierde.

EXPERIMENTOS 13 y 14.

Objetivos: a) Buscar molaridad adecuada del bufer del gel - al mismo pH (8.6) y b) probar tiempos de corrimiento de 6 - (Experimento 13) y 18 horas (Experimento 14) a 150 volts.

Resultados: a) Con molaridad 0.25 se observó mayor migración (Fig. 1, experimento 13), la banda más catódica migró 13 mm - y la menos catódica 5 mm. Este experimento se realizó en - cuatro ocasiones adicionales en busca de reproducibilidad, - sin embargo ésta no se logró (Fig. 2 y 3); b) a 18 horas no - se observó actividad de SORD.

EXPERIMENTO 15:

Objetivo: Buscar una migración mayor de 13 mm incrementando el tiempo y utilizando concentraciones mayores de acrilamida.

Resultados: No se observó actividad de SORD, probablemente debido al tiempo de corrimiento, por lo que se decidió abandonar experimentos a tiempos largos.

EXPERIMENTO 16:

Objetivo: Buscar mayor migración con un tiempo de corrimiento de 8 horas. Este experimento es semejante al 13 con una sola molaridad (0.25).

Resultados: Se logró mayor migración (17 a 26 mm), sin embargo se observó una sola banda.

EXPERIMENTO 17:

Objetivo: Buscar resolución adecuada de SORD a cuatro horas. Este experimento es semejante al 16.

Resultados: No se mejoró la resolución de las bandas.

EXPERIMENTOS 18 y 19:

En este experimento se disminuyó la molaridad del bufer de corrimiento (0.15) y la del bufer del gel (0.15 y 0.075).

Objetivos: Buscar una mejor resolución en dos concentraciones diferentes de acrilamida, 5% (Experimento 18) y 7% (Expe

rimento 19).

Resultados: Esta modificación no fue adecuada para los geles de acrilamida al 5%, sin embargo en los geles al 7% los resultados fueron favorables habiéndose observado una mejor resolución y migración con molaridad 0.075 del bufer del gel. Estos resultados indican que se obtiene mayor resolución - - cuando la molaridad del bufer del gel es menor que la del bufer de corrimiento. En este experimento se observaron nuevamente dos bandas con actividad de SORD (15 y 10 mm).

Es importante señalar que en este y los experimentos anteriores se removi6 del gel la hemoglobina (Hb) que por migrar al ánodo podía contaminar facilmente el bufer, ya que los experimentos en acetato de celulosa mostraron 3 bandas se pens6 que al remover la Hb se favorecía la desaparición de la banda menos catódica, por lo que se decidi6 no eliminar la Hb.

EXPERIMENTO 20:

Objetivos: a) Confirmar la resolución y migración observada en el experimento 19 (búfer del gel 0.075 M y búfer de corrimiento 0.15 M ambos a pH 8.6); b) confirmar la presencia de tres bandas si no se remueve la Hb del gel.

Resultados: a) Se confirm6 la capacidad de resolución y migración previstas; b) no remover la Hb de los geles permiti6 la visualización de tres bandas con actividad de SORD (Fig.4)

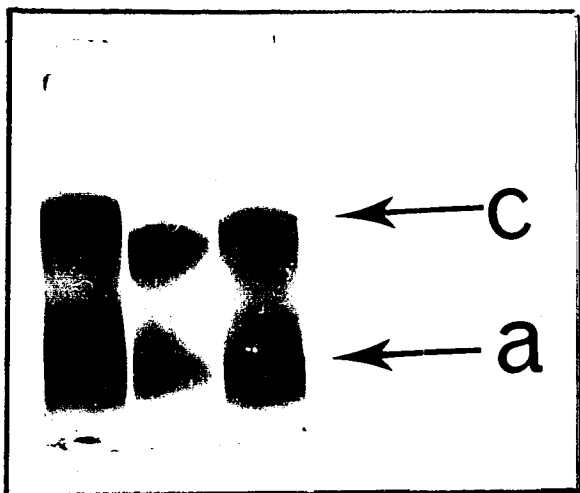


Fig. 1

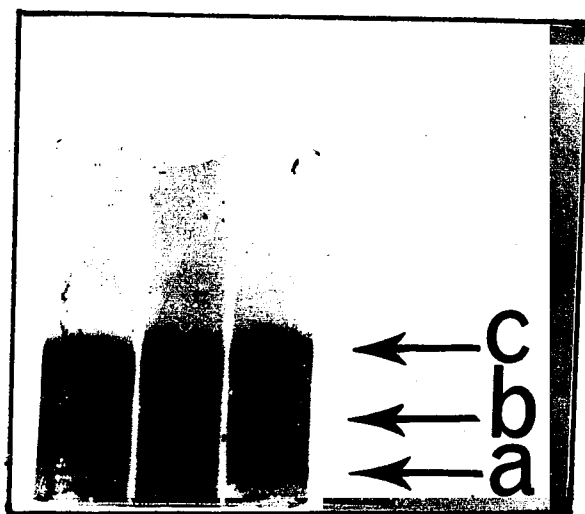


Fig. 2

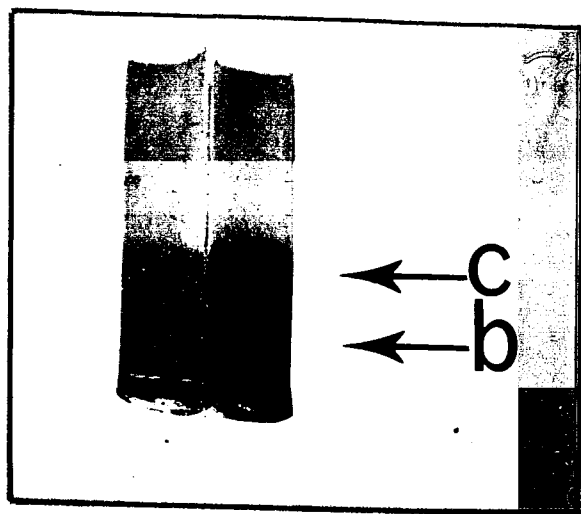


Fig. 3

denominadas arbitrariamente a, b y c (2, 8 y 14 mm de migración respectivamente).

Fig. 4



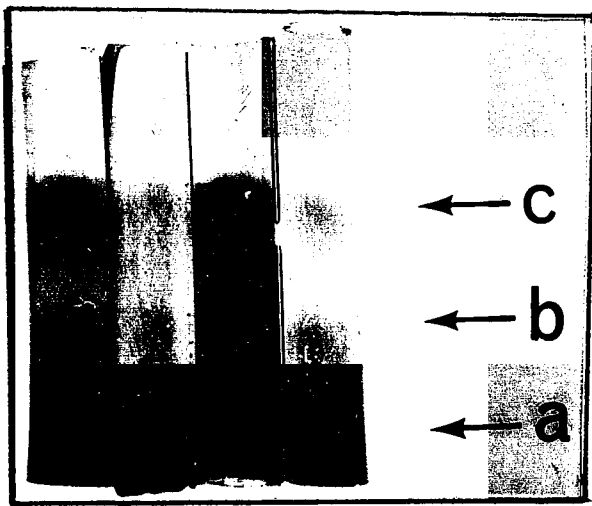
Utilizando las condiciones del experimento 20, se investigó el fenotipo electroforético de SORD en eritrocitos de dos grupos de individuos: A) 6 individuos a quienes se les tomaron tres muestras (en ayunas, postprandial el mismo día y posteriormente 8 días después), grupo B) 61 individuos, una sola muestra.

En el grupo A) se observaron diferencias intra e interindividuales que se resumen de la siguiente manera: 1) las bandas a, b ó c mostraron diferentes intensidades; 2) la banda b estuvo ausente en algunas ocasiones. No hubo diferencias entre las muestras tomadas en ayunas o postprandialmente.

En el grupo b), 50 individuos presentaron el fenotipo de tres bandas a, b y c, y los 11 restantes las bandas a y c. - Se observaron además diferencias en las intensidades de las

tres bandas entre los individuos. (Fig. 5)

Fig. 5



V. DISCUSION.

Los experimentos realizados en el presente trabajo muestran los pasos necesarios para la obtención y estandarización de un método electroforético de una enzima. Por lo reportado en la literatura y las experiencias adquiridas por el grupo de trabajo en el que se realizó la presente tesis, se puede observar en la secuencia de experimentos realizados que las condiciones adecuadas van siendo adaptadas empíricamente, es decir, de acuerdo a las observaciones obtenidas en cada experimento; en general podemos considerar los siguientes factores:

1). Tiempo. Se obtuvieron buenos resultados entre 4 y 8 horas de corrimiento, tiempos de 2 y 18 horas resultaron inadecuados, la mejor migración se observó a 4 horas; 2) Voltaje. Fue claro que voltajes de 50 y 80 volts mostraron ser insuficientes y mayores de 150 produjeron incrementos considerables de temperatura; 3) pH. La disminución o el incremento de pH (respecto a 8.6) tanto en bufer del gel como el de corrimiento produjeron una difusión de las bandas de actividad de SORD; 4 y 5) molaridad del bufer y concentración de acrilamida. Se obtuvieron mejores resultados cuando la molaridad del bufer del gel fue menor de la del bufer de corrimiento; es importante señalar que menor molaridad del bufer del gel mostró mayor migración, análogamente a lo que ocurrió al disminuir la concentración de acrilamida, sin embar-

go, modificar simultáneamente ambos factores produce resultados inadecuados, por otra parte, al incrementar la concentración de acrilamida se observa menor migración.

En el experimento 20, por lo tanto, se conjugan las condiciones que mostraron mejores resultados, en el cual pudieron identificarse 3 bandas; a, b y c con actividad de SORD - (Fig. 4). Ya que las bandas observadas en hígado humano comparativamente con eritrocito (Experimento 5) fueron semejantes, y por analogía con los experimentos realizados por Nealon (18) podemos inferir que la banda a corresponde a SORD-1 y que la banda c a SORD-2. Estas condiciones mostraron reproducibilidad y sensibilidad adecuadas para el estudio de la enzima en diferentes individuos.

Los resultados del grupo A mostraron que en un mismo individuo la banda b puede o no estar presente, lo que sugiere que se trata de una modificación secundaria de la banda a (SORD-1) o de la banda c (SORD-2) o bien de un híbrido SORD-1/SORD-2. Las diferentes intensidades de las bandas a, b ó c, no dependen de las condiciones alimenticias del individuo. Por otra parte, todas las muestras de los individuos del grupo B presentaron las bandas a y c, y el 83% presentó además la banda b; considerando además las bandas a y c como el 100%, la intensidad de la banda a (SORD-1) varió entre 50 y 60% y la banda c (SORD-2) mostró una intensidad de 40 a 50%. Estos resultados sugieren que si la banda a (SORD-1) es producto de un gene y la banda c (SORD-2) producto de un-

gen distinto, ambos genes en eritrocito se expresan en niveles semejantes, a diferencia de lo que ocurre en el hígado - probablemente debido a la función específica de la enzima en cada tejido.

VI. CONCLUSIONES.

1) Se diseñó y estandarizó un método electroforético en geles de poliacrilamida para la detección de SORD de eritrocitos.

2) La presencia de 2 bandas electroforéticas constantes (a y c) y una variable (b) sugiere que las primeras sean productos génicos directos y que la segunda sea una modificación secundaria de cualquiera de las bandas a ó c, ó bien un híbrido de ambas.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Gabbay, K.H.: The sorbitol pathway and the complication of diabetes. *N. Engl. J. Med.* 288: 831, 1973.
2. Mann, T y Lutwak-Mann, C.: Male reproductive function and semen. *Themes and Trends in Physiology, Biochemistry - and Investigative Andrology.* Springer-Verlag, Berlin, - 1981.
3. Travis, S.F., Morrison, A.D., Clements, R.S., Winegrad, - A.A., Oski, F.A.: The role of the polyol pathway in methaemoglobin reduction in human red cells. *Brit. J. - Haematol.* 27: 597, 1974.
4. Chylak, L.T., Cheng, H.M.: Sugar metabolism in the crystalline lens. *Suru. Ophthalmol.* 23: 26, 1978.
5. Kinoshita, J.H.: Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol.* 4: 786, 1965.
6. Kinoshita, J.H.: Mechanisms initiating cataracts formation. *Invest. Ophthalmol.* 13: 713, 1974.
7. Van Heyningen, R.: Sugar alcohols in the pathogenesis of galactose and diabetic cataracts. *En: The Eye and Inborn Errors of Metabolism. Birth Defects XII:* 295, 1976.
8. Fangius, J., Janieson, S.: Effects of aldose reductase-inhibitor treatment in diabetic polyneuropathy: a clinical and neurophysiological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 44: 991, 1981.
9. Segal, S.: Disorders of galactose metabolism. *En: The - Metabolic Basis of Inherited Disease.* Stanbury, J.B.,

Fredrickson D.S. (Eds) McGraw Hill: 1983.

10. 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.
11. Market, C.L.: Isozymes: The development of a concept and its application. En: *Isozymes: Current topics in biological and medical Research.* Ratazzi, M.C., Scandalios, J.G., Whitt, G.S. (Eds.). Alan R. Liss., New-York. 1977.
12. Harri, H.: *The principles of human biochemical genetics.* Elsevier/North Holland. Amsterdam, 1980.
13. Op't Hof, J.: Isozymes and population genetics of sorbitol dehydrogenase (EC. 1.1.1.14) in swine (*susscrofa*). *Humangenetik*, 7:258, 1969.
14. Op't Hof, J., Wolf, U. and Krone, W.: Studies on isozymes of sorbitol dehydrogenase in some vertebrate species. *Humangenetik*. 8:178, 1969.
15. Charlesworth, D.: Starch gel electrophoresis of four isozymes from human red blood cells: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, fructoaldolase, glyoxalase II and sorbitol dehydrogenase. *Ann. Hum. Genet.* 35: 477, 1972.
16. Donald, L.J., Wang, H.S., Hamerton, L.J.: Assignment of the sorbitol dehydrogenase locus to human chromosome 15 pter--- q21. *Biochem. Genet.* 18:425, 1980.

17. 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. Genet. (Paris) 25:53, 1982.
18. Nealon, D.A., Daniel, A., and Rej, R.: Human liver - sorbitol dehydrogenase evidence for two forms. Selected, Topics in Clinical Enzymology. 2:535, 1984.
19. Harris, H., Hopkinson, D.A.: Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland, Amsterdam. 1976.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número

Sr. Carlos Alvarez Moya
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de tesis "Diseño y Estandarización de un -
Método Electroforetico en Acrilamida para la Enzima Sorbi__
tol ueshidrogenasa (Sord)" para obtener la Licenciatura en-
Biología con Orientacion Biomédica.

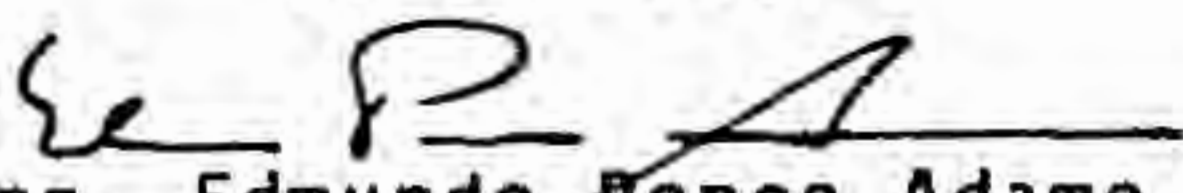
Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora
Galindo.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Diciembre 18 de 1985

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes,

c.c.p. El M. en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis, -Pte.
c.c.p. El expediente del alumno,

mpjsd.

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R.,
GUADALAJARA, JAL.

TELEFONOS 17-88-29 Y 17-43-17

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número