



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
CUAUTITLAN

Determinación de Tres Actividades Enzimáticas  
Involucradas en la Defensa Contra Infecciones  
Bacterianas en Macrófagos Alveolares de Cerdo

T E S I S

Que para obtener el Título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a

**JOSEFINA BUSTILLOS AGUILAR**

DIRECTOR DE LA TESIS:

**M. C. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA JACOBS**

---

1 9 8 0



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PROFESORES DEL JURADO.**

**PRESIDENTE.**

**Q.F.I. GILDA FLORES ROSALES.**

**VOCAL.**

**Q. ARTURO JANOVITZ.**

**SECRETARIO.**

**M. EN C. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA J.**

**1o SUPLENTE.**

**I.Q. JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE.**

**2o SUPLENTE.**

**Q. GLORIA SOTO HERNÁNDEZ.**

*A mis padres por su gran cariño y  
confianza que tanto me ayudaron  
para alcanzar esta meta.*

*A mi esposo Benjamín, por su amor,  
comprensión y paciencia.*

*A mis queridos hijos.*

*A mis hermanas, con gran afecto.*

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA COORDINACION DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS DE POST-GRADO DE LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES - CUAUTITLAN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL M. EN C. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA J. A QUIEN AGRADEZCO SU AYUDA TANTO TECNICA COMO HUMANA.

## I N D I C E

INTRODUCCION. . . . .	1
OBJETIVOS. . . . .	23
METODOS Y MATERIALES. . . . .	25
RESULTADOS Y DISCUSION. . . . .	32
CONCLUSIONES. . . . .	64
BIBLIOGRAFIA. . . . .	66

## INTRODUCCION.

El pulmón es uno de los órganos que constantemente es invadido por agentes extraños y requiere de un mecanismo de defensa sumamente eficaz para prevenirse de los agentes químicos o biológicos externos.

Los mecanismos de defensa con que cuenta el pulmón pueden ser agrupados en cuatro categorías:

- 1) Efectos mecánicos.
- 2) Mecanismos de fagocitosis.
- 3) Sustancias químicas humorales.
- 4) Factores inmunológicos, ya sean de tipo celular o humoral (1).

Estos mecanismos de defensa no trabajan independientemente, sino que están íntimamente interrelacionados e integrados para llevar a cabo la defensa del pulmón.

### DEFENSA MECANICA.

El común denominador de la inducción de enfermedades pulmonares es la partícula presente en el medio ambiente que es inhalada. Estas partículas encuentran en las partes iniciales

del tracto respiratorio un mecanismo de filtración aerodinámico llevado a cabo por las corrientes de aire y la presencia de pelos visibles. Las partículas de aire que penetran son sometidas a una turbulencia en las cavidades nasales y luego a un cambio violento en su dirección, que provocan que las partículas suspendidas se impacten sobre la superficie traqueobronquial, su velocidad disminuye, la inercia decae y las fuerzas gravitacionales ejercen un efecto predominante (2).

Las partes iniciales de las vías respiratorias poseen pelos visibles capaces de filtrar las partículas grandes; así el 90% de las partículas que poseen un diámetro mayor a 2-3 micras son las más peligrosas pues penetran a regiones más profundas, impactándose en el alveolo como es el caso de los organismos en general. Las partículas sólidas que poseen un diámetro mucho más pequeño a 0.2-3 micras, no se impactan y son sucesivamente exhaladas (3). Si en el medio llegara a existir de un 60 a un 90% de humedad, las partículas higroscópicas crecerían impactándose en un sitio superior del árbol traqueobronquial.

Afortunadamente todas las vías respiratorias se encuentran recubiertas de una secreción mucosa que actúa como pegamento y retiene las partículas que llegan. El moco se desplaza hacia arriba a razón de 10 a 20 mm por minuto, merced a la

intervención de células epiteliales ciliadas que revisten el árbol respiratorio. El transporte en la mucosa traqueobronquial se lleva a cabo por un fluido que consiste en una fase en gel y otra en sol (4). En el sujeto sano, esta capa mucosa elimina cada hora un 90% de la sustancia depositada y si acaso llegara a producirse una disminución en su actividad, es compensada por el mecanismo de la tos. Cuando ambos mecanismos fallan durante las tres primeras horas después de una infección, se permite la multiplicación de las bacterias en las secreciones mucosas.

#### DEFENSA FAGOCITICA.

Cuando el microorganismo ha podido evadir las defensas de la primera barrera y llega a los alveolos pulmonares, se enfrenta a una segunda barrera que es llevada a cabo por los macrófagos presentes en esta región, y de esta forma la respuesta fagocítica constituiría la mayor parte de los mecanismos de defensa.

Los macrófagos son células mononucleadas que tienen la capacidad de fagocitar gérmenes y generalmente destruirlos digiriéndolos por medio de las enzimas contenidas en sus lisosomas. Existe otro tipo de fagocito que es una célula blanca de la --

sangre que penetra en el tejido conectivo laxo cuando hay invasión de partículas extrañas y ahí presenta gran capacidad fagocítica; este fagocito, que es más pequeño que el macrófago, es un leucocito polimorfonuclear, ya sea un basófilo o -- neutrófilo.

El conocimiento del macrófago data desde 1882 y los primeros descubrimientos se le atribuyen al zoólogo y anatomista ruso Metchnikoff, quien realizó experimentos con larvas transparentes de estrella de mar a las que le introducía espinas de rosas y al día siguiente observaba que alrededor del objeto extraño se reunían células móviles. De esta experiencia pasó a otras con diversos vertebrados, y comprobó que los macrófagos del tejido conectivo laxo y los polimorfonucleares de la sangre podían fagocitar y muchas veces destruir diversos tipos de gérmenes patógenos (5).

Los macrófagos no sólo ingieren algunos tipos de bacterias infecciosas, sino que también ayudan a liberar al tejido conectivo laxo de restos resultantes de la desintegración de células de diversos tipos (5).

Los macrófagos se desarrollan a partir de los glóbulos blancos llamados monocitos que atraviesan las paredes de las

vénulas de los tejidos y una vez ahí, se transforman en macrófagos. La membrana celular de un macrófago presenta en forma característica un contorno irregular, proyectándose hacia -- afuera en forma de pequeños pseudópodos y hacia adentro en -- forma de depresiones y hendiduras (Fig. 1). Contiene las dos

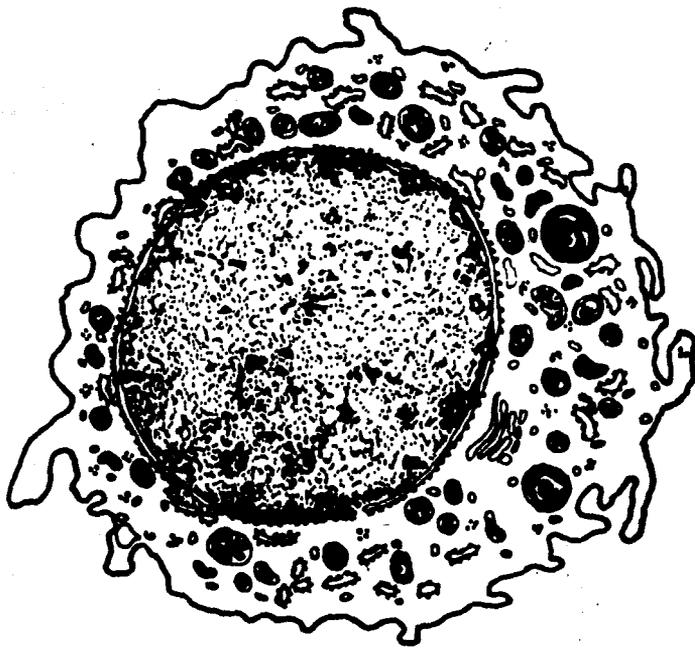


Figura 1. Representación esquemática general de un macrófago. Obsérvese su núcleo excéntrico y la forma irregular de su membrana.

terceras partes del total de colesterol que se encuentra presente en dos compartimientos subcelulares: uno de intercambio rápido y otro lento. El colesterol se intercambia con las alipoproteínas y no es afectado por inhibidores de la síntesis de proteínas o de la fosforilación oxidativa. Un aumento en el total del colesterol libre o del contenido de fosfolípidos del macrófago ocurre después de una pinocitosis o fagocitosis.

El núcleo de un macrófago suele tener forma oval, dentada de un lado, y está situado hacia un extremo de la célula, con un borde convexo dirigido al extremo celular. La forma más simple de observar un macrófago es recurriendo a sus capacidades fagocíticas, esto se logra inyectando en el tejido areolar de un animal vivo una suspensión o solución de algún material que sea fagocitado por los macrófagos que al penetrar en su citoplasma permita identificarlas. Estas células fagocitan rápidamente algunos colorantes coloidales denominados colorantes vitales como es el caso del azul de tripano o el rojo neutro. Si se inyecta una solución al 1% de estos colorantes en el tejido conectivo laxo de un animal en experimentación, uno o dos días más tarde revelarán gran número de macrófagos con un citoplasma lleno de colorante inyectado (5).

En estudios recientes de microscopía electrónica hechos

con macrófagos alveolares de cerdo (6) se encontró que poseen un tamaño que varía entre 9 y 16 micras de diámetro y poseen las características generales de núcleo ovoide y excéntrico -- de cromatina ligeramente concentrada y en ocasiones con núcleo visible. En el citoplasma se pudieron observar lisosomas que aparecen como vesículas de tamaño variable con bordes irregulares y gránulos densos. También se observaron vacuolas fagocíticas o fagolisosomas con figuras mieloides. Los ribosomas se encontraron libres por todo el citoplasma y unidos al retículo endoplásmico, el cual es poco aparente pero bien distribuido. El aparato de Golgi se observó poco desarrollado, encontrándose cerca de él gránulos y vesículas. Las mitocondrias se encontraron distribuidas por todo el citoplasma y no son muy abundantes.

En este mismo estudio se pudo observar que los macrófagos alveolares de cerdo presentan núcleos más o menos regulares a diferencia de los encontrados en células de conejos en las que se reportan núcleos más irregulares y con una gran cantidad de gránulos pequeños y muy densos.

#### *Mecanismo de la Fagocitosis de Microorganismos.*

El complejo proceso de la fagocitosis principio con el reconocimiento y la unión del microorganismo a la superficie de

la membrana, del macrófago continúa con el englobamiento del cuerpo extraño por las proyecciones membranales formando la vacuola fagocítica o fagosoma y termina con la muerte y digestión del microorganismo dentro del lagolisosoma (7). Los factores más importantes que participan en este proceso son:

- a) Receptores de membrana para la unión fagocito-microorganismo (8, 9).
- b) Aparato de microtúbulos y microfilamentos para la formación del fagosoma (10).
- c) Aumento en el metabolismo oxidativo para la muerte intracelular (11, 12).
- d) Desgranulación y activación de las enzimas hidrolíticas para la digestión (13, 14).

a) Receptores de Membrana para la Unión Fagocito-microorganismo.- La unión de los microorganismos al macrófago requiere la alteración de la superficie del primero (Opsonización) - para facilitar la fagocitosis; se ha propuesto que el englobamiento ocurre cuando la superficie del microorganismo se hace más hidrofóbica que la superficie de las células fagocíticas. La opsonización de las partículas provee un sitio de unión entre las membranas del fagocito y el microorganismo, y cuando esta unión se lleva a cabo, hay estimulación de la glucólisis y de la síntesis de lípidos y el proceso de englobamiento comienza a efectuarse.

b) Aparato de Microtúbulos y Microfilamentos para la Formación del Fagosoma.- La vía de la glicólisis es la que provee la energía necesaria para la fagocitosis del microorganismo (16), los eventos moleculares que se llevan a cabo en la --contracción del citoplasma del fagocito y en la formación de --pseudópodos que rodean al microorganismo, se llevan a cabo ---principalmente por la acción de una proteína de unión con la --actina que está íntimamente asociada con las membranas plasmáticas del fagocito . Cuando esta proteína es activada como --respuesta de la membrana plasmática del fagocito durante la --fagocitosis, ocurre un cambio configuracional llevándose a cabo una polimerización de la actina a microfilamentos; la gelificación o la contracción de estos filamentos forman los pseudópodos que rodean a las partículas, quedando dentro de una --membrana que constituye el fagosoma (17).

c) Aumento en el Metabolismo Oxidativo para la Muerte Intracelular.- Cuando la fagocitosis se lleva a cabo hay un aumento sorprendente en el consumo de oxígeno y también se dispara el metabolismo de la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato (HMP). La función oxidativa en la fagocitosis no es --sensible a inhibidores de la cadena respiratoria y puede ser --medida por el consumo de oxígeno, por la producción de peróxido de hidrógeno, por la reducción de nitro azul de tetrazolio

(NBT) (18), por la producción de ión superóxido (19), o por -- quimioluminiscencia (20).

Los requerimientos metabólicos para una ingestión eficiente están separadas claramente de los mecanismos microbicidas; la glucólisis es la que provee al fagocito de la energía necesaria para la ingestión de la partícula, pero es la acción metabólica oxidativa la necesaria para la muerte de los microorganismos.

Durante el proceso de la fagocitosis se ha encontrado un marcado aumento en el consumo de oxígeno y en la actividad de la vía del fosfogluconato. Esta vía, también conocida como la vía de la degradación de la hexosa monofosfato (HMP) tiene dos objetivos principales:

- 1) La generación de poder reductor en el citoplasma extra mitocondrial en forma de NADPH.
- 2) La síntesis de pentosas con liberación de  $\text{CO}_2$  (21) (Ver Fig. 2).

El  $\text{NADP}^+$  resulta ser un factor limitante en dos pasos de esta vía:

- en la oxidación de la glucosa-6-fosfato por la acción de la glucosa-6-P-deshidrogenasa.

- en la oxidación del 6-fosfogluconato por la acción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (21).

El  $\text{NADP}^+$  necesario para llevar a cabo la vía del fosfogluconato es suministrado por la reacción de la glutatión peroxidasa,



seguida por la reacción de la glutatión reductasa,



De esta forma una deficiencia de la glutatión peroxidasa - en este mecanismo oxidativo, limitaría la estimulación de la - vía del fosfogluconato.

El aumento en el consumo de oxígeno se explica por la acción que tiene la NADPH oxidasa para generar más  $\text{NADP}^+$  y moléculas de ión superóxido (22). (Fig. 2).

Los productos de la reducción incompleta del oxígeno participan en las reacciones microbicidas de los macrófagos; la enzima mieloperoxidasa (MPO) emigra al fagosoma durante la fagocitosis y su acción aunada a la del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se ve aumentada *in vitro* cuando al medio se le adiciona algún halogenuro como io-

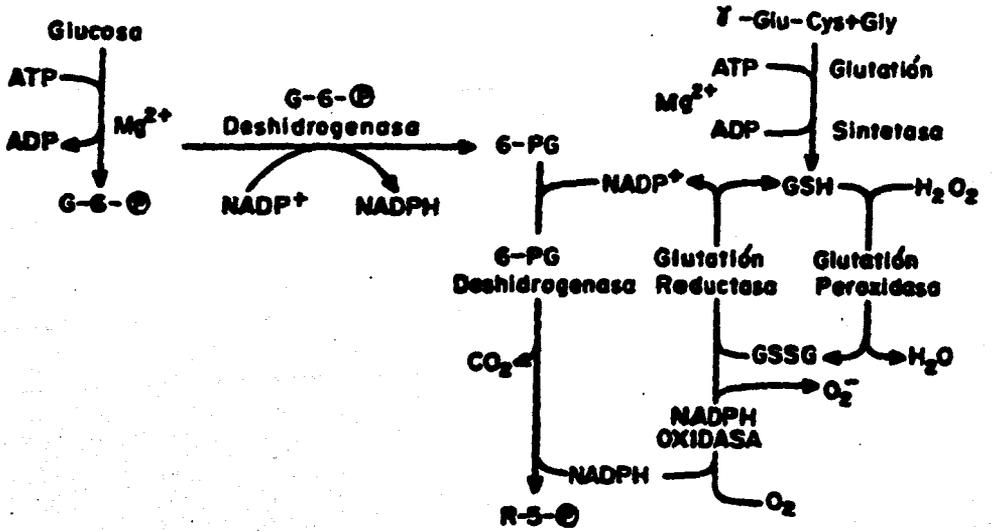
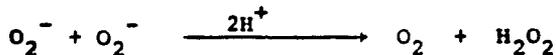


Figura 2. Esquema simplificado del metabolismo oxidativo asociado con el fenómeno de la fagocitosis. La respiración acelerada trae consigo un aumento en el consumo de glucosa y la actividad del mecanismo para la degradación de HMP es aumentada 10 veces. Se producen grandes cantidades de ión superóxido ( $O_2^-$ ) y de  $H_2O_2$ .

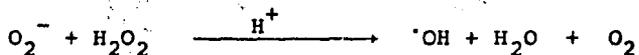
duro o cloruro (23). El sistema antimicrobiano MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haluro es eficiente tanto en células polimorfonucleares como en -macrófagos alveolares; sin embargo, en estudios más recientes se ha encontrado que éstos últimos requieren necesariamente -que el halogenuro sea I<sup>-</sup> para poder llevar a cabo la oxida--ción de los sustratos apropiados presentes en el microorganismo y ocasionar su muerte.

La reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno se lleva a cabo por la transferencia de dos electrones en total, pero si el oxígeno acepta la transferencia de tan solo un electrón, se formarán otros productos intermediarios como el ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical oxhidrilo (<sup>•</sup>OH) y oxígeno excitato (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) (11, 12).

El ión superóxido es un radical libre formado por la re-ducción monovalente del oxígeno molecular o por la oxidación monovalente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta molécula altamente reactiva es un potente agente óxido-reductor; en presencia de un pH ácido, -el ión superóxido es altamente inestable y sufre una dismutación espontánea para generar moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno por la reacción (20),



El ión superóxido puede ser convertido al radical oxhidrilo - por medio de la reacción de Haber-Weiss (21),



La producción de estas moléculas altamente reactivas trae como consecuencia el rompimiento de las membranas de los microorganismos por la acción oxidante sobre ellas.

El ión superóxido es detectado en los sistemas biológicos por su capacidad de reducir compuestos como el citocromo C (26) o el NBT (27) y por su transformación a oxígeno molecular en la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD); la contribución del superóxido en el poder bactericida se ha estudiado en diferentes sistemas. Cuando la SOD se fija a -- partículas de látex que entran junto con las bacterias a los fagosomas, se observa casi una completa inhibición del poder bactericida (28). Se han obtenido otros resultados muy parecidos con catalasa unida a partículas de látex. Aunque estos estudios *in vivo* afirman la participación del ión superóxido en los eventos bactericidas, no pueden aclarar si su papel es como agente primario o como un intermediario para la subsecuente formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La generación de estados de excitación electrónica en las células fagocitarias fue por primera vez reportada por Allen (20): él observó un marcado aumento en la quimioluminiscencia que fue inicialmente relacionada con la fagocitosis y la activación del sistema de degradación de la HMP. Él propuso que las especies luminiscentes fueran oxígenos excitados o un producto de oxidación mediado por ellos. Una vez que el oxígeno excitado (que es excepcionalmente reactivo) se ha formado, es un potente reactivo oxidante capaz de atacar regiones de densidad electrónica alta en un gran número de sustancias moleculares. Los microorganismos que han sido fagocitados y se encuentran dentro del fagosoma, son una rica fuente de sustratos oxidables por su alto contenido de ácidos grasos insaturados que forman parte de los lípidos de membrana, de ácidos nucleicos y de residuos de aminoácidos. El producto de la oxidación del oxígeno electrónicamente excitado puede ser un dioxietano u otro intermediario inestable que se desintegra para dar grupos carbonilos electrónicamente excitados. La relajación de estos grupos carbonilo a sus estados basales da como resultado la emisión de un fotón que se manifiesta como quimioluminiscencia (Fig. 3) (20).

El oxígeno excitado ( $O_2^*$ ) puede ser producido en los sistemas biológicos por varios caminos; uno de ellos incluye el sistema  $MPO-H_2O_2$ -halogenuro y el otro puede ser una dismutación espontánea del ión superóxido a un pH adecuado (Fig. 4).

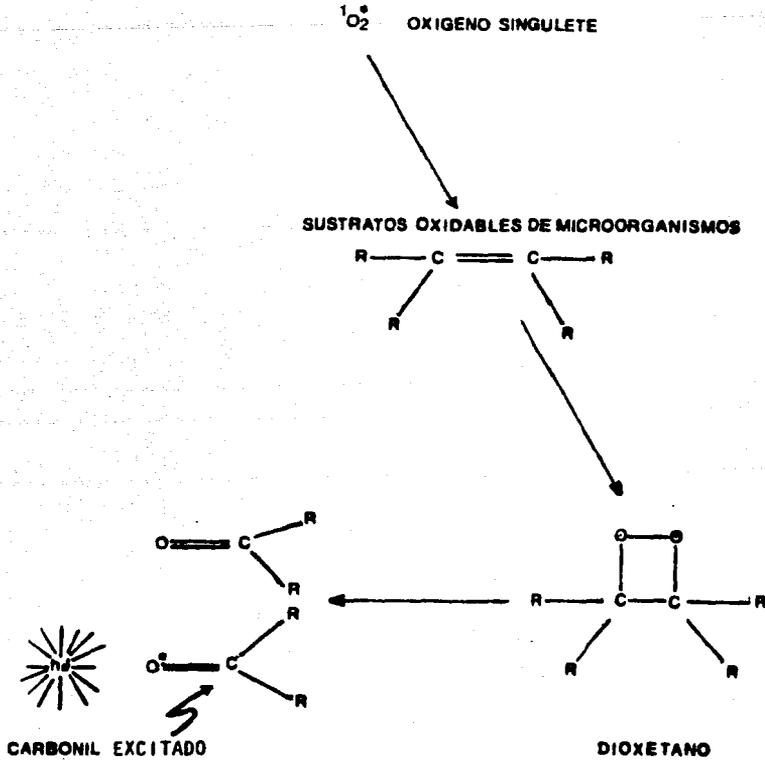


Figura 3. Representación esquemática de la oxidación microbiciada propues-  
ta por Allen (20) mediada por un oxígeno excitado ( $\text{O}_2^*$ ). El -  
sustrato microbiano es una representación de una región de alta densidad  
electrónica. El Dioxetano es un producto intermedio inestable cuyo --  
anillo se rompe para dar carbonilos excitados que al regresar a su estado  
basal emiten radiación electromagnética ( $h\nu$ ).

Nota: El oxígeno excitado se le nombra también oxígeno singulete por su  
espectro que presenta sólo un pico a diferencia del oxígeno basal  
que presenta un triple.

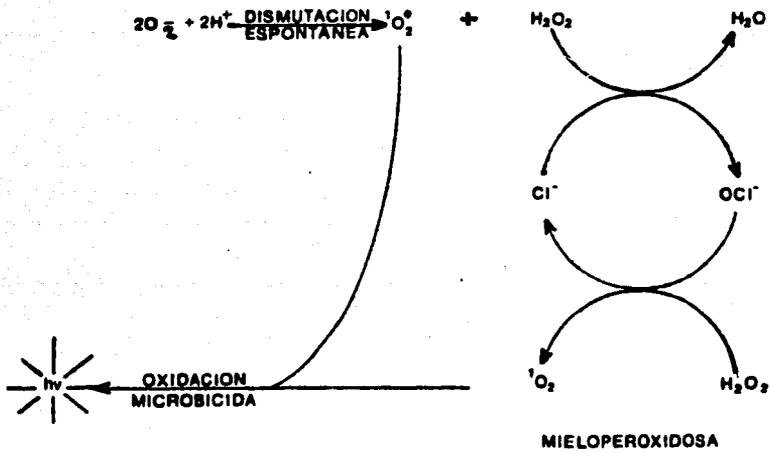


Figura 4. Representación esquemática de la fuente de  $O_2^{\cdot\cdot}$  en el fagosoma. el  $O_2^-$  es el ión superóxido, producto de la reducción incompleta del oxígeno molecular por un solo electrón. El  $O_2^{\cdot\cdot}$  es el estado electrónicamente excitado del oxígeno molecular y que es capaz de regresar a su estado basal con la subsecuente emisión de un fotón o atacar una región de alta densidad electrónica de los sustratos moleculares. La oxidación microbiana se lleva a cabo como se ilustra en la figura 3.

Aunque todos los productos de la reducción incompleta del oxígeno poseen un poder bactericida, la acumulación de ellos dentro de la célula puede producir daños irreversibles (29). - La célula está equipada con enzimas que eliminan estos productos tóxicos; el ión superóxido es dismutado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) generando oxígeno molecular y  $H_2O_2$ ; - el  $H_2O_2$  es eliminado por la peroxidasa para dar oxígeno y agua. Así, en células donde la actividad de estas enzimas es muy elevada, el sistema bactericida realizado por sustancias oxidantes resulta poco relevante.



d) Desgranulación y Activación de las Enzimas Hidrolíticas para la Digestión del Microorganismo.- Existe una serie de enzimas que son productos de la desgranulación del lisosoma en el fagosoma y que tienen propiedades bactericidas. El mecanismo de la fusión de la membrana del lisosoma con el fagosoma está influenciado por cambios en la concentración de cationes divalentes. La desgranulación y la liberación de enzimas hi--

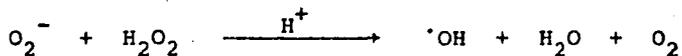
drolíticas se inicia por la acción de los radicales oxhidrilo ( $\cdot\text{OH}$ ), ya que las sustancias que son capaces de eliminarlo, - también inhiben a su vez la desgranulación.

El mecanismo propuesto para la desgranulación es el siguiente:

- 1) Formación del ión superóxido y su dismutación a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno,



- 2) Reacción entre el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido para producir radicales oxhidrilo,



- 3) Peroxidación de las membranas lisosomales.
- 4) Desgranulación y liberación de las enzimas digestivas.

Entre las enzimas liberadas en la desgranulación tenemos la lisozima que tiene una capacidad bactericida limitada, ya que esencialmente actúa sobre las bacterias Gram<sup>+</sup> pues en las de tipo Gram<sup>-</sup> la mureína (sustrato de la lisozima) se encuentra recubierta por una capa de lipopolisacáridos. La lactoferrina también es liberada durante la desgranulación, pero tiene un efecto bacteriostático más que bactericida (30). --

Existen otras proteínas con poder bactericida que son altamente catiónicas pero que aún no se encuentran plenamente identificadas (31).

Además de la liberación de sustancias bactericidas antes mencionadas, la desgranulación libera una gran variedad de enzimas hidrolíticas que actúan sobre el microorganismo ya desactivado. Entre las más importantes de estas enzimas tenemos:

- a) Fosfatasa ácida.
- b) Ribonucleasa ácida.
- c) Desoxirribonucleasa ácida.
- d) Arilsulfatasa.
- e) Catepsina.
- f) Colagenasa.
- g) Beta-galactosidasa.
- h) Manosidasa alfa.
- i) Glucosidasa alfa.
- j) Beta-glucuronidasa.
- k) Reductasa del citocromo C.
- l) Fagocitina.

Los restos de la célula bacteriana pueden ser finalmente metabolizados por el macrófago o expulsados al exterior de la célula.

#### DEFENSA QUIMICA HUMORAL.

Esta barrera actúa en cooperación con la fagocitosis y está formada por una serie de sustancias químicas que se encuentran en el suero. La lisozima es una de estas sustancias ya que también puede actuar extracelularmente produciendo la lisis del microorganismo para que después sea fagocitado.

El sistema properdina también posee propiedades antibacterianas; es una beta-globulina que se encuentra en el suero. Otras sustancias que entrarían en este grupo serían las betalinas, algunas proteínas básicas como las protaminas e histonas, ácidos dicarboxílicos y cetoácidos, ácido láctico producido a partir de la glicolisis anaerobia y un factor muy importante que es el interferón (32), presente sólo en el caso de una infección viral.

#### DEFENSA INMUNOLOGICA.

Hasta aquí sólo hemos hablado acerca de las barreras inespecíficas que posee el organismo, pero existe otra barrera de tipo específico que es la inmunológica, la cual actúa estimulando a la fagocitosis y viceversa, ya sea de forma celular o humoral.

Podemos decir que el pulmón se defiende con diversos mecanismos de la entrada de microorganismos; sin embargo, es importante señalar que cada uno de estos mecanismos actúa en -- una forma íntimamente relacionada y es imposible separar la - acción de cada una de ellos en forma independiente.

## OBJETIVOS.

Una de las principales pérdidas económicas de la industria pecuaria en México, se debe a la gran recurrencia que se ha tenido de enfermedades respiratorias producidas por diversos microorganismos que actúan en forma mixta con otros factores como pueden ser los ambientales o la interrelación con infecciones virales (33).

La acción de las sustancias bactericidas presentes en los macrófagos alveolares es de gran importancia para la defensa contra las infecciones bacterianas. A pesar de su importancia, es muy poca la información que se posee acerca de los mecanismos que acompañan a la fagocitosis específicamente en lo que se refiere a la actividad de enzimas de macrófagos alveolares de cerdo, hecho que nos motivó a la realización del presente trabajo, el cual consiste en la determinación de las actividades de tres de las enzimas de mayor importancia en estos mecanismos como son la Lisozima, la Peroxidasa y la Superóxido Dismutasa, presentes en los macrófagos alveolares de cerdo normal.

En estudios realizados se ha encontrado que las infecciones virales suprimen la actividad bactericida intrapulmonar,

hecho que se relaciona con los desperfectos que pudiera sufrir el mecanismo bactericida más que con las alteraciones del sistema de transporte dentro del pulmón (44, 45).

Los antecedentes mencionados sugieren que algunas de las enzimas de mayor importancia en el sistema bactericida pudieran modificar su actividad como consecuencia de una infección viral, dando como resultado una mayor recurrencia en el animal en las enfermedades de tipo bacteriano.

Así, las actividades enzimáticas basales de lisozima, peroxidasa y superóxido dismutasa determinadas en el presente -- trabajo, podrán servir de punto de comparación para trabajos -- posteriores realizados con cerdos infectados, para determinar si la hipótesis antes enunciada resulta ser falsa o verdadera.

## MATERIALES Y METODOS.

### OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES.

Los macrófagos se obtuvieron a partir de pulmones de cerdos sanos de cuatro semanas de edad y con un peso aproximado de 8.70 Kg. Se sacrificaron desangrándolos en blanco por incisión de las arterias branquiales previa anestesia con 5 ml de anestésal. La cavidad torácica fue abierta y la parte superior de la traquea cerrada para prevenir la entrada de sangre a los pulmones durante la disección según una modificación de la técnica de Myrvik (34), que a continuación se describe:

La traquea fue cortada por arriba del punto donde fue cerrada y se extrajeron los pulmones, corazón y tráquea como una sola pieza que se lavó con solución isotónica con la traquea aún cerrada. El corazón fue separado cuidadosamente previniendo cualquier lesión en los pulmones y limpiándolos con gasa para eliminar el exceso de fluido externo que pudiera contaminar. Se hicieron dos lavados introduciendo por la traquea 60 ml de solución de NaCl isotónica (6), cuidando de que todo el líquido entrara por los bronquios para que se distribuyera por cada uno de los lóbulos del pulmón. La traquea se cerró para dar un firme masaje a los pulmones; el líquido se depositó en tubos fríos que se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm en una centrifuga clínica.

Al sobrenadante se le determinó su contenido celular; el volumen de la pastilla fue medido y resuspendido en 5 ml de solución salina isotónica. Se hizo una tinción vital con rojo neutro al 1% (34) y se realizó la cuenta viable con la técnica de rutina para glóbulos blancos (35), se centrifugó nuevamente a 1500 rpm durante tres minutos, el sobrenadante fue desechado y la pastilla se resuspendió en 5 ml de solución -- hipotónica de sacarosa 0.2 M.

#### LISIS DE MACROFAGOS ALVEOLARES (37).

Los macrófagos obtenidos en la solución hipotónica fueron homogenizados a 4°C en un homogenizador de vidrio provisto de un émbolo de teflón durante seis minutos; se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 0.1% y se sometió a un proceso de congelación (-85°C, 15 min) y descongelación -- (50°C, 5 min) por seis veces consecutivas. Se centrifugó de nuevo durante 30 minutos a 1500 rpm para eliminar todos los fragmentos celulares producidos por la lisis (Fig. 5).

#### CUANTIFICACION DE PROTEINA (36).

Al sobrenadante obtenido de la última centrifugación se le determinó su contenido protéico según la técnica de Groves (36) que utiliza una determinación espectrofotométrica en un

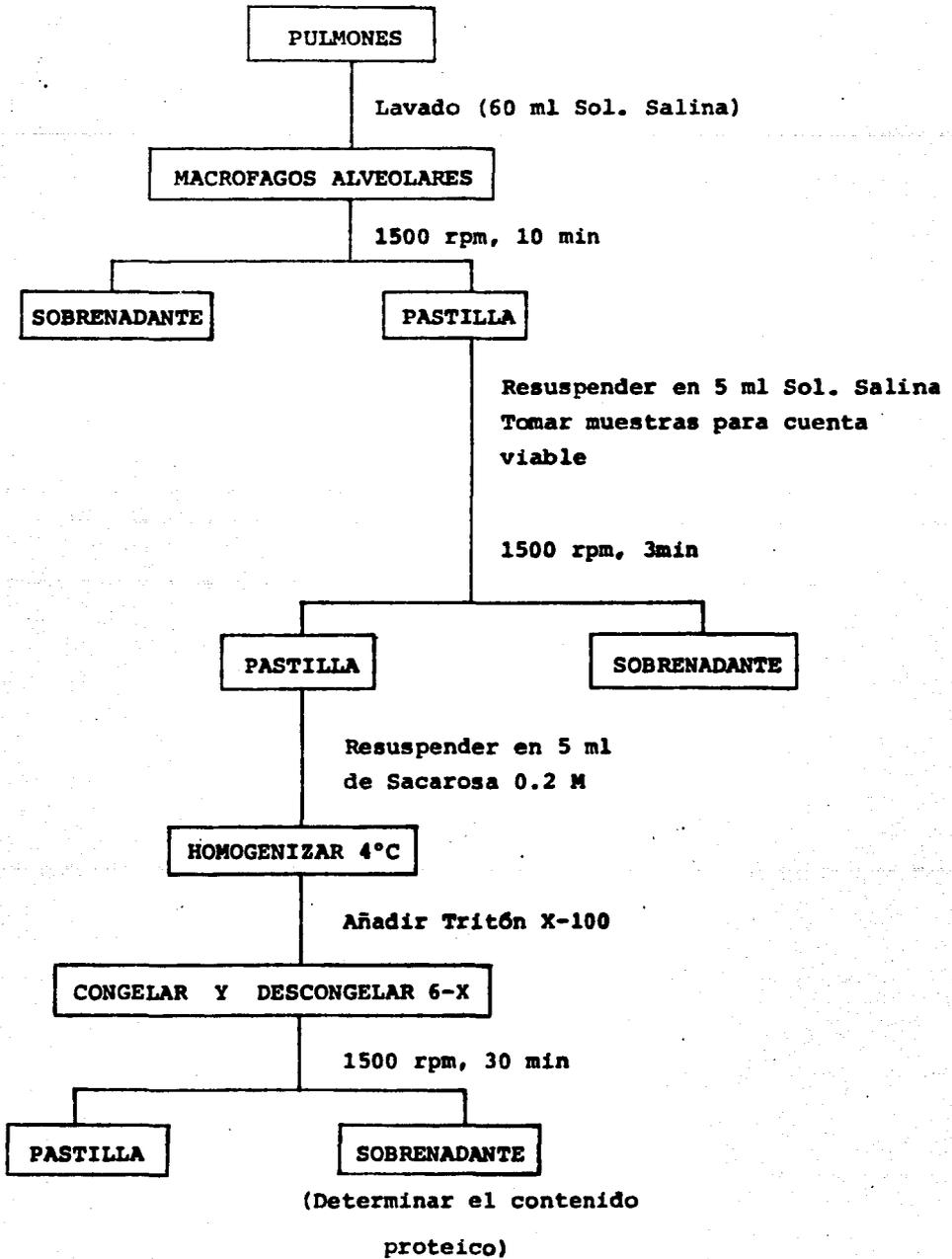


Figura 5. Método para la obtención y lisis de macrófagos alveolares.

rango de luz ultravioleta donde se elimina la interferencia de ácidos nucleicos y otras sustancias presentes en el extracto. Se utilizó como control para la curva de calibración, soluciones de concentración conocida de Albumina Bovina. La fórmula empírica para esta cuantificación es la siguiente:

$$\mu\text{g/ml} = \frac{\Delta A}{(0.680)(10^{-2})(\text{Dilución})}$$

donde:  $\Delta A = A_{224\text{nm}} - A_{2373.\text{nm}}$

#### ENSAYO DE LISOZIMA.

De un cultivo joven de *Micrococcus lysodeikticus* fue tomada una muestra y resuspendida en 0.5 ml de buffer fosfatos --- 0.05 M y pH 6.2 a una dilución final de aproximadamente  $10^{10}$  - bacterias/ml (correspondiente a una transmitancia del 50% a -- una longitud de onda de 650 nm cuando se ajusta el blanco con agua destilada).

Se añadieron 0.5 ml del extracto crudo de proteína libre de células y se agitó. La actividad de la lisozima fue determinada por la cinética de la lisis de *M. lysodeikticus* en un - espectrofotómetro Zeiss (Modelo PM 2D) adaptado con un grafica dor continuo y calibrado a 100% de transmitancia con agua destilada a 650 nm. El progreso de la reacción fue seguido durante 15 minutos.

Se hizo una estandarización utilizando como control una solución de 30 µg/ml de liozina marca Miles No. 36-323 con una actividad de 20,000 U/mg.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que causa un decremento de absorbancia a 650 nm de 0.001 por minuto a 25°C (42) (Véase: RESULTADOS).

#### ENSAYO DE PEROXIDASA (39, 40).

La actividad de la peroxidasa fue determinada por la desaparición de la banda de absorción del ácido úrico a 290 nm medida espectrofotométricamente durante el curso de la acción de la peroxidasa sobre el donador de electrones.

Se colocaron 2.35 ml de buffer fosfatos 0.07 M y pH 7.3 en la fotocelda y se añadieron 0.15 ml de ácido úrico 0.5 mM más 0.5 ml del extracto crudo de protefna. La reacción se inició añadiendo al tiempo cero 20 microlitros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM. La disminución de la absorbancia debida a la desaparición de la banda de absorción del ácido úrico a 290 nm, fue registrada durante 40 minutos a condiciones ambientales (39, 40).

Se estandarizó utilizando una solución de Peroxidasa marca Miles N<sup>o</sup>. 36-453 con una actividad de 100 U/mg.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de en zima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $25^\circ\text{C}$  (43) (Véase: RESULTADOS).

#### ENSAYO DE SUPEROXIDO DISMUTASA.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determi n6 por la aparición de la banda de absorción a 560 nm del --- azul de formazán que es el producto de la reducción del azul de tetrazolio (BT) por la oxidación del i6n superóxido; en di ferentes tubos se a6adieron los siguientes reactivos, vari6n- dose la cantidad de extracto crudo de proteina en cada uno de ellos;

0.40 ml riboflavina  $1.17 \times 10^{-5}$  M.

0.15 ml metionina 0.1 M

0.15 ml NaCN  $2 \times 10^{-4}$  M.

2.60 ml buffer  $\text{PO}_4^{3-}$  0.25 M pH 7.8.

0.20 ml BT  $11.2 \times 10^{-4}$  M

El espectrofot6metro se calibr6 con esta mezcla de reac- ción al tiempo cero y se coloc6 el tubo de ensayo en una c6ma ra de fotoinducción forrada de papel aluminio y provista de - una fuente de luz fluorescente de 12 watts. Al minuto 12 se determin6 el aumento en la absorbancia a 560 nm producido por la aparición del azul de formazán; establecido perfectamente

este parámetro, se añadieron a los diversos tubos conteniendo la mezcla de reacción antes descrita, diferentes volúmenes -- del extracto crudo de SOD manteniendo el volumen constante; - se registraron los valores obtenidos de densidad óptica al mi nuto 12 en cada uno de los tubos, siendo ésta una modificación a la técnica de Beauchamp y Fridovich (37).

Se utilizó como control la misma mezcla de reacción sin la enzima y se checó el aumento en absorbancia a los diferentes tiempos para establecer perfectamente la lectura que se - registraba a los 12 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### OBTENCION DE MACROFAGOS.

El volumen húmedo de células empacadas después de la centrifugación varió entre 0.2 y 0.3 ml. El promedio de los recuentos de células fue de  $3.122 \times 10^8 \pm 0.260 \times 10^8$  macrófagos /ml (Tabla I).

### MORFOLOGIA.

Los macrófagos observados con tinción vital presentan un tamaño variable de 5 a 10 micras de diámetro; el núcleo ubicado excéntricamente se tiñe más intensamente que el resto de la célula (Fig. 6). Se hicieron otras preparaciones de estos macrófagos utilizando otras técnicas de tinción (5). Estas fotografías se observan en la figura 7.

### LISIS DE MACROFAGOS.

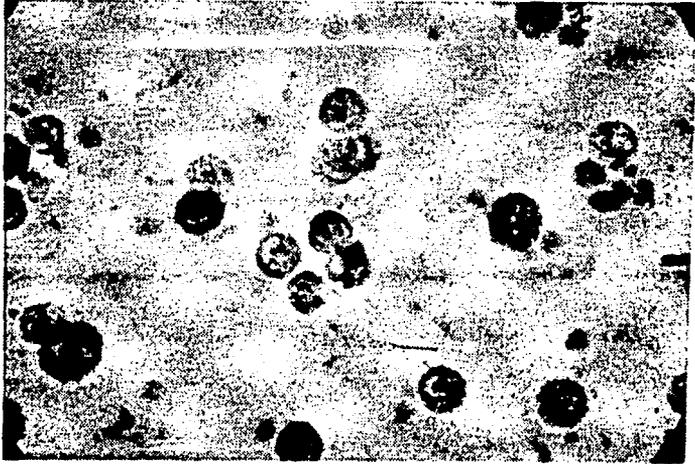
Las células fueron completamente rotas con el método utilizado, obteniéndose así un extracto crudo de enzimas libre de células (Fig. 8).

### CUANTIFICACION DE PROTEINA.

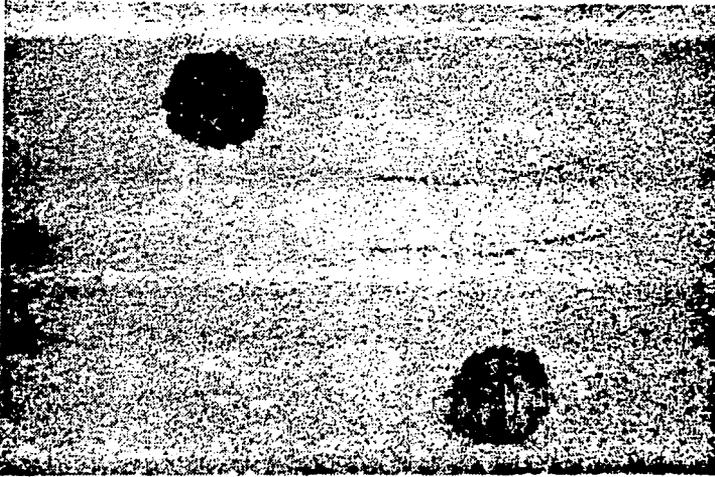
El promedio del contenido de proteína total fue de 5.99 mg/ml (Tabla I)

GRUPO DE EXPERIMENTOS.	Macrs/ml $\times 10^8$	Macrs $\times 10^8$ Totales	PROTEINA mg/ml	PROTEINA TOTAL EN EL EXTRACTO. mg.
I	3.29	16.48	4.74	23.70
II	2.87	14.39	7.04	35.22
III	3.40	17.00	5.92	29.60
IV	2.91	14.58	6.27	31.36
PROMEDIO	3.12	15.61	5.99	29.97
DESVIACION STANDARD	$\pm 0.26$	$\pm 1.32$	$\pm 0.95$	$\pm 4.79$

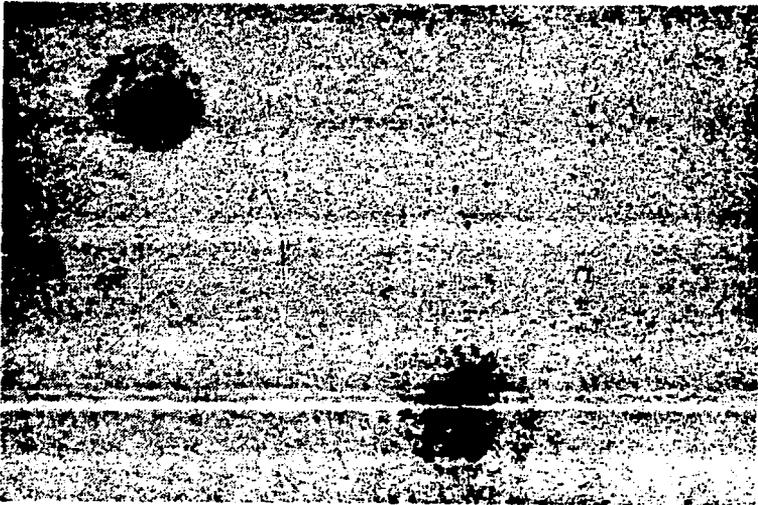
Tabla 1. El recuento de macrófagos se hizo en cámaras de Neubauer siguiendo la técnica de rutina para globulos blancos. Los macrófagos se encontraban suspendidos en solución isotónica y teñidos con rojo neutro al 1%. El contenido protéico fue determinado espectrofotométricamente (32).



**Figura 6.** Macrófagos alveolares de cerdo de cuatro semanas de edad teñidos con tinción vital de rojo neutro al 1%. Obsérvese la forma arrinconada y la posición excéntrica del núcleo que se tiñe con mayor intensidad que el resto de la célula. (1000 X) Las fotografías fueron tomadas en un microscopio de investigación con cámara incluida en el cuerpo. Marca Karl Zeiss, modelo 472547-990, campo claro, plan apocromático, lente 100/1.3.

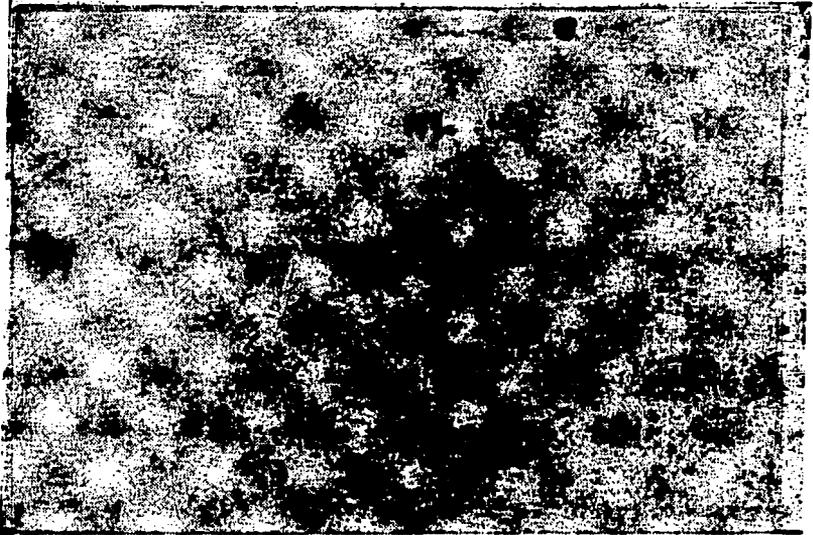


A



B

Figura 7. Macrófagos alveolares de cerdo teñidos con: A - Hematoxilina-Eosina; B - Técnica de Shorre. (1000 X).



**Figura 8. Macrófagos alveolares de cerdo lisados en un homogenizado tipo Potter con solución hipotónica de sacarosa 0.2 M y Tritón - al 0.1% y sometidos por 6 veces a congelamientos y descongelamientos. Obsérvese el rompimiento de las membranas celulares que dejan libre el contenido enzimático. (1000 X).**

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LISOZIMA (37, 38, 42).

Fundamento.

La acción de la lisozima sobre la pared celular de los *Micrococcus lysodeikticus* disminuye la turbiedad de la suspensión bacteriana ocasionando un aumento en la transmitancia a una longitud de onda de 650 nm.

Los resultados obtenidos, los promedios y las desviaciones standard se encuentran contenidos en la Tabla II.

De acuerdo al curso de la reacción vemos que la relación transmitancia-tiempo, cumple con una función cuya ecuación es similar a la de Michaelis-Müntén (46).

$$T = \frac{T_{\max} t}{k+t} \quad (1)$$

donde,

T = transmitancia (variable dependiente).

t = tiempo (variable independiente).

$T_{\max}$  = constante (valor máximo de la transmitancia).

k = constante.

Al sacar el inverso de la ecuación (1) por el método de dobles recíprocas similar a la ecuación de Hineweaven-Burk -- (46), obtenemos:

$$\frac{1}{T} = \frac{k + t}{T_{\max} t} \quad (2)$$

GPO DE EXPERIMENTOS	TRANSMITANCIA				
	% T <sub>0</sub>	% T <sub>3</sub>	% T <sub>5</sub>	% T <sub>10</sub>	% T <sub>15</sub>
I	30.0	31.9	33.7	34.4	35.4
	33.0	34.5	36.2	37.3	37.8
	33.2	34.6	36.8	37.5	38.2
	32.0	33.7	35.4	36.3	36.5
	33.5	35.0	37.1	37.5	37.6
PROMEDIO	32.3	33.7	35.8	36.6	37.1
DESV. STD.	+ 1.4	+ 1.0	+ 1.3	+ 1.3	+ 1.0
II	30.7	33.2	36.0	38.2	38.5
	31.4	34.7	37.2	39.6	39.8
	32.0	35.2	37.8	40.0	40.4
PROMEDIO	31.3	34.3	36.9	39.2	39.5
DESV. STD.	+ 0.5	+ 0.8	+ 0.8	+ 0.8	+ 0.8
III	32.3	35.4	37.6	38.5	39.5
	31.7	36.0	38.4	39.7	40.8
	33.6	37.8	38.7	40.3	41.4
PROMEDIO	32.5	36.4	38.2	39.5	40.5
DESV. STD.	+ 1.0	+ 1.0	+ 0.5	+ 0.7	+ 0.8
IV	31.5	34.8	36.2	39.1	39.7
	32.0	35.6	37.0	38.1	39.0
	31.7	35.7	36.7	37.6	38.4
PROMEDIO	31.7	35.3	36.5	38.4	39.0
DESV. STD.	+ 0.3	+ 0.5	+ 0.4	+ 0.8	+ 0.7

Tabla II. Valores de % de Transmitancia obtenidos a diferentes tiempos durante la reacción enzimática de 0.5 ml de *M. lysodeikticus* con - 0.5 ml de extracto crudo de proteína en buffer PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.05M, pH 6.2, λ=650mμ. Cada grupo de experimentos se refiere a los resultados obtenidos a partir de un mismo cerdo.

T<sub>x</sub><sup>1</sup> = Transmitancia al minuto x.

Rearreglando la ecuación (2) obtenemos:

$$\frac{1}{T} = \frac{k}{T_{\max}} \frac{1}{t} + \frac{1}{T_{\max}} \quad (3)$$

que es la ecuación de una recta donde:

$$y = \frac{1}{T} ; \text{ variable dependiente.}$$

$$x = \frac{1}{t} ; \text{ variable independiente.}$$

$$m = \frac{k}{T_{\max}} ; \text{ pendiente de la recta.}$$

$$b = \frac{1}{T_{\max}} ; \text{ ordenada al origen.}$$

Con los valores reportados en la Tabla III, la ecuación (3) y haciendo un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (47), se obtienen las rectas de la figura 9.

A partir de los cálculos anteriores se pueden normalizar las curvas que se muestran en la figura 10, donde se han obtenido las curvas promedio para cada caso experimental.

La actividad enzimática de la lisozima se define (42),

$$U/mg = \frac{\Lambda_{650nm} / \text{min.}}{(10^{-3}) (\text{Dilución}) (\text{mg/ml Prot. Total})}$$

GPO DE EXPERIMENTOS	% T	1/T	t	1/t	1/T'	% T'	1/T' max	% T' max	ABSORBANCIA
I	32.3	0.0309	0	-	-	31.5	0.0262	381	0.409
	33.7	0.0296	3	0.33	0.0295	33.9			0.469
	35.8	0.0279	5	0.20	0.0282	35.5			0.449
	36.6	0.0273	10	0.10	0.0272	36.8			0.434
	37.1	0.0269	15	0.07	0.0269	37.2			0.429
II	31.3	0.0319	0	-	-	30.8	0.0242	41.3	0.504
	34.3	0.0291	3	0.33	0.0291	34.4			0.463
	36.9	0.0271	5	0.20	0.0271	36.8			0.434
	39.2	0.0255	10	0.010	0.0256	39.0			0.409
	39.5	0.0253	15	0.07	0.0251	39.7			0.401
III	33.5	0.0307	0	-	-	33.6	0.0241	41.4	0.488
	36.4	0.0274	3	0.33	0.0274	36.4			0.439
	38.2	0.0261	5	0.20	0.0261	38.2			0.418
	39.5	0.0253	10	0.10	0.0251	39.8			0.400
	40.5	0.0246	15	0.07	0.0248	40.3			0.395
IV	31.7	0.0315	0	-	-	32.3	0.0250	39.9	0.449
	35.3	0.0283	3	0.33	0.0284	35.1			0.455
	36.5	0.0274	5	0.20	0.0271	36.9			0.433
	38.4	0.0260	10	0.10	0.0260	38.4			0.416
	39.0	0.0256	15	0.07	0.0257	38.8			0.411

Tabla III. Cálculo de los valores de 1/T y 1/t para la obtención de las rectas que por regresión lineal darán como resultado una normalización de las curvas.

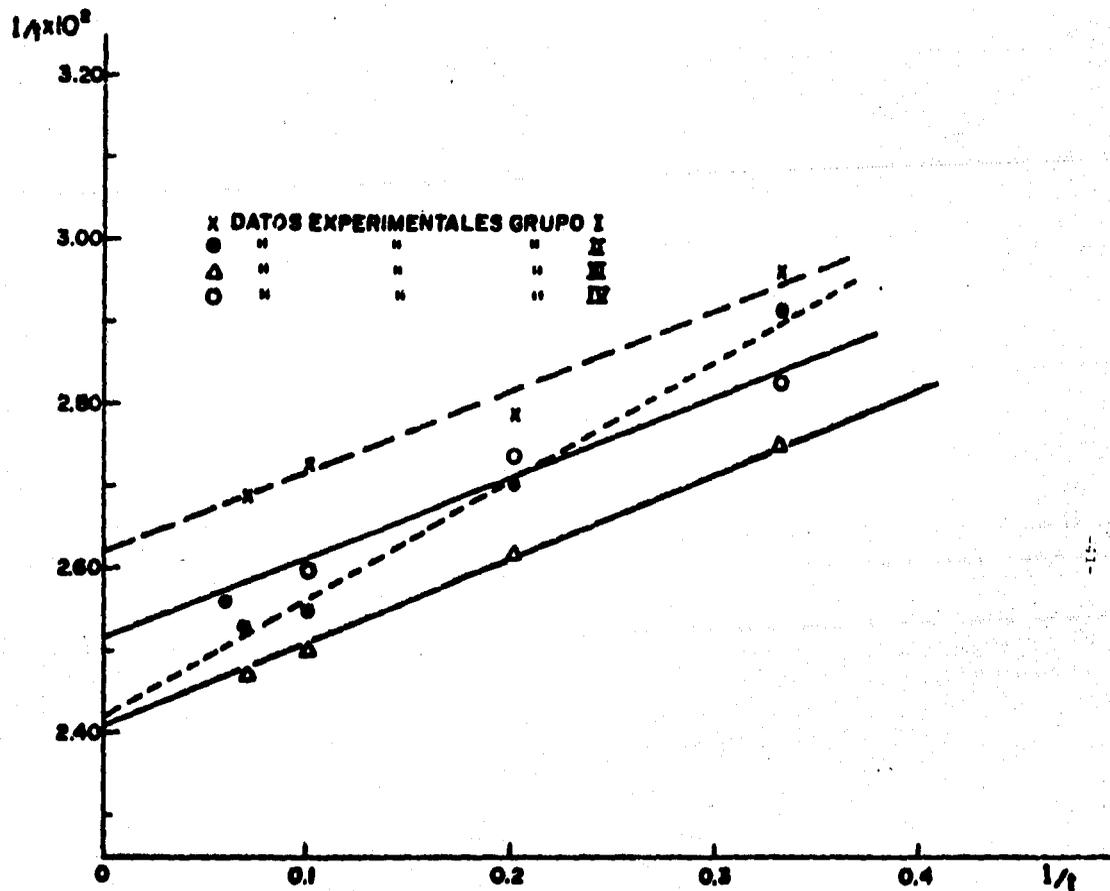


Figura 9. Curvas obtenidas por el método de mínimos cuadrados según datos reportados en la Tabla III.

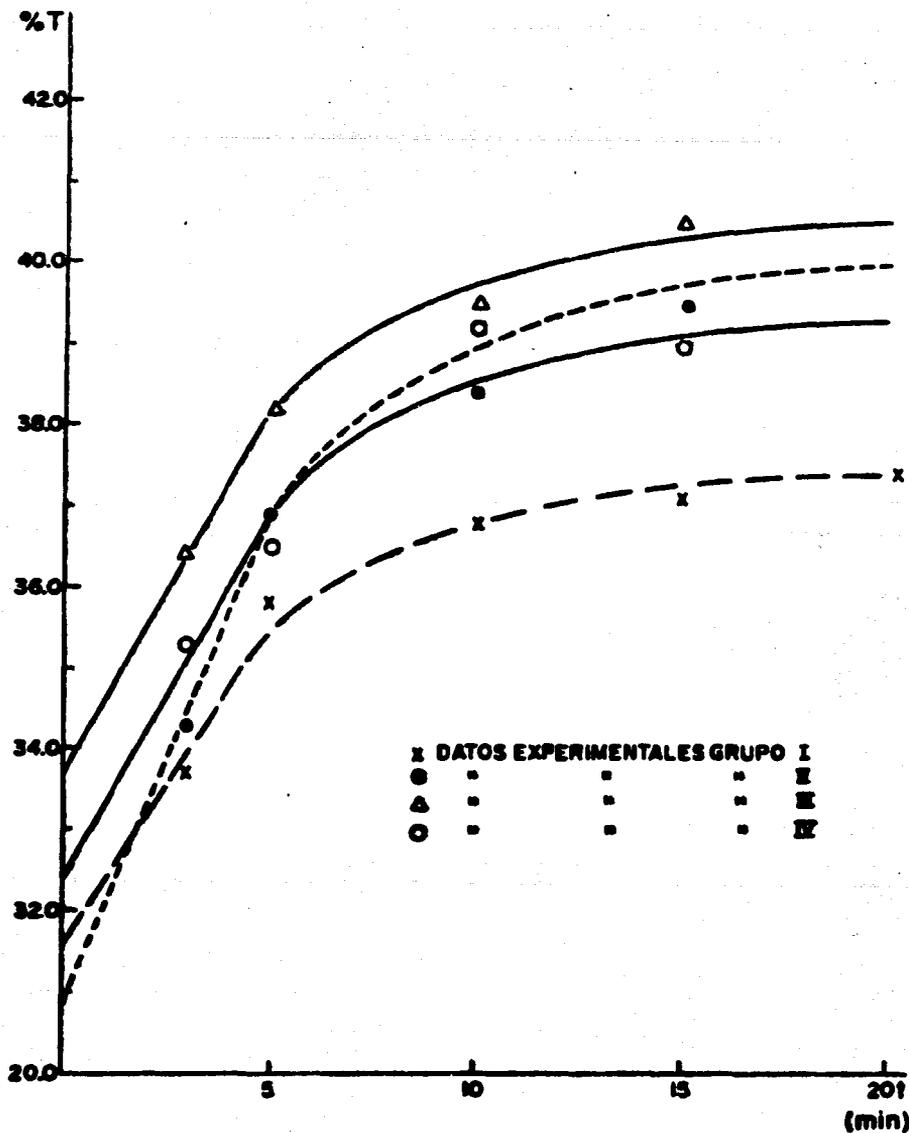


Figura 10. Curso de reacción de lisozima. Sustrato: 0.5 ml de *N. lysodeikticus*. Fuente enzimática: 0.5 ml extracto crudo de lisozima. pH 6.2. Buffer  $\text{PO}_4^{3-}$  0.05M = 650 nm.

El incremento de absorbancia por unidad de tiempo se calcula a partir del segmento inicial de la curva donde la pendiente es constante, es decir, durante los primeros tres minutos de actividad. (Tabla IV).

GRUPO DE EXPERIMENTOS	$A_{650nm}/min$	DILUCION	PROT. TOTAL mg/ml	ACTIVIDAD U/mg
I	0.008	0.5	4.74	3.37
II	0.012	0.5	7.04	3.40
III	0.007	0.5	5.92	2.36
IV	0.012	0.5	6.27	3.82
PROMEDIO	0.010	0.5	5.99	3.24
DESV. STANDARD	$\pm 0.003$	$\pm 0.0$	$\pm 0.95$	$\pm 0.62$

Tabla IV. Actividad de lisozima en extractos crudos de enzima de macrófagos alveolares de cerdo estimada como promedio de un lote de cuatro cerdos de la misma camada y sin problemas de infección.

### *Discusión.*

La acción de la lisozima contenida en el extracto de proteína de los macrófagos alveolares, provoca un aumento de la transmitancia en el medio debido a la lisis de la pared celular de la bacteria. Se observa que este incremento se efectúa lentamente, lo que se traduce en una actividad enzimática baja comparada con el control.

Los coeficientes de correlación obtenidos (Fig. 9) indican que efectivamente el curso de la reacción sigue la función propuesta (Ecuación 1), pues al linearizarla por el método de mínimos cuadrados, se obtienen rectas con un alto coeficiente de correlación.

En la figura 9 se puede observar que la recta correspondiente al grupo de experimentos II posee una pendiente mayor que la de las otras rectas. Esto es explicable, ya que cada uno de los experimentos se realizó con diferentes cantidades de proteína, y al hacer la corrección de la actividad por mg de proteína total no se aprecia una gran desviación del valor de éste con respecto a los demás (Tabla IV).

En la figura 10 se puede observar que las curvas que presentan el curso de la reacción de los experimentos, no sólo no parten del origen, sino que cada una de ellas se origina a di-

ferentes valores de transmitancia, esto se debe a que no todas las suspensiones de *M. lysodeikticus* tenían la misma concentración de bacterias por lo que el valor de la transmitancia variaba para cada experimento.

#### ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PEROXIDASA.

##### Fundamento.

La oxidación del ácido úrico por la acción del  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa provoca una desaparición en la banda de absorción a 290 nm.

La reacción química que se lleva a cabo es la siguiente:



donde ROOH representa el peróxido de hidrógeno y  $AH_2$  es la molécula donadora de electrones que es el ácido úrico.

Los resultados obtenidos de la oxidación de 0.15 ml de ácido úrico 0.5 mM por la acción de 20 microlitros de  $H_2O_2$  15 mM en presencia de 0.5 ml de extracto crudo de enzima peroxidasa se encuentran en la Tabla V.

Se analizaron los resultados obtenidos como se hizo en -

GPO DE EXPERIMENTOS	A B S O R B A N C I A								
	A <sub>0'</sub>	A <sub>5'</sub>	A <sub>10'</sub>	A <sub>15'</sub>	A <sub>20'</sub>	A <sub>25'</sub>	A <sub>30'</sub>	A <sub>35'</sub>	A <sub>40'</sub>
I	1.128	1.076	1.024	0.986	0.954	0.936	0.927	0.922	0.920
	1.120	1.067	1.015	0.977	0.942	0.921	0.916	0.911	0.906
	1.126	1.072	1.025	1.002	0.962	0.938	0.922	0.918	0.915
	1.130	1.086	1.037	1.015	0.982	0.957	0.942	0.938	0.929
	1.127	1.079	1.022	0.998	0.969	0.936	0.923	0.917	0.905
PROMEDIO	1.126	1.076	1.024	0.997	0.962	0.938	0.926	0.921	0.915
DESV STD	±.003	±.007	±.007	±.014	±.015	±.012	±.009	±.010	±.009
II	0.902	0.801	0.716	0.667	0.639	0.607	0.600	0.596	0.590
	1.110	1.007	0.926	0.847	0.810	0.776	0.756	0.745	0.730
	1.086	0.928	0.857	0.726	0.703	0.685	0.673	0.667	0.659
PROMEDIO	1.032	0.912	0.833	0.746	0.717	0.689	0.676	0.669	0.659
DESV STD	±.113	±.103	±.107	±.091	±.086	±.084	±.078	±.074	±.070
III	1.326	1.106	0.927	0.846	0.720	0.707	0.693	0.687	0.675
	1.627	1.402	1.202	1.097	0.938	0.896	0.807	0.785	0.782
	1.469	1.302	1.194	1.001	0.975	0.898	0.842	0.803	0.795
PROMEDIO	1.474	1.270	1.074	0.981	0.892	0.833	0.780	0.758	0.750
DESV STD	±.150	±.150	±.138	±.126	±.149	±.109	±.073	±.062	±.065
IV	1.163	1.067	0.987	0.920	0.865	0.822	0.797	0.786	0.775
	1.207	1.116	1.016	0.946	0.873	0.804	0.753	0.741	0.736
	1.058	0.967	0.955	0.897	0.821	0.751	0.706	0.691	0.682
PROMEDIO	1.142	1.050	0.986	0.921	0.850	0.792	0.752	0.739	0.731
DESV STD	±.076	±.075	±.030	±.024	±.026	±.036	±.045	±.047	±.046

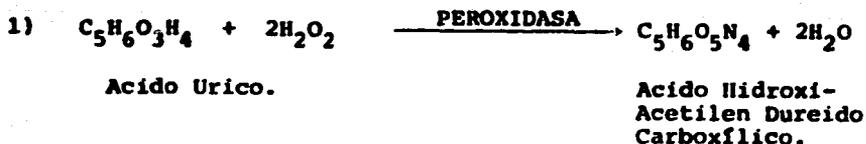
Tabla V. Oxidación de 0.15 ml de ácido úrico 0.5 mM por la acción de 20 microlitros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM en presencia de 0.5 ml de extracto crudo de peroxidasa. Buffer PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.07 M, pH 7.3 T = 27°C. Longitud de onda = 290 nm.

el caso de la lisozima; éstos se normalizaron para calcular la actividad de la peroxidasa en forma más exacta. Este análisis se encuentra en la Tabla VI y las rectas obtenidas en la figura 11.

En la figura 12 se encuentran las curvas correspondientes ya corregidas del curso de la reacción de peroxidasa.

Una unidad de actividad de peroxidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $25^\circ\text{C}$  (43). Conociendo los  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se van reduciendo en base a los  $\mu\text{moles}$  de ácido úrico que se van oxidando y sabiendo la estequiometría de la reacción será posible determinar su actividad. (Fig. 13).

Expresado la reacción con fórmulas condensadas se tiene:



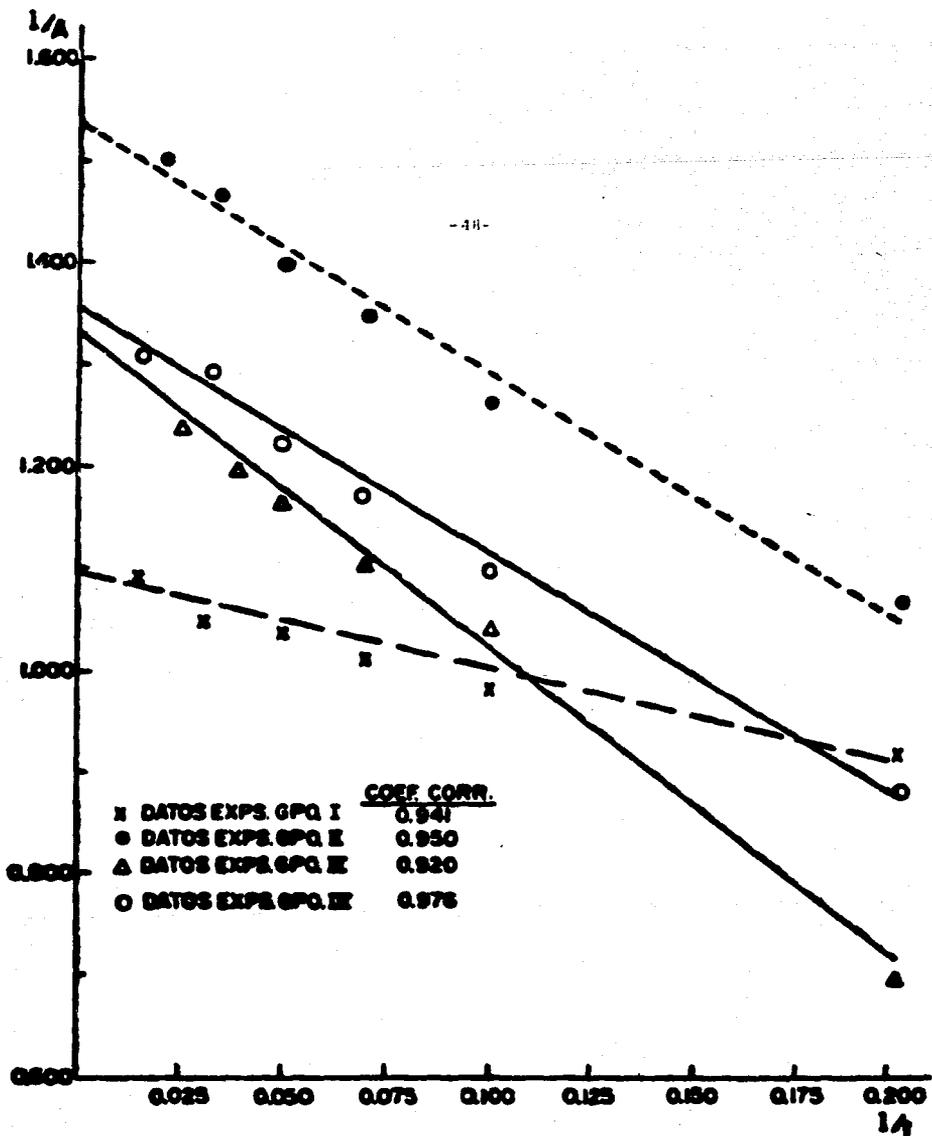


Figura 11. Curvas obtenidas por el método de mínimos cuadrados según datos reportados en la Tabla VI.

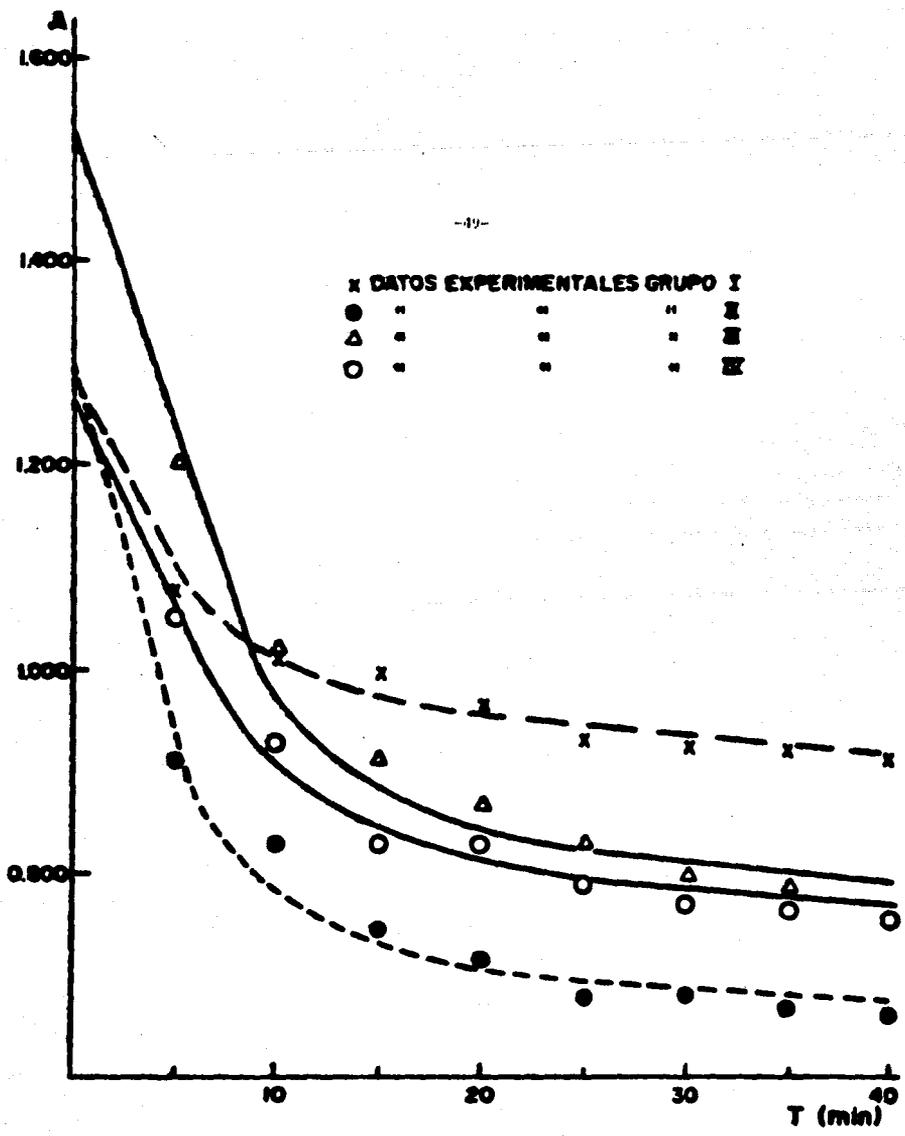


Figura 12. Curso de reacción de Peroxidasa. Sustrato: 20 microlitros --  $H_2O_2$  15 mM. Donador de electrones: 0.5 ml extracto crudo de enzima. Buffer  $PO_4^{3-}$  0.07 M pH 7.3 = 290 nm.

GPO DE EXPERIMENTOS	A	t	1/A	1/t	1/A'	A'
I	1.126	0	0.888	-	-	1.290
	1.076	5	0.929	0.200	0.909	1.100
	1.024	10	0.977	0.100	1.004	0.995
	0.997	15	1.003	0.070	1.032	0.968
	0.962	20	1.040	0.050	1.051	0.951
	0.938	25	1.006	0.040	1.061	0.942
	0.926	30	1.080	0.033	1.068	0.937
	0.921	35	1.086	0.028	1.072	0.932
	0.915	40	1.093	0.025	1.075	0.930
II	1.032	0	0.969	-	-	1.280
	0.912	5	1.096	0.200	1.048	0.954
	0.833	10	1.200	0.100	1.293	0.773
	0.746	15	1.340	0.070	1.367	0.731
	0.717	20	1.395	0.050	1.416	0.706
	0.689	25	1.451	0.040	1.441	0.694
	0.676	30	1.479	0.033	1.458	0.686
	0.669	35	1.495	0.028	1.470	0.680
	0.659	40	1.517	0.025	1.478	0.677
III	1.474	0	0.678	-	-	1.520
	1.270	5	0.787	0.200	0.814	1.228
	1.074	10	0.931	0.100	1.025	0.975
	0.981	15	1.019	0.070	1.118	0.894
	0.892	20	1.121	0.050	1.181	0.847
	0.833	25	1.200	0.040	1.212	0.825
	0.780	30	1.282	0.033	1.233	0.811
	0.758	35	1.319	0.028	1.249	0.801
	0.750	40	1.333	0.025	1.258	0.795
IV	1.142	0	0.876	-	-	1.260
	1.050	5	0.952	0.200	0.943	1.060
	0.986	10	1.014	0.100	1.117	0.896
	0.921	15	1.086	0.070	1.189	0.841
	0.850	20	1.176	0.050	1.237	0.809
	0.792	25	1.263	0.040	1.261	0.793
	0.752	30	1.330	0.033	1.277	0.783
	0.739	35	1.353	0.028	1.289	0.776
	0.731	40	1.368	0.025	1.296	0.771

Tabla VI. Cálculo de los valores de 1/A y 1/t para la obtención de las rectas que por regresión lineal y mínimos cuadrados darán como resultado la normalización de las curvas.

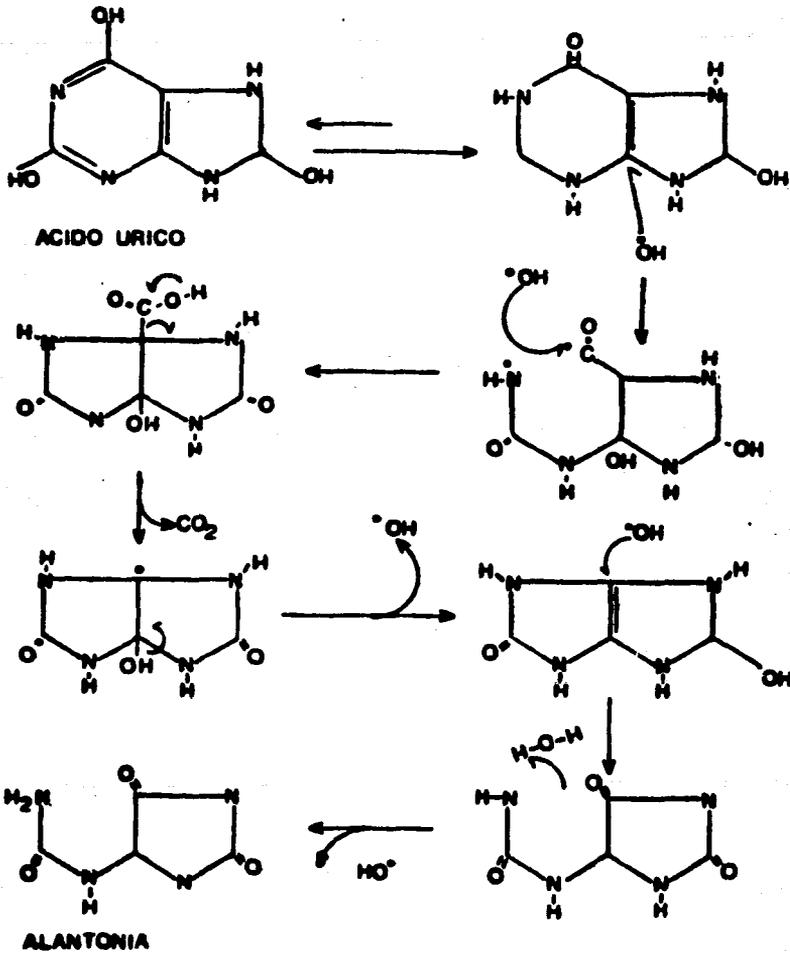


Figura 13. Mecanismo de la oxidación de ácido úrico por peróxido de hidrógeno vía radicales libres en donde se indica que la estequiometría es de 2 moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que oxidan a 1 mol de ácido úrico.

y basándose en la Ley de Lambert-Beer que relaciona la concentración de una sustancia con la absorbancia,

$$A = Kc.$$

donde,

A = absorbancia.

K = constante (coeficiente de extinción).

c = concentración.

se puede calcular la concentración del ácido úrico que se oxida a lo largo de la reacción; la constante K se calcula a partir del valor de la absorbancia al tiempo cero donde la concentración de ácido úrico es de 25 nmol/ml (Tabla VII).

GRUPO DE EXPERIMENTOS	$A_0$	Acido Urico nmol/ml	$K \times 10^{-6}$
I	1.290	25	0.052
II	1.280	25	0.051
III	1.520	25	0.061
IV	1.260	25	0.050

Tabla VII. Valores de la absorbancia registrada al tiempo cero de 25 nmol/ml de ácido úrico a 290 nm, a partir de los cuales se calcula el coeficiente de extinción molar.

Las concentraciones de ácido úrico a los diferentes tiempos de la reacción se encuentran reportados en la Tabla VIII.

En promedio se oxidan  $0.774 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/mg prot} \times \text{min}$  de ácido úrico lo que indica que la actividad de la peroxidasa -- presente en los macrófagos alveolares de cerdo es de:

$$3.87 \times 10^{-3} \text{ U/mg.}$$

#### *Discusión.*

La acción de la peroxidasa presente en el extracto proteico proveniente de los macrófagos alveolares, cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que a su vez oxida al ácido úrico provocando una disminución en la banda de absorción a 290 nm. Esta disminución es lenta lo que indica que la cantidad de ácido úrico que se va oxidando (o de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se reduce) es muy poca, lo que se traduce en una baja actividad de la enzima (Tabla VIII).

Esta disminución tan lenta en la absorbancia hizo pensar en un principio que probablemente se debiera tan solo por una sedimentación de ácido úrico dentro de la foto celda, por lo que se utilizaron controles sin contener el extracto proteico. No se observó ninguna disminución en la absorbancia llegando a la conclusión de que el extracto proteico si posee actividad -- aunque ésta resultó ser muy baja en comparación con la peroxidasa control.

T I E M P O (min)	GPO EXP I		GPO EXP II		GPO EXP III		GPO EXP IV	
	A <sub>290</sub>	C nmol/ml	A <sub>290</sub>	C nmol/ml	A <sub>290</sub>	C nmol/ml	A <sub>290</sub>	C nmol/ml
0	1.290	25.0	1.280	25.0	1.520	25.0	1.260	25.0
1	1.244	23.9	1.224	24.0	1.454	24.0	1.220	24.4
2	1.208	23.2	1.158	22.7	1.400	22.9	1.180	23.6
3	1.168	22.5	1.084	21.3	1.344	22.0	1.140	22.8
4	1.128	21.7	1.020	20.0	1.288	21.1	1.100	22.0
5	1.100	21.2	0.954	18.7	1.228	20.1	1.060	21.2
nmol Ac Urico Ox/5 min	0.76		1.26		0.98		0.78	
mg Proteína Total	4.74		7.04		5.92		6.27	
nmol Urico Ox/ mg x 30 min	0.801		0.88		0.810		0.606	
P R O M E D I O	0.774 nmol Urico Ox/mg prot x min							
D E S V. S T D.	± 0.15							

Tabla VIII. Concentración de ácido úrico a diferentes tiempos, a medida que se va oxidando por la acción de la peroxidasa sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Buffer PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.07 M, pH 7.3, T = 27°C, longitud de onda = 290 nm.

En la figura 11 se puede observar que los coeficientes de correlación indican que el curso de la reacción sigue la función propuesta (Ecuación 1) aunque ahora la variable dependiente es la absorbancia y la variable independiente sigue -- siendo el tiempo.

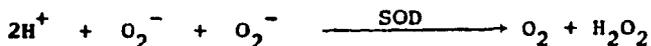
En la figura 12 observamos que el grupo de experimentos III tiene su origen a un valor más alto de absorbancia, esto se debe a las diferentes concentraciones del extracto proteínico, pero la cantidad de ácido úrico que se oxida durante el curso de la reacción podrá ser detectado independientemente de este factor (Tabla VIII).

#### ACTIVIDAD ENZIMATICA DE SUPEROXIDO DISMUTASA (41).

##### *Fundamento.*

La reducción del azul de tetrazolio (BT) por la acción del ión superóxido ( $O_2^-$ ) provoca una aparición en la banda de absorción a 560 nm. La presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) provoca una disminución de la concentración de  $O_2^-$  y por lo tanto su actividad se observa mediante la desaparición de la banda a 560 nm.

La fotorreducción de la riboflavina produce los iones superóxido que interaccionan con el azul de tetrazolio según la reacción:



impidiéndose de esta manera la acumulación de azul de formazán y la consiguiente desaparición de la banda de absorción a 560 nm.

Los resultados obtenidos de la iluminación de las soluciones conteniendo riboflavina, metionina y BT durante 12 minutos se encuentran en la Tabla IX. Los valores para la normalización de las curvas se encuentran en la Tabla X y la gráfica correspondiente en la figura 14.

Se utilizó como fuente enzimática de SOD el extracto proteico obtenido a partir de los macrófagos alveolares según la técnica antes descrita.

La unidad de actividad de la SOD puede ser definida como la actividad para la cual se alcanza la mitad de la inhibición máxima en las condiciones dadas (41).

En la figura 15 se grafica el por ciento de inhibición alcanzado como función de la cantidad de protefna total añadida y en la Tabla XI se muestra una recopilación de los resultados obtenidos.

GPO DE EXPERIMENTOS								
I	PROTEINA mg/ml	0.0	0.270	0.677	1.354	2.031	2.709	3.380
	A <sub>12'</sub>	0.254	0.242	0.226	0.198	0.186	0.183	0.181
	% INHIBICION	0.0	4.7	11.02	22.04	26.77	27.95	28.40
II	PROTEINA mg/ml	0.0	0.402	1.006	2.011	3.017	4.022	5.020
	A <sub>12'</sub>	0.246	0.225	0.207	0.182	0.175	0.173	0.171
	% INHIBICION	0.0	8.5	15.8	26.01	28.86	29.60	30.40
III	PROTEINA mg/ml	0.0	0.338	0.846	1.691	2.537	3.383	3.870
	A <sub>12'</sub>	0.239	0.218	0.202	0.187	0.180	0.178	0.176
	% INHIBICION	0.0	8.7	15.4	21.7	24.6	25.5	25.9
IV	PROTEINA mg/ml	0.0	0.358	0.896	1.791	2.687	3.583	4.470
	A <sub>12'</sub>	0.265	0.251	0.235	0.215	0.203	0.198	0.196
	% INHIBICION	0.0	5.2	11.3	18.8	23.4	25.3	26.2
V	PROTEINA mg/ml	0.0	0.243	0.608	1.217	1.825	2.434	3.040
	A <sub>12'</sub>	0.224	0.209	0.191	0.167	0.155	0.150	0.149
	% INHIBICION	0.0	6.6	14.7	25.4	30.8	33.0	33.4

Tabla IX. Inhibición de la reducción de BT por la SOD presente en los extractos crudos de proteína. Buffer PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.25 M, pH 7.8, longitud de onda = 560 nm, fuente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> = riboflavina 1.17 x 10<sup>-5</sup>

INHIBICION I	CONCENTRACION C	1/I	1/C	1/I'	I'
0.0	0.0	-	-	-	-
4.7	0.27	0.213	3.70	0.211	4.7
11.02	0.67	0.090	1.49	0.093	10.8
22.04	1.35	0.045	0.74	0.0-2	19.2
26.77	2.03	0.037	0.49	0.039	25.6
27.95	2.70	0.036	0.37	0.034	29.4
28.40	3.38	0.035	0.29	0.032	30.7
0.0	0.0	-	-	-	-
8.5	0.40	0.117	2.5	0.117	8.5
15.8	1.00	0.003	1.00	0.061	16.4
26.01	2.01	0.038	0.50	0.042	23.8
28.86	3.01	0.035	0.33	0.035	28.6
29.60	4.02	0.033	0.25	0.032	31.3
30.40	5.02	0.032	0.20	0.030	32.3
0.0	0.0	-	-	-	-
8.7	0.33	0.114	3.03	0.114	7.1
15.4	0.84	0.065	1.19	0.063	15.9
21.7	1.69	0.046	0.59	0.097	21.3
24.6	2.53	0.040	0.39	0.041	24.4
25.5	3.38	0.039	0.29	0.038	26.3
25.9	3.87	0.038	0.26	0.037	27.0
0.0	0.0	-	-	-	-
5.2	0.35	0.192	2.86	0.192	5.2
11.3	0.89	0.088	1.12	0.088	11.4
18.8	1.79	0.053	0.56	0.055	18.2
23.4	2.68	0.042	0.37	0.044	22.7
25.3	3.58	0.039	0.28	0.038	26.3
26.2	4.47	0.038	0.22	0.036	27.6
0.0	0.0	-	-	-	-
6.6	0.24	0.151	4.16	0.150	6.7
14.7	0.60	0.068	1.66	0.069	14.5
25.4	1.21	0.039	0.83	0.042	23.8
30.8	1.82	0.032	0.55	0.033	30.3
33.0	2.43	0.030	0.41	0.029	34.5
33.4	3.40	0.029	0.29	0.027	36.8

Tabla X. Cálculo de los valores de 1/I y 1/C, para la obtención de las rectas que por regresión lineal darán como resultado la normalización de las curvas.

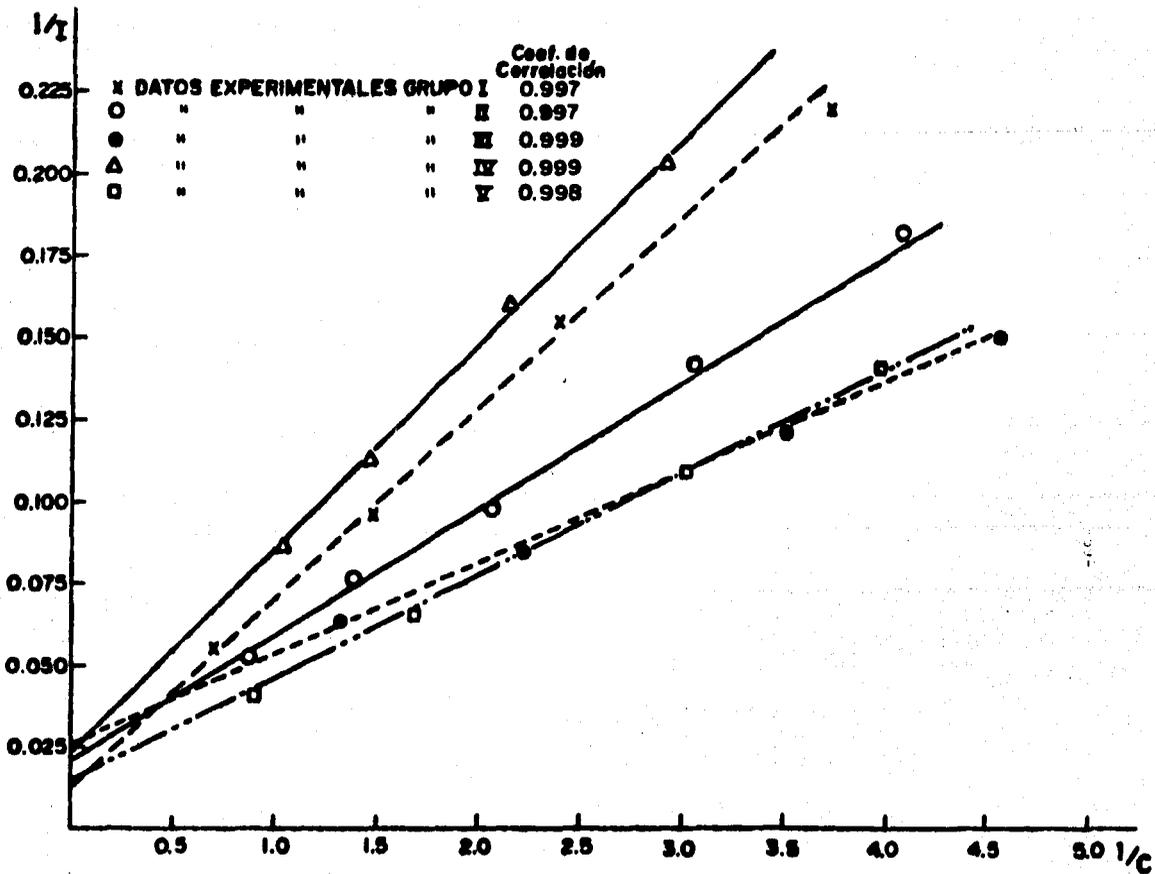


Figura 14. Curvas obtenidas por el método de mínimos cuadrados según datos reportados en la Tabla X.

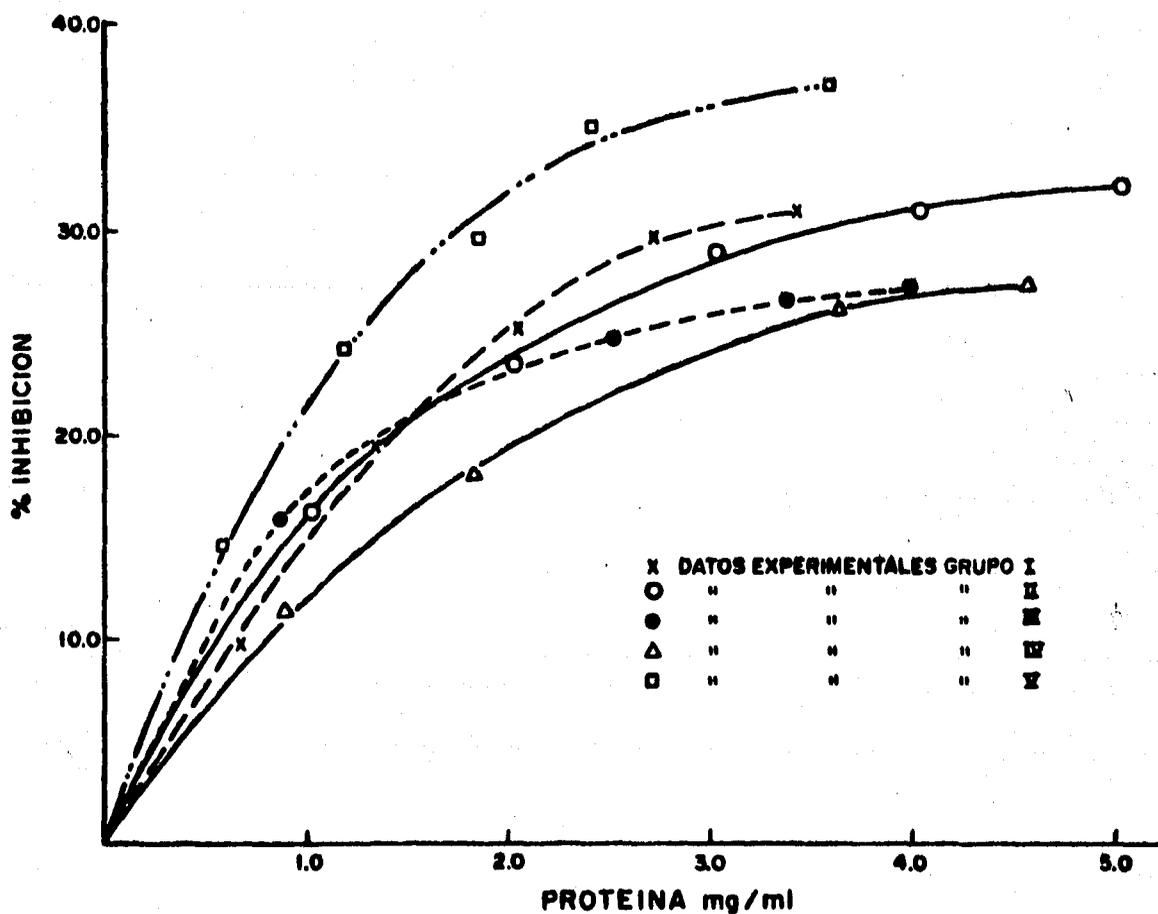


Figura 15. Inhibición de la reducción de BT por la presencia de SOD. La fotocelda contenía 0.4 ml de riboflavina  $1.17 \times 10^{-5}M$ , 0.15 ml metionina 0.1 M, 0.15 ml NaCN  $2 \times 10^{-4}M$  y las cantidades indicadas de proteína de macrófagos alveolares de cerdo en un volumen total de 3.5 ml. Buffer  $PO_4^{3-}$  0.25 M pH 7.8 T = 30°C.

GRUPO DE EXPERIMENTOS.	% INHIBICION. TOTAL	PROTEINA TOTAL mg/ml	1/2 INHIBICION. TOTAL.	UNIDAD DE ACTIVIDAD mg prot.	ACTIVIDAD U/mg
I	30.7	3.38	15.3	1.02	0.98
II	32.3	5.02	16.1	0.98	1.22
III	27.0	3.87	13.5	0.80	1.02
IV	27.6	4.47	13.8	1.20	0.83
V	36.8	3.04	18.4	0.84	1.19

Tabla XI. Unidad de actividad de SOD calculada a partir de las gráficas de la figura 14.

En la última columna de la Tabla X, se reportan los valores que corresponden a la unidad de actividad de la SOD. A partir de estos valores se puede calcular la actividad de una enzima siempre y cuando se conozca el contenido protéico total presente en un extracto de macrófagos alveolares.

### *Discusión.*

La presencia de la enzima Superóxido Dismantasa (SOD) -- contenida en el extracto protéico de macrófagos alveolares de cerdo, inhibe la reducción del azul de tetrazolio (BT). Cuando en el medio de reacción no se haya contenida la enzima SOD, se alcanza un incremento de absorbancia a los 12 minutos que se toma como un 0% de inhibición; a medida que se va añadiendo el extracto protéico (manteniendo el volumen constante), la inhibición va aumentando, ya que el ión superóxido se dismuta impidiendo la reducción del BT y por consiguiente, la aparición del azul de formazán que absorbe a 560 nm. (Tabla IX).

La mitad de la inhibición máxima se alcanza a valores -- muy altos de concentración de proteína (Tabla XI) lo que indica que el contenido de SOD presente en el extracto protéico es muy bajo. En la figura 14 se puede observar que los coeficientes de correlación obtenidos para las rectas que ahí se ilustran, son altos, lo cual indica que efectivamente es posible hacer una linearización de las curvas que cumplen con la función de la ecuación (1).

En la figura 14 se ilustra el por ciento de inhibición - máxima alcanzada y a partir de ella encontramos los mg de pro teína que corresponden a la unidad de actividad de SOD (41).

La actividad de SOD presente en el extracto protéico de macrófagos alveolares de cerdo es baja en comparación a los - valores reportados (49) ya que se alcanzan sólo valores de -- 1 U/mg.

### CONCLUSIONES.

1) El método utilizado para la obtención de macrófagos -  
dió un buen rendimiento, pues los volúmenes obtenidos  
de células empacadas, así como el recuento de macrófagos, son  
del orden de los reportados en la literatura (6).

2) Fue necesario utilizar tres técnicas conjuntas para -  
lograr el rompimiento de la membrana celular del ma--  
crófago, lo que nos indica su alto grado de resistencia.

3) El método utilizado para la determinación de protef--  
nas es exacto ya que se comprobó con patrones inter--  
nos; se eliminaron las interferencias y es sumamente rápido --  
por lo que se recomienda para futuras determinaciones de conte  
nido protéico en extractos crudos libres de células.

4) En cada uno de los casos de la determinación de las -  
tres actividades enzimáticas concluimos que es fasi--  
ble tratar las curvas que señalan los cursos de reacción según  
la ecuación (1), ya que al hacer la lineanización por el méto-  
do de dobles recíprocas (Ecuación 3), los coeficientes de co--  
relación estuvieron cercanos a 1.

5) En el caso de las tres determinaciones de actividades enzimáticas, éstas resultaron muy bajas en comparación a las actividades reportadas en la literatura para las mismas enzimas de macrófagos en otras especies animales. Sin embargo, en todos los casos citados (Lisozina (37), Peroxidasa (48), SOD (49)), se determinó la actividad con enzimas puras por lo que no existe punto de comparación y habría que hacer otros experimentos con extractos protéicos purificados a partir de la misma fuente.

BIBLIOGRAFIA.

1. Haber, A.L., Clin. Res., 18:485 (1970).
2. Green, A.M., Am. Rev. Resp. Dis., 102:691 (1970).
3. Hatch, T.F., Bacteriol. Rev., 25:237 (1961).
4. Kilburn, K.H., Arch. Environ. Health., 14:77 (1961).
5. Han, A.W. "Tratado de Histología". Ed. Interamericana. México (1969) pág. 247.
6. Appendini, C.H. Reunión Anual de Inv. en Med. Vet., INIP-ENEP, México (1978).
7. Paape, M.J., J. Am. Vet. Med. Ass., 170:1214 (1977).
8. Lay, W.H., J. Exp. Med., 128:991 (1968).
9. Messner, R.P., J. Clin. Invest., 49:2165 (1970).
10. Stossel, T.P., N. Engl. J. Med., 290:774 (1974).
11. Holmes, B., J. Clin. Invest., 46:1422 (1967).
12. Klebanoff, S.J., Semin. Hematol., 12:117 (1975).
13. Bainton, D.F., J. Cell. Biol. 58:249 (1973).
14. Hirsch, J.A., "The Inflammatory Process" 2nd. ed., Vol. I. New York, Academic Press, 1974. p. 411-447.
15. Van Oss, C.J., J. Clin. Invest. 46:786 (1967).
16. Dunham, P.B., J. Cell. Biol., 63:215 (1974).
17. Hartwig, J.H., J. Biol. Chem. 250:5696 (1975).
18. Baehmer, R.L., Science, 155:835 (1967).
19. Babior, B.M., J. Clin. Invest., 52:741 (1973).
20. Allen, R.C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:909 (1974).

21. White, R. "Principles of Biochemistry". McGraw Hill. New York (1975) p. 454.
22. Reed, P.W. J. Biol. Chem. 244:2459 (1969).
23. Klebanoff, S.J., J. Bacteriol., 95:2131 (1968).
24. Stauff, J., Photochem. Photobiol., 4:1199 (1965).
25. Haber, F., Weiss, J., Proc. R. Soc., London Ser A. 147: 332 (1934).
26. Mc Cord, J.M., Fridovich, I., J. Biol. Chem., 243:5753 (1968).
27. Rajagopalan, K.V., et al. J. Biol. Chem., 239:2022 (1964).
28. Johnston, R.B. et al., J. Clin. Invest. 52:44a (1973).
29. Rister, M., Baehner, R.L., Brit. J. Haematol., 36:241 (1977).
30. Masson, P.L., et al., J. Exp. Med., 130: 643 (1969).
31. Seya, H.I., J. Exp. Med., 127:927 (1968).
32. Eisen, H.N., Tratado de Microbiología, Parte III:365, Salvat Editores, 2o. edición (1978).
33. Pijoan, C., Interacción Etiológica en la Producción de Neumonía, Memorias del 1o. Congreso Enf. Resp. Cerdos (1978).
34. Myrvik, Q.N., et al., J. Immunol., 86:128 (1961).
35. Wintrabe, W.W., An. J. Med. Sc. 185:58 (1933).
36. Groves, W.E. Analyt. Bioch. 22:195 (1968).
37. Biggar, W.D., et al., Inf. and Imm., 16:974 (1977).
38. Jollés, P., Methods in Enzimol. Vol. V:(12), p. 137
39. Chance, B. and Mahely, A.C. Methods in Enzymol. Vol. II: (136), 764.
40. Maehly, A.C., Methods in Enzymol. Vol. II:(142), 794.

41. Beuchamp, Ch., and Fridovich, I., Anal. Biochem. 44:276 (1971).
42. Shugar, D., Biochim. Biophys. Acta., 8:302 (1952).
43. Bergmeyer, H.U. Methods in Enzymol Anal. 1(495) 2nd. Edit. New York: Academic Press, Inc. (1974).
44. Jakab, G.J. and Green, G.M., The J. Inf. Dis., 129:263 (1974).
45. Campos, M., Tesis Profesional. MVZ, ENEP-UNAM, México (1977) Inhibición de la fagocitosis de los macrófagos alveolares por la vacuna contra cólera porcino.
46. Lehninger, A.L. "Biochemistry", Worth Publishers, Inc. 2nd. Edition. New York, (1975), p. 191.
47. Daniel, W.W. "Bioestadística", Ed. Limusa, 1a. Edición. México (1979) p. 291.
48. Paul, B.B. Science, 181 (1973).
49. Boyer, J. "The Enzymes" Vol. XII.