

9
302827

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
Incorporada a la
Universidad Nacional Autónoma de México



CARACTERIZACION DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN PANCREAS CANINO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para obtener el Título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a :
MARIA ELIZABETH GARCIA PLASCENCIA
México, D.F. 1990



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 está 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.

INDICE

	PAG.
CAPITULO I. INTRODUCCION.	1
1.1. HIPOTESIS.	7
1.2. OBJETIVOS.	7
 CAPITULO II. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA.	8
2.1. CARACTERIZACION ENZIMATICA.	10
2.1.1. EFECTO DEL pH.	10
2.1.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA.	12
2.1.3. EFECTO DE LA FUERZA IONICA.	14
2.2. CINETICA ENZIMATICA.	15
2.2.1. INHIBICION ENZIMATICA.	19
2.3. ENZIMAS DESHIDROGENASAS.	19
2.3.1. BIOQUIMICA DE LAS 17 β - HIDROXI-- ESTEROIDE DESHIDROGENASAS.	20
2.3.2. PESOS MOLECULARES, COMO PROPIEDAD FISICA DE LAS 17 β - HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS EN DIFERENTES TEJIDOS ANIMALES.	21
2.4. QUIMICA DE LOS ESTEROIDES.	22
2.4.1. ESTRUCTURA.	22
2.4.2. HORMONAS SEXUALES FEMENINAS.	23
2.4.3. HORMONAS SEXUALES MASCULINAS.	23
 CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.	24
3.1. DIAGRAMA GENERAL.	24
3.1.1. DIAGRAMA DE CENTRIFUGACION -	

DIFERENCIAL.	25
3.2.MATERIAL BIOLÓGICO.	26
3.3.METODOLOGÍA.	26
3.3.1.FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE PAN- CREAS CANINO.	26
3.3.2.DETERMINACION DE PROTEÍNA.	26
3.3.3.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	27
3.4.RESULTADOS.	30
CAPITULO IV.DISCUSION.	58
CAPITULO V.RESUMEN.	64
CAPITULO VI.CONCLUSIONES.	68
BIBLIOGRAFIA.	70
APENDICE.	77
8.1.MATERIAL Y EQUIPO.	77
8.1.1.MATERIAL DE VIDRIO Y VARIOS.	77
8.1.2.EQUIPO DE LABORATORIO.	78
8.1.3.DISOLVENTES Y REACTIVOS.	79
8.2.PREPARACION DE REACTIVOS.	80
8.2.1.PREPARACION DEL MATERIAL RADIACTIVO	82
8.2.1.1.CALCULOS.	82
8.2.1.2.REPURIFICACION DEL MATERIAL RADIACTIVO.	84
8.3.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	

DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN PANCREAS CANINO.	85
8.3.1.PREPARACION DEL MEDIO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.	85
8.3.2.INCUBACION.	85
8.3.3.EXTRACCION DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LA REACCION.	86
8.3.4.DETECCION DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LA REACCION.	86
8.3.5.CUANTIFICACION.	86

I. INTRODUCCION.

En la literatura, se han acumulado evidencias que señalan la participación de las hormonas esteroides en la fisiopatología pancreática; por ejemplo, en 1963, Ullberg y Bengtsson, estudiando cualitativamente la distribución de la radiactividad en los tejidos de ratones, después de la administración de estradiol ó estrona radiactivos, reportan que el páncreas de los animales así tratados captan esta radiactividad, la cual detectaron hasta cuatro horas después de la inyección del estrógeno radiactivo, depositándose principalmente en la parte exócrina del páncreas más que en los Islotes de Langerhans. (50).

Una segunda notificación a este respecto aparece en 1972 cuando Rashad Y. Kirdani y colaboradores, empleando biopsias estudiaron la distribución de radiactividad en tejidos y fluidos biológicos de perros y mandriles machos, después de la administración simultánea de pares de estrógenos / andrógenos marcados con isótopos radiactivos diferentes. Las muestras de tejidos se obtuvieron, de los animales antes mencionados, a intervalos de 15 minutos durante un período de dos horas. Esta radiactividad se retuvo en mayor cantidad y tiempo en el páncreas de ambas especies de animales, que en cualquier otro órgano, incluyendo tejidos esteroideogénicos como próstata y testículo. Resultados similares se obtuvieron en la rata, cobayo, perro y mandril después de la administración de estradiol, estriol y dietil-estilbestrol. (23).

Reportes posteriores demuestran la presencia de receptores específicos para estrógenos en las fracciones: nuclear, micro-

somal y citosólica de las células acinares pancreáticas de diferentes especies de mamíferos incluyendo la humana. (4, 42).

También se ha descrito, la presencia de un receptor para andrógenos en la fracción citosólica y nuclear del páncreas de ratas, el cuál une testosterona y dihidrotestosterona con afinidad similar "in vitro." (38). Así como una proteína fijadora de estrógenos (EBP), con baja afinidad y alta capacidad, purificada en páncreas de ratas. (41). Posteriormente, Ake Pousette, reporta la caracterización de una macromolécula fijadora de estrógenos en páncreas humano (hEBP), postulando que ésta proteína con media afinidad y alta capacidad para fijar estrógenos presenta una función diferente a la descrita por los receptores pancreáticos anteriormente mencionados. (39).

Se han encontrado receptores con alta afinidad para estrógenos en las fracciones citosólica y nuclear del tejido fetal humano y en tejido tumoral de pacientes con adenocarcinoma de páncreas, comparados con los receptores detectados en tejido pancreático normal. (22,17). Estos estudios sugieren la posible dependencia hormonal del carcinoma de ésta glándula, corroborándose posteriormente mediante la inducción de la carcinogénesis experimental por fármacos, donde se demuestra que la incidencia y el crecimiento de tumores de páncreas son más elevados en las ratas macho que en las hembras. En éstos trabajos también se señala que en las ratas macho castradas la incidencia de éstos tumores disminuye mientras que la castración seguida de la administración de testosterona resulta en una mayor incidencia de

tumores pancreáticos en animales de ambos sexos. (13,29,40).

En los últimos años ha sido mayor la importancia de la patología y fisiología pancreática, sin embargo se han llevado a cabo pocos estudios, y es poca la información disponible respecto a las capacidades del páncreas para sintetizar y metabolizar hormonas esteroideas. En 1963, se determinó la actividad de dos enzimas involucradas en las vías metabólicas de hormonas esteroideas siendo éstas la aromatasa y 5 alfa reductasa estudiadas en homogenados de tejido pancreático : de adulto normal, fetal y tumoral, encontrando la actividad de ambas enzimas significativamente más alta en el adenocarcinoma .(12,15).

De acuerdo a las evidencias mencionadas que señalan la participación de las hormonas esteroideas en la fisiología pancreática surge el interés de caracterizar una enzima relacionada en el metabolismo de hormonas esteroideas, está es la 17 β -HIDROXI-ESTEROIDE DESHIDROGENASA en páncreas de perros macho y de esta forma, al determinar sus características cinéticas, usando testosterona, androstendiona y estradiol como sustratos, compararlas con aquellas que anteriormente han sido determinadas en otras 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS en tejidos como placenta, endometrio, próstata, testículo, hígado, riñón y otros de distintas especies animales, como a los que a continuación se mencionarán.

ENZIMAS 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS (17 β HED).
(HED) de PLACENTA HUMANA.

A esta enzima se le determinó su cinética en 1959 por Langer y Engel previa a su purificación realizada por los mismos autores en 1970, y cuyo procedimiento de purificación se simplificó en 1986 por G. Mendoza H. (32,33). Después de la purificación se reportaron actividades de la enzima con diferentes sustratos y especificidad para nucleótidos de nicotinamida, observando que la enzima es más reactiva para aquellos esteroides de 18 carbonos y un grupo 17 β HIDROXILO, como lo es el 17 β Estradiol y NAD'/NADP' de coenzimas (20).

(HED) DE ENDOMETRIO HUMANO.

La actividad de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, usando 17. Estradiol como sustrato, fué demostrada en el endometrio humano primeramente por Ryan y Engel, observando que la enzima presenta variabilidad en su actividad durante el ciclo menstrual de la mujer. (52). Su distribución fué reportada por Follow en la fracción mitocondrial, microsomal y citosólica del endometrio humano; caracterizando la enzima observó que las tres fracciones presentaban actividades enzimáticas muy similares y el NAD' fué la coenzima preferida en la conversión de 17 β Estradiol a estrona. (37).

(HED) EN PROSTATA DE PERRO, TESTICULO HUMANO Y DE CERDO.

En próstata de perro, la enzima 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA ha sido parcialmente purificada y su actividad se encontró en la fracción microsomal, utilizando testosterona co-

mo sustrato y como coenzimas NAD'y NADP'; (52). Inano y Tamaoki estudiaron la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de testículo en numerosas especies de animales; localizándose en mayor proporción en la fracción microsomal. Los mismos autores solubilizaron la enzima membranal de testículo de cerdo, y estudiaron la especificidad para nucleótido de piridina de la enzima purificada, en donde el NADP'(H)'; es la coenzima preferida por la enzima, y presentando actividades similares tanto para testosterona como para 17 β -estradiol .(14).

La (HED) EN HIGADO DE COBAYO Y DE CONEJO.

En el hígado de cobayo se ha purificado parcialmente la -- 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA y se midió su actividad, usando los esteroides C18 y C19 como sustratos para la enzima y su coenzima fué el NADP'(H)'. Asi mismo otras 17 β -HED se encontraron en el citosol de hígado de conejo.(18).

La (HED) DE RINON DE CERDO.

La 17 HED mejor caracterizada en riñón, es aquella hallada en la fracción soluble de cobayo y posteriormente se completó su purificación teniendo mayor actividad con NADP'y NAD' como coenzimas, y testosterona como sustrato. (2,52).

(HED) DE OTROS TEJIDOS.

En otros tejidos menos estudiados se detectó la actividad de la 17 HED, por ejemplo cataliza la interconversión de estradiol a estrona en la sangre periférica de mujeres embarazadas en etapas iniciales de gestación, y los niveles séricos de esta

enzima aumentan durante el progreso del embarazo.

Se ha purificado parcialmente y caracterizado en eritrocitos humanos hemolisados teniendo siempre como absoluto requerimiento al NADP. La enzima de eritrocitos humanos utilizó tanto andrógenos como estrógenos con grupo 17 β -hidroxil, así como derivados sulfatados. (16,36).

Areas específicas del cerebro como hipotálamo, y pituitaria pueden concentrar 17 β estradiol y testosterona, más aún, estas hormonas pueden influir en la secreción de gonadotropinas por la pituitaria, lo que promovió el estudio de las 17 HED en el sistema nervioso, reportándose la oxidación de 17 β -estradiol y testosterona como sustratos de la enzima en el sistema nervioso de ratas, y en el sistema nervioso de fetos humanos, mandriles y perros. (35).

La influencia de los estrógenos en las actividades biológicas de la piel del ser humano adulto ha propuesto la investigación del metabolismo de esteroides de este tejido; en ratas recién nacidas se encontró la 17 β HED en la fracción microsomal de la piel de estos animales, reaccionando con el 17 β -estradiol y la testosterona (7).

Las evidencias anteriores corroboran la importancia de la -- 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, como la enzima involucrada en procesos metabólicos donde intervienen esteroides en diferentes tejidos animales (11).

1.1. HIPOTESIS.

A raíz de que el páncreas tiene receptores capaces de manejar estrógenos, y que existe diferencia significativa de la presencia del carcinoma pancreático en hombres y mujeres, se propone con este trabajo estudiar en páncreas canino, una enzima, la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA cuya presencia en este órgano sería importante, ya que como se mencionó anteriormente la capacidad catalítica de esta enzima es limitada para los esteroides, de esta manera se tendría una evidencia específica de que el páncreas podría actuar como órgano extragonadal capaz de manejar esteroides.

1.2. OBJETIVOS.

1.2.1. GENERAL: REALIZAR EL ESTUDIO CINETICO DE LA ENZIMA 17 β HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en páncreas canino.

1.2.2. PARTICULARES:

A. Localizar en qué fracción subcelular del páncreas canino se encuentra la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA.

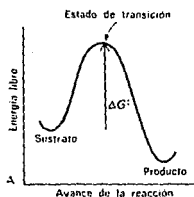
B. Comparar el comportamiento cinético de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, frente a diferentes sustratos esteroides.

C. Realizar estudios de inhibición por producto esteroide en la reacción catalizada por la enzima.

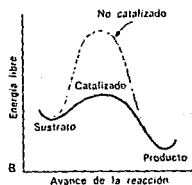
D. Comparar los parámetros cinéticos de esta enzima, con los de otras 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS descritas en otros tejidos.

II. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA.

Una de las características más distintivas de la célula humana es su habilidad para desarrollar reacciones complejas rápidamente y a la temperatura corporal. Los agentes que participan en el metabolismo celular son las enzimas, que pertenecen a un grupo específico de proteínas, actuando como catalizadores biológicos, por lo que no alteran el equilibrio de una reacción química, pero si disminuyen la energía de activación de las reacciones catalizadas por ellas, es decir, disminuyen el ΔG^{\ddagger} (fig.1)*. La combinación del sustrato con la enzima crea una nueva vía de reacción que tiene un estado de transición de menor energía de la que tendría en ausencia de la enzima.(47).



Reacción no Enzimática



Reacción Enzimática

Fig 1. ΔG^{\ddagger} . Energía Libre de Gibbs.

Las enzimas son altamente específicas, ya que cada molécula de sustrato se une específicamente al centro activo de la enzima como por ejemplo en la catálisis enzimática de la reacción :



Se define claramente como el sustrato se une a la enzima formando primeramente el complejo [ES], su existencia se ha demostrado por microscopía electrónica, cristalografía de rayos X, solubilidad, estabilidad, aislamiento y características espectroscópicas. (27).

El estudio de la cinética enzimática es importante, para definir las condiciones óptimas de reacción, como el efecto de varios factores sobre la enzima: pH, temperatura, etc. La cinética es una parte vital para cualquier estudio detallado de una enzima, y es necesaria para realizar mayores investigaciones sobre la enzima e interpretar resultados. En 1835, el químico sueco Berzelius estableció las bases de la catálisis química efectuada por las enzimas, sugiriendo la existencia de una fuerza vital generada por enzimas que una vez separadas del organismo que las contenía podría ser una propiedad debida a los reaccionantes químicos; y a mediados del siglo XIX ya se habían postulado las siguientes generalizaciones de la acción enzimática :

- a). La velocidad de una reacción enzimática es mayor que cuando la reacción se lleva a cabo por catalizadores no biológicos.
- b). Los catalizadores enzimáticos se distinguen de los demás, en que son altamente específicos y catalizan una sola o un pe -

queño número de reacciones.

c). _Existe una amplia variedad de catalizadores enzimáticos, ca da uno de los cuales desempeña una función limitada.

d). _La acción catalítica se realiza dentro de una región geométrica: centro activo.(3).

2.1.CARACTERIZACION ENZIMATICA:

2.1.1.Efecto del pH :

Las enzimas, por ser proteínas, son modificadas notablemente por los cambios de pH del medio en que se encuentran, ya que contienen por lo menos dos grupos iónicos: el grupo amino terminal y el grupo carboxilo terminal.(25) :

Enzima EH_2^+	Enzima EH	Enzima E^-
pH bajo	pH isoeléctrico	pH alto

Tienen además grupos R iónicos de algunos aminoácidos, los cuales intervienen también en la característica iónica total de la enzima, comportándose ésta como una molécula poliprótica y anfipática.

Por estudios fisicoquímicos, se ha demostrado que la enzima poliprótica en disolución presenta cambios considerables en función del pH, como lo es su solubilidad, ya que el pH al que una proteína muestra un mínimo de solubilidad es en su punto isoeléctrico, definido como el valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica; y al no existir atracción electrostática entre las moléculas de proteína vecinas, tiende a precipitar; si el pH se halla por encima del punto isoeléctrico, la proteína

posee una carga negativa neta, aumentando en magnitud a medida que el pH aumenta, análogamente, a cualquier pH por debajo del punto isoeléctrico, la proteína posee carga positiva; por lo que el pH al afectar el carácter iónico de la enzima, modifica su estabilidad y el sitio catalítico específico al sustrato.(47).

Para probar el efecto directo del pH en la estabilidad enzimática se preincuba la enzima a diferentes pH por arriba y debajo del pH óptimo y después se mide la actividad a éste pH, observándose que en cambios bruscos de pH la enzima presenta inactivación irreversible, que puede deberse a un rompimiento de los enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno que juegan un papel importante para mantener la estructura terciaria de una proteína .(8).

De una manera muy particular el cambio de pH altera la propiedad iónica del sitio activo de la enzima modificando grupos iónicos específicos, por ejemplo:

- a)El grupo alfa carboxilo terminal.
- b)EL grupo alfa amino terminal.
- c)Grupo Imidazólico (de histidina).
- d)Grupos sulfhidrilos (de cisteínas).
- e)Grupos fenólicos OH (de tirosinas).
- f)Grupos de Guanidina (de argininas).

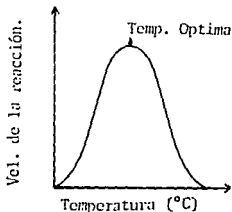
El conocimiento de las propiedades ácido - básicas de una proteína determinada hace posible, por tanto, predecir su comportamiento en soluciones de pH diferentes y utilizarse de modo directo en métodos que permitan la separación y el análisis de mezclas de proteínas, como: la electroforesis y la cromatogra -

fía de intercambio iónico.

Más aún, el pH modifica en ocasiones al sustrato que contiene grupos ionizables de los cuales sólo una forma iónica específica puede unirse a la enzima y desencadenar la catálisis.(44).

2.1.2 Efecto de la temperatura.

La temperatura es otro factor que modifica la actividad enzimática, ya que la enzima es una molécula muy delicada, debido a la precisión y ordenamiento elevado de su estructura terciaria, que permite la unión específica, en el espacio, con el sustrato. La siguiente figura es típica para velocidades de reacciones catalizadas por enzimas medidas a diferentes temperaturas . (28)..:



Así al haber un incremento de la temperatura se proporciona mayor energía cinética a las moléculas reaccionantes dando como resultado mayor número de colisiones entre E y S por unidad de tiempo y un incremento en la velocidad catalítica; generándose una temperatura óptima, que es la mayor temperatura en la cual una enzima presenta una actividad máxima constante en un periodo de tiempo x. Si la molécula enzimática absorbe demasiada energía, su estructura terciaria se rompe y la enzima sufre

desnaturalización, y por consiguiente una disminución de su actividad catalítica, que de acuerdo a la hipótesis propuesta por Anfinsen, en la que se establece, que la enzima nativa tiene una energía mínima, y si se aumenta la temperatura, la proteína sufre cambios en sus magnitudes termodinámicas, esto es, que evita un estado termodinámico desfavorable para tener la conformación mas estable, por lo tanto el plegado de la cadena polipeptídica estaria controlado en forma cinética.(44).

Por consiguiente, un aumento en la entalpía del sistema contribuiría con un aumento en la energía libre de Gibbs, definiéndose el sistema como no espontáneo; así mismo la ruptura de los enlaces hidrófobos de la proteína generada por el aumento de la temperatura disminuye la entropía que mantiene plegada a la enzima.

Por otro lado el efecto de la temperatura en una reacción catalizada por enzimas es frecuentemente expresada en términos de coeficiente de temperatura : Q10 siendo el factor por el que la velocidad se eleva por cada incremento de 10 °C de temperatura.

Otro efecto de la temperatura que contribuye al cambio de las características fisicoquímicas de una proteína se manifiesta en la solubilidad protéica, que aumenta al aumentar la temperatura hasta el punto donde se genera la inestabilidad y comienza la proteína a desnaturalizarse, generalmente con pérdida de solubilidad, de esta manera, al precipitarse la enzima reaccionaría muy poco con el sustrato y la catálisis se vería también disminuída.

En general, la estabilidad de una enzima a diferentes temperaturas depende a su vez de otros factores como son; pH, fuerza iónica del medio, y presencia o ausencia de ligandos.

Los sustratos frecuentemente protegen contra la desnaturación de la enzima, y el bajo peso molecular de una simple cadena polipeptídica y alto contenido de puentes disulfuro en la molécula son generalmente características que hacen a la enzima más estable al calor, también generalmente las enzimas son más estables en preparaciones libres de células conteniendo altas concentraciones de otras proteínas, exceptuando enzimas proteolíticas. (44).

2.1.3. Efecto de la fuerza iónica.

La fuerza iónica del medio influye en las características de la enzima, por ejemplo:

Para grandes fuerzas iónicas la atmósfera se condensa alrededor del macroión, y si es pequeña la atmósfera iónica se difunde y extiende.

La fuerza iónica de la solución se determina :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum M_i \cdot Z_i^2$$

Donde:

μ : Fuerza iónica.

M_i : Molaridad del ión.

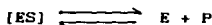
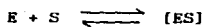
Z_i : Carga del ión.

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas, siendo las sales de los iones divalentes como: el $MgCl_2$ y $(NH_4)_2SO_4$, mucho más eficaces que las sales de iones monovalentes. La capacidad de éstas sales para influir en la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica, definida como una medida tanto de la concentración como del número de cargas eléctricas existentes en los cationes y los aniones unidos por la sal. El efecto es causado por cambios de la tendencia a la ionización, de los grupos R disociables de la proteína, y a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, y a una fuerza iónica lo suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución: (salting out) en este caso la concentración elevada de sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína, reduciendo su solubilidad y haciendo con ésto el cálculo de su actividad más difícil viéndose afectada directamente en una clara disminución de la actividad enzimática, aunque no se afecta la configuración nativa de la proteína. (44).

2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA.

La concentración de sustrato es uno de los factores más importantes para determinar la velocidad de una reacción enzimática, aumentando la velocidad con el aumento gradual de la concentración de sustrato dando una hipérbola rectangular. (5).

En 1905, Brown y Henri, sugirieron que la enzima primero forma un complejo con el sustrato: $[ES]$, y éste subsecuentemente se rompe dando la enzima libre : E y el producto P :

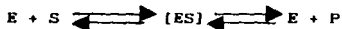


ECUACION DE HENRI;

$$v = \frac{K S}{1 + Ks}$$

Posteriormente en 1913 Michaelis y Menten describen este tipo de proceso que confirma el trabajo experimental de Henri y colaboradores.

La reacción que toman en consideración es :

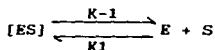


En la cual se establece una reacción de equilibrio rápido, donde E, S y [ES] se equilibran rápidamente en comparación de como [ES] forma E + P, siendo la velocidad de la reacción a cualquier tiempo dependiente de la concentración de [ES].

$$v = K_p [ES]$$

En donde la K_p es la constante catalítica .

Si tomamos en cuenta que [ES] puede expresarse en términos de E y S, para una reacción de disociación, K_s sería la constante de disociación del complejo [ES].:



$$K_s = \frac{E \cdot S}{[ES]} = \frac{K-1}{K_1}$$

y por tanto,
$$[ES] = \frac{E \cdot S}{K_E}$$

Sustituyendo [ES] en la ecuación :

$$\frac{v}{E_t} = \frac{K_p [ES]}{E + [ES]}$$

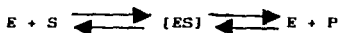
Cancelando y simplificando términos, y asumiendo que $K_p E_t = V_{máx}$.

Tenemos:

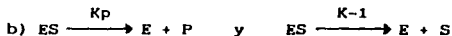
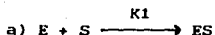
$$\frac{v}{V_{máx}} = \frac{S}{K_E + S}$$

La ecuación anterior es la comúnmente conocida como ecuación de Michaelis Menten (3, 44).

En 1925 Briggs-Haldane establecen que la concentración de [ES] no está en equilibrio, ya que la velocidad como [ES] forma E + P es más rápida de como [ES] se disocia en E + S, y por ende E, S y [ES], no están en equilibrio :



En vez de ello determinan la concentración de ES a partir de una ecuación de estado estacionario, donde la concentración de sustrato es mayor que la cantidad de enzima, y la concentración de [ES] permanece constante con el tiempo, siendo por esto la velocidad con que se forma ES (a), igual a la velocidad de su descomposición (b) :



La velocidad de Formación $K_1 E S$ = La velocidad de descomposición $(K_{-1} + K_p) [ES]$

$$Y \text{ siendo } [ES] = \frac{K_1 E S}{(K_{-1} + K_p)}$$

El grupo de las tres constantes = $k_{-1} + K_p / K_1$, es definido como la constante de Michaelis " K_m ". Y al sustituirla en la ecuación de Michaelis y Menten tenemos :

$$\frac{v}{V_{\text{máx}}} = \frac{S}{K_m + S}$$

De esta manera la constante de Michaelis y Menten, es una constante dinámica y no de equilibrio, es equivalente a la concentración de sustrato que se tiene en la mitad de la velocidad máxima alcanzada por la catálisis enzimática.

$$\text{Si } S = K_m \quad v = 1/2 V_{\text{máx}}$$

"La constante de Michaelis - Menten ; K_m " indica la afinidad con que un sustrato se puede unir a la enzima. (47).

2.2.1. Inhibición enzimática.

Cualquier sustrato que disminuya la velocidad de una reacción enzimática se considera un inhibidor. Los estudios de inhibición pueden indicar la arquitectura fisicoquímica del sitio activo de la enzima, algunos inhibidores enzimáticos descritos son: antibióticos, preservativos, toxinas, y sustratos similares al sustrato específico para la enzima. (44).

Hay diferentes tipos de inhibición :

a) Inhibición Competitiva .

Donde únicamente se ve afectada la K_m aparente de la reacción y la $V_{máx}$ no se altera por el inhibidor.

b) Inhibición No Competitiva .

La K_m aparente no se ve afectada y la $V_{máx}$ disminuye en presencia de un inhibidor en la reacción enzimática.

c) Inhibición Incompetitiva.

La $V_{máx}$ disminuye en presencia de un inhibidor y la K_m aparente también disminuye.

d) Inhibición de tipo mixto.

Donde se ven afectadas: K_m , $V_{máx}$ y la pendiente de $K_m/V_{máx}$.

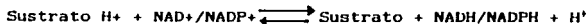
2.3. ENZIMAS DESHIDROGENASAS.

Las deshidrogenasas son enzimas que catalizan reacciones de óxido - reducción ó Redox, en las que se verifica transferencia de electrones e^- ; desde un dador electrónico (agente reductor) a un receptor electrónico (agente oxidante); en el caso de la deshidrogenación, la transferencia de hidrógenos H^+ y por ende, esta deshidrogenación equivaldría a una oxidación. (25).

Las 17 β -HED anteriormente estudiadas son del tipo de deshidrogenasas piridin - dependientes:

Esta clase de deshidrogenasas necesitan ejercer su acción catalítica de dos coenzimas: NAD'ó coenzima I y NADP'ó coenzima II.

La reacción que catalizan estas deshidrogenasas es la siguiente:



La parte reactiva del NAD'y NADP' es el anillo de nicotinamida, que durante la oxidación de un sustrato acepta un (H)'y dos electrones, mientras que otro(H)' derivado, a su vez por el sustrato aparece en el disolvente :

Los nucleótidos de piridina se hallan unidos de forma no covalente a la proteína de la deshidrogenasa, por lo tanto, el NAD+ y NADP+ no se consideran grupos prostéticos de la enzima sino primeros sustratos, ya que al axaminar el comportamiento cinético de las deshidrogenasas se ha visto que el nucleótido piridínico es el primero en unirse al centro activo (sustrato conductor), uniéndose a continuación el sustrato específico de la enzima.

Las deshidrogenasas piridin - dependientes muestran un comportamiento cinético característico de Michaelis- Menten, tanto con el sustrato como para la coenzima.(47).

2.3.1. Bioquímica de las 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS:

Las 17 β -HIDROXIESTEROIDES DESHIDROGENASAS son enzimas de - dependientes de piridin-nucleótidos que catalizan la interconver-

ción específica de los grupos hidroxilo y carbonilo del carbono 17 (C17) de los esteroides de 18 carbonos : Estrógenos, y de 19 carbonos: Andrógenos. Las 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS al catalizar la modificación química en el carbono 17 de los esteroides tienen una actividad fisiológica importante.(46).

Propiedades Generales:

Hay dos tipos de enzimas HIDROXIESTEROIDES DESHIDROGENASAS; La 17 (beta) y la 17 (alfa), cuya diferencia radica en la estereoespecificidad de la reacción enzimática en el carbono 17 alfa y 17 beta del sustrato esteroide.

De acuerdo a las propiedades físicas y químicas de ambas enzimas, se han podido purificar, obtener sus pesos moleculares por diversos métodos como: filtración en gel ó ultracentrifugación; así como análisis cinéticos, como el realizado por Warren y Crist de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de placenta humana.(46).

2.3.2. Pesos Moleculares, como propiedad física de las 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS, en diferentes tejidos animales.

Se han reportado una variedad de valores de peso molecular de esta enzima, obtenidas por diversos métodos como filtración en gel, ultracentrifugación y electroforesis. Por ejemplo, se obtiene un promedio de 66 000 daltons para la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE PLACENTA HUMANA. Estudios posteriores se realizaron acerca de su subunidad estructural encontrando que la cadena polipeptídica, con peso molecular al antes mencionado,

está constituida por un dímero cuya secuencia de aminoácidos desde el extremo N-terminal a una distancia de por lo menos cinco residuos de la misma.

Para la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE OVARIO DE OVEJA, se reportó un valor de 104 000 daltons por medio de centrifugación de gradiente - sucrosa, y empleando la técnica de filtración en gel se reporta un valor de 70 000 daltons para la misma enzima.

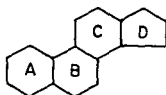
La 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE ENDOMETRIO HUMANO, presenta un valor de 54 000 daltons por filtración en gel (Sephadex), para eritrocitos humanos de: 75 500 daltons, y para la enzima purificada y caracterizada de TESTICULO DE CERDO es de 35 500.

Para la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE RIÑON de cobayo por ultracentrifugación es de 35 100. (52).

2.4. QUIMICA DE LOS ESTEROIDES .

2.4.1. ESTRUCTURA .

Los esteroides se derivan del esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno, los cuatro anillos que lo forman se designan con las letras : A , B , C , D .(24),:



Los compuestos esteroides importantes son: hormonas sexuales femeninas, hormonas sexuales masculinas, hormonas adrenocorticoideas, vitamina D, ácidos biliares y ciertos venenos que afectan el corazón .

Las hormonas sexuales se clasifican dentro de tres grandes grupos:

- 1) Hormonas sexuales femeninas .
- 2) Hormonas sexuales masculinas .
- 3) Hormonas del embarazo , ó progestinas .

2.4.2. HORMONAS SEXUALES FEMENINAS:

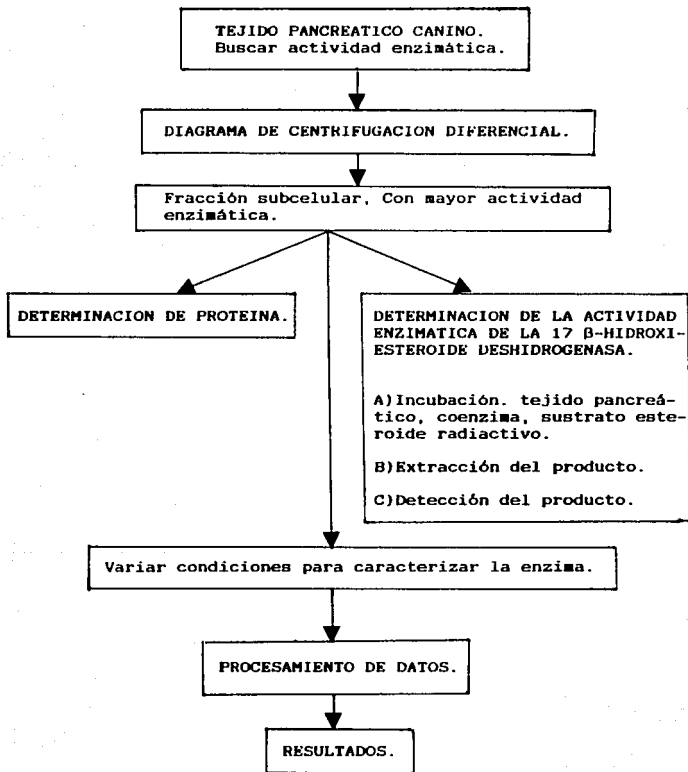
Los estrógenos, fueron los primeros esteroides aislados. Los estrógenos se caracterizan por tener un anillo A del núcleo esteroides aromático, lo que hace que el hidroxilo en posición tres junto con el anillo den un grupo fenólico, la naturaleza de dicho anillo condiciona la ausencia del grupo metilo angular en C-10. Estos esteroides junto con la progesterona controlan el ciclo sexual de los mamíferos hembra .

2.4.3. HORMONAS SEXUALES MASCULINAS :

Los andrógenos son compuestos que originan el desarrollo de los órganos sexuales masculinos o características sexuales secundarias son esteroides de 19 átomos de carbono, que poseen sustituyentes oxigenados en C-3 y C-17. (5,48).

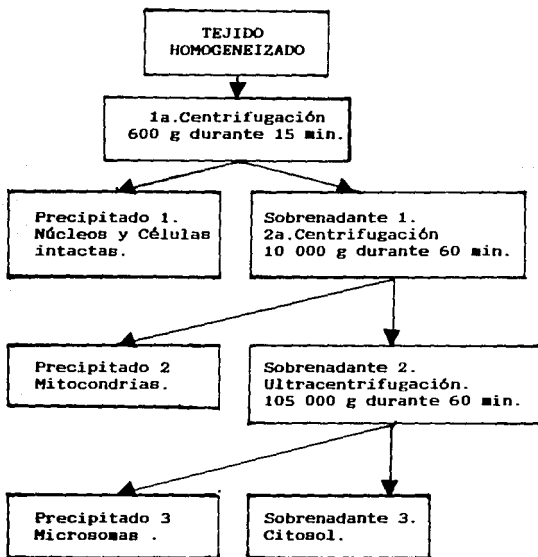
III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. DIAGRAMA GENERAL.



3.1.1. DIAGRAMA DE CENTRIFUGACION DIFERENCIAL.

Utilizando un gradiente de sacarosa 0.25 M.



Nota : Resuspender los precipitados en aproximadamente 10 ó 15 ml con amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.0. Guardar las fracciones así obtenidas en refrigeración a 4 °C, hasta el momento de utilizarse.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

El Instituto Nacional de Cardiología, de la ciudad de México donó páncreas de perros callejeros, muertos por electro-shock, transportándose en hielo al laboratorio y guardándolos a -70°C hasta el momento de su utilización.

3.3. METODOLOGÍA.

Limpia el tejido pancreático a 4°C , de cualquier residuo de grasa y tejido conectivo; resuspender un gramo de tejido en 10 ml de amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.0. (34).

3.3.1. Fraccionamiento subcelular de páncreas canino.

Usar un gradiente de centrifugación de sacarosa y los pasos correspondientes al diagrama anteriormente mencionado.

3.3.2. Determinación de proteína.

a) Tomar 1 ml de muestra de tejido pancreático, diluir 1:10 ó 1:20 según sea necesario.

b) Adicionar 5 ml de una solución que contiene: 0.1 ml de la solución de sulfato de cobre al 1% con agua destilada, 0.1 ml de una solución de tartrato de sodio y potasio al 2% en agua destilada, y 10 ml de una solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.

c) Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

d) Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin .

e) Dejar incubar a temperatura ambiente 30 minutos .

f) Leer a 750 nm.

Usar blanco de reactivo y realizar la correspondiente curva de calibración con una solución de referencia de albúmina. (26).

3.3.3. Determinación de la actividad enzimática.

Posteriormente medir la actividad de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de páncreas canino a 37°C y 10 min. de incubación colocar una concentración específica de esteroide así como el esteroide radiactivo, la coenzima y el amortiguador de fosfatos 5 mM, dejar correr la reacción después de colocar la fracción mitocondrial de tejido pancreático en cantidad tal que en el medio de reacción se tenga 1 μ g de proteína, parar la reacción con éter etílico, agitar y centrifugar para separar las fases: acuosa y eterea formadas, decantar la fase etérea, evaporar y adicionar una solución de arrastre que contenga el sustrato y el producto esteroide esperado, realizar la separación de ambos por cromatografía en capa fina y un sistema de disolventes conocido; cortar la placa después de revelarse con luz ultra - violeta y/o vapores de yodo, y contar la radiactividad recuperada. (Ver apéndice 8.3).

Para determinar los parámetros cinéticos, variar las demás condiciones de reacción, por ejemplo en la búsqueda de la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ variar la concentración de sustrato ya sea testosterona, androstendiona y estradiol, (Tablas No.1,2); al determinar el pH y temperatura óptimos aparentes variar el pH y temperatura del medio de incubación manteniendo las demás condiciones de la reacción constantes.

Otras condiciones del comportamiento cinético son las de variar diferentes tiempos de incubación de la reacción, y concentraciones de proteína de la fracción mitocondrial del tejido pancreático.

TABLA No. 1

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS: K_m Y $V_{m\acute{a}x}$. DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN LAS REACCIONES DE OXIDACION DE TESTOSTERONA, (Test) Y EN LA REDUCCION DE ANDROSTENDIONA (And).

VIALES	CONCENTRACION DE SUSTRATO μM	SUSTRATO 0.5 mM	EVAPORAR	SUSTRATO H 100 ml cpm	COENZIMA NAD ⁺ /NADH 2 mg/100ul	ENZIMA 1 mg de
1	2	4 μl	S	100 μl	100 μl	P
2	5	10 μl	E	100 μl	100 μl	R
3	10	20 μl	Q	100 μl	100 μl	O
4	20	40 μl	u	100 μl	100 μl	T
5	40	80 μl	E	100 μl	100 μl	E
6	80	160 μl	D	100 μl	100 μl	I N
Blanco	15	30 μl	A	100 μl	100 μl	—
Control (+)	15	30 μl	D	100 μl	100 μl	A

Llevar a 1 ml con amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.0.

Realizar el control positivo (+), con la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de placenta humana.

TABLA No.2

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS K_m y $V_{m\acute{a}x}$ DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN LA REACCION DE OXIDACION DEL ESTRADIOL.

VIALES	CONCENTRACION DE SUSTRATO μM	SUSTRATO 0.05 mM	EVAPORAR	SUSTRATO H 100 μl cpm	COENZIMA NAD ⁺ /NADH 2mg	ENZIMA 1 mg de
1	0.5	10 μl	S	100 μl	100 μl	P
2	1.0	20 μl	E	100 μl	100 μl	R
3	2.0	40 μl	Q	100 μl	100 μl	O
		0.5 mM				
4	5.0	10 μl	U	100 μl	100 μl	T
5	10.0	20 μl	E	100 μl	100 μl	E
6	20.0	40 μl	D	100 μl	100 μl	I
7	50.0	100 μl	A	100 μl	100 μl	N
Blanco	15.0	30 μl	D	100 μl	100 μl	
Control	15.0	30 μl		100 μl	100 μl	A

Llevar a 1 ml con amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.0.

Realizar el control positivo (+), con 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de placenta humana.

3.4. RESULTADOS.

Debido a que el objetivo del presente trabajo era el de de -
mostrar, y efectuar el análisis cinético de una enzima con acti-
vidad de óxido - reducción de hormonas esteroides en tejido
pancreático canino, era indispensable asegurar que los sustratos
que se utilizaran fueran puros; para tal objeto se obtuvo estra-
diol, androstendiona y testosterona tritiadas, una fracción de
los cuales se recristalizó por calentamiento y se sometió cada
una de las muestras a cromatografía en capa fina contra
estándares conocidos. Los resultados mostraron que las muestras
ensayadas contenían una cantidad mínima pero no determinada de
contaminantes que podrían ser productos de la hidrólisis del
sustrato; sin embargo el hecho de estar marcados con radiactivi-
dad podría interferir en los posteriores ensayos, razón por la
cual se decidió eliminar los contaminantes a través de cromato-
grafía por filtración en gel, utilizando columnas de 20 cm. em-
pacadas con Sephadex LH 20-100 las cuales tienen un diámetro de
poro de entre 25 y 100 micras, utilizando los solventes más ade-
cuados para la separación de esteroides. Como se puede observar
en las figuras 1,2,3, el procedimiento fue capaz de eliminar la
mayoría de los contaminantes, sin embargo para mayor sensibili-
dad en los ensayos posteriores se decidió utilizar solamente los
dos tubos de cada una de las respectivas columnas en los que se
concentraba más del 90% de la radiactividad.

Con objeto de confirmar que efectivamente el páncreas posee
la enzima de interés se efectuaron experimentos con extractos
crudos de páncreas los cuales se incubaron con 100 000 cpm. de

los sustratos previamente purificados. El ensayo en capa fina de el residuo de las incubaciones efectuadas corroboró la presencia de la enzima en el páncreas canino. Una vez demostrado lo anterior se decidió tratar de determinar en qué fracción del tejido pancreático se encontraba la enzima, para esto se decidió hacer un fraccionamiento subcelular del tejido pancreático ya que se conoce que estas enzimas son de localización intracelular. Para este objeto se efectuaron homogeneizados de tejido pancreático los cuales previamente se libraron de tejido conectivo por medios físicos; estos homogeneizados se centrifugaron de manera diferencial en gradientes de sacarosa (Ver diagrama 3.1.1., del capítulo Parte Experimental). La tabla No.3 demuestra que el 86% de la actividad se recuperó en la fracción mitocondrial, el 5% recuperado en la fracción nuclear podría ser consecuencia de una deficiente decantación de los tubos. Para que la reacción enzimática se lleve a cabo, es necesario la presencia de una coenzima que sea específica para la enzima, para tal objeto se decidió probar las dos diferentes coenzimas descritas para las 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS aisladas de otros órganos. Los resultados de estos experimentos mostraron que solamente la NAD^+ tanto en su forma oxidada como reducida actuó como coenzima específica para esta reacción. Debido a lo anterior todos los experimentos realizados con la enzima y los diferentes sustratos se efectuaron siempre con 2 μ g por ml de coenzima que corresponde a una cifra 20 veces mayor a la concentración óptima requerida. La gráfica No.4 representa la cinética de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

con respecto a la testosterona en donde se puede apreciar claramente que la velocidad máxima de la enzima corresponde a 0.4 nmol.mg.min. y donde también se observa que la mitad de la velocidad máxima de la reacción (K_m) es de $3.5 \pm 0.5 \mu M$, a pH y temperatura constantes. Para hacer más claro estos resultados en la gráfica No. 5 se representa de manera lineal los mismos resultados. Finalmente, la tabla No. 4 muestra los valores a partir de los cuales se obtuvieron las curvas.

Las gráficas 6 y 7 representan la cinética de la enzima con respecto a la androstendiona; en estas gráficas se observa como la K_m de la enzima es considerablemente mayor al utilizar este sustrato ($K_m = 9.5 \pm 0.9$), de manera similar al otro sustrato la tabla No. 5 muestra los valores que se utilizaron para calcular las curvas.

Finalmente las gráficas 8 y 9 así como la tabla No.6 muestran la similitud en el valor de K_m de la enzima cuando se utiliza como sustrato al estradiol con respecto a la K_m utilizando testosterona. La pequeña diferencia en los valores de V_{max} al utilizar ambos tipos de sustrato traduce una saturación más rápida de la enzima en el caso del estradiol.

Aunque todos los experimentos anteriormente mencionados se efectuaron a 37 °C se decidió efectuar una cinética modificando la variable temperatura; las gráficas 10 y 11 corroboran que la actividad de la enzima es óptima a 37 °C en el caso de la androstendiona, sin embargo, para la testosterona la temperatura óptima es de 40 °C, lo cual quiere decir que si los experimentos se hubieran efectuado a esta temperatura para dicho sustrato

los valores de la K_m probablemente serían menores; sin embargo como se puede observar en la gráfica No.10 el haber efectuado los experimentos a 37 °C en el caso de la testosterona tuvo una influencia aproximada de menos del 10 % con respecto a los valores óptimos obtenidos.

De manera similar a las determinaciones de temperatura las gráficas 12 y 13 representan el efecto del pH sobre la actividad de la enzima en dos diferentes sustratos. Los resultados muestran que las determinaciones que se efectuaron a pH 7.0 no se encuentran lejos de los pH óptimos aparentes para los diferentes sustratos; sin embargo lo que más llama la atención es el hecho de que al parecer la androstendiona es capaz de proteger a la enzima aun a pH tan disímiles como serian valores menores a 6.0 ó mayores a 7.0.

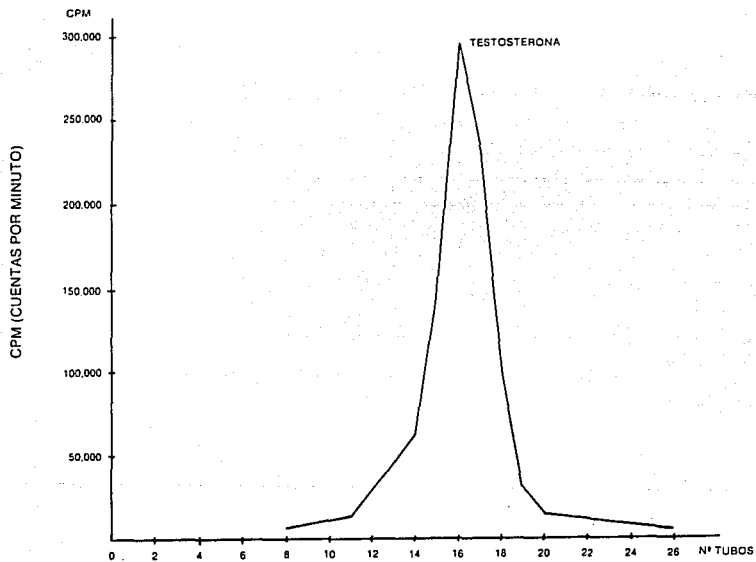
El tiempo de incubación que se manejó en estos experimentos (10 min.) es totalmente compatible con los resultados que se obtuvieron y que se demuestran en las figuras 14 y 15 en las cuales se observa que la meseta de respuesta de la reacción se alcanza cuando el tiempo de incubación es de más de 30 min. Debido a que la K_m de las enzimas se calcula con respecto al tiempo y a la concentración, y en el caso de la primera variable siempre se estuvo en los rangos adecuados. Similar a lo anterior, se tiene que los resultados de las gráficas 16 y 17 muestran que la concentración de proteína obtenida de la fracción mitocondrial con la que siempre se trabajo (1 μ g) estuvo dentro de los parámetros de linealidad ya que manejando concentraciones hasta de 2 μ g de proteína no se alcanzó la

meseta.

Las pruebas de inhibición por producto, se realizaron utilizando testosterona, y androstendiona como sustratos y añadiendo el producto esteroide a diferentes concentraciones en la reacción enzimática, observándose en las gráficas 18 y 19 que el efecto no era el esperado ya que se obtuvo un aumento de la actividad enzimática al añadir el producto correspondiente a la reacción, lo cual puede deberse a un efecto del medio en que se encuentra la enzima, ya que no se encuentra pura.

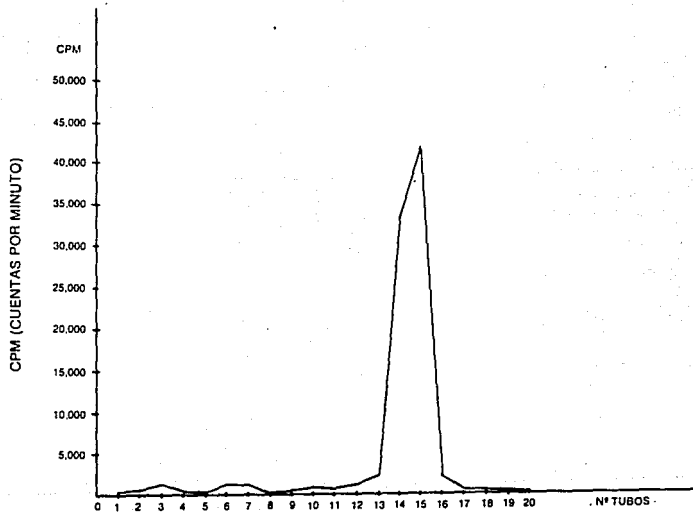
GRAFICA No. 1

REPURIFICACION DE LA TESTOSTERONA -H³



GRAFICA No. 2

REPURIFICACION DE LA ANDROSTENDIONA -H³



GRAFICA No. 3

REPURIFICACION DEL ESTRADIOL - H³

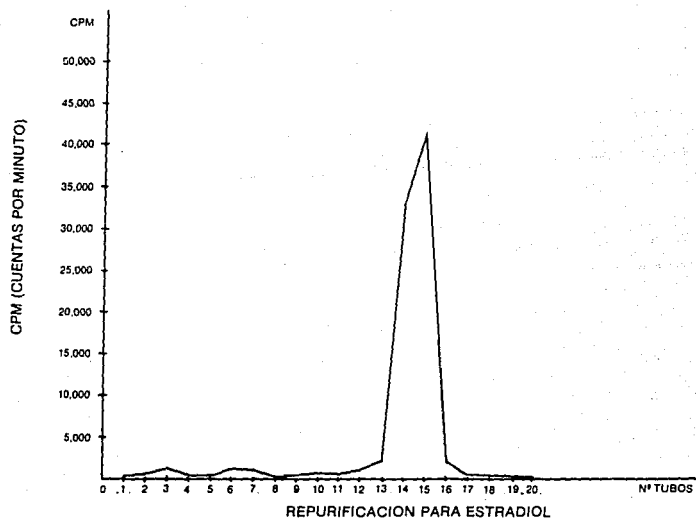


TABLA No. 3

DISTRIBUCION INTRACELULAR DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN PANCREAS CANINO.

FRACCION SUBCELULAR	CONCENTRACION DE PROTEINA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	VOLUMEN (ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA		ACTIVIDAD TOTAL		ACTIVIDAD RECUPERADA	
			(nmol/ $\mu\text{g}\cdot\text{min}$)		(nmol. $\cdot\text{min}$)		($\%$)	
			TEST.	AND.	TEST.	AND.	TEST.	AND.
HOMOGENADO	14.8	505	0.111	0.081	829.6	605.4	100.0	100.0
NUCLEAR	14.5	20	0.150	0.104	43.5	30.2	5.2	4.9
MITOCONDRIAL	37.8	45	0.420	0.317	714.4	539.2	86.1	89.1
MICROSOMAL	38.2	11	0.051	0.027	21.4	11.3	2.6	1.8
CITOSOLICA	11.3	380	0.003	0.000	12.8	0.0	1.5	0.0

TEST. = Testosterona.

AND. = Androstendiona.

TABLA No.4

CINETICA DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, UTILIZANDO TESTOSTERONA COMO SUSTRATO.



S μ M	1/S μ M	Vexp. nmol/mg.min.	1/Vexp. nmol/mg.min.	V calculada nmol/mg.min.	1/Vcalculada nmol/mg.min.
1	1.0	0.021	47.6	0.033	30.3
2	0.5	0.131	7.6	0.149	6.7
5	0.2	0.261	3.8	0.244	4.1
10	0.1	0.319	3.1	0.311	3.2
20	0.05	0.387	2.6	0.362	2.7
40	0.025	0.401	2.5	0.394	2.5
80	0.0125	0.405	2.4	0.408	2.4

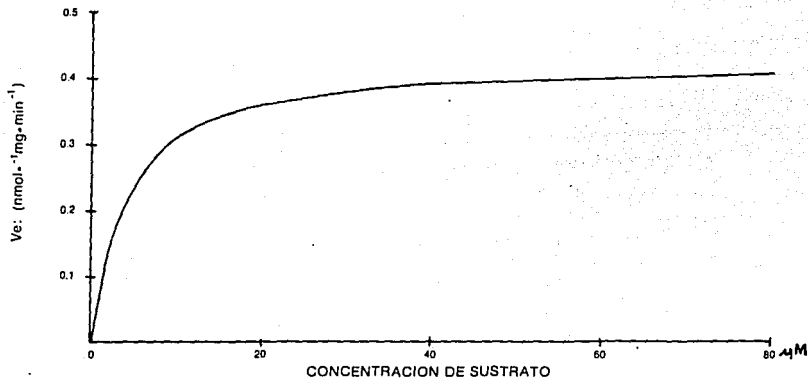
Donde: S= Sustrato, Vexp.=Velocidad experimental, Vcalc.=Velocidad calculada por medio del análisis estadístico por G.N. Wilkinson. (53).

Estos resultados son el promedio de cuando menos cinco experimentos.

A partir de los resultados anteriores se determina: K_m : $3.5 \pm 0.5 \mu$ M, $-1/K_m$: -0.28μ M, V_{MAX} : 0.4 nmol/mg.min. , $1/V_{MAX}$: 2.5 nmol/mg.min.

GRAFICA No. 4

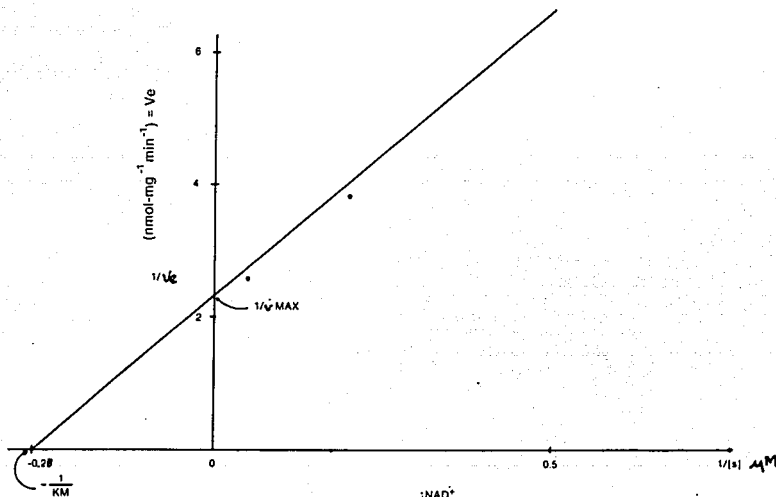
REPRESENTACION GRAFICA DE LA CINETICA DE VELOCIDADES INICIALES EN FUNCION A LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO ESTEROIDE.



REACCION: TESTOSTERONA $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
KM = 3.5 ± 0.5 μM y VMAX: 0.403 nmol·mg⁻¹·min⁻¹,
pH = 7.0 . 37 °C

GRAFICA No. 5

GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK DOBLE RECIPROCA $1/v$
 EN FUNCION A $1/[S]$ DE LA
 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA



REACCION: TESTOSTERONA $\xrightleftharpoons{NAD^+}$ ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
 $-1/Km = -0.25 \text{ M}^{-1}$, $1/VMAX = 2.5$

TABLA No. 5.

CINETICA DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, UTILIZANDO ANDROSTENDIONA COMO SUSTRATO.



S μ M	1/S μ M	Vexp. nmol/mg.min.	1/Vexp. nmol/mg.min.	V calculada nmol/mg.min.	1/Vcalculada nmol/mg.min.
2	0.5	0.063	15.8	0.055	20.0
5	0.2	0.123	8.1	0.100	8.3
10	0.1	0.195	5.1	0.200	5.0
20	0.05	0.238	4.2	0.240	4.1
40	0.025	0.279	3.6	0.330	3.0
80	0.0125	0.320	3.1	0.400	2.5

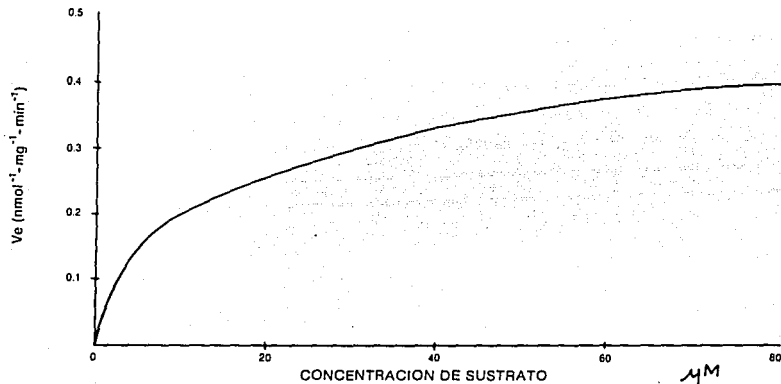
Donde S= Sustrato, Vexp.= Velocidad experimental, Vcalc.= Velocidad calculada de acuerdo al análisis estadístico en cinética enzimática realizado por G.N. Wilkinson. Estos resultados son el promedio de cuando menos cinco experimentos.

A partir de los resultados anteriores se determina: K_m : $9.5 \pm 0.9 \mu$ M, $-1/K_m$: -0.1053

V_{MAX} : 0.4 nmol/mg.min. , $1/V_{MAX}$: 2.5 nmol/mg.min.

GRAFICA NO. 6

REPRESENTACION GRAFICA DE LA CINETICA DE
VELOCIDADES INICIALES EN FUNCION A LA CONCENTRACION
DE SUSTRATO ESTEROIDE



REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightleftharpoons{\text{NADH} + \text{H}^+}$ TESTOSTERONA + NAD⁺
KM: $9.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$; VMAX: $0.4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
pH = 7.0, 37 °C

GRAFICA No. 7
 GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK DOBLE RECIPROCA
 1/v EN FUNCION A 1/[S] DE LA
 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

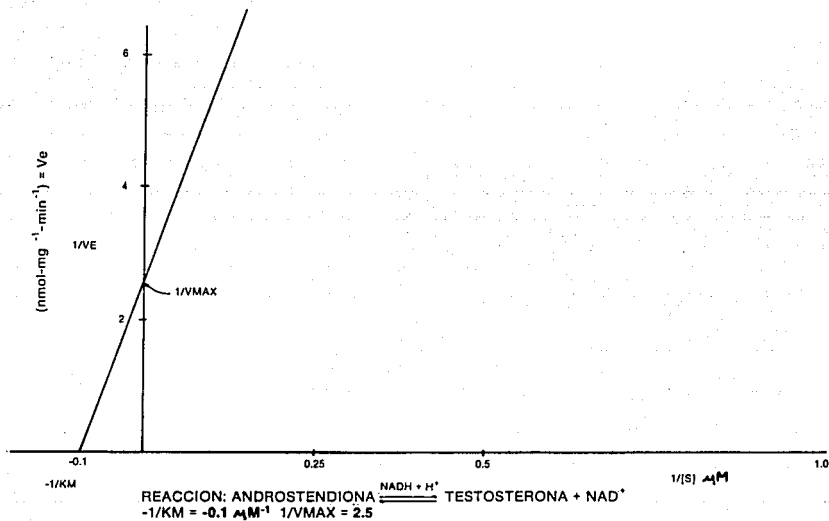
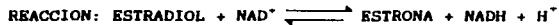


TABLA No. 6.

CINETICA DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA UTILIZANDO 17 β -ESTRADIOL, COMO SUSTRATO.



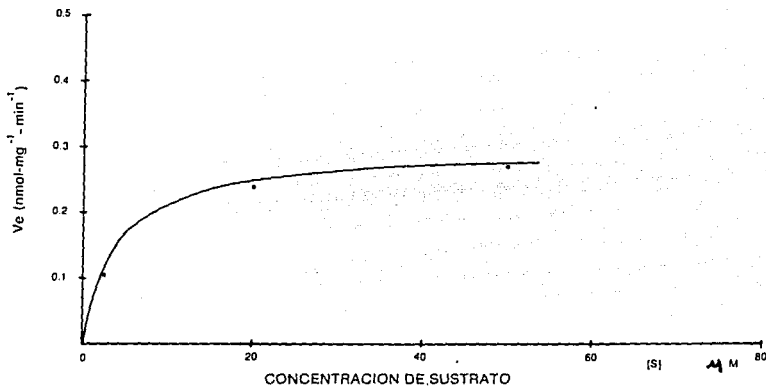
S μM	I/S μM	Vexp. nmol/mg.min.	1/Vexp. nmol/mg.min.	V calculada nmol/mg.min.	1/Vcalculada nmol/mg.min.
0.5	2.0	0.031	32.2	0.037	27.0
1.0	1.0	0.064	15.6	0.065	15.4
2.0	0.5	0.109	9.2	0.106	9.4
5.0	0.2	0.166	6.0	0.170	5.8
10.0	0.1	0.222	4.5	0.213	4.7
20.0	0.05	0.238	4.2	0.244	4.1
50.0	0.02	0.300	3.3	0.340	3.3

Donde: S= Sustrato, Vexp. = Velocidad experimental, Vcalc.= Velocidad calculada por medio del análisis estadístico en cinética enzimática realizada por G.N Wilkinson
Estos resultados son el promedio de cuando menos cinco experimentos.

A partir de los resultados anteriores se determina: K_m : $3.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$. $-1/K_m$: -
0.29, V_{MAX} : 0.3 nmol/mg.min. , $1/V_{MAX}$: $3.33 \text{ nmol/mg.min.}$

GRAFICA No. 8

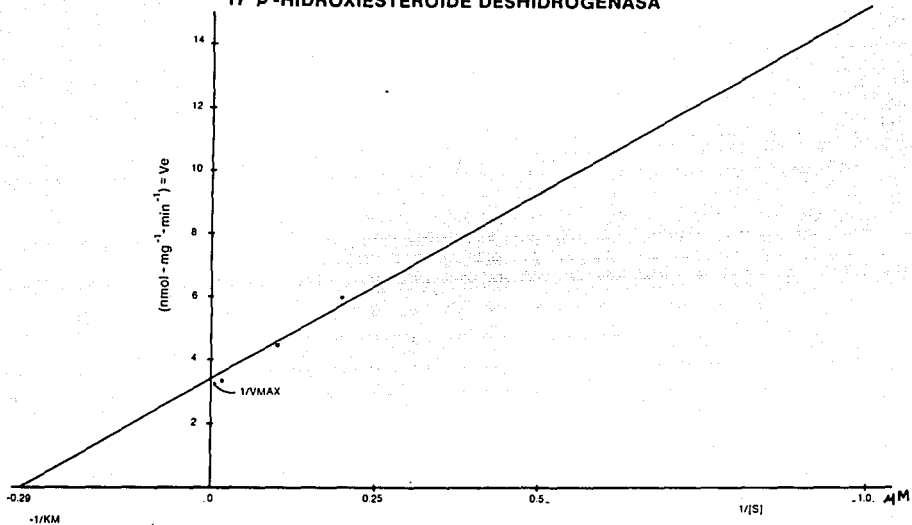
REPRESENTACION GRAFICA DE LA CINETICA DE VELOCIDADES INICIALES EN FUNCION A LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO ESTEROIDE



REACCION: ESTRADIOL $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ESTRONA + NADH + H⁺
 KM = 3,4 ± 0,5 μM; Vmáx: 0,3 nmol·mg⁻¹·min⁻¹
 pH = 7,0 , 37 °C

.GRAFICA No. 9

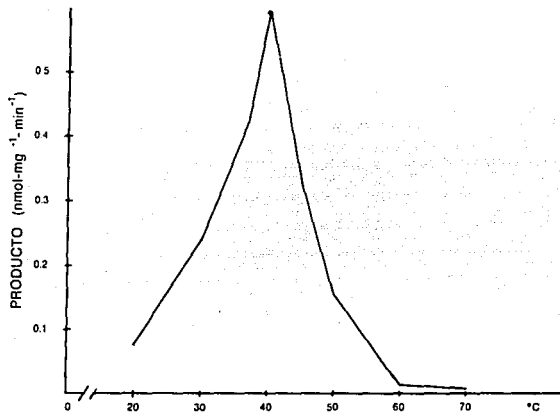
GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK DOBLE RECIPROCA 1/V EN
FUNCION A 1/[S] PARA LA
17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA



REACCION: ESTRADIOL $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ESTRONA + NADH + H⁺
 $-1/K_M = -0.29 \text{ } \mu\text{M}^{-1}$; $1/V_{\text{MAX}} = 3.33$

GRAFICA No. 10

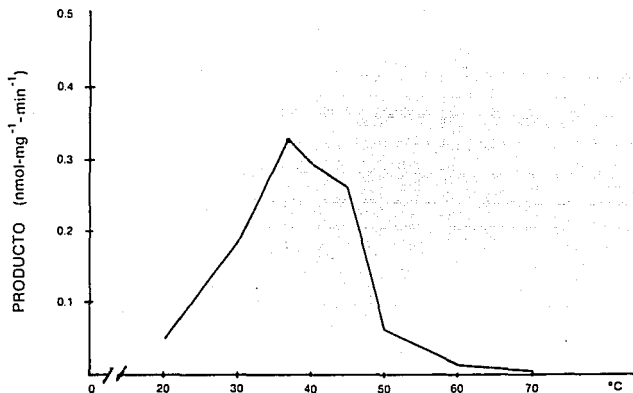
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
EN FUNCION DE LA TEMPERATURA



REACCION: TESTOSTERONA $\xrightarrow{\text{NAD}^+}$ ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
LA ACTIVIDAD MAXIMA APARENTE PARA
LA OXIDACION DE TESTOSTERONA FUE ALCANZADA A: 40 °C

GRAFICA No. 11

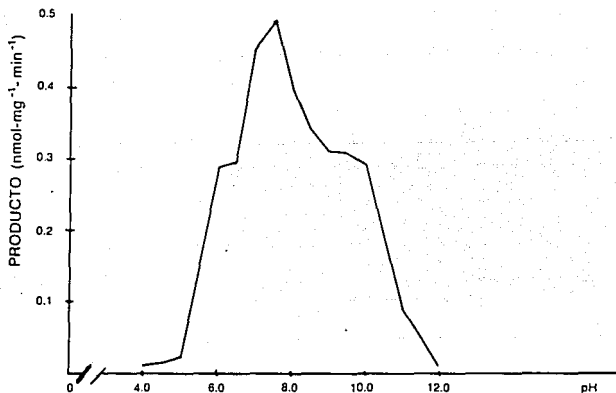
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
EN FUNCION DE LA TEMPERATURA



REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightarrow{\text{NADH} + \text{H}^+}$ TESTOSTERONA + NAD⁺
LA ACTIVIDAD MAXIMA APARENTE PARA
LA REDUCCION DE ANDROSTENDIONA FUE ALCANZADA A: 37 °C.

GRAFICA No. 12

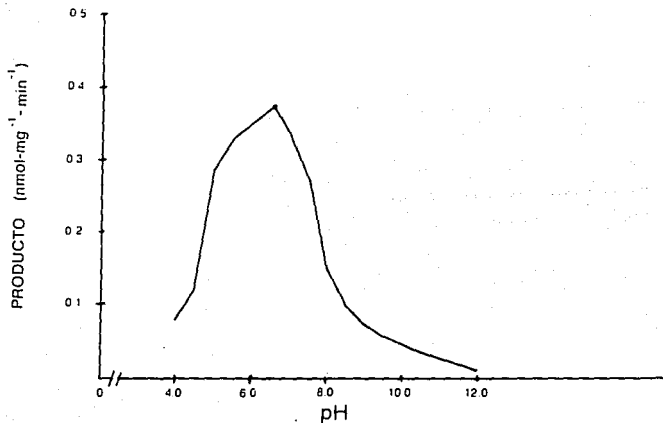
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROESTEROIDE DESHIDROGENASA
EN FUNCION DEL pH



REACCION: TESTOSTERONA $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
pH OPTIMO DE LA ENZIMA
PARA LA OXIDACION DE LA TESTOSTERONA: 7.5

GRAFICA No. 13

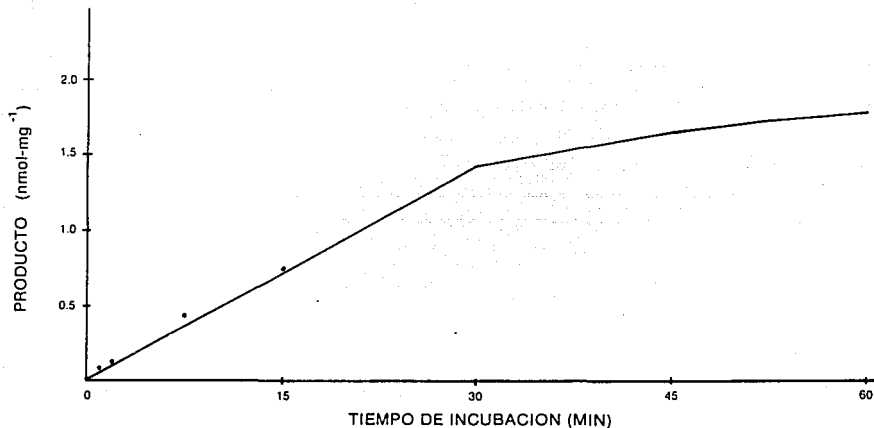
ACTIVIDAD DE LA 17β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
EN FUNCION DEL pH



REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightarrow{\text{NADH}}$ TESTOSTERONA + NAD⁺ FORMADA
pH OPTIMO DE LA ENZIMA
PARA LA REDUCCION DE ANDROSTENDIONA: 6.0 - 6.5

GRAFICA No. 14

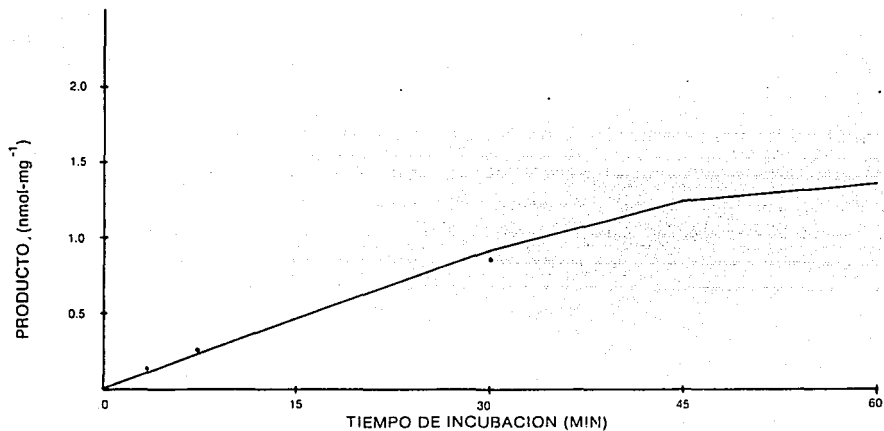
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION



REACCION: TESTOSTERONA + NAD⁺ \rightleftharpoons ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
(1 mg DE PROTEINA X REAL)
SIENDO LINEAL HASTA LOS 30 MIN.

GRAFICA No. 15

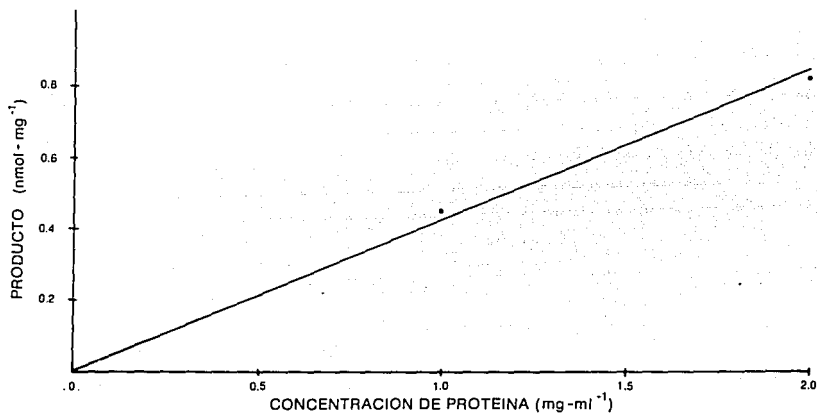
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION



REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightarrow{\text{NADH}\cdot\text{H}^+}$ TESTOSTERONA + NAD⁺
(1 mg DE PROTEINA)
ES LINEAL HASTA LOS 30 MIN.

GRAFICA No. 16

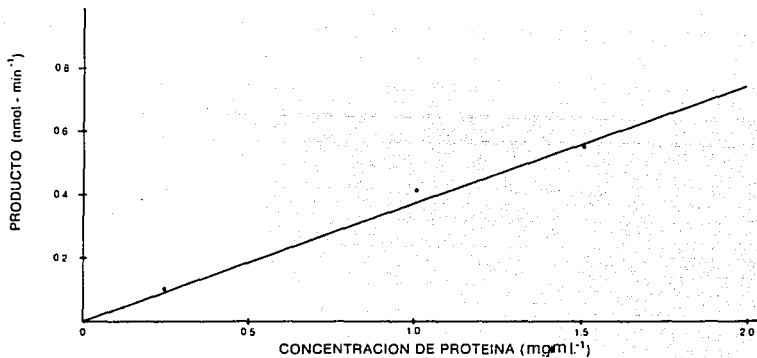
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINA



REACCION: TESTOSTERONA $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ANDROSTENOINA + NADH + H⁺
PRESENTA LINEARIDAD HASTA > 2 mg DE PROTEINA

GRAFICA No. 17

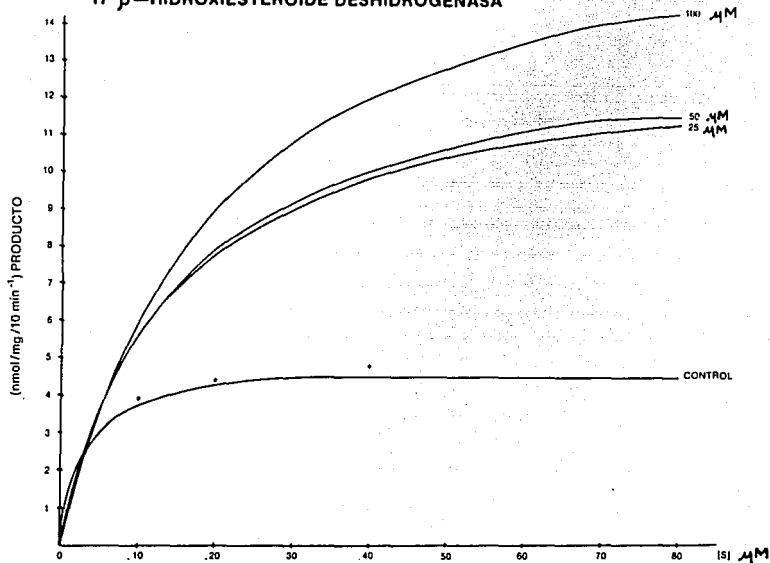
ACTIVIDAD DE LA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINA



REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightleftharpoons{\text{NADH} + \text{H}^+}$ TESTOSTERONA + NAD⁺
ES LINEAL HASTA 2.0 mg · ml⁻¹

GRAFICA No. 18

ACTIVACION POR PRODUCTO DE LA
17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

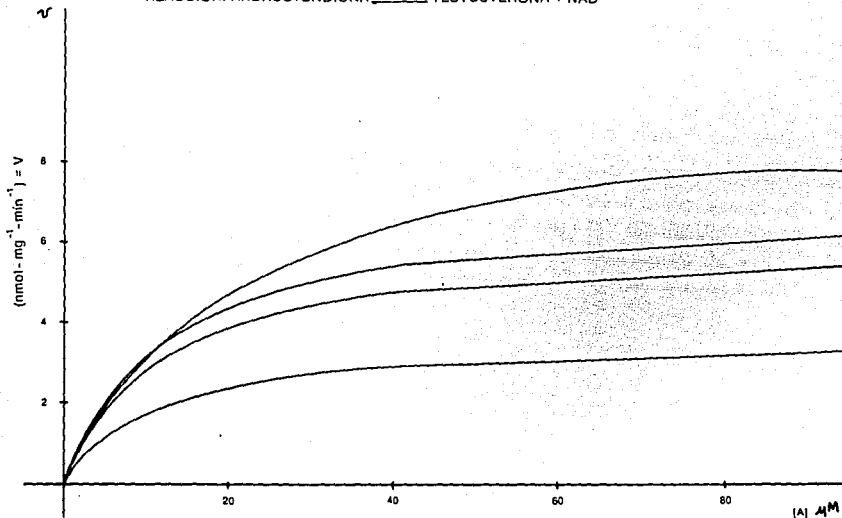


REACCION: TESTOSTERONA $\xrightleftharpoons{\text{NAD}^+}$ ANDROSTENDIONA + NADH + H⁺
EXISTE ACTIVACION POR PRODUCTO (ANDROSTENDIONA) AÑADIDO

GRAFICA No. 19

CINETICA, ACTIVACION POR PRODUCTO

REACCION: ANDROSTENDIONA $\xrightarrow{\text{NADH} \cdot \text{H}^+}$ TESTOSTERONA + NAD^+



RESULTADOS:

1. CONTROL

TEST = 0 M; $K_m = 11.438$, $V_{m\acute{a}x} = 3.303$

2. TEST = 10 M; $K_m = 12.216$, $V_{m\acute{a}x} = 6.213$

3. TEST = 15 M; $K_m = 12.683$, $V_{m\acute{a}x} = 7.104$

4. TEST = 25 M; $K_m = 22.429$, $V_{m\acute{a}x} = 9.983$

IV. DISCUSION.

Los resultados de este estudio muestran la presencia catalítica de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en pán - creas de perros machos, en la fracción mitocondrial, posiblemente relacionada con la estructura membranal de este organelo ya que posteriormente a este trabajo se realizó el tratamiento con fosfolipasa tipo A la cual disminuye la actividad enzimática en un 90% a diferencia de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA reportada en la fracción no membranal microsomal de testículo de cerdo.(14). La mayoría de las 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS descritas en la literatura se encuentran en microsomas y citosol, lo cual ha permitido su probable purificación, aunque se reportó una enzima mitocondrial de endometrio humano capaz de oxidar el 17 β -Estradiol utilizando NAD⁺ y NADP⁺ como coenzimas, (Ver tabla No. 7) en comparación con la enzima estudiada en este trabajo cuya especificidad para coenzima se limita al NAD⁺ / (H)⁺, en donde la bioconversión de los sustratos esteroides en presencia de la enzima no pudo ser detectada al utilizar el nucleótido de piridina: NADP⁺ / (H)⁺.

La enzima presenta una amplia especificidad de sustrato siendo capaz de catalizar la conversión del grupo hidroxilo -17 y grupo oxo - 17 de andrógenos : testosterona y androstendiona, así como la conversión de estradiol a estrona.

La oxidación del grupo 17 hidroxilo de la testosterona en presencia de NAD⁺ procede con mayor facilidad, dato revelado por su parámetro cinético K_m (Constante de Michaelis Menten), donde la enzima tiene una mayor afinidad por el sustrato ($K_m = 3.5 \pm$

0.5 μM), y del mismo orden de magnitud a la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de testículo humano, porcino y de rata, los cuales se encuentran fisiológicamente relacionados con la biosíntesis de testosterona. En contraste a la menor afinidad de la enzima a la androstendiona ($K_m = 9.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$). (52).

La dependencia de pH para la conversión enzimática, de testosterona, y androstendiona dan curvas con un máximo relativamente estrecho, y con pendientes que decrecen con rapidéz a ambos lados de la curva, la porción más elevada correspondió al pH óptimo para este ensayo, siendo de 6 - 6.5 en la reducción de androstendiona y de 7.5 en la oxidación de la testosterona, aunque las preparaciones enzimáticas se realizaron a pH de 7.0 donde la oxidación y reducción de ambos sustratos ocurrían aproximadamente a la misma velocidad y trabajándose con esto a un pH cercano al biológico. El pH óptimo de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de testículo porcino fué de 7.0, (ver tabla No.7) valor cercano al reportado en este trabajo para la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en páncreas de perros machos.

En cuanto a la dependencia de la temperatura por la enzima en un rango de 20 °C y 70 °C se ve que en ambas reacciones de oxido-reducción se obtiene un pico máximo de actividad enzimática siendo para androstendiona de 37 °C y para la testosterona de 40°C (gráficas 10 y 11), siendo esta última cercana a la alcanzada por la enzima mitocondrial de endometrio humano. La denaturalización por calor de la enzima para ambas actividades se manifiesta por arriba de los 40 °C. (37).

Los estudios de inhibición por análogos al sustrato se realizaron adicionando cantidades micromolares del producto esteroide (posible inhibidor) al medio de incubación, observando que en lugar de producirse inhibición en la reacción enzimática hay un aumento en la actividad, aumentando la K_m y $V_{máx}$ del esteroide estudiado frente a la concentración del producto añadido.

Es importante mencionar que durante la estandarización del método se variaron condiciones como la mejor utilización de solventes orgánicos, soluciones amortiguadoras y demás material utilizado, realizando durante los experimentos los controles positivos (con una enzima 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, purificada de placenta humana) así como controles negativos formados por desnaturalización de la enzima al calor, sin coenzima NAD⁺ (H⁺) ó sin enzima dando blancos de la misma magnitud en los tres casos.

La estabilidad de la enzima es baja a cambios bruscos de congelación y descongelación, por lo que fue necesario formar alícuotas de la fracción mitocondrial de páncreas de perros machos, con la finalidad de ser utilizada para un ensayo en particular y evitar con esto el manipuleo constante y por ende la pérdida de la actividad enzimática. Para mantener más tiempo la estabilidad de la enzima se probó la albúmina, proteína que ha sido descrita por la literatura como capaz de conservar y en ocasiones activar reacciones enzimáticas, así como también ejerce efectos contrarios de inhibición para algunas enzimas, para esta 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA de páncreas se

incrementó la actividad en un 80 % tras la adición de albúmina, dato que puede deberse a la capacidad de la albúmina para incrementar la solubilidad de esteroides en reacciones enzimáticas aunque su efecto se ha visto que depende de las condiciones del ensayo y de la enzima que se esté estudiando. (43).

Los resultados demuestran la actividad de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, en páncreas de perros machos lo cual sugiere una posible función biológica de dicha enzima en el órgano aunque como se sabe las condiciones in vitro no son extrapolables in vivo, este estudio permite tener la primera evidencia de que una enzima capaz de manejar esteroides se encuentra localizada en páncreas canino, órgano no descrito en la literatura como posible interventor en el metabolismo de esteroides.

TABLA No.7

CARACTERIZACION DE OTRAS 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS EN DIFERENTES TEJIDOS ANIMALES.

TEJIDO	LOCALIZACION SUBCELULAR	ESPECIFICIDAD DE COENZIMA	CONSTANTES CINETICAS			pH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA ° C
			Sustrato	K _m	V _{MAX}		
Endometrio humano.	Mitocondria	NAD ⁺	Estradiol-17	13.4	0.14	9.5	45
		NADP ⁺	Estradiol-17	12.8	0.009		
Carcinoma de endometrio.	Mitocondria	NAD ⁺	Estradiol=17	13.1	0.1		
		NADP ⁺	Estradiol-17	12.5	0.007		
Piel de rata	Microsomas	NAD ⁺	Estradiol-17	4.1	0.092	8.5	
		NAD ⁺	Testosterona	4.0	0.093		
Testiculo Porcino.	Microsomas poca actividad en mitocondria	NADP ⁺	Androstendiona	40	48	7.0	50

TABLE No.7
(Continuación)

Eritrocito Humano.	Citoplasma	NAD ⁺	Testosterona	170		9.2	
		NAD ⁻	Estradiol-17	91		9.7	
Placenta Humana.	Citosol	NAD ⁺	Estradiol-17	14	12 mil		
		NAD ⁻	Estradiol- 17	15	9 mil		
Ovario de Cordero.	Citosol	NAD ⁺	Estradiol=17	30		8.15	
Higado de cerdo de Guinea.	Microsomas	NAD ⁺	Testosterona	410		10.1	
	Citosol	NAD ⁻	Testosterona	140		10.7	
Glándula Submaxilar de rata.	Homogenado	NAD ⁺ NAD ⁻	Existe conversión de testosterona a Androstendiona y de Estradiol a Estrona (No se reportan las constantes cinéticas). (1, 21, 31).				

V. RESUMEN.

Hasta el momento, el páncreas no ha sido considerado un órgano involucrado en la biosíntesis de hormonas esteroides. Sin embargo, en los últimos años una serie de evidencias permiten suponer que dicho órgano juega un papel importante en el metabolismo de hormonas esteroides. Rosenthal y Sandberg reportaron la presencia de una globulina fijadora de estrógenos en el citosol de páncreas de rata.(41). Los mismos autores demostraron la existencia de receptores a hormonas esteroides en páncreas humano.(42). Otros reportes señalan niveles altos de receptores a estrógenos en adenocarcinoma de páncreas y tejido fetal.(22). La presencia de algunas enzimas participan - tes en la transformación de hormonas esteroides, se encuentra generalmente asociada a la presencia en los tejidos de receptores para sustratos respectivos.(11). En estudios recientes se reporta que la incubación de testosterona con homogenados de tejido pancreático adulto normal, fetal y adenocarcinoma resulta en la producción de cantidades detectables de estradiol -17 β y 5 α dihidrotestosterona evidenciándose la actividad de dos enzimas involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroides aromataza y 5 α - reductasa; particularmente interesante resulta que la actividad de estas enzimas es cuantitativamente diferente cuando se comparan el tejido normal y el carcinoma.(15).

En base a lo anterior surge el interés de caracterizar una enzima relacionada con el metabolismo de hormonas esteroides con la finalidad de encontrar una actividad catalítica especí-

fica en el tejido pancreático canino.

Este trabajo presenta parte de una investigación sobre el papel potencial del páncreas en la biosíntesis y metabolismo de hormonas esteroides. Siendo la caracterización de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA utilizando testosterona, androstendiona, y estradiol como sustratos.

Primeramente se probó la actividad de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en homogenados de páncreas canino los cuales se obtuvieron de perros callejeros machos proporcionados por el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y después de su transportación fueron procesados realizándose su fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial.

La identificación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo incubando homogeneizados de tejido en presencia de sustratos radiactivos, siendo la actividad valorada por cuantificación del producto por medio de centelleo líquido, después de la extracción con disolventes orgánicos y separación por cromatografía en capa fina.

La identidad de los productos se confirmó cristalizando el producto radioactivo con estándares y valorando la actividad específica así como por comparación de la conducta cromatográfica de los productos con estándares en diferentes sistemas de disolventes orgánicos.

Las constantes cinéticas (K_m aparente = constante de Michaelis-Menten y V_{max} = velocidad máxima alcanzada) se determinaron incubando la muestra de tejido pancreático manteniendo una constante de proteína, la coenzima requerida, e incrementando la concent

tración de sustrato.

Los ensayos de determinación de pH y temperatura óptimos se realizaron manteniendo las condiciones de incubación constantes, variando únicamente las diferentes concentraciones de [H] y la temperatura. También se determinaron las velocidades de la enzima frente a diferentes concentraciones de proteína y varios tiempos de incubación.

Los estudios de inhibición por análogos del sustrato esteroide (producto de la reacción) se realizaron esencialmente como se mencionó al inicio para la determinación de K_m y V_{max} , pero en presencia de distintas concentraciones del inhibidor en estudio.

Como resultado se observa que esta enzima se localiza en la fracción mitocondrial de páncreas canino. Presenta una especificidad de coenzima para $NAD^+(H)^+$ catalizando la óxido-reducción de los andrógenos, testosterona y androstendiona, así como para la oxidación del 17- β estradiol.

La k_m aparente de la enzima utilizando testosterona como sustrato fué de $3.5 \pm 0.5 \mu M$, V_{Max} aparente de $0.4 \text{ nmol/ } \mu\text{g. min.}$, el pH óptimo de 6.8 - 7.0 y temperatura óptima entre 6.8 - 7.0 °C respectivamente.

La k_m aparente de la enzima utilizando androstendiona fué de $9.5 \pm 0.9 \mu M$ y la V_{Max} aparente de $0.4 \text{ nmol/ } \mu\text{g. min.}$, el pH óptimo de 6.5 y la temperatura óptima de 37 °C.

Utilizando estradiol presenta una k_m aparente de $3.4 \pm 0.5 \mu M$, V_{Max} aparente de $0.3 \text{ nmol/ } \mu\text{g. min.}$ Las condiciones de pH y temperatura óptimas no se determinaron.

Las pruebas de inhibición adicionando diferentes concentraciones del producto en cada una de las reacciones para andrógenos dieron como resultado una activación de la catálisis enzimática.

Al ser una enzima localizada en mitocondrias dificulta su probable purificación, presenta una especificidad para coenzima NAD⁺; a diferencia de otras 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS como la de endometrio y placenta humano.

Presenta amplia especificidad de sustrato ya que tiene la capacidad de interconvertir testosterona - androstendiona y el 17 β -Estradiol - Estrona.

Las constantes cinéticas variaron con respecto al sustrato utilizado, pero la K_m utilizando testosterona y estradiol como sustratos para la enzima fueron del mismo orden de magnitud.

Al mostrar la actividad de la 17 β - HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en páncreas canino, se sugiere una posible función biológica de dicha enzima en el órgano, ampliando una gama de posibilidades de acción de las hormonas esteroideas en el páncreas.

VI. CONCLUSIONES.

Al buscar la actividad enzimática de la 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA, ésta se presentó en el homogenado de tejido pancreático, lo cual cumple con la hipótesis planteada; por otro lado se realizó la caracterización parcial de la enzima en páncreas canino, utilizando testosterona, androstendiona y estradiol como sustratos, cumpliendo con los objetivos planteados al inicio del trabajo. Al determinar los parámetros cinéticos K_m , V_{MAX} , temperatura y pH óptimos, tiempos de incubación y concentración de proteína, se pudo comparar su actividad cinética con el de otras 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS, de otros tejidos.

La localización de la enzima en la fracción mitocondrial, así como su caracterización con los tres diferentes sustratos propone que esta enzima 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA desempeña un papel catalítico importante en dicho órgano, el cual abriría nuevos horizontes en el campo de la investigación por ejemplo:

El trabajo preparativo de apoyo y la estandarización del método anteriormente descrito propone una posibilidad para la caracterización in vitro de otras enzimas que utilicen esteroides .

Abre la posibilidad de caracterizar otras enzimas involucradas en la esteroidogénesis con la finalidad de establecer posibles vías de síntesis de hormonas esteroideas en páncreas.

Al ver que la enzima tiene actividad en páncreas canino, es-

tudiar la actividad de esta enzima 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en el páncreas humano, lo cual se aplicaría en:

Crear biotecnología, es decir, nuevas pruebas diagnósticas enzimáticas, y ver la posible relación en cuanto a cantidad y/o especificidad de la enzima 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA en diferentes alteraciones pancreáticas.

Estudiar la influencia de las hormonas esteroideas sobre las actividades fisiológicas del páncreas.

Dentro de la investigación científica básica se podría realizar un estudio comparativo de la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroideas en tejido pancreático normal y carcinoma pancreático, abriendo con esto una posibilidad de manejo hormonal de pacientes, en el tratamiento de esta patología.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Baldi Alberto, E.H.Charreau; 17 β -Hidroxysteroid Dehidrogenase activity in rat submaxillary; Endocrinology, vol. 90 pp. 1643-1646, 1972.
- 2.- Bardin Wayne C., J.F. Catterall; Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism; Science, vol. 211, pp. 1285-1293, 1981.
- 3.- Bernhard. Estructura y función de enzimas. Ed. H.Blume, pp. 212-263, 1977.
- 4.- Boctor Amal, P.Band, A. Grossman; Specific binding of [H]³ Estradiol of the cytosol of rat pancreas alteration of the apparent number of binding sites by an endogenous factor and oligopeptide derivatives; Journal Steroid Biochemistry, vol.18, pp. 245-252, 1983.
- 5.- Conn. Bioquímica Fundamental. Ed. Limusa, pp. 205-213,1986
- 6.- Chan Lawrence. M., B.W. O' Malley; Mechanism of action of the sex steroid hormones; The New England Journal of Medicine, vol.294, pp. 1322-1328, 1372-1381, 1430-1437, 1976
- 7.- Davis P. Barry, E. Rampini, S.L Hsia; 17 β -Hidroxysteroid Dehydrogenase of rat skin; The Journal of Biological Chemistry, vol. 247, pp. 1407-1413, 1972.
- 8.- Dixon. Enzymes. Ed. Academic Press, New York, 3a.Edición, pp. 139-141, 1979.
- 9.- Dorfman Ralph. Androgens: Biochemistry physiology and clinical significance. Ed. Wiley, New York, pp. 89-101, 220-221, 1911.
- 10.- Fischer. Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Interamericana, México, pp. 276-281 ,1971.

- 11.- Gower D.B., G.H. Cooke; Regulation of steroid transforming enzymes by endogenous steroids; Journal Steroid Biochemistry, vol.19, pp. 1527-1556, 1983.
- 12.- Hafez. E.S.E. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Interamericana, México, 4a. Edición, pp.60 - 80, 1984.
- 13.- Hayashi Yuzo, H. Katayama; Promoting effect of testosterone propionate on experimental exocrine pancreatic tumors by 4- Hydroxyaminoquinoleine 1- Oxide in rats; Toxicology Letters, vol. 9, pp. 349-354, 1981.
- 14.- Inano Hiroshi, B. Tamaoki; Purification and properties of NADP-dependent 17 β -Hidroxy steroid Dehydrogenase solubilised from porcine testicular microsomal fraction ; European Journal Biochemistry, vol. 44, pp. 13-23, 1974.
- 15.- Iqbal Jawed, B. Greenway; Sex - steroid enzymes, aromatase and 5 alfa reductase in the pancreas: a comparison of normal adult, foetal and malignant tissue; Clinical Science, vol. 65, pp. 71-75, 1983.
- 16.- Jacobsohn Geath, R. Rhoehberg; 17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE from human red blood cells; The Journal of Biological Chemistry, vol. 243 pp. 2985-2994, 1968.
- 17.- Jamieson, J.D., D.E Ingber, M. Muresan, B.E. Hull, M.P. Sarras, I. Mayliepfeninger; Cell surface properties of normal differentiating and neoplastic pancreatic acinar cells; Cancer vol.47, pp. 1516-1525, 1981.
- 18.- Kageura Echiko, S. Toki; New aspect of Guinea pig liver 17 β -HYDROXYSTEROID (testosterone) DEHYDROGENASE; Life Science, vol. 10 part II , pp. 469-474, 1971.

- 19.- Kaplan Colowick; Enzyme systems: steroid hormone metabolism; Methods in Enzymology, vol. 7, pp. 4-50, 1966.
- 20.- Karavolas Harry J., L. Engel; Human Placental 17 β -Estra - diol Dehydrogenase. Substrate specific of the diphosphopyridine nucleotide- (triphosphopyridine nucleotide) linked enzyme; Endocrinology, vol 88, pp. 1165-1169, 1971.
- 21.- Kautsky Marie P., D. Hagerman; 17 β -Estradiol Dehydrogenase of ovine ovaries; Journal of Biological Chemistry, vol.245 pp. 1978-1984, 1970.
- 22.- Keshgegian Albert, J. Wheeler; Estrogen receptor protein in malignant carcinoid tumor; Cancer, vol.45, pp. 293-296, 1980.
- 23.- Kirdani Rashad, M. J. Varkarakis, G. Murphy A., Sandberg ; Distribution of simultaneously injected androgens and estrogens in animal tissues; Endocrinology, vol.90, pp. 1245-1251, 1972.
- 24.- Klyne John. Química de los esteroides. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A, México, pp. 151-171, 1979.
- 25.- Laidler James. Introduction to the chemistry of enzymes, Ed. Laidler, Mc. Graw Hill, New York, 3a. Edición, pp. 80-87, 1954.
- 26.- Legler Gunter, C.M. Muller-Platz, H.M. Mentees, G. Pflieger E. Julich; On the chemical basis of the Lowry protein determination; Analytical Biochemistry, vol. 150, pp. 278-287, 1985.
- 27.- Lehninger. Bioquímica, Ed. Omega, Barcelona 2a. Edición pp. 223-253, 1974 .

- 28.- Lehninger. Guía de Principios de Bioquímica. Ed. Omega Barcelona, pp. 102-123, 1987.
- 29.- Lhoste Euclýne F. B.D. Racbuck, E.J. Stem, D.S. Longnecker
Effect of orchietomy testosterone on the early stages of azaserine induced pancreatic carcinogenesis in the rat; Pancreas, vol. 2, pp. 38-43, 1987.
- 30.- Lowry Oliver H, N.J, Rosebrough , A.L. Farr , R.J. Randall
Protein measurement with the Folin phenol reagent; Journal Biological Chemistry, vol. 193, pp. 265-275, 1951.
- 31.- Magoffin Denis A., G.F. Erickson; Mechanism by which 17 -
Estradiol inhibits ovarian androgen production in the rat; Endocrinology, vol 108, pp. 962-968, 1980.
- 32.- Mendoza Hernández G., M. Calcagno, N. H. R. Sánchez, J.C. Díaz Zagoya; Dehydroepiandrosterone is a substrate for Estradiol 17 β -Dehydrogenase from human placenta; Biochemical and Biophysical Research communications, vol. 119, pp. 83-87, 1984.
- 33.- Mendoza Hernández G., J.L. Rendón, J.C. Díaz Zagoya; A single step procedure for purification of estradiol 17 -
Dehydrogenase from human placenta; Biochemical and Biophysical Research communications, vol.126, pp. 477-461, 1985.
- 34.- Miller J. Michael; Receiving and handling biological specimens safely; Laboratory of Medicine, vol. 19, pp.300, 1988.
- 35.- Moss Donald E.; Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources; Biochemical Pharmacology, vol. 27, pp. 2693-2698, 1978.
- 36.- Mulder E.G., S. Lambers, H.J. Van Der Molen; Isolation and

- characterization of 17 -Hydroxysteroid Dehydrogenase from human erythrocytes; Journal Biochemistry, vol. 127, pp.649-659, 1972.
- 37.- Follow Kunhard, H. Lubbert, B. Follow; 17 - Hydroxysteroid Dehydrogenase from human endometrium and endometrial carcinoma characterization and inter-mitochondrial distribution; Journal of Steroid Biochemistry, vol.7, pp. 45-50, 1976.
- 38.- Pousette Ake; Demonstration of an androgen receptor in rat pancreas; Journal Biochemistry, vol. 157, pp. 229-232, 1976.
- 39.- Pousette Ake, R. Fernstad, N. Theve, H. Skoldefors, K. Carlstrom; Further characterization of the estrogen binding macromolecule in human pancreas; Journal Steroid Biochemistry, vol. 123, pp.115-119, 1985.
- 40.- Renaud Urora, R. Sveralik, V.I Lawzewitsch, R.L. Pérez L. R.R. Rodriguez, V.G. Foglia; Metabolic and pancreatic changes caused in male dogs by testosterone chronic administration; Acta Physiological Pharmacological Latinoamericana, vol. 36, pp. 403-417, 1986.
- 41.- Rosenthal Hannah, A.A. Sandberg; Estrogen binding proteins in rat pancreas; Journal of Steroid Biochemistry, vol.9, pp. 1133 -1139, 1978.
- 42.- Sandberg Avery A., H. Rosenthal; Steroid receptors in exocrine glands, the pancreas and prostate; Journal of Steroid Biochemistry, vol.11, pp. 293-299, 1979.

- 43.- Scopes Robert. Protein Purification Principles and Practice. Ed. Springer-Verlag, vol. 180, pp. 151-163, 1986.
- 44.- Segel Irwin H. Enzyme Kinetics. Ed. A Wiley Interscience Publication, Canadá, pp. 16-30, 884-944, 1988.
- 45.- Snyder Solomon H; The molecular basis of communication between cells; Scientific American, vol. 9, pp.132-142, 1980.
- 46.- Solomons T.W.Graham. Organic Chemistry. Ed. Wiley and Sons, Toronto, 2a. Edición , pp. 954-958, 1980.
- 47.- Stryer Lubert. Bioquímica. Ed. Reverté, España, 2a.Edición pp. 220-240, 1985.
- 48.- Todd Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Ed. Salvat, México, 7a. Edición, pp. 397-400, 1984.
- 49.- Turini Paola, S. Kurooka, M. Steer, A.N. Corbascio, T.P. Singer; The action of phenyl methyl sulfonyl Fluoride on human acetylcholinesterase chymotrypsin and trypsin; The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics, vol. 167, pp. 98-104, 1969.
- 50.- Ullberg Sven, G. Bengtsson; Autoradiographic distribution studies with natural estrogens; Acta Endocrinology, vol. 43, pp. 75-86, 1963.
- 51.- Weber Klaus, M. Osborn; The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfatepoliacrylamide gel electrophoresis; The Journal of Biological Chemistry, vol. 244, pp. 4406-4412, 1969.

- 52.- Williamson D.G.; The Biochemistry of the 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases; Steroid Biochemistry, vol. 10, pp. 83-110 1978.
- 53.- Wilkinson G.N.; Statistical Estimations in Enzyme Kinetics; Journal of Biochemistry, vol. 80, pp. 324-332, 1961.

APENDICE

8.1.MATERIAL Y EQUIPO.

8.1.1.MATERIAL DE VIDRIO Y VARIOS .

Cámara de vidrio para cromatografía.

Matraces Erlenmeyer. Pyrex de 125, 500 y 1000 ml.

Matraces Volumétricos, de 250, 500 y 1000 ml.

Pipetas de 5, 10 y 20 ml.

Pipetas Pasteur.

Probetas Pyrex de 50, 100, 500, y 1000 ml.

Tubos de Vidrio de varios tamaños.

Varillas de Vidrio.

Vasos de precipitado de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml.

Viales de Vidrio borosilicados.

VARIOS:

Bolsas de plástico.

Bulbos para pipetas Pasteur.

Equipo de cirugía.

Espátulas.

Frascos con dosificador.

Gradillas para tubos y viales.

Imán.

Papel de aluminio y parafilm.

Pincel.

Pisetas.

Placas de Silica Gel. Sigma Co.

Puntas desechables para pipetas Wilson.

Reloj, con cronómetro.

Tubos de plástico para centrífuga.

Viales de plástico

8.1.2. EQUIPO DE LABORATORIO.

Agitador Magnético. Corning PC - 353 Stirrer.

Balanza Analítica. Mettler H - 54 AR.

Balanza Granataria. Mettler PC - 440 .

Baño Metabólico con agitación. Dubnoff.

Centrífuga con refrigeración. Sorvall RT 6000.

Centrífuga con refrigeración. Sorvall RC-5B. Refrigerated super speed centrifugal. Rotores: GSA; SS - 34.

Computadora. Commodore 128.

Computadora Brother PC.

Contador Beta. Packard 3255. Auto Gamma Scintillation.

Espectrofotómetro. Zeiss PM 2 DL.

Homogeneizador. Medical Electronics Rainin Instruments.

Lámpara de luz ultravioleta. Chromato - VUE CC - 20.

Pipetas Automáticas, de 20, 200 y 1000 ul Gilson .

Potenciómetro. Metrohm - 610.

Sonicador, SONIPREP - 150.

Ultracentrífuga, Beckman L5 - 65. Rotor: 60 TI.

Ultracongelador. REVCO.

Vortex Genie 2. Scientific Industries.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

8.1.3. DiSOLVENTES Y REACTIVOS. Grado Analítico.

Acetona. Merck. Co.

Acetato de Sodio. Sigma Chemical Co.

Acido clorhídrico. J.T. Baker.

Acido Etilen Diamino Tetraacético sal disódica. Sigma Chem.Co.

Agua Desionizada.

Albúmina Sérica Bovina, en polvo (96 % - 99 %) de pureza
Sigma Chemical Co.

Androstendiona.(H). New England Nuclear Co.

Androstendiona. Steraloids. INC.

Azida de Sodio. Sigma Chemical. Co.

Cloroformo grado analítico. Merck Co.

Cloruro de Magnesio. Merck Co.

2,5 Difenitoxasol (PPO). Sigma Chemical Co.

Etanol 100 % . Merck Co.

Eter de Petróleo. Merck Co.

Estradiol 17-β (H). New England Nuclear Co.

Estradiol 17-β. Steraloids INC.

2,p-Fenilenebis 4 metil, 5 feniloxazol.(Dimetil POPOP).Sigma
Chemical Co.

Fenil- metil- sulfonil Fluoruro. (PMSF). Sigma Chemical Co.

Folin - Ciocalteu. Sigma Chemical Co.

Fosfato Dibásico de potasio. J.T. Baker.

Fosfato Monobásico de potasio. J.T. Baker.

Fosfolipasa A. Sigma Chemical Co.

Glicina. Merck Co.

Glicerol. J.T. Baker.

Hidróxido de Sodio. J.T. Baker.

Hidroxi metil aminometano (TRIS). Merck Co.

B -Mercaptoetanol. Sigma Chemical Co.

Metanol Grado Analítico. J.T. Baker.

Nicotinamido Adenin Dinucleótido. (forma oxidada - NAD⁺).
Sigma Chemical Co.

Nicotinamido Adenin Dinucleótido. (forma reducida - NADH).
Sigma Chemical Co.

Nicotinamido Adenin Dinucleótido fosfato. (forma oxidada -
NADP⁺). Sigma Chemical Co.

Nicotinamido Adenin Dinucleótido fosfato. (forma reducida-
NADPH). Sigma Chemical Co.

Testosterona (H). New England Nuclear Co.

Testosterona. Steraloids INC.

Tolueno. Merck Co.

Tritón. Sigma Chemical Co.

Yodo. Sigma Chemical Co.

8.2. PREPARACION DE REACTIVOS.

Amortiguador de fosfatos (K_2HPO_4) 5.0 mM, pH 7.0, para homogeneizar, centrifugar e incubar:

K_2HPO_4 5.0 mM.

PMSF (fluoruro de metilsulfonyl fenol), 10 μ M.

$MgCl_2$ 5.0 mM.

EDTA 1.0 mM.

Mercaptoetanol 7 mM.

Agua Desionizada cbp.1 lt.

Amortiguador de fosfatos (K_2HPO_4) 0.2 M, pH 7.0. Para preparar la coenzima, tanto $NAD^+(H^+)$ como $NADP^+(H^+)$.

K_2HPO_4 0.2 M.

$MgCl_2$ 5.0 mM.

EDTA 1.0 mM.

Mercaptoetanol 7 mM.

Agua Desionizada cbp. 1 lt.

Reactivos para determinar la concentración de proteína por el método de Lowry.

Solución A : Tartrato de Sodio. H₂O al 2%.

Solución B : Sulfato de Cobre. H₂O al 1%.

Solución C : Carbonato de Sodio al 2% en Hidróxido de Sodio 0.1N.

Solución D : 0.1 volumen de solución A + 0.1 volumen de la solución B + 10 volúmenes de la solución C.

Solución de líquido de centelleo.:

PPO 0.5 % + Dimetil POPOP 0.03 %, disolver en una mezcla que contiene: Tritón 1 L + Tolueno 10 Lts.

Agitar a 4 °C .

Soluciones amortiguadoras para cinética de pH.

Tris HCl 0.05 M pH 6.5 - 9.0.

Acetato de Sodio 0.05 M pH 4.0 - 6.0.

Glicina - NaOH 0.05 M pH 9.5 - 12.0.

Mantener todos los reactivos a 4 °C

8.2.1. PREPARACION DEL MATERIAL RADIOACTIVO.

TESTOSTERONA. NEW. ENGLAND. NUCLEAR. CORP.

Actividad Especifica = 49.0 Ci/ μ mol.

ANDROSTENDIONA . NEW. ENGLAND. NUCLEAR. CORP.

Actividad especifica : 49.0 Ci/ μ mol.

ESTRADIOL. NEW. ENGLAND. NUCLEAR. CORP.

Actividad Especifica = 94 Ci/ μ mol.

ESTRONA . NEW. ENGLAND. NUCLEAR. CORP.

Actividad especifica : 94 Ci/ μ mol.

El ritmo de desintegración radiactiva (decaimiento) parece ser afectado solamente por la estructura del núcleo inestable, la vida media es específica para cada isótopo y es el tiempo necesario para que la mitad del número de átomos presentes se desintegren. Es importante tomar en consideración este parámetro ya que considerando cualquier número de átomos radiactivos, el número de desintegraciones por segundo será inversamente proporcional a la vida media.(46).

8.2.1.1. Cálculos.

Calcular el número de átomos con núcleos inestables existentes en un tiempo t , de acuerdo a la siguiente relación :

$$N_t = N_0 e^{-Kt}$$

Donde:

N_t = Número de átomos existentes con núcleos inestables, a un tiempo x .

No = Número original de núcleos inestables a un tiempo inicial to.

e = Base de logaritmos naturales .

K = Una constante = $0.693 / 12.5$ años (vida media del tritio).

t = Tiempo transcurrido .

Tomar en consideración que los esteroides radiactivos se recibieron aproximadamente en Diciembre de 1983, efectuar los cálculos antes mencionados.

Fecha en utilizar el material radiactivo: Febrero de 1988.

Tiempo transcurrido = 5.2 años, por lo tanto :

$$K = 0.056528.$$

$$Kt = (0.056528) (5.2) = 0.2939$$

$$e^{-Kt} = 0.746029$$

Para Testosterona y Androstendiona :

$$N_t = 49 \text{ Ci}/\mu\text{mol} \times 0.746029$$

$N_t = 36.5 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$. Cantidad de radiactividad Existente .

Para Estradiol y Estrona :

$$N_t = 94 \text{ Ci}/\mu\text{mol} \times 0.746029$$

$N_t = 71.12 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$. Cantidad de radiactividad.

Si la eficiencia del contador es del 40%, y $1 \text{ uCi} = 2.22 \times 10^6$

dpm.

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

Despejando de la ecuación anterior cpm, se tiene:

$$cpm = (40 \%) (2.22 \times 10^6)$$

$$cpm = 8.88 \times 10^5$$

Actividad específica de los esteroides usados como sustrato, en cada uno de los ensayos.

TESTOSTERONA Y ANDROSTENDIONA : 100 000 cpm / 3.1 pmol.

ESTRADIOL Y ESTRONA ; 100 000 cpm /1.6 pmol.

8.2.1.2. Repurificación del material radiactivo.

Repurificar los compuestos tritiados comerciales mediante el método de filtración en gel.

Utilizar una columna de 20 cm de largo por 1.5 cm de diámetro.

Sephadex LH 20 - 100 y un sistema de eluyentes : Tolueno / Metanol: 85ml/15ml.

Preparación del esteroide radiactivo:

Evaporar el esteroide radiactivo, resuspendiéndolo con 500 µl del sistema de eluyentes (Tolueno, 85 ml/Metanol 15 ml), y aplicar en el lecho de la columna.

Recolectar 1 ml del material eluido en cada tubo, tomar una alícuota de cada uno para medir la cantidad de radiactividad, realizar la gráfica de purificación, obteniendo la fracción del esteroide puro, la cual se procede a evaporar y resuspender en un volumen adecuado para formar una solución patrón de 100 000 cpm. en 100 µl utilizando la siguiente fórmula :

$$C1V1 = C2V2$$

Donde :

C1 = Cantidad de radiactividad emitida por la muestra.

V1 = Volumen en que está esa cantidad de radiactividad.

C2 = Cantidad de radiactividad que se quiere (100 000 cpm).

V2 = Volumen requerido para resuspender dicha radiactividad .

8.3.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 17 β - HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN PANCREAS DE PERROS MACHO.

8.3.1.Preparación del medio para medir la actividad enzimática.

Aplicar el sustrato esteroide de la reacción en una concentración de 15 μ M en un vial evaporar a sequedad, adicionar 100 μ l del esteroide radiactivo previamente repurificado para tener 100 000 cpm por ensayo, y 2 μ g de la correspondiente coenzima (NAD,NADP)' / (H +) en 100 μ l de amortiguador fosfatos 0.2 M añadir el volumen necesario de la fracción mitocondrial de páncreas canino, que al llevar el volumen final de la reacción a 1 ml con amortiguador de fosfatos 5mM, pH 7.0 permita que la concentración final de proteína de dicha fracción mitocondrial sea de 1 μ g en 1 ml.

8.3.2.Incubación:

Una vez iniciada la reacción, incubar durante 10 min a 37 °C, con agitación constante y en una atmósfera de oxígeno. Terminar la reacción al término de este tiempo, con 10 ml de éter etílico Q.P., agitar vigorosamente, dejar reposar por 15 min. a temperatura ambiente para separar la fase acuosa de la fase etérea y para completar perfectamente la separación centrifugar

a 3000 rpm. durante 10 min.

8.3.3.Extracción de los productos finales de la reacción.

Colocar el vial, sin agitar, en una mezcla de acetona-CO₂ (-70 °C) para congelar la fase acuosa y separar por decantación la fase etérea, y evaporar el éter a 37 °C .

8.3.4.Detección de los productos finales de la reacción :

Redisolver el residuo del paso anterior, con 200ul de etanol Q.P. que contenga el sustrato y el producto esperado . Agregar estos últimos como medio de localización en el momento de realizar la cromatografía en capa fina, usando placas de sílica gel y un sistema de eluyentes formado por 90 ml de cloroformo y 10 ml de acetona.

Una vez separados los esteroides (sustrato -producto) proceder a su identificación en la placa de sílica gel, por ejemplo los esteroides de tipo estrógenos se identifican al revelar la placa con vapores de yodo ó con ácido sulfúrico diluido y calor, y los andrógenos por medio de radiación ultravioleta. (19,51).

8.3.5.Cuantificación.

Cortar la placa de sílica gel en las zona en donde fué identificado el (sustrato - producto) de la reacción, aplicán -dolos por separado en viales que contienen liquido de centelleo y proceder a medir la cantidad de radiactividad sustrato-producto transformado.