

113



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA ENZIMA GLUTATION REDUCTASA (GSSG-Rd) EN CONDICIONES DE ESTRES OXIDATIVO MEDIANTE UN ANTISUERO POLICLONAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JORGE HUMBERTO LIMON PACHECO



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ELISABETH GONSEBATT BONAPARTE

MEXICO, D. F.



JULIO 2001.

295221

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio de la enzima glutatión reductasa (GSSG-Rd) en condiciones  
 de estrés oxidativo mediante un antisuero policlonal.

Realizado por Jorge Humberto Limón Pacheco

con número de cuenta 9653305-1, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. María Eugenia Consebatt Bonaparte

Propietario

Dr. Victor M. Valdés López

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña de Molcs

Suplente

Biólogo Julio Alejandro Prieto Sagredo

Suplente

Biólogo David Garcíadiago Cázares

Consejo Departamental de

BIOLOGIA

Dra. Patricia Ramos Morales

Facultad de Ciencias  
 U.N.A.M.



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

Esta tesis se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Y con el apoyo de PAPIIT IN 207196 y PROBETEL.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dra. María Luisa Fanjul, Dr. Víctor Valdés, Biólogo Julio Prieto Sagredo y Biólogo David Garciadiego por sus valiosos comentarios y observaciones a este trabajo.

A Paty Ramírez, mi maestra de técnicas, a Vicky y Mónica del laboratorio del Dr. Larralde por asesorarme y compartir conmigo su experiencia.

A la Sra. Delfina por su amistad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Wendy, Luciana, Emilia, Quitzé, Paty Guzmán, Gerardo, Bernardo, Cillali y todos los que se me hayan olvidado porque de una u otra manera hacen cada momento agradable en el laboratorio.

Muy en especial me gustaría agradecer a la Dra. María Eugenia Gonsebatt, porque me ha mostrado el vasto mundo de la ciencia desde una perspectiva muy bella, por abrimme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas, su ejemplo, su apoyo y actitud frente a la vida.

## DEDICATORIA

Con todo el respeto y cariño que existen en mí, a mis padres, parte de mi propia fortaleza. Gracias por sus desvelos, su apoyo, por alentarme, comprenderme y quererme. Mi mente y mi corazón siempre están con ustedes.

A mis hermanas Vero (Pecs) y Montse (Bimbos), las mejores del mundo, siempre juntos.

A mis tres abuelas que siempre están conmigo.

A todos los profesores que han influido en mi formación como Zenón, Víctor y en especial a Alicia Grau Delfin.

A Gaby y Giobany por su valiosa amistad.

A las proteínas de choque térmico Xavier y René "...we are the crime...". (HSP)

A mis amigos y compañeros de la facultad:

Mayra, Claudia Elizabeth, Aurora, Elena, Lilia, Claudia V., José, Noé, Héctor, Octavio, Capitán Ariel, Ivonne, Víctor, Susana, Juan, Rodrigo, Carlos M., Agustina, Carlos S., Rosita, David, María, Armando Silver, Benom, Quique, Yadira, Katy, Patocita, Daniel y Abraham por todos los momentos compartidos.

*Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Quanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas.*

PARACELSO

*" el hombre no nació para la derrota..."*

E. M. HEMINGWAY



# ÍNDICE

## INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>4</b>
Generalidades	4
Radicales libres	4
Especies reactivas del oxígeno (ROS)	5
<b>MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA CONTRA DAÑO OXIDATIVO</b>	<b>7</b>
Los antioxidantes	7
Ejemplos de moléculas antioxidantes	8
<b>CICLO REDOX DEL GLUTATIÓN</b>	<b>10</b>
El glutatión: breve historia	10
Propiedades	11
Ciclo redox del GSH	13
Enzimas relacionadas al GSH	14
Padecimientos asociados a la deficiencia del GSH	16
<b>GLUTATIÓN REDUCTASA</b>	<b>18</b>
Breve historia	18
Distribución de la GSSG-Rd en la naturaleza	18
Distribución subcelular de la GSSG-Rd	20
Reacción catalizada por la GSSG-Rd	20
Propiedades fisicoquímicas	21
Regulación	21
Inducción	21
Inhibición de la actividad de la GSSG-Rd	23

Enfermedades asociadas a la deficiencia de la GSSG-Rd	24
Indicadores moleculares de estrés químico: la GSSG-Rd como biomarcador	24
<b>EL USO DE UN ANTISUERO POLICLONAL COMO ESTRATEGIA COMPLEMENTARIA EN EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES MOLECULARES</b>	26
<b>XENOBIÓTICOS Y ENZIMAS QUE LOS METABOLIZAN</b>	28
Xenobióticos, metales, metaloides y generación de ROS	29
Cromo	30
Arsénico	30
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	32
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	33
<b>V. OBJETIVOS</b>	34
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODO</b>	35
Generación del antisuero	
Preparación del antisuero	
Determinación de la afinidad por ELISA	
Cultivo de hepatocitos fetales humanos (WRL-68)	
Generación de estrés oxidativo	
Determinación de la concentración de proteínas	
Electroforesis de proteínas	
<i>Westernblott</i>	
Análisis estadístico	
<b>VII. RESULTADOS</b>	40
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	44
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	49
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	50
<b>XI. LITERATURA CONSULTADA</b>	51
<b>XII. APÉNDICE</b>	60

## ABREVIATURAS

ATP	Adenin Intfosfato
BNF	$\beta$ -Nafitofavona
CAT	Catalasa
DMA	Dimetil arsénico
DNIC	Dinitrosil-ditiol-hierro
ESR	Electrón spin resonance
FB	Fenobarbital
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutatión reducido
GSH-Px	Glutatión peroxidasa
GSSG	Glutatión oxidado
GSSG-Rd	Glutatión reductasa
GST	Glutatión-S-transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
MDA	Malondialdehido
MMA	<i>Mono metil arsénico</i>
MPM	Marcador de peso molecular
NADP	Fosfato de Nicotin Adenin Dinucleótido
NADPH	Fosfato de Nicotin Adenin Dinucleótido, forma reducida
ROS	Especies reactivas del oxígeno (por sus siglas en inglés; reactive species of oxygen)
SOD	Superóxido dismutasa
TR	Tioredoxin reductasa

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones que son asociadas con el decremento de los niveles de glutatión (Modificado de Sen, 1997).

Tabla 2. Distribución de algunas enzimas en tejidos de rata donde se indica la actividad relativa de la enzima en un peso dado de tejido húmedo. El valor es relativo al tejido más activo el cual se da valor de 100 (Modificado de Dixon y Webb, 1979).

Tabla 3. Propiedades de la GSSG-Rd de diferentes orígenes (modificado de Scandalios, 1997).

Tabla 4. Valores promedio de absorbancia del antisuero control y el antisuero contra la GSSG-Rd de levadura.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de algunas vías principales que llevan al estrés oxidativo y algunos antioxidantes que defienden de esto a una típica célula eucarionte.

Figura 2. Glutatión. A) Representación espacial de los elementos, B) bajo condiciones fisiológicas el glutatión es aniónico (Tomado de Sen, 1997).

Figura 3. Estructura química del glutatión a) forma reducida, b) forma oxidada (Tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999).

Figura 4. Ciclo redox del glutatión en células de mamífero donde se considera la destrucción de peróxidos (Tomado de Scandalios, 1997).

Figura 5. Reacciones en conexión con el ciclo redox del Glutatión.

Figura 6. Estructura de la Glutatión reductasa donde los números indican la posición de los residuos de aminoácidos y los óvalos los límites de los dominios.

Figura 7. Electroforesis de muestras de microsomas de rata tratados con FB y  $\beta$ -Nafloflavona como inductores de estrés oxidativo.

Figura 8. Detección de la glutatión reductasa en microsomas de hígado de rata tratados con FB-BNF y en hepatocitos humanos WRL-68 tratadas con mono y dimetil arsénico usando el antisuero policlónico, el peso molecular corresponde a los 50 kD.

Figura 9. *Westemblott* de muestras tratadas con diversos agentes que inducen estrés oxidativo, MMA y DMA monometil y dimetil arsénico respectivamente en células WRL-68 a concentración de  $1 \times 10^{-5}$ ; CHPP, control hepatopáncreas; HPPT hepatopáncreas de *P. clarkii* tratados con cromo; GSSG-Rd L, glutatión reductasa de levadura usada como control.

Figura 10. *Westemblott* de órganos de ratón tratados con  $\text{NaAsO}_2$  a una dosis de 10 mg/Kg de peso, por 20 días. RC y RT, riñón control y tratado; HC y HT, hígado control y tratado; PC y PT, pulmón control y tratado respectivamente. GSSG-Rd es la glutatión reductasa usada como control.

Figura 11.  $\text{As}^{-3}$ = WRL-68 tratadas con  $1 \times 10^{-5}$  de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ );  $\text{As}^{-6}$ = WRL-68 tratadas con  $1 \times 10^{-5}$  de  $\text{NaAsO}_2$ ; CAs=  $\text{NaAsO}_2$  control y MPM= marcador de peso molecular.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

# I. RESUMEN

## I. RESUMEN

Vivir en un ambiente oxidante requirió de estrategias celulares efectivas para detectar y desintoxicar metabolitos de oxígeno molecular conocidas como especies reactivas del oxígeno (Ondarza *et al.*, 1983). Los antioxidantes son moléculas que hay en las células aeróbicas, que neutralizan los reactivos intermediarios químicos producidos por vías endógenas y por el metabolismo de xenobióticos. Intervienen en reacciones enzimáticas capaces de eliminar químicos electrofílicos y metabolitos o de reducir peróxidos orgánicos altamente tóxicos. La actividad de estos sistemas antioxidantes se puede incrementar o inhibir bajo condiciones de estrés químico causado por xenobióticos. Las dos formas de respuestas no son antinómicas y dependen de la intensidad y la duración del estrés así como de la susceptibilidad del organismo expuesto. La deficiencia en los sistemas por una pobre actividad sugiere un estado precario caracterizado por una alta susceptibilidad al estrés ambiental y hasta pueden esperarse efectos adversos importantes. Debido a esto es muy importante considerar que estos pueden constituir marcadores potenciales que reflejen no sólo la exposición a contaminantes, sino además el grado de toxicidad generado. Es por ello que se requieren diversos modelos y estrategias para su investigación. En los últimos años se han hecho estudios en las moléculas antioxidantes como el glutatón y la glutatión reductasa, sin embargo las herramientas para detectar enzimas primarias están basadas en reacciones químicas y pocas son las que emplean anticuerpos para su detección y sólo se han incluido a la superóxido dismutasa, catalasa y a la glutatión peroxidasa (Yan *et al.*, 1998). Las enzimas anteriormente mencionadas juegan un papel primario en la detoxificación celular, sin embargo el papel de la glutatión reductasa es igual de prioritario debido a que ésta enzima se encarga de mantener los niveles de glutatión, el tiol de mayor concentración celular que neutraliza muchas moléculas altamente reactivas. Por lo anterior en el presente trabajo se desarrolló un método para estudiar los cambios de la glutatión reductasa en muestras sometidas a agentes inductores de estrés oxidativo basado en la generación y empleo de un antisuero y la técnica *Westernblott*. Se encontró que el arsénico y el tratamiento con fenobarbital y betanaftoflavona tienen la capacidad de inducir a esta enzima en el riñón y el pulmón de ratones y microsomas de hígado de rata respectivamente, así mismo el arsenito de sodio en hepatocitos de la línea celular WRL-68, además con ello se demostró que el anticuerpo es capaz de reconocer a la enzima de diferentes especies.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## II. INTRODUCCIÓN

## II. INTRODUCCIÓN

### ESTRÉS OXIDATIVO

#### *Generalidades*

El estrés oxidativo es una condición que ocurre comúnmente en los organismos aeróbicos, en los cuales se producen diferentes especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. El término estrés oxidativo es ampliamente usado pero pocas veces es definido y en esencia se refiere a la situación de un serio desbalance entre la producción de estas moléculas reactivas y las de defensa antioxidante. En 1991 Sies definió el estrés oxidativo como una alteración entre el balance pro-oxidante-antioxidante que favorece la formación de moléculas reactivas y lleva a un daño potencial. Este daño a menudo es referido como un daño oxidativo.

Existen muchas formas de generar estrés oxidativo en los organismos. Procesos normales como la respiración, hasta patologías como la inflamación de algún tejido, una infección parasitaria o una alteración digestiva pueden generar una gran cantidad de moléculas capaces de interactuar con proteínas, desestabilizarlas y generar así un daño oxidativo. Otro de los factores principales que provocan el estrés oxidativo es la disminución en las defensas antioxidantes. Esto puede ser originado como consecuencia de una disminución de estas moléculas y otros constituyentes esenciales en la dieta (Halliwell y Gutteridge, 1999). Actualmente la actividad humana ocasiona muchos contaminantes que son arrojados sin control al ambiente y que tienen esa capacidad de daño. En ocasiones las concentraciones de estos tóxicos ambientales pueden ser tan altas que influyen negativamente los procesos fisiológicos normales de los organismos.

#### *Radicales libres*

Un radical libre se ha definido como una entidad química (un átomo o molécula) que contiene uno o más electrones desapareados (Younes en Marquardt *et al.* 1999). La palabra *radical* proviene de *radix* (raíz) indicando el significado biológico fundamental de las reacciones que involucran a los radicales libres, el adjetivo *libre* enfatiza una alta reactividad.

Esta definición considera por ejemplo al átomo de hidrógeno (con un electrón desapareado) y a los iones de metales de transición como el hierro, cobre y manganeso. Los radicales libres pueden ser aniónicos, catiónicos o neutros. Bajo el punto de vista biológico, sin lugar a dudas los radicales que tienen mayor importancia son los que derivan del oxígeno (Bergendi *et al.*, 1999).

Los radicales libres fueron demostrados primero en 1900 por Gomberg quien describió primero la descomposición del compuesto hexa-feniletano en dos trifeniletil radicales. En 1929, Paneth y Hofeditz describieron la destrucción del tetrametil plomo en radicales libres. La degradación de moléculas primarias a radicales libres requiere de energía de alta activación a diferencia de la subsecuente descomposición que requiere mucho menos energía. Las reacciones de radicales libres requieren poca energía y pueden derivar en reacciones en cadena pudiendo ser muy peligrosas para cualquier ser vivo (Bergendi *et al.*, 1999).

Los radicales libres pueden ser medidos indirectamente *in vivo* atrapándolos con otros químicos y midiendo el producto *ex vivo* usando métodos como el de ESR (electron spin resonance). Para evaluar los efectos de los radicales libres se pueden incluir determinaciones de los sistemas naturales de defensa que protegen a los organismos del daño que producen como es la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), el glutatión (GSH) y las enzimas asociadas a este.

### ***Especies reactivas del oxígeno (ROS)***

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son generadas como resultado normal del metabolismo intracelular normal en distintas partes de la célula como las mitocondrias, los peroxisomas o bien a partir de una amplia variedad de sistemas enzimáticos. Sin embargo la generación de ROS también puede ser debida por agentes externos. Los radicales libres en general, dentro de los cuales se incluyen varios tipos de especies reactivas del oxígeno, pueden ser generados por contaminantes del aire, agua, radiaciones, xenobióticos y metales entre otros (Guyton y Kensler, 1993).

Niveles elevados de ROS pueden interrumpir el papel fisiológico de los antioxidantes en la proliferación celular y en la defensa de la célula. También los niveles altos de ROS pueden debilitar a la célula y llevarla finalmente a la muerte celular o a un precipitado envejecimiento celular muchas veces asociado a enfermedades vinculadas a la edad. Se ha visto que cuando la capacidad de la célula se ve rebasada por los ROS puede haber un ataque estocástico a las proteínas (Stadtman, 1992; Berlett y Stadtman, 1997), los lípidos, los carbohidratos y al DNA (Henle y Linn, 1997; Beckman y Ames, 1997), afectando muchas funciones importantes. Además los niveles de ROS pueden constituir una señal que active vías específicas sensibles a señales redox que una vez activadas pueden dañar o potenciar las funciones protectoras.

Las especies reactivas del oxígeno han sido asociadas a lesiones de tejidos en un buen número de enfermedades incluyendo artritis reumatoide, arterosclerosis, síndrome de afección respiratoria adulta, desórdenes inmunológicos, cataratas, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades hepáticas, psoriasis, lesión de corazón asociada a isquemia-reperusión, cerebro y páncreas, entre otros (Stvrťinová *et al.*, 1995).

Bajo condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre los mecanismos que generan especies reactivas del oxígeno y otros radicales así como con los mecanismos que se encargan de atraparlos y eliminarlos. Si este importante equilibrio se ve alterado, el daño a los tejidos y estructuras celulares puede presentarse. La generación de este daño puede deberse a factores genéticos, ambientales, factores genéticos y ambientales, o bien, desórdenes en los sistemas metabólicos.

## MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO

### **Antioxidantes**

Como se ha mencionado los organismos tienen mecanismos de defensa contra el efecto tóxico de los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, decrementando o eliminando las consecuencias de sus efectos en las células.

Los sistemas de protección que pueden disminuir la influencia negativa de los ROS en el organismo pueden dividirse en:

1. Mecanismos que previenen la formación de ROS (antioxidantes en un sentido amplio.)
2. Mecanismos que eliminan los ROS formados a través del secuestro y eliminación de los mismos (antioxidantes en un sentido más estricto).
3. Sistemas de reparación que remueven moléculas dañadas del organismo antes de su acumulación

Desde un punto de vista químico, cualquier sustancia que previene la oxidación de otros compuestos por oxidantes (radicales libres), lo cual implica que se debe oxidar asimismo, puede ser considerado un antioxidante.

En Biología, el significado del antioxidante es el de un compuesto que, en bajas concentraciones, después de una reacción con un radical libre, es relativamente estable estando en forma nativa y unida al radical y no produce reacciones posteriores en las que se generen nuevos radicales libres además de que se producen substratos oxidados. La acción de un antioxidante desde cualquier perspectiva, resulta útil en la protección de moléculas biológicamente importantes, células y tejidos y consecuentemente a un organismo completo contra el daño oxidativo por ROS (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los sistemas antioxidantes en compartimentos acuosos, por ejemplo el citosol y los fluidos extracelulares, consisten en antioxidantes de bajo peso molecular como el GSH, el

ascorbato (vitamina C) y el urato, las enzimas reductasas que catalizan la regeneración de formas reducidas de estas moléculas antioxidantes como es el caso de la glutatión reductasa (GSSG-Rd) y enzimas antioxidantes como la SOD, las CAT y las peroxidasas (Selverstone *et al.*, 1998).

### **Ejemplos de moléculas antioxidantes**

Las células están provistas de un buen número de defensas endógenas contra el daño oxidativo y estas incluyen: 1) acarreadores enzimáticos como la SOD, la cual acelera la dismutación de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ ; la CAT y la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la cual descompone  $H_2O_2$  en agua; 2) los acarreadores radicales hidrofílicos como el ascorbato, urato, y el GSH; 3) los acarreadores radicales lipofílicos como los tocoferoles, flavonoides, carotenoides y ubiquinol; 4) enzimas involucradas en la regeneración de formas oxidadas de pequeños antioxidantes moleculares, como la GSSG-Rd, o responsables de mantener los tioles proteínicos, como es el caso de la tioredoxin reductasa (TR); y 5) la maquinaria celular que mantiene un ambiente reducido como por ejemplo la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). De no contar con estos sistemas antioxidantes las células quedan expuestas a recibir un daño oxidativo. Lin en 1993 menciona que los radicales libres promueven:

- Rompimiento de las proteínas de membrana anulando el reconocimiento de unas con otras.
- Apertura de la membrana celular que facilita la entrada de bacterias y virus.
- Alteración en la membrana nuclear abriendo el núcleo y exponiendo la información genética.
- Mutaciones en el material genético al modificar o destruir nucleótidos.
- Oxidaciones en proteínas y compartimentos celulares.
- Generación de productos tóxicos.

Además los daños están asociados a un buen número de enfermedades como la arteriosclerosis, el cáncer, el SIDA, las cataratas, la artritis, la anemia, el Alzheimer, esterilidad y su acumulación esta asociada al envejecimiento. En la figura 1 se representan varios tipos de daño oxidativo en una célula eucarionte así como los principales agentes antioxidantes que actúan en compartimentos acuosos y lipídicos.

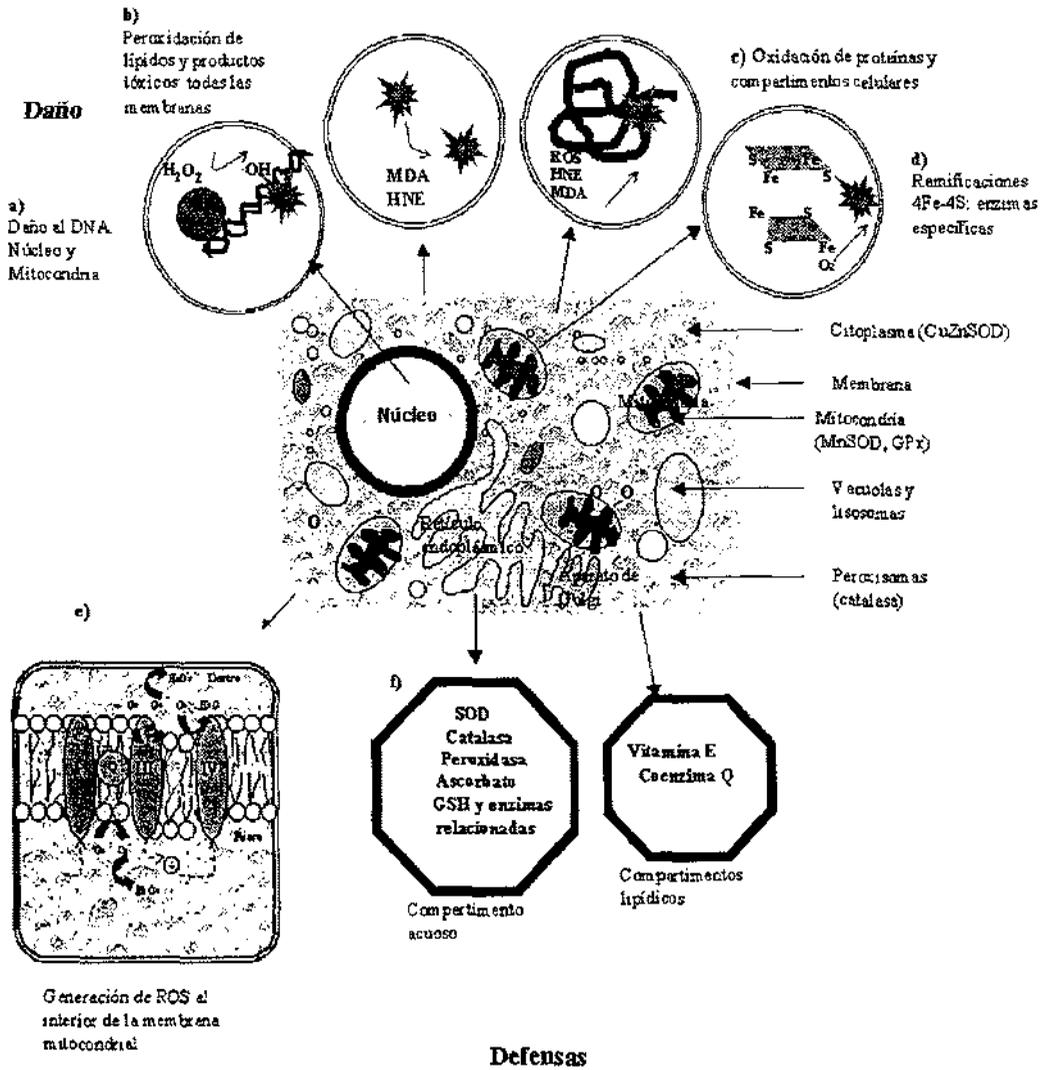


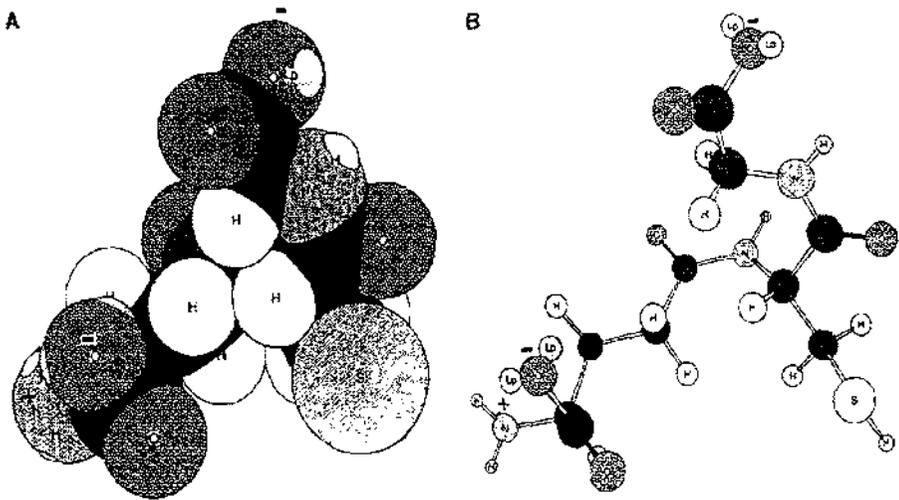
Figura 1. Representación de algunas vías principales que llevan al estrés oxidativo y algunos antioxidantes que defienden de esto a una típica célula eucariote. Se ilustran cuatro tipos de daño oxidativo: a) Daño sito específico al DNA que involucra la generación de radicales hidroxilo generados por reacciones catalizadas por metales que tiene como resultado final el rompimiento de hebras y lesiones a las bases del DNA. b) Peroxidación de lípidos que daña las membranas y produce compuestos tóxicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) que reacciona con otros componentes celulares. c) Daño a proteínas que resulta de oxidaciones directas con ROS o con reacciones con productos del metabolismo lipídico (por ejemplo el HNE, MDA) d) Reacciones directas del superóxido con ciertas ramificaciones hierro-azufre de grupos en posiciones expuestas, la cual resulta en un desensamblaje parcial de la ramificación, inhibición de la enzima y la liberación del hierro que puede generar radicales hidroxilo e) Representación esquemática de la mayor fuente de superóxido y peróxido de hidrógeno en la célula (vinculada a la transferencia de electrones a partir de la cadena de transporte electrónico I, III y IV representan los complejos I (NADH dehidrogenasa), III (coenzima Q: citocromo c oxidoreductasa) y IV (citocromo oxidasa) de la cadena de transporte electrónico Q, coenzima Q, C, citocromo c. f) Moléculas de defensa de acuerdo a su presencia en compartimentos acuosos o lipídicos

## CICLO REDOX DEL GLUTATIÓN

Para entender mejor porque la glutatión reductasa es una enzima tan importante para los organismos es necesario dar una revisión al sistema que en el que participa, al GSH sus funciones y características, así como a las interacciones con otras enzimas ya que GSSG-Rd esta involucrada en una serie de reacciones bioquímicas que en conjunto constituyen uno de los mecanismos de defensa más importantes de los organismos contra el daño oxidativo.

### *El glutatión: breve historia*

En 1888, de Rey-Pailhade observó que las levaduras contenían una sustancia que era responsable de la formación de sulfuro de hidrógeno cuando las células eran cultivadas con sulfuro elemental. Obtuvo gran evidencia de que la misma sustancia estaba presente en otros tejidos como el músculo de pez, res, hígado, sangre fresca de oveja, cerebro de oveja, intestino delgado de borrego, entre otros. Por su afinidad a reaccionar con el sulfuro, de Rey-Pailhade nombró a la sustancia *philothion*, del griego *philo*=amor y *thion*=sulfuro (Dolphin y Poulson, 1989; Sen, 1997). Hopkins posteriormente observó el *philothion* en músculo, hígado y levadura y que además podría ser extraído con agua. Con un poco más de experiencia en sus estudios, se planteó la posibilidad de que el *philothion* pudiera ser un dipéptido constituido por glutamato y glicina. Fue hasta 1921, que Hopkins demostró que el glutatión contenía sulfuro. En 1929, Hopkins y Kendall y colaboradores, de manera independientemente, descubrieron que el glutatión es en realidad un tripéptido que contiene glutamato, cisteína y glicina con un peso molecular de 307 (Sies, 1999) quedando definida su estructura finalmente como L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina (Fig. 2).



**Figura 2.** Glutathión A) Representación espacial de los elementos, B) bajo condiciones fisiológicas el glutathión es aniónico (Tomado de Sen, 1997).

El GSH es actualmente considerado como una de las más fascinantes moléculas presente en las células en altas concentraciones, con aproximadamente 0.5-10 mM (Préville, *et al.*, 1999; Di Simplicio *et al.*, 1998). Esta molécula autorregula su síntesis celular y se sabe además que es multifacética, es decir, que sus funciones van desde defensa antioxidante, detoxificación de xenobióticos electrofílicos, modulación de la señal de transducción regulada por reacciones óxido reductoras, almacenamiento y transporte de cisteína, regulación de la proliferación, síntesis de desoxirribonucleótidos, regulación de las respuesta inmune y regulación del metabolismo de las prostaglandinas (Sen, 1997).

### **Propiedades**

Las funciones fisiológicas de muchas proteínas, incluyendo enzimas y moléculas de señalamiento, están reguladas por el intercambio de tioles disulfuro entre tioles proteicos y disulfuros de bajo peso molecular como el glutathión. En este último, el residuo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína es el que confiere muchas de sus propiedades fisiológicas (Figura 3).

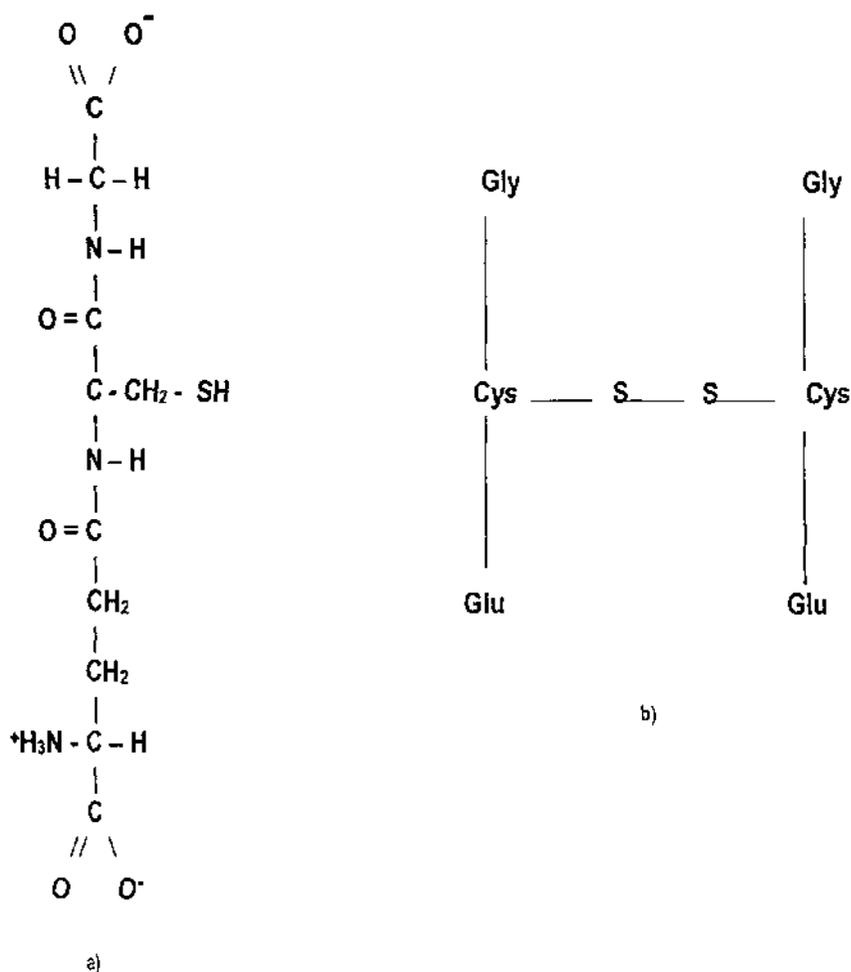


Figura 3. Estructura química del glutatión a) forma reducida, b) forma oxidada (Tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999).

La formación de disulfuros constituye un proceso reversible e involucra la oxidación y dos electrones. En las reacciones que ocurren en los seres vivos los donadores y aceptores en estos procesos incluyen al oxígeno molecular, al NADPH y flavin cofactores, y otros tioles y disulfuros. De acuerdo a Gilbert (1995), las reacciones reversibles de intercambios tioldisulfuro ocurren por un ataque nucleofílico en uno o dos átomos de un enlace disulfuro (S = S)

### **Ciclo redox del GSH**

Como se ha dicho, el glutatión reducido es uno de los mayores conjugadores electrofílicos celulares y sus reacciones se pueden dividir en dos categorías. La primera es en la que hay una reacción del glutatión con moléculas inestables a nivel de electrones y se da como resultado la formación de un conjugado-S-glutatión o una mezcla de disulfuros. En este caso una de las características importantes del glutatión es que éste puede reaccionar con una gran variedad de compuestos que tienen centros electrofílicos. Esta reacción es catalizada por la glutatión S-Transferasa (GST).

La segunda categoría y de más relevancia para la glutatión reductasa es donde el GSH reacciona con otras moléculas para formar glutatión oxidado (GSSG). Esta función se da en el ciclo del ascorbato glutatión en plantas y en el ciclo redox que involucra a la GSSG-Rd y a la GSH-Px en mamíferos donde este último previene de los daños que podría causar una generación y acumulación de peróxido de hidrógeno (Figura 4). Estos ciclos oxido-reductores son importantes mecanismos antioxidantes de la célula empleados en diferentes funciones como la respiración, la fotosíntesis o la fijación de nitrógeno donde normalmente se producen ROS que podrían ser un problema (Mullineaux y Creissen en Scandalios, 1997).

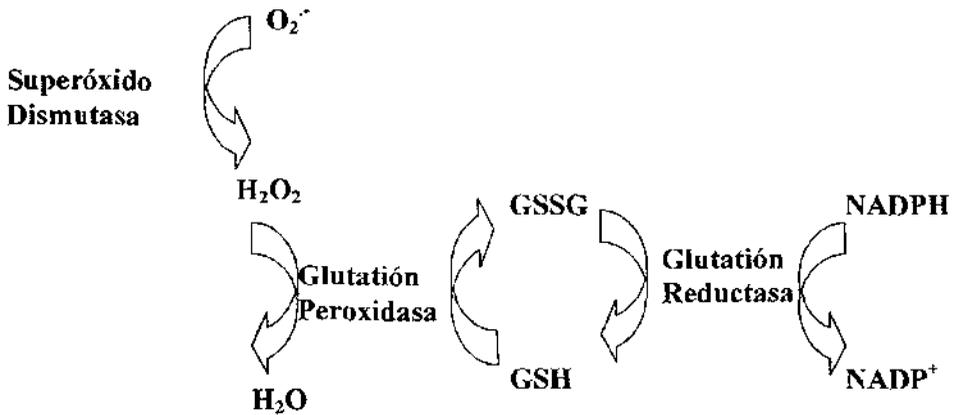


Figura 4. Ciclo redox del glutatión en células de mamífero donde se considera la destrucción de peróxidos (Tomado de Scandalios, 1997).

### **Enzimas relacionadas al GSH**

Es importante mencionar que el metabolismo de drogas se divide en dos fases, la primera es la fase I incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis entre otras reacciones y participan moléculas como los citocromos P450. En la fase II del metabolismo las reacciones involucran a otras enzimas que permiten que sustancias tóxicas sean solubles y excretables por orina. Durante este proceso participan algunas enzimas asociadas al GSH. Muchas de las reacciones son representadas en la figura 5 donde el GSH aparece implicado en la defensa celular contra el estrés oxidativo y en el mantenimiento de un estatus redox de tioles (Deneke, S. M. y B. L. Fanbury, 1989; Meister, 1995)

La GSH-Px es específica para su donador de hidrógeno, el GSH, pero también puede ampliar su rango de sustratos usando peróxidos de hidrógeno hasta hidroperóxidos. Las GST catalizan la reacción entre los grupos sulfidilo (-SH) del glutatión reducido y agentes alquilantes potenciales con lo cual neutralizan los sitios electrofílicos haciéndolos solubles y excretables. Estas enzimas representan además uno de los mayores grupos de enzimas de fase II (Clapper y Szarka, 1998; Strange *et al.*, 2000).

La síntesis de GSH esta regulada por dos procesos, ambos dependientes de ATP (Taniguchi *et al.*, 1989; Fujii *et al.*, 2000). El hígado parece ser el sitio donde el GSH es sintetizado en vivo con el sulfuro de cisteína suplementado por la metionina a través de la ruta de la cistionina. Esta cisteína y la transportada por al interior celular sirve como sustrato para la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa (EC 6.3.2.2) para formar  $\gamma$ -glutamilcisteína la cual es acoplada a una glicina via GSH sintetasa (EC 6.3.2.3) para completar la síntesis de glutatión (Hodgson y Levi, 1994).

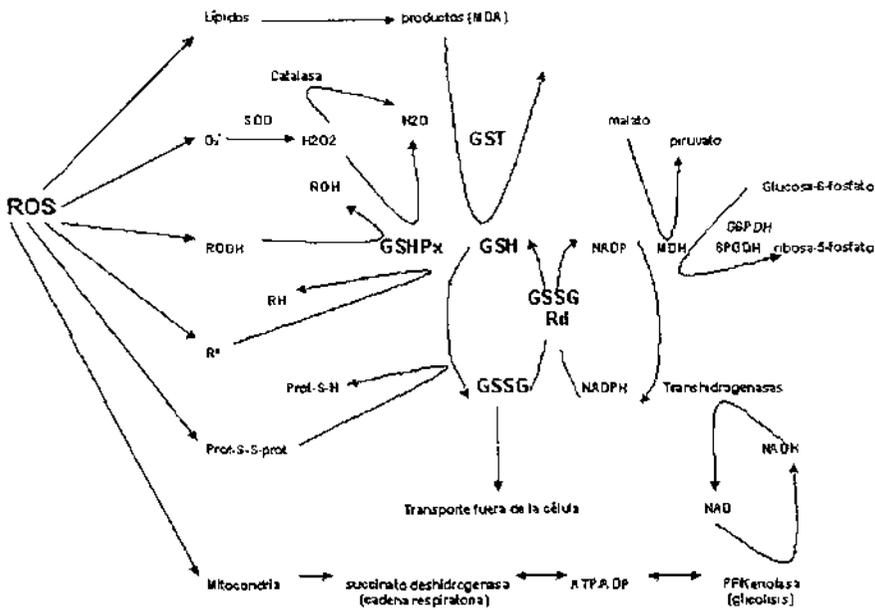


Figura 5. Reacciones en conexión con el Ciclo Redox de Glutatión. Tomado de Ritter *et al.* 1999

### ***Padecimientos asociados a deficiencias de GSH***

Existe un número importante de enfermedades que han sido asociadas al decremento del GSH en los individuos, como lo son las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Bains y Shaw, 1997), además la generación de ROS durante el envejecimiento y producidas en exceso durante el ejercicio disminuyen el contenido de glutatión en los tejidos (Tabla 1).

De acuerdo a Sen (1997) los factores que pueden contribuir a los bajos niveles de GSH son:

- a) Limitada síntesis de GSH.
- b) Elevada utilización de GSH y una pobre reducción de GSSG.

Deficiencias congénitas en la GSH sintetasa son raras, pero han sido reportadas (Sen, 1997). Un factor limitrofe intracelular común de la síntesis, es la disponibilidad del sustrato cisteína. También existe una regulación de GSH por hormonas, y aunque todavía no es claro, se piensa que puede ser debido a una estrategia para preservar la cisteína celular para la síntesis proteica en respuesta al estrés. Una elevada utilización de la molécula que contribuye a los bajos niveles de GSH ocurre al haber exposición a xenobióticos o durante el ejercicio extenuante.

La reducción limitada de GSSG a GSH también disminuye su disponibilidad. La GSSG-Rd requiere un adecuado suplemento de NADPH como cofactor (Salvemini *et al.*, 1999; Préville *et al.*, 1999). Si existe una limitada cantidad de NADPH intracelular, la reducción de GSSG a GSH tan esperada no ocurre, trayendo como consecuencia la acumulación de GSSG y su expulsión de la célula (Sen, 1997).

Tabla 1 Condiciones que son asociadas con el decremento de los niveles de glutatión (Modificado de Sen, 1997).

Condición/especie	Tejido/célula/componente subcelular
VIH + humano	Células mononucleares de sangre periférica Fluido de tejido recubrimiento pulmonar
Hepatitis C humano	Células mononucleares de sangre periférica
Cirrosis Hepática humano	Plasma, eritrocitos
Envenenamiento con acetaminofen ratón	Riñón , hígado
Diabetes tipo II humano	Sangre total
NIDDM humano	Eritrocitos
Tolerancia deteriorada a la glucosa humano	Eritrocitos
Colitis ulcerativa humano	Sangre y tejido colónico
Quemaduras de piel rata y conejo	Tejido epidérmico y mitocondria
Fibrosis idopatótica pulmonar humano	Fluido de tejido recubrimiento pulmonar
Síndrome de insuficiencia respiratoria en adulto humano	Fluido de tejido recubrimiento pulmonar
Malnutrición humano	Eritrocito
Ejercicio físico rata	Hígado, músculo y sangre
Atrofia muscular rata y perro	Músculo esquelético
Envejecimiento ratón	Hígado
humano	Mucosa gástrica y eritrocitos
rata y ratón	Mitocondria de hígado, riñón y cerebro
Hipoxia pennatal humano	Sangre arterial umbilical
Infarto al miocardio humano	Sangre
Citotoxicidad por glutamato humano	Células T
rata	Células neuronales
Muerte celular programada Humano	Células T

VIH+, virus de inmunodeficiencia humana; NIDDM, diabetes melitus no-insulinodependiente

## GLUTATIÓN REDUCTASA

La glutatión reductasa (EC 1.6.4.2) es un miembro de las piridin-nucleotido-disulfuro oxidoreductasas, una familia de flavoenzimas (Schulz *et al.*, 1978), la cual incluye a la tioredoxin reductasa, tippoamida deshidrogenasa, mercurio reductasa y tripanotión reductasa (Carlberg y Mannervik, 1975).

### **Breve historia**

La GSSG-Rd fue estudiada por primera vez en eritrocitos y levaduras por Meldrum y Tarr en 1935. Sin embargo, fue hasta 1951 cuando Mapson y Goddard por una parte, y Conn y Vennesland por otra, hicieron un análisis más detallado de la actividad de la GSSG-Rd en semillas de chícharos y germen de trigo respectivamente. Posteriormente en 1963, Mapson y Isherwood hicieron un estudio sobre las propiedades y naturaleza de la enzima en chícharos germinados (Scandalios, 1997) y la estructura de la GSSG-Rd de eritrocito humano fue ampliamente descrita por Schulz y colaboradores en 1978.

### **Distribución de la GSSG-Rd en la naturaleza**

La enzima esta ampliamente distribuida en bacterias, hongos, plantas, protozoarios y animales pero no es ubicua, ya que no ha sido detectada todavía en eubacterias anaeróbicas y en arqueobacterias. En el caso del protozooario *Trypanosoma sp.* la GSSG-Rd ha sido sustituida por la tripanotión reductasa. Posiblemente otros organismos tengan reductasas de bajo peso molecular capaces de reducir disulfuros que son químicamente relacionados con el glutatión. En la tabla 2 se muestra la distribución de la GSSG-Rd en comparación con algunas enzimas antioxidantes en tejidos de rata.

Tabla 2. Distribución de algunas enzimas en tejidos de rata donde se indica la actividad relativa de la enzima en un peso dado de tejido húmedo. El valor es relativo al tejido más activo el cual se da valor de 100 (Modificado de Dixon y Webb, 1979).

EC <sup>1</sup>	Nombre de la enzima	Hígado	Riñón	Bazo	Corazón	Músculo esquelético	Pulmón	Mucosa gástrica	Intestino delgado	Intestino grueso	Páncreas	Cerebro	Timo	Tiroides	Testículo	Sangre
1.6.4.2	Glutatión reductasa	33	100	-	4	3	-	-	80	-	22	10	-	26	4	-
1.15.1.1	Superóxido dismutasa	100	30	10	9	-	4.5	3	-	-	7	6	2	-	-	18
1.11.1.9	Glutatión Peroxidasa	100	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	43
1.11.1.6	Catalasa	100	78	99	-	4	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-

- Significa que no ha sido determinada la actividad enzimática en ese órgano.

<sup>1</sup> EC y el número correspondiente se refieren a la clasificación enzimática propuesta por la Comisión de Enzimas

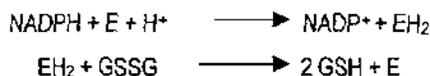
Los órganos y tejidos en los que se ha estudiado su actividad en vertebrados superiores han sido cerebro (Marttila *et al.*, 1988), riñón (Di Ilio *et al.*, 1995), colon, estómago e hígado, (Fuji *et al.*, 2000).

### **Distribución subcelular de la GSSG-Rd**

El GSH y las enzimas asociadas a este como la GSSG-Rd parecen ser sintetizados primariamente en el compartimento citoplasmático de las células, sin embargo no es exclusivo puesto que al estar la célula sometida constantemente a estrés oxidativo en diferentes zonas requiere una amplia variedad de funciones de desintoxicación, protección y funciones fisiológicas en compartimentos tales como el núcleo, la matriz mitocondrial, el retículo endoplásmico cloroplastos y espacios extracelulares y muchas veces se requiere de su transporte extracelular (Taniguchi *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1996).

### **Reacción catalizada por la GSSG-Rd**

La reducción de GSSG a GSH, catalizada por la GSSG-Rd depende de NADPH como cofactor de reducción y procede en dos reacciones tomando lugar cada una en superficies opuestas de la molécula.



E representa la forma oxidada de la enzima con sitio activo en el residuo Cys-58-Cys-63; EH<sub>2</sub> contiene residuos Cys-58 y Cys-63 como ditiol es la forma dos electrones reducida. Ambas formas son bastante estables. EH<sub>2</sub> puede ser producida a partir de E por NADPH o por GSH y se ha pensado que es la forma de la enzima predominante en el interior celular.

### ***Propiedades fisicoquímicas***

Las propiedades más importantes de esta enzima han sido estudiadas en diversos organismos donde además se ha encontrado que no existen grandes diferencias. Un resumen de estas características y su estructura molecular se presentan en la tabla 3 y la figura 6.

### ***Regulación***

En animales parece que la expresión de la GSSG-Rd está regulada en respuesta al estrés oxidativo. Esta regulación tal vez ocurre a nivel de síntesis de GSSG-Rd RNAm o bien en coordinación con la regulación de otros componentes del sistema de defensa contra estrés oxidativo (Mullineaux y Creissen, 1997).

### ***Inducción***

La síntesis de esta enzima puede ser estimulada mediante productos de rompimiento de glucosinatos derivados de las coles de Bruselas. Staack y colaboradores en 1998 demostraron que suministrando en la dieta compuestos como el Iberin, el feniletilisotiocianato (PEITC), el crambene (1-ciano-2-hidroxi-3-buteno) y el indol 3-carbinol (I3C) pueden incrementar la síntesis de GSSG-Rd en ratas y además estos compuestos son considerados como agentes protectores contra el estrés oxidativo. Se piensa que la inducción está regulado por el incremento del GSH debido a que el tratamiento con crambene eleva los niveles de RNAm de la  $\gamma$ -glutamilcistein-ligasa que es una de las enzimas encargadas de la síntesis del GSH y esto también podría estar ocurriendo en el caso de la GSSG-Rd, sin embargo esto es una hipótesis que maneja Staack y colaboradores desde 1998 y aún no queda claro.

Tabla 3. Propiedades de la GSSG-Rd de diferentes orígenes (modificado de Scandalios, 1997)

Origen	Peso molecular de la forma nativa kD	Tamaño de la subunidad kD	pH Óptimo	Afinidad por el sustrato Km (μM) GSSG	Afinidad por el sustrato Km (μM) NADPH	Punto isoeléctrico
<i>Spirulina maxima</i>	177 (T) 94.8 (D)	47	-	120	3.5	4.35
<i>Anabaena sp.</i>	104 (D)	53	9	210	9	4.02
Levadura	120 (D)	60	7.1	55-60	3.8-7.6	-
Huevo de erizo de mar	102 (D)	52	7.2	100	5	-
Hígado de ratón	105 (D)	52.5	7.25	107	5.9	6.5
Chicharo (hojas)	114	55	7.6	56	4.8	4.1-4.8
<i>Arabidopsis</i> (Hoja)	110 (D)	52.7	7.8-8	44	5	4.8
Eritrocitos Humanos	106 (D)	52.5	6.8	65	8.5	-
Eritrocitos de cerdo*	103	-	7	76	21	6.85
Hígado de conejo	108 (D)	59	6.9	58	8	-

D, T, indica si es dímero o tetrámero; \* Tomado de Boggaram, et al, 1978.

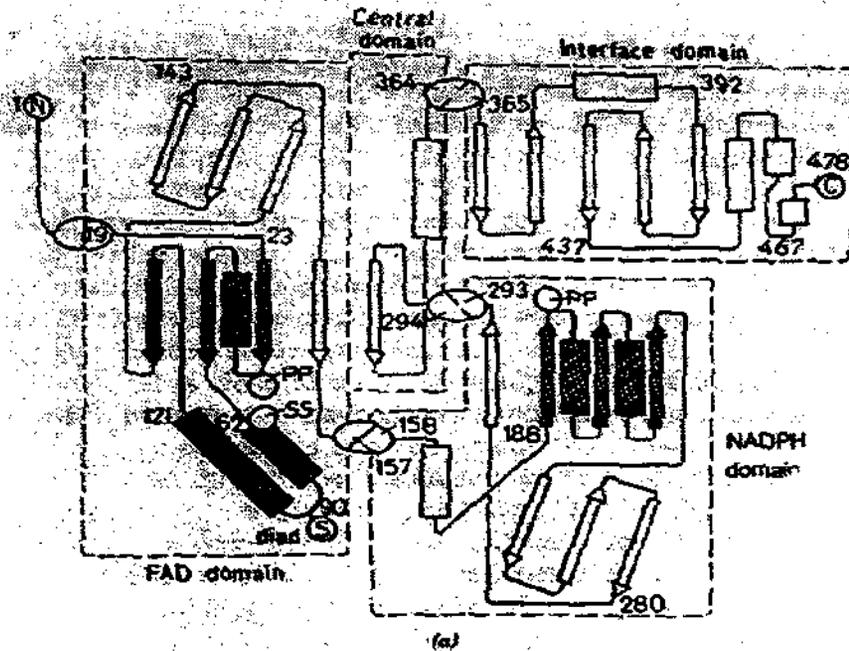


Figura 6. Estructura de la Glutatión reductasa donde los números indican la posición de los residuos de aminoácidos y los óvalos los límites de los dominios. Las zonas con plegamiento tipo  $\beta$  están representadas por flechas, la conformación de hélice esta como rectángulo. Abreviaturas: PP, pirofosfato; SS, el ditiol redox activo Cys-58-Cys-63; S, el azufre del residuo Cys-90 que forma una unión disulfuro con el Cys-90'.

#### Inhibición de la actividad de la GSSG-Rd

Los inhibidores de la GSSG-Rd constituyen una amplia variedad de compuestos químicos como los derivados del arsénico, nitrosauras además de iones de metales pesados, muchos de ellos derivados de la contaminación ambiental generada por industrias. Estos compuestos tienen la capacidad de inactivar a la enzima en su forma reducida  $\text{EH}_2$ . Se ha reportado que los nitrosotioles son inhibidores de la actividad de la glutatión reductasa en sistemas *in vitro* y algunos de los más potentes son los complejos dinitrosil-ditiol-hierro, DNIC por sus siglas en inglés (Keese *et al.* 1997).

En sistemas *in vivo* la actividad de esta enzima también ha sido inhibida por el óxido nítrico (NO) tanto endógeno como exógeno. En un modelo *in vitro* la GSSG-Rd de cerebro de borrego fue inhibida por el ión Cadmio (Acan y Tezcan, 1995).

Zhang y colaboradores en 1997 estudiaron la inhibición de la GSSG-Rd por polifenoles con el fin de entender cómo es que estos compuestos pueden sensibilizar las células de un adenocarcinoma humano de colon a drogas contra el cáncer y descubrieron que el ácido tánico, quercetin, butein y el acacetin exhiben una inhibición no competitiva con la GSSG-Rd en presencia de NADPH. Otra forma de inactivación de esta enzima está asociado con el estrés nitrosativo aunque esto no ha quedado claro (Fujii *et al.* 2000). Otro estudio *in vitro* fue realizado en 1995 por Styblo y Thomas donde encontraron que el arsenotriglutatión, un producto de reacción del arsenato o el arsenito con el glutatión es una mezcla tipo inhibidor de la GSSG-Rd.

#### ***Enfermedades asociadas a la deficiencia de GSSG-Rd***

Se ha observado que pacientes con deficiencias de glutatión reductasa desarrollan tempranamente cataratas. La deficiencia en poblaciones humanas se atribuye a la falta de grupo prostético que es el FAD a su vez debido a una ingesta insuficiente de riboflavina muy común en poblaciones que padecen desnutrición. Sin embargo existe una deficiencia que es rara, descrita en poblaciones hispánicas con un 0.09% de incidencia y 0.6% en poblaciones de Arabia Saudita, y los cambios en la actividad de esta enzima están asociados a varios aspectos clínicos como el decremento en el tiempo de vida de los eritrocitos asociada a una disminución severa en la estabilidad del glutatión en células rojas; o el favismo, que consiste en una crisis hemolítica después de la ingesta de habas; y sordera a temprana edad, siendo esto un fenómeno que aún no queda bien explicado. El desarrollo de cataratas se dice puede ser consecuencia de la acumulación de daño por episodios de estrés oxidativo por una deficiencia en la capacidad de esta enzima para mantener la relación entre GSH y GSSG.

#### ***Indicadores moleculares de estrés químico: la GSSG-Rd como biomarcador***

La actividad de muchas enzimas ha sido empleada como un biomarcador molecular de estrés químico. Muchos compuestos que se encuentran en el ambiente son capaces de inhibir

sistemas enzimáticos y no sólo eso, otros son capaces de inducir muchos sistemas de desintoxicación como por ejemplo las oxidasas y otras proteínas no enzimas como las proteínas de choque térmico, HSP por sus siglas en inglés, que son capaces de proteger a otras enzimas ante una gran variedad de agentes estresantes. El glutatión y las enzimas asociadas a éste como la glutatión reductasa son otro ejemplo y en este caso se ha visto que metales pesados son capaces de alterar la actividad de ambos. Los xenobióticos que contienen metales pesados son producidos e incorporados al ambiente como parte de la actividad industrial principalmente.

Se han establecido tres categorías de marcadores biológicos: los de exposición, que señalan la presencia de una sustancia exógena o el producto de la reacción de un xenobiótico con un blanco celular y que puede ser medido, los de efecto, que son indicadores de alteración bioquímica, fisiológica o genética como resultado de la exposición a un agente xenobiótico, y los de susceptibilidad, que son indicadores de limitaciones para responder ante la exposición a un xenobiótico (NRC,1992).

La glutatión reductasa es una molécula que ha tomado un papel importante como un biomarcador de exposición y efecto, empleándose para evaluar las respuestas de diversos organismos muchos de ellos nativos de una zona contaminada como las almejas y algunos crustáceos en ríos y zonas marinas (Cossu *et al.*, 1997; Brouwer y Brouwer, 1998; Astley *et al.*, 1999; Dandapat *et al.*, 2000), en peces y anfibios como marcador de exposición, efecto y susceptibilidad (Grundy y Storey, 1998; Ploch *et al.* 1999; Vaglio y Landriscina, 1999), y en semillas de vegetales como chícharos y cebada (Edwards, *et al.* 1994; Patra y Panda, 1998) entre otros, evaluados principalmente por métodos enzimáticos.

## EL USO DE UN ANTISUERO POLICLONAL COMO ESTRATEGIA COMPLEMENTARIA EN EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES MOLECULARES

Cuando se introduce a la sangre de un vertebrado una sustancia extraña, habitualmente una molécula del tipo de una proteína o un heteropolisacárido, se producen anticuerpos, proteínas que identifican a la sustancia extraña y la bloquean. Un antígeno representa la sustancia extraña que desencadena la formación de algún anticuerpo, comúnmente se emplean proteínas o péptidos aunque también carbohidratos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas orgánicas (denominadas haptenos) conjugadas con una macromolécula, células o extractos celulares o tisulares pueden ser empleados. Los anticuerpos son proteínas del suero llamadas inmunoglobulinas que tienen capacidad de unión con antígenos específicos (Laguna y Piña, 1977; Harlow y Lane, 1988).

Se sabe desde hace mucho tiempo que muchas enfermedades infecciosas una vez contraídas casi nunca se repiten, es decir que de alguna manera el organismo *recuerda* haberla padecido y vencido al adquirir protección o inmunidad contra ella (Laguna y Piña, 1979; Rojas, 1988). Lo que ocurrió fue que un agente infeccioso (antígeno) produjo un estímulo para la formación de anticuerpos. La primera vez que se produce la respuesta inmunitaria, los anticuerpos tardan algunos días en aparecer y a esto se le conoce como *respuesta primaria* (Golub, 1987). La segunda vez que se introducen los mismos antígenos se obtiene una respuesta secundaria más rápida y con mayor cantidad de anticuerpos demostrando así que se desarrolló una *memoria* para formar anticuerpos (Tizard, 1992). La formación de inmunoglobulinas ante el estímulo de ciertos antígenos es muy específica y los anticuerpos elaborados contra un antígeno tienen poca o ninguna capacidad de reaccionar con cualquier otro antígeno. Esta es la base molecular de la inmunidad y actualmente se emplea como una herramienta para el estudio de muchas moléculas.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas: las IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, de las cuales las más abundantes son las IgG que constituyen el 80% del total además de ser la molécula en la cual se basa la descripción general de las otras. Es la proteína que se forma en mayor cantidad durante la respuesta secundaria y por ello es la que más se emplea como herramienta de estudio al obtener las fracciones de IgG de un antisuero policlonal.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales de acuerdo al grado de afinidad contra un antígeno en particular, en el caso de los monoclonales se emplea, como esta implícito en su nombre, un anticuerpo que será clonado con el fin de disminuir el riesgo de una reacción no deseada, mientras que el segundo caso presenta también afinidad por el antígeno pero existe una posibilidad de darse una reacción cruzada no deseada

La primer consideración antes de emplearlos en cualquier estudio es el fin que se les dará, los anticuerpos policlonales son particularmente valorados para la inmunoprecipitación y la inmunolocalización en tejidos, técnicas ampliamente socorridas en el estudio de diversas proteínas y enzimas, en tanto que los monoclonales son empleados al necesitar de mayor especificidad en la detección, como por ejemplo de sitios de unión específicos (Ausubel *et al.* 2000).

La cantidad de anticuerpo también debe ser valorada y los antisueros son una opción adecuada cuando se requieren grandes cantidades de anticuerpos policlonales ellos, ya que pueden ser obtenidos en grandes volúmenes a partir de un solo conejo o de muchas ratas o ratones genéticamente idénticos. A diferencia, los anticuerpos monoclonales son producidos en menor volumen en clones de hibridomas, es decir células somáticas híbridas de células tipo B del bazo de un animal inmunizado y de mielomas de los cuales se puede realizar la producción de las inmunoglobulinas monoclonales. Esta es una metodología que tiene la ventaja de ser muy específica pero su inconveniente es que es larga, complicada y cara.

La mayoría de los estudios sobre la GSSG-Rd se basan en la estimación de su actividad a través de métodos bioquímicos. En estos casos no se puede saber si el cambio de actividad se debió a una disminución o aumento en la síntesis de la proteína. Para ello se requiere utilizar otro tipo de ensayos como sería el uso de la técnica *Westernblott* empleando anticuerpos para revelar la presencia y la cantidad de la enzima en los tejidos.

## XENOBIÓTICOS Y ENZIMAS QUE LOS METABOLIZAN

Los xenobióticos son definidos como compuestos químicos derivados de fuentes no biológicas como por ejemplo medicamentos o contaminantes, y pueden hacer que las enzimas que los metabolizan sean modificadas. Estos compuestos pueden producir: a) la inducción de la expresión de la enzima, b) la represión de la expresión de la enzima, c) la activación directa de la función enzimática y d) la inhibición directa de la función enzimática (Oesch y Arand, 1999).

En el sentido estricto el término inducción se refiere a un incremento en la cantidad del producto del gen debido a una tasa elevada de transcripción. Este término es a menudo empleado para describir cualquier proceso que eventualmente lleva a un incremento en la concentración de la enzima en el tejido blanco. También se ha considerado dentro de esta definición que este proceso implica una mayor estabilidad en la proteína o el RNAm. La inducción de enzimas metabolizantes de xenobióticos es a menudo más pronunciada en el hígado pero no se restringe sólo a este órgano. También se ha observado un incremento en riñón, intestino, pulmón, cerebro, piel y placenta. Otro aspecto interesante es que el incremento en los niveles de enzimas metabolizantes lleva a una tolerancia hacia el xenobiótico (Oesch y Arand, 1999).

Por otra parte la represión de la expresión de enzimas metabolizantes de xenobióticos ha sido menos observada pero es también de gran importancia. Algunas veces la inducción de un grupo de enzimas que se encargan de metabolizar drogas depende de la expresión de otro paquete de estas enzimas. Ejemplo de ello es que varias citocinas como la interleucina  $1\beta$ , la interleucina 6, y el interferon  $\gamma$ , regulan la expresión de isoenzimas de la familia de los citocromos.

La inhibición de la actividad de la enzima puede deberse a la interacción directa con la enzima, que en determinados casos puede llevar a la inhibición de isoenzimas específicas, o por una disminución del cofactor que afecta a un grupo de enzimas. Finalmente la activación de estas enzimas puede deberse a la interacción directa del agente con la proteína.

### **Xenobióticos, metales, metaloides y generación de ROS**

Algunos xenobióticos como es el caso del fenobarbital (FB) y de la  $\beta$ -naftoflavona (BNF), un flavonoide cuyo peso es de 272.30 y que también es conocido como 5,6-benzoflavona (Ashida *et al.*, 2000), son capaces de inducir enzimas de fase I y II como los citocromos P450 1A y las GST. Estos compuestos tienen la capacidad de incrementar varias veces los niveles de las enzimas mencionadas, y existen trabajos que emplean a la BNF para inducir a estas enzimas (Novi, *et al.*, 1998).

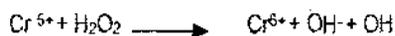
Los iones de metales pueden promover la producción intracelular de ROS de diferentes maneras. Al parecer los más potentes generadores de estas moléculas reactivas son los metales de transición que son capaces de modificar su configuración electrónica bajo condiciones biológicas. Muchos de estos metales son cofactores esenciales de muchos complejos enzimáticos, pero a veces pueden jugar el papel de pro-oxidantes.

La toxicidad de un metal no se restringe a un sólo tejido pues a menudo ocurre que varios tejidos se ven afectados por la presencia anormal de un metal y es claro que algunos órganos son más vulnerables. El sistema nervioso y los riñones, por diferentes razones son más vulnerables que otros de órganos a este tipo de daño. Por un lado los riñones, encargados de la filtración y producción tubular de la orina puede llevar a concentrar y precipitar metales. En el cerebro ocurre que al bajar los niveles en los sistemas enzimáticos de protección contra el estrés oxidativo puede haber una propagación de eventos peroxidativos que modifiquen la actividad de éste órgano por daño a lípidos o a la mielina (Bains y Shaw, 1997).

Los metales como el cromo y metaloides como el arsénico tienen una capacidad citotóxica que involucra una variedad de anomalías bioquímicas y fisiológicas siendo la formación excesiva de ROS una de ellas. Algunos metales de transición pueden inducir estrés oxidativo al cambiar de configuración electrónica cuando donan o reciben electrones ya que algunos de ellos son cofactores de muchas enzimas y de proteínas de transporte (Bondy, 1997).

## Cromo

El cromo (Cr) es un elemento de la tabla periódica del grupo VI B, su peso atómico es de 52 y su número atómico es 24. Se considera como un elemento esencial para lograr un metabolismo normal de la glucosa en la dieta de animales. El cromo tiene múltiples estados de oxidación: Cr<sup>6+</sup>, Cr<sup>5+</sup>, Cr<sup>3+</sup>. Éste último es el estado más estable. Ejemplos de compuestos del cromo Cr<sup>6+</sup> son el cromato de sodio (Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) y el dicromato (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), que pertenecen a las especies del y los cloruros como el CrCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CrCl<sub>6</sub>, pertenecientes al grupo Cr<sup>5+</sup> y pueden reaccionar aparentemente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar radical hidroxilo (OH)



El Cr<sup>6+</sup> puede ser reducido a Cr<sup>5+</sup> por el ascorbato, además del GSH y otros sistemas reductores celulares, generando GS<sup>•</sup> y radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) entre otros. Los cromatos parecen entrar a través del sistema de transporte del sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Se sabe que el cromo ha sido tóxico, carcinogénico y mutagénico en animales expuestos y trabajadores expuestos durante su labor en la industria del cromado. Es probable que la reducción del Cr<sup>6+</sup> seguida de la generación de OH dañe al DNA contribuyendo a la carcinogénesis. Otro radical que puede ser generado por la reacción de Cr<sup>2+</sup> con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el ·OH (Halliwell y Gutteridge, 1999).

## Arsénico

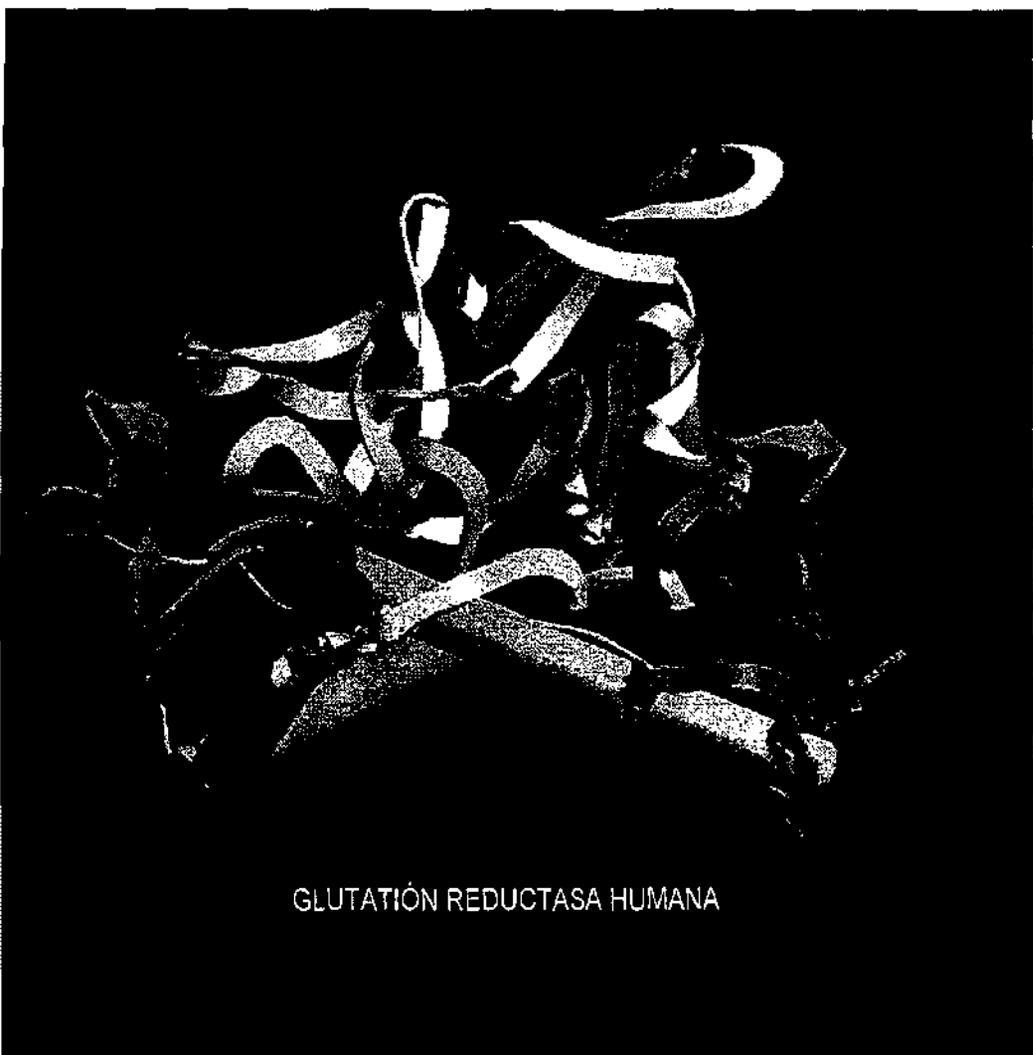
El arsénico (As) es un elemento del grupo V A de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico es 74.9. Los estados de oxidación son el As<sup>-3</sup>, <sup>-3</sup> y <sup>+5</sup>, siendo la arsina un ejemplo de compuesto del primer estado. De los otros existe una gran variedad de compuestos trivalentes como los arsenitos y los pentavalentes como los arsenatos siendo las formas más tóxicas los primeros (Rudel *et al.*, 1996).

Este elemento es un metaloide, pero muchas de sus propiedades parecen más bien de un metal pesado. Por sus propiedades químicas es capaz de reaccionar con los residuos sulfidrilos de las proteínas (Leonard y Gerber, 1994), teniendo como consecuencia la inhibición o el cambio de la actividad de la proteína.

Otros estudios mencionan que puede haber genotoxicidad, acumulación y aumento en los niveles de oxidación considerables por exposición a arsénico inorgánico y arsenitos (Tabacova, *et al.* 1996; Concha *et al.* 1998).

El arsénico orgánico se encuentra rara vez en la naturaleza, a menudo esta presente formando compuestos con el cobre, zinc y plomo, por lo que su obtención a menudo requiere de procesos de purificación. El arsénico elemental tiene un papel importante como componente especial de algunas aleaciones con el cobre y el plomo. Entre los usos que tiene este compuesto está principalmente la fabricación de vidrios, la purificación de soluciones electrolíticas con el fin de producir zinc electrolítico, etcétera. Arsenatos de zinc, cromo y cobre son empleados como preservativos de madera, los cuales son un problema cuando se queman. En la agricultura y la actividad forestal los arsénicos orgánicos e inorgánicos son empleados como pesticidas y herbicidas aunque esta actividad ha declinado en los últimos años en todo el mundo o su uso se va restringiendo cada vez más. El ácido arsenilico se usa como aditivo de alimentos. En la industria de electrónicos se emplean formas arsenicales de galio o de indio. Otros usos se relacionan con la industria farmacéutica y como catalizadores.

Desde 1990 se ha planteado una teoría sobre la carcinogénesis del arsénico y en ella se habla del arsénico como un agente que genera estrés oxidativo. Yamanaka y colaboradores en 1990 desarrollaron la primera teoría de la carcinogénesis del arsénico por estrés oxidativo donde se incluía una probable vía metabólica. Otros estudios mencionan que el arsenito, una de las formas más tóxicas del arsénico, incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, siendo a su vez antagonizado este efecto por la adición de enzimas antioxidantes SOD y CAT (Nordenson y Beckman, 1991). Estos y otros resultados sugieren que algunos efectos del arsénico sobre el DNA son mediados vía radicales libres (Kitchin, 2001).



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un científico enfrenta a diario problemas en campo y en laboratorio y en ocasiones los estudios se ven entorpecidos por la falta de una herramienta de estudio conveniente para el modelo que estudia, aunque otras veces ni siquiera existe. Por esa razón a diario se trata de implementar o hacer mejoras en las técnicas y métodos de estudio.

Comúnmente muchos organismos entre ellos el humano se encuentran sometidos a condiciones ambientales generadas por la actividad humana que pueden perturbar su condición normal y generar un estrés químico en ocasiones con consecuencias graves. El estudio de los marcadores moleculares como la GSSG-Rd, tiene un papel importante en la investigación del estrés oxidativo, además existen diversos xenobióticos que tienen la capacidad de alterar estos mecanismos de defensa y por consiguiente los ciclos que regulan. La importancia de estudiar a esta enzima radica en la importancia que tiene el mantenimiento del glutatión intracelular. El GSH tiene un papel en la transducción y regulación molecular de la fisiología de la célula (Voehringer, 1999). Así que los cambios en la actividad enzimática de la GSSG-Rd pueden alterar el equilibrio en el estado redox promoviendo alteraciones celulares que se reflejan finalmente en el desarrollo de enfermedades.

Debido al importante papel que juega la GSSG-Rd al modular los niveles de GSH/GSSG para amortiguar el efecto deletéreo del estrés oxidativo, surge el interés de contar con un antisuero policlonal que sea la base de un método de estudio diferente al bioquímico clásico, que permita estudiar sus cambios en respuesta al estrés oxidativo inducido en condiciones de laboratorio. Ello permitiría evaluar de otra manera a esta enzima como parámetro y así discutir su utilidad como marcador biológico.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

# IV. HIPÓTESIS

#### IV. HIPÓTESIS

1) Siendo la GSSG-Rd una enzima altamente conservada en la mayoría de los organismos aeróbicos, un antisuero generado contra la enzima purificada de levadura tendrá la capacidad de reconocer a la proteína equivalente en muestras de diversas especies de organismos sometidos a la acción de xenobióticos inductores de estrés oxidativo.

2) Si la inducción de ROS por xenobióticos incrementa los niveles de GSSG con ello también la presencia de la GSSG-Rd que podrá conocerse en *westernblotts* de los tejidos blanco.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## V. OBJETIVOS

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

Estudiar a la enzima GSSG-Rd en condiciones de estrés oxidativo mediante un antisuero policlonal.

Determinar la utilidad del antisuero para la detección de la enzima GSSG-Rd en diferentes especies.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Generar un antisuero contra la enzima GSSG-Rd en conejos para usarlo en su detección en *westernblots* de tejidos tratados con inductores de ROS.

Conocer los cambios de la GSSG-Rd en tejidos de los modelos *Procambarus clarkii*, ratones cepa Balb/C, ratas Wistar, y hepatocitos fetales humanos de la línea WRL-68 tratados con agentes generadores de estrés oxidativo.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## VI. MATERIAL Y MÉTODO

## **VI. MATERIAL Y MÉTODO**

### ***Generación del antisuero***

A intervalos de 2-3 semanas se inyectaron 200, 150 y 100  $\mu\text{g}$  de GSSG-Rd purificada de levadura (SIGMA) a conejos New Zeland usando adyuvante completo de Freund (CFA por sus siglas en inglés) para la primera inmunización e incompleto (IFA por sus siglas en inglés) para las subsecuentes. Estas dosis fueron aplicadas después de un calculo basado en las recomendaciones de Harlow y Lane (1988). Previo a la inmunización se sangraron los animales para obtener el suero control. Tres semanas después de la tercera inmunización se sangraron nuevamente y el suero fue preparado como se describe a continuación.

### ***Preparación del antisuero***

De acuerdo a Harlow y Lane (1988) y Ausubel y colaboradores (2000) la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante 4 horas aunque también se hizo dejando toda la noche a 4° C. El suero se decantó y transfirió a tubos de centrifuga de 15 ml. Para remover células sanguíneas y otros materiales que quedaron después de la separación se centrifugó el suero durante 10 minutos a 2700 g, en una centrifuga IEC Centra MP4 a 4° C guardando el sobrenadante. Este se alicuotó en tubos Eppendorf en volúmenes de 500  $\mu\text{l}$  los cuales se etiquetaron y almacenaron a -20°C.

### ***Determinación de la afinidad por ELISA***

El antígeno se diluyó en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 de tal manera que se usan 100  $\mu\text{l}$ /pozo de la solución del antígeno. Se sensibilizaron las placas de ELISA con 100 $\mu\text{l}$  de la solución a 37° C por una hora. Transcurrido este tiempo se hicieron lavados con 150  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween 20 0.03% en cada pozo por cuatro veces. Se uso una dilución 1:50 del antisuero en solución amortiguadora PBS-Tween 0.05%, BSA 3%. Se agregaron nuevamente 100  $\mu\text{l}$ /pozo de esta solución incubando a 37° C por una hora. Se hicieron 4 lavados nuevamente y enseguida se incubaron 100  $\mu\text{l}$ /pozo del anticuerpo secundario acoplado a

peroxidasa a una dilución 1:2000 a 37° C por media hora. Se reveló con 100 µl de OPD (o-fenilenediamina) parando la reacción con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N.

### ***Cultivo de hepatocitos fetales humanos (WRL-68)***

Para la estudiar a la GSSG-Rd bajo condiciones de estrés oxidativo, se emplearon hepatocitos fetales de la línea WRL-68. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de esterilidad con medio DMEM (SIGMA) pH 7.4 suplementado con aminoácidos no esenciales, 8% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos que contenía estreptomycin y penicilina (Gibco). Las células se sembraron en cajas de cultivo de 200 ml de capacidad bajo una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C en una incubadora Lab-Line modelo 322 (Lab-Line Instruments). De acuerdo a Gutierrez-Ruiz y colaboradores (1994) se hicieron recambios de medio cada tercer día, lavando medio restante con PBS estéril pH 7.4 y adicionando medio reciente hasta el momento en que se alcanzó la confluencia.

### ***Generación de estrés oxidativo***

La generación de estrés oxidativo se realizó sometiendo a las células en medio que contenía NaAsO<sub>2</sub> 1x10<sup>-9</sup> y 1x10<sup>-5</sup> M y monometil arsénico (MMA) y dimetil arsénico (DMA) a concentración de 1x10<sup>-6</sup> M. Las soluciones se prepararon justo antes de iniciar el tratamiento para evitar la oxidación del arsénico. La exposición fue durante tres horas. Pasado este tiempo se desechó el medio con el agente inductor de estrés y se hicieron lavados usando PBS pH 7.4 dos veces manteniendo todo en frío. Después se agregó 1 ml de dicha solución amortiguadora y se rasparon las células con ayuda de un rastrillo de plástico. Las células se depositaron en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1350g por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en lo que quedó de PBS en el tubo. Se tomó una alícuota de 20 µl para registrar la viabilidad. Se adicionó al resto de la muestra solución de lisis solución amortiguadora de fosfatos 50 mM con Tritón al 1% pH 7 y se lisó con ayuda de una jeringa. Se adicionaron inhibidores de proteasas y se guardaron todas las muestras a -70° C.

Se trataron ratas Wistar machos usando FB y BNF, que son conocidos agentes inductores de estrés oxidativo. Durante los primeros tres días se administraron a las ratas 60 mg/kg de FB, al tercer día se administraron 80 mg/kg de BNF, al cuarto día se suministraron 30 mg/kg de peso de FB usando aceite de maíz como vehículo, para que finalmente, al quinto día se sacrificaran las ratas y se les extrajeran los hígados. De los hígados se obtuvieron las fracciones microsomales, que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Un grupo de 10 acociles *Procambarus clarkii* fue expuesto a  $200\ \mu\text{g/l}$  de dicromato de potasio durante 12 horas. Se sacrificaron y se les extrajo el hepatopáncreas que fue homogenizado para ser almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para las muestras de ratones se usaron ratones machos de la cepa Balb/c, a los cuales se les administró oralmente arsenito de sodio a una dosis de 10 mg/kg de peso, durante 20 días. Después del tratamiento los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el hígado, riñón y pulmones, que fueron homogenizados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Determinación de la concentración de proteínas**

Previo a la electroforesis, las muestras de homogenizados de tejidos se analizaron por el Método de Bradford. La determinación se hizo basándose en la unión del colorante azul brillante de Coomassie a las proteínas desconocidas de una muestra de  $0.5\text{-}1\ \mu\text{l}$  de tejido homogenizado y comparando esta unión a cantidades diferentes de una proteína estándar, como lo es la albumina (BSA), a una concentración de  $0.5\ \text{mg/ml}$ . Se hicieron duplicados de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y  $35\ \mu\text{l}$  del stock de BSA y se diluyó llevando a  $100\ \mu\text{l}$  con  $0.15\ \text{M}$  de NaCl en tubos Eppendorf, colocando también  $100\ \mu\text{l}$  de la solución de NaCl para usar como blanco. Posteriormente se adicionó 1 ml de colorante de Bradford (BIORAD). Se agitó moderadamente en un vórtex Gennie 2 (Daigger and Co., Inc.). Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a  $595\ \text{nm}$  en una cubeta de cuarzo de 1 ml de capacidad en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Los valores de absorbancia de la proteína se emplearon para hacer la curva estándar en el programa de análisis de datos INPLOT. Los valores de absorbancia de las muestras de proteína desconocidas se metieron a la curva para calcular la cantidad de proteína.

### ***Electroforesis de proteínas***

Se colocaron 70 µg de tejido homogenizado en cada carril. Como control se empleó a la GSSG-Rd purificada de levadura (SIGMA) y en un solo caso se empleó a la GSSG-Rd purificada de intestino de bovino (SIGMA). Las muestras tratadas se analizaron a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) modificada usando un gel de separación al 10%, corriendo a 100 volts por una hora. Los geles se tñieron con una solución de azul de Coomassie durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo de tinción el gel se cambió a una solución desteñidora con 30% de metanol, 50% de agua y 20% de ácido acético, haciendo recambios cada 4 horas hasta que las bandas eran claramente visibles y finalmente se conservaron en agua para ser fotografiados.

### ***Westernblott***

Con el objetivo de detectar la GSSG-Rd con el antisuero policlonal generado, las proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham) durante 1.5 horas a 100 volts. Después de la transferencia los sitios de unión no específicos en la membrana se bloquearon con una solución de leche en polvo al 5% peso/vol en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 en agitación constante durante toda la noche a 4° C. Después se incubó la membrana por dos horas a temperatura ambiente y posteriormente fue lavada con TBS (solución amortiguadora de sales de Tris) tres periodos de 5 minutos cada uno y luego con otros dos periodos con TBST (solución amortiguadora de sales de tris con Tween 20) de 10 minutos, para finalmente dar un solo lavado con TBS por 10 minutos. Posteriormente se incubó la membrana con el antisuero generado diluido en PBS, leche en polvo 1% y BSA 1% en dilución 1:200 por dos horas a temperatura ambiente en agitación moderada. Una vez transcurrido el tiempo se lavó con PBS por dos periodos cada uno de 5 minutos e inmediatamente se dejó incubando con el anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:2000 en PBS, leche en polvo 1% y BSA al 1%) durante dos horas a temperatura ambiente, después de un ligero lavado con PBS, se reveló con diaminobenzidina hasta que las bandas aparecieron. Finalmente las membranas fueron fotografiadas.

### **Análisis estadístico**

La afinidad registrada del antisuero policlonal fue evaluada con la prueba de ELISA, a los resultados obtenidos de este ensayo se les aplicó una prueba de *t de Student* para determinar diferencias significativas entre los promedios, con una  $p < 0.001$  es decir 99.9 % de confianza (Zar, 1984).



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## VII. RESULTADOS

## VII. RESULTADOS

La comparación de los promedios de absorbancia se muestra en la tabla 4, y representa el promedio de absorbancia de 2 experimentos  $\pm$  desviación estándar, el análisis estadístico demostró la existencia de diferencias significativas entre la afinidad del suero control y el antisuero contra la GSSG-Rd ( $t= 55$ ,  $P<0.001$ ).

Un aspecto importante es que el antisuero generado tuvo la capacidad de reconocer no sólo a la GSSG-Rd de levadura contra la que fue generado sino además a la enzima en otras especies. En la figura 7 y 8 se muestra la electroforesis y el *westernblott* de microsomas de hígado de rata y de lisado de hepatocitos de la línea WRL-68 tratados con MMA y DMA a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M. En la electroforesis (fig. 7) se pueden observar las bandas del control representado por la GSSG-Rd de levadura, la cual fue empleada en la generación del antisuero, también se observa a la misma enzima purificada de intestino de bovino adquirida comercialmente y usada como control positivo, y de muestras de microsomas de hígado de rata tratadas con FB y BNF. Es notorio un incremento en la cantidad de proteína después del tratamiento con FB y BNF, lo cual permite sospechar la inducción de GSSG-Rd. También en la figura 8 se pueden observar los cambios en la GSSG-Rd después del tratamiento con MMA y DMA respecto al control, aparentemente el MMA es un inductor de esta enzima y el DMA parece inhibir la síntesis de esta. La reactividad del antisuero fue en bandas de un peso molecular de  $\approx 50$  kD aunque en esta figura 9 se hace evidente la afinidad por otra banda que está ubicada en los  $\approx 55$  kD.

Tabla 4. Valores promedio de absorbancia del antisuero control y el antisuero contra la GSSG-Rd de levadura.

Grupo	n	promedio	Desviación estándar
control	10	0.083	$\pm 0.009$
experimental	10	0.308	$\pm 0.042$



Figura 7. Electroforesis de muestras de microsomas de rata tratados con  $\beta$ -Naftoflavona como inductor de estrés oxidativo. Las flechas indican la ubicación de la GSSG-Rd. **MPM**, marcador de peso molecular; **CFB-BNF** control Fenobarbital y  $\beta$ -Naftoflavona; **FB-BNF**, tratamiento; **GSSG-Rd**: glutatión reductasa de bovino y levadura controles.



Figura 8. Detección de la glutatión reductasa en microsomas de hígado de rata tratados con FB-BNF y en hepatocitos humanos WRL-68 tratadas con mono y dimetil arsérico usando el antisuero policlonal, el peso molecular corresponde a los 50 kD

También se logró detectar esta enzima en homogeneizados de hepatopáncreas de *Procambarus clarkii* donde el antisuero presentó afinidad por las bandas de un peso peso de 50 kD (Figura 9). Cabe mencionar que las bandas no están muy definidas y es muy posible que en estas muestras la proteína haya estado degradada, por esa razón no se puede determinar si existen diferencias en la cantidad de proteína por efecto del tratamiento con dicromato de potasio.

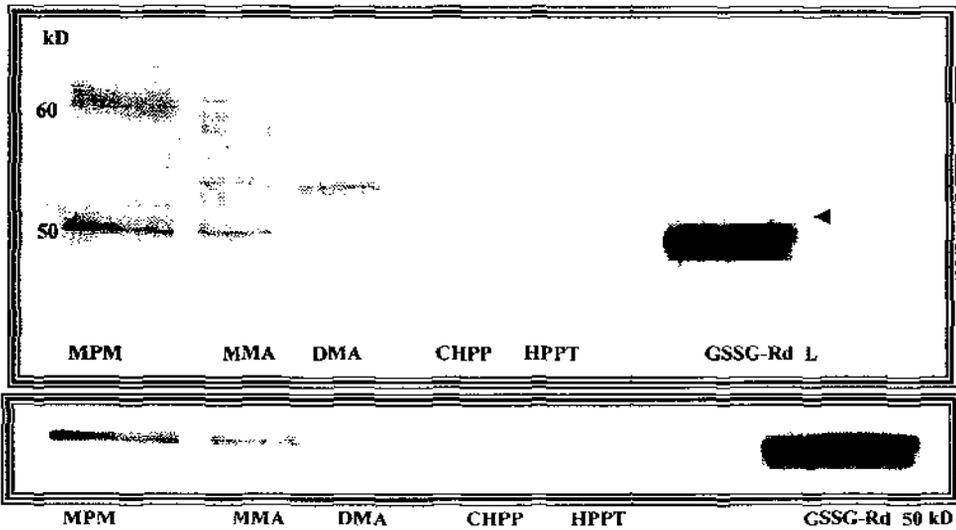


Figura 9 *Westernblot* de muestras tratadas con diversos agentes que inducen estrés oxidativo. MMA y DMA monometil y dimetil arsénico respectivamente en células WRL-68 a concentración de  $1 \times 10^{-5}$ ; CHPP, control hepatopáncreas; HPPT hepatopáncreas de *P. clarkii* tratados con cromo; GSSG-Rd L, glutatión reductasa de levadura usada como control

En la figura 10 se muestra el *westernblot* de muestras de varios órganos de ratón tratados con arsenito de sodio y se puede observar la detección de la enzima con un peso molecular aproximado de 50 kD. Se aprecia la diferencia entre la cantidad de enzima en la muestra de tejido control y la de tratamiento en riñón y pulmón indicando una probable inducción de la enzima por efecto del compuesto. En hígado no aprecia una diferencia en la presencia de la enzima. Por otra parte también se muestra la reactividad cruzada no deseada con proteínas de un peso molecular aproximado de 24.7 kD y otras por debajo de este peso. Aproximadamente en los 55 kD se encuentran otras bandas de proteínas no deseadas. El peso molecular reportado para la glutatión reductasa de ratón en la literatura es de 50 kD siendo este dato un criterio para descartar proteínas con reactividad no deseada.

Finalmente en la figura 11 se observa la disminución en la presencia de GSSG-Rd en hepatocitos de la línea WRL-68 a concentraciones de  $1 \times 10^{-9}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M. Los resultados obtenidos después de tres repeticiones muestran que existe una probable inhibición de la síntesis de la enzima.

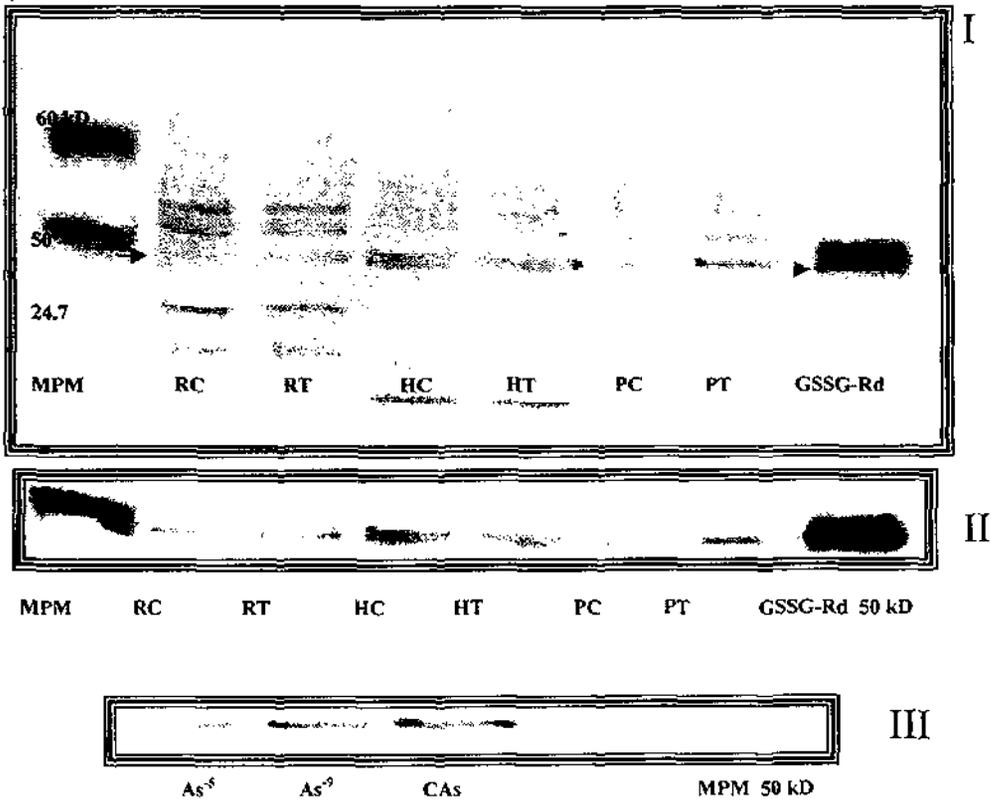


Figura 10. Cuadro I y II. *Westernblott* de órganos de ratón tratados con  $NaAsO_2$  a una dosis de 10 mg/Kg de peso, por 20 días. RC y RT, riñón control y tratado; HC y HT, hígado control y tratado; PC y PT, pulmón control y tratado respectivamente. GSSG-Rd es la glutatión reductasa usada como control

Figura 11. Cuadro III.  $As^{-5}$  = WRL-68 tratadas con  $1 \times 10^{-5}$  de arsenito de sodio ( $NaAsO_2$ ),  $As^{-9}$  = WRL-68 tratadas con  $1 \times 10^{-9}$  de  $NaAsO_2$ ; CA =  $NaAsO_2$  control y MPM = marcador de peso molecular.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## VIII. DISCUSIÓN

## VIII. DISCUSIÓN

El desarrollo de estrategias como la que se ha descrito aquí constituyen herramientas para realizar biomonitoreos ambientales. Landis y Yu en 1995 mencionan que los estudios de un biomonitoreo ordenado pueden ser en varios niveles: bioacumulación, biotransformación, biodegradación, monitoreo bioquímico, monitoreo fisiológico y conductual, parámetros de población, parámetros de comunidad y por último efectos en el ecosistema y por su carácter, el presente trabajo podría ser considerado dentro del nivel de monitoreo bioquímico y como una herramienta de estudio. Nuevos métodos que permitan estudiar los cambios a nivel enzimático de un sistema son herramientas indispensables para dilucidar el efecto posible de un agente xenobiótico. En el presente trabajo se logró desarrollar una estrategia que permite estudiar los cambios en la glutatión reductasa al tratar células, tejidos u organismos con agentes inductores de estrés oxidativo.

Gutterer y colaboradores en 1999 desarrollaron un antisuero contra glutatión reductasa de cerebro de bovino y de acuerdo a su diseño experimental ellos consideraron analizar sus muestras de tejido homogenizado por SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes, esto fue porque consideraron que la elevada temperatura o el uso del  $\beta$ -mercaptoetanol podrían ser capaces de generar un daño químico a las zonas de la proteína que pudieran funcionar como epitopes. En el presente trabajo se hicieron análisis de proteínas por SDS-PAGE bajo condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes logrando en ambas la detección esperada. Cabe mencionar que en las muestras analizadas bajo condiciones no desnaturizantes las muestras tuvieron poca movilidad en el gel y las bandas no quedaron bien definidas lo cual dificultó la visualización de la enzima y por tanto el peso molecular no se estimó adecuadamente.

En la figura 8 se muestran la GSSG-Rd detectada en tres especies de organismos. Un aspecto interesante en este punto es la detección de GSSG-Rd en microsomas de hígado de rata control y tratados con FB y BNF. Fujii *et al.* (2000), reportaron que en microsomas de hígado de rata tratadas con nitrosotioles, generadores de estrés oxidativo, no hay glutatión reductasa usando 40  $\mu$ g de esta fracción. En este trabajo se encontró glutatión reductasa en

70µg de microsomas de hígado de rata tratados con FB y BNF. Estos compuestos son generadores de estrés oxidativo e inductores de enzimas de fase I y II y como se esperaba al estar sometido el tejido a agentes estresantes como éstos, los niveles en su sistema de defensa antioxidante, particularmente la glutatión reductasa del sistema GSH, se incrementó lo cual se observa en la electroforesis y en el *westernblott* respecto al control (Figs. 7 y 8).

Mullineaux y Cressen (1997) mencionan que en muchos casos la reactividad cruzada de anticuerpos policlorales contra GSSG-Rd de diferentes especies en plantas no se da y ello demuestra que realmente existen diferencias notables en la enzima interespecies. Sin embargo en el presente estudio, el antisuero policlonal generado usando glutatión reductasa de levadura fue capaz de reconocer no sólo a la enzima purificada de este hongo, sino también a la de tejidos provenientes de ratón, rata, humano, y acocil confirmando que la enzima esta altamente conservada en estos organismos. Hay que mencionar además que la enzima puede presentar cambios después de ser purificada y que en plantas existen varias isoformas cuyas diferencias sean muy notorias.

La figura 9 muestra el *westernblott* de muestras de homogenizado de hepatopáncreas de acocil tratado con una dosis de 200 µl dicromato de potasio. El peso molecular aproximado de la enzima proveniente de levadura esta entre los ≈50-60 kD en forma de dímero y de las muestras analizadas de *P. clarkii* se encontró inmunoreactividad con proteínas de un peso aproximado de 50 kD, siendo este último un dato que no había sido registrado con anterioridad. No se logró observar una diferencia por efecto del tratamiento con dicromato de potasio entre el control y el tratamiento, además las bandas son muy tenues y esto indica que las proteínas de esas muestras estaban degradadas pues habían sido almacenadas durante algunos mese. A este aspecto se debe considerar la posibilidad de un cambio en actividad enzimática y el estado físico de la GSSG-Rd al haber sido almacenadas las muestras durante un periodo largo de tiempo. Józwik y colaboradores en 1997 demostraron que la GSSG-Rd de sangre almacenada pierde significativamente su actividad a partir del día doce de almacenamiento y esta disminución puede estar relacionada con la degradación de las enzimas durante este proceso. Como se ha mencionado en el caso de las muestras de *P. clarkii* hubo una detección muy baja de la enzima y es muy posible que después de varios meses de almacenamiento las enzimas se hayan degradado y por tanto la cantidad de proteína detectada fue menor.

Sería muy interesante repetir estos experimentos pues el acocil *P. clarkii* es un modelo que puede ser empleado como organismo centinela y de existir un cambio en la GSSG-Rd se podría monitorear zonas donde se sospecha la existencia de contaminantes derivados del cromo. Estudios posteriores se deberán realizar con muestras recientes.

Ye y colaboradores (1997) desarrollaron un método para detectar GSSG-Rd basado en el SDS-PAGE y usando para ténir DTNB [5, 5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)] y DCIP (diclorofenolindofenol) y NBT (nitroazul de tetrazolio). El DTNB tiene la capacidad de inhibir la respuesta enzimática de proteínas dependientes de NADPH a excepción de la GSSG-Rd, logrando una buena detección y cuantificación de la enzima, sin embargo ellos no dejan de considerar que, debido a su alta grado de homología, la TR pudo haber sido detectada también. A pesar de ello consideran que su método de estudio es mucho más específico que otros existentes hasta esa fecha. Uno de lo inconvenientes que puede existir en este método es la reacción cruzada no deseada con otras proteínas diferentes de la glutatión reductasa. Se piensa que bajo condiciones desnaturalizantes quizá algunas zonas de otras proteínas quedan expuestas y estas tengan un gran parecido con las zonas que funcionan como epítopes en la GSSG-Rd. Antecedentes bibliográficos demuestran que la tioredoxin reductasa y la glutatión reductasa son enzimas altamente conservadas en bacterias, hongos y mamíferos, y se ha reportado un 33% de similitud entre la TR de *Drosophila melanogaster* y la GSSG-Rd de humano (Kanzok, et al., 2001). Interesante es que la TR también tiene la capacidad de reducir al GSSG bajo algunas condiciones, además de tener una alta afinidad por el NADPH como cofactor, así que la idea de que exista reacción cruzada en las muestras analizadas durante este trabajo no puede ser descartada, y una cuestión importante que queda es si dentro de esas zonas altamente conservadas se encuentran los aminoácidos que funcionan como epítopes. Hace unos años Ondarza y colaboradores (1983) reportaron un índice de similitud del 40% entre la lipoamida deshidrogenasa de corazón de cerdo y la glutatión reductasa de humano además de mencionar que también sus regiones funcionales son homólogas con TR, la aminoácido oxidasa, la p-hidroxibenzoato hidroxilasa y la familia de la lactato deshidrogenasa. Este dato sentó la base para plantear la homología de estas enzimas. Existe fuerte evidencia de que la GSSG-Rd y la lipoamida deshidrogenasa son muy parecidas y se habla de que la reductasa de glutatión probablemente divergió de la lipoamida deshidrogenasa durante el periodo de

generación de oxígeno en la Tierra (Ondarza, *et al.*, 1983). Con base en la interpretación del estudio anterior, el porcentaje de similitud reportado entre estas enzimas puede explicar las reacciones cruzadas no deseadas que son un punto desfavorable del antisuero, estas se pueden observar en las figuras 9 y 10, por esa razón se recomienda como un criterio, saber el peso molecular aproximado de la GSSG-Rd al estudiar un modelo conocido y de no ser así, entonces la purificación de los anticuerpos podría ser una mejora técnica y se complementaría muy bien con la actividad enzimática determinada a través de los métodos bioquímicos clásicos generando así más información.

Los resultados del tratamiento con arsénico en sus formas metiladas y de arsenito de sodio demuestran que este metaloide puede tener efectos muy diversos dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición pues como por ejemplo en el caso de los ratones sometidos a tratamiento subcrónico se aprecian algunas diferencias en la presencia de GSSG-Rd en tejidos como riñón y pulmón pero no así en hígado. Hay que destacar que el hígado es considerado uno de los principales órganos donde se concentra el GSH y por ende la GSSG-Rd (Kaplowitz, *et al.*, 1989), ello explicaría que no se requiriera la presencia de más enzima para amortiguar el efecto oxidativo del xenobiótico (Fig. 10). Esto llama la atención pues los efectos del arsénico son muy diversos sobre los modelos. Con una exposición de 3 horas al arsenito de sodio  $1 \times 10^{-9}$  y  $5 \times 10^{-5}$  M y al dimetil arsénico concentración  $1 \times 10^{-5}$  M la GSSG-Rd de los hepatocitos WRL-68 disminuyó su presencia (Fig. 10 y 11). Es muy probable que la síntesis de esta enzima haya sido detenida, y sería muy interesante tratar de establecer el mecanismo por el cual se lleva a cabo tal inhibición. Lo anterior demuestra también la dificultad que existe en la investigación al tratar de describir los mecanismos por los que una sustancia genera un daño celular. En los últimos años se ha descrito la inhibición de esta enzima en modelos *in vitro* por compuestos derivados del arsénico (Styblo y Thomas, 1995; Styblo, *et al.*, 1997) pero el mecanismo no queda claro. Menos claro es el mecanismo de carcinogenicidad por arsénico, y siendo que en el mundo existen millones de personas expuestas crónicamente a este xenobiótico a través de la ingesta de agua contaminada, resulta un problema de salud pública muy importante. Por esa razón muchos investigadores han enfocado sus esfuerzos en la comprensión de este problema y uno de los mecanismos propuestos para la carcinogénesis por arsénico es la vía del estrés oxidativo (Goering, *et al.*, 1999), donde el sistema de protección glutatión y sus enzimas asociadas juegan un papel prioritario. Por esta razón se deben buscar estrategias metodológicas diversas para atacar el problema y este trabajo puede ser una herramienta para ese propósito.

Muchos estudios sobre el glutatión y las moléculas relacionadas a él emplean técnicas bioquímicas basadas en la reducción del compuesto y lecturas en el espectrofotómetro reflejando la actividad enzimática. Al usar material biológico como sistema indicador de rutina la reproducibilidad es un factor importante, con base a los resultados obtenidos, el antisuero policlonal generado demostró que no sólo existe una buena reproducibilidad y detección de la enzima sino que además este mismo antisuero puede ser empleado en el estudio de tejidos o células de diferentes especies por ello el uso de antisuero policlonal para la detección de la GSSG-Rd es una estrategia muy útil que evidencia la cantidad de proteína que existe en un órgano bajo condiciones de estrés oxidativo.

Finalmente a pesar de que existen muchos avances en el desarrollo de técnicas para el estudio de la GSSG-Rd, existen varias razones de porque es más deseable el empleo de anticuerpos para su detección. Una de ellos es que su producción requiere poco tiempo, el equipo que se requiere es relativamente simple y muy disponible y puede ser empleado no sólo en *westernblotts*, como fue la vía que se exploró en este trabajo, sino además puede ser usado para realizar inmunoprecipitación, ELISA o inmunohistoquímica.



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

# IX. CONCLUSIONES

## IX. CONCLUSIONES

Se generó un antisuero contra la enzima reductasa y se logró la detección de la misma en condiciones de estrés oxidativo.

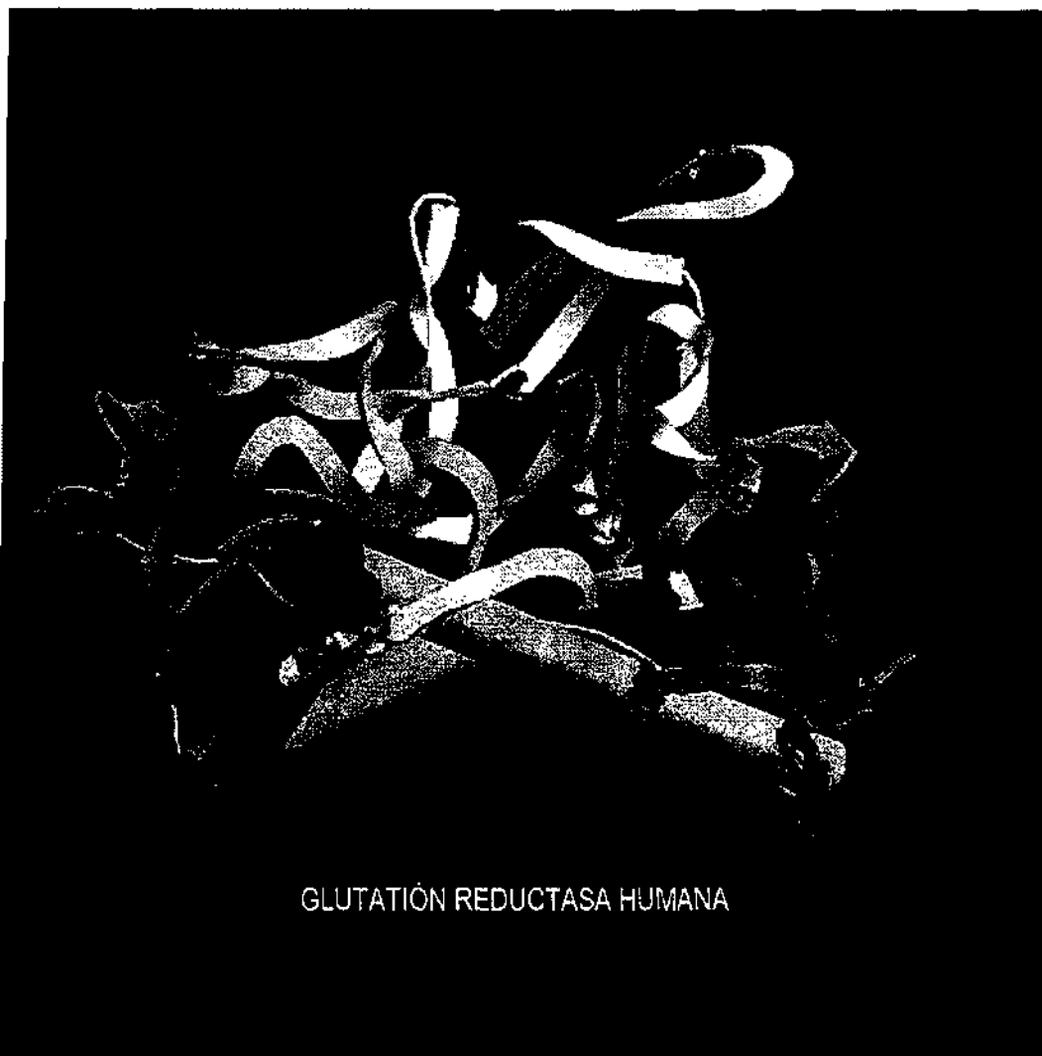
El antisuero generado tiene la capacidad de reconocer a la enzima glutatión reductasa de diversas especies.

El método descrito aquí constituye una herramienta de estudio para la enzima glutatión reductasa útil y su uso puede extenderse para evaluarla cuando se encuentra sometida a la acción de varios xenobióticos.

La enzima glutatión reductasa es inducida por xenobióticos como el fenobarbital, la  $\beta$ -naftoflavona y el monometil arsénico, este último a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M en tratamiento de 3 horas. La enzima disminuye su presencia con el tratamiento de dimetil arsénico  $1 \times 10^{-5}$  M, y el  $\text{NaAsO}_2$  concentración  $1 \times 10^{-9}$  y  $1 \times 10^{-5}$  expuestas por tres horas debido posiblemente a la inhibición de su síntesis.

Se encontró reactividad en proteínas con un peso molecular de 50 kD en los tejidos estudiados de *P. clarkii*, sin embargo no se pudo apreciar una diferencia en la presencia de la enzima por efecto del tratamiento.

La generación de ROS y otros radicales libres por xenobióticos llevan a una inducción del sistema GSH con la respectiva síntesis de GSSG-Rd.



GLUTATION REDUCTASA HUMANA

# X. PERSPECTIVAS

## X. PERSPECTIVAS

Sería muy interesante profundizar en los siguientes aspectos:

Corroborar la inducción de la enzima GSSG-Rd en microsomas de ratas debido al tratamiento con FB y BNF empleando los anticuerpos policlonales contra dicha enzima pero aunado a la medición de su actividad mediante las técnicas bioquímicas ya estandarizadas.

Otro tema interesante sería determinar las diferencias en la inducción de dicha enzima en las células WRL-68 debidas al tratamiento con mono y dimetil arsénico así como con el arsenito de sodio con nuevas dosis de tratamiento, en primer lugar por la importancia que tienen en el aspecto de salud humana y por el otro por que se sabe que estos compuestos son capaces de generar una gran cantidad de respuestas en los mecanismos de defensa, en ocasiones inhibiendo la actividad de esta enzima, y esto abre la posibilidad de que las células sintetizen más proteína como un mecanismo de compensación lo que se podría caracterizar con ayuda de un método como este además de los bioquímicos clásicos.

Una aplicación importante del antisuero policlonal es en el estudio de la enzima en tejidos con lesiones asociadas a cáncer. Se ha visto que los sistemas antioxidantes son modificados al presentarse este padecimiento (Navarro et al. 1999; Abou Ghalia y Fouad, 2000), por lo que sería de gran interés conocer si las células sintetizan más glutatión y por ende esta enzima



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

# XI. LITERATURA CONSULTADA

## XI. LITERATURA CONSULTADA

- Abou Ghalia, A. e I. Fouad. 2000. Glutathione and its Metabolizing Enzymes in Patients with different Benign and malignant Diseases. *Clinical Biochemistry*. Vol. 33. No. 657-662.
- Ashida, H., I. Fukuda, T. Yamashita, K. Kanazawa. (2000). Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Letters* **476**: 213-217.
- Astley, K.N., H. C. Meigh, G.A. Glegg, J. Braven y M.H. Depledge: (1999). Multi-variate Analysis Of biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*. **39**: 145-154
- Ed. Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith y K. Struhl. 2000. *Current Protocols in Molecular biology*. John Wiley and Sons. USA. Vol. 2, 11.12.1.
- Banes, J. y C. Shaw. (1997). Neurodegenerative disorders in human: the role of glutathione In oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Reserch News* **25** 335-358
- Beckman, K. B. y B. N. Ames. (1997). Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**: 19633-19636
- Bergendi, L' , L. Beneš, Z. Ďuračková y M. Ferenčík. (1999). Chemistry, physiology and pathology Free radicals. *Life Sciences* Vol. 65, **18/19**: 1865-1874.
- Berlett, B. y E. R: Stadtman. (1997)Protein Oxidation in Aging Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* Vol **272**, **33**: 20313-20316
- Boggaram, V., K. Larson y B. Mannervik. (1978). Characterization of glutathione reductase from Porcine erthrocytes. *Biochemica and Byoohisica Acta* **527**: 337-347

- Bondy, S. 1997. *Free-Radical-Mediated Toxic Injury to the Nervous System*. In *Free radical Toxicology*. (Ed. Wallace, K. B.). Taylor and Francis. Washington. 442 pp.
- Brouwer, M. y T. Brouwer. (1998). Biochemical defense Mechanism against Copper-Induced Oxidative Damage in the Blue crab, *Callinectes sapidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 351, 2. 257-264
- Carlberg, I. y B. Mannervik. (1975). Purification and characterization of Glutathione reductase From rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250: 5475-5480
- Clapper, M. L. y C. E. Szarka. (1998). Glutathione S-transferases - biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 377-388
- Concha, G., G. Vogler, D. Lezcano, B. Nermell Y M. Vahter. (1998) *Exposure to Arsenic Metabolites During early Human Development*. *Toxicological Sciences* 44: 185-190
- Cossu, C., A. Doyotte, M.C. Jacquin, M. Babut, A. Exinger y P. Vasseur. (1997). Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38: 122-131
- Dandapat, J., G.B.N. Chainy y K. J. Rao. (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant Defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127: 101-115
- Deneke, S. M. Y B. L. Fanbury. (1989). Regulation of Cellular Glutathione. *American Journal of Physiology and Cellular and Molecular Physiology*. 257:L163-L173
- Di Ilio, C. P. Sacchetta, S. Angelucci, A. Zezza, R. Tenaglia y A. Aceto. (1995). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in cancerous and non-cancerous human kidney tissues. *Cancer Letters* 91: 19-23

- Di Simplicio, P., M. Cacace, L. Lusini, F. Giannerini, D. Giustarini y R. Rossi. (1998). Role Of Protein -SH Groups in Redox Homeostasis- The erythrocyte as a Model System. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 355 2: 145-152
- Dixon, M y E. C. Webb. 1979. *Enzymes*. 3ª ed. Academic Press. New York. p 634.
- Ed. Dolphin, D. y R. Foulson. 1989. *Glutathione Chemical, Biochemical, and Medical aspects. Part A* John Wiley and Sons, Inc. New York. Pp 553-596
- Edwards, E.A., C. Enard, G.P. Creissen y P.M. Mullineaux. (1994) Synthesis and properties of Glutathione reductase in stressed peas. *Planta* **192**: 137-143
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2000 Proposed revision to arsenic drinking Water Standard. <http://www.epa.gov/OGWDW/mcl.html> Última actualización junio 26 del 2001.
- Fujii, T. R. Hamaoka, J. Fujii Y N. Taniguchi. (2000). Redox Capacity of Cells Affects Inactivation of Glutathione Reductase by Nitrosative Stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 378, 1: 123-130
- Gilbert, H. F. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods in enzymology* 251, 8-28
- Goering, P., V. Aposhian, M. Mass, M. Cebrián, B. Beck y M Waalkes. (1999). The enigma of Carcinogenesis: Role of Metabolism. *Toxicological Sciences* **49**: 5-14
- Grundy, J.E. y K.B. Storey. (1998). Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in Starving toads, *Scaphiopus couchii*. *Journal of Comparative Physiology B* **168**:132-142
- Gutterer, J. M. R. Dringen, J. Hirrlinger y B. Hamprecht. (1999). Purification of glutathione reductase From Bovine Brain, Generation of an antiserum, and Immunocytochemical Localization of the Enzyme in Neural Cells. *Journal of Neurochemistry* **4**: 1422-1430

- Gutiérrez-Ruiz, M., L. Bucio, V. Souza, J. Gómez, C. Camposy A. Cárabaez. (1994). Expression of some Hepatocyte-like functional Properties of WRL-68 cells in culture. *In Vitro Cell Developmental Biology* **30 A**. 366-371
- Guyton, K. y T. Kensler. (1993). Oxidative mechanism in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*. Vol. 49, **3**. 523-544
- Halliwell, B. y J. Gutteridge. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3a ed. Oxford University Press. New Press. New York. 936 pp.
- Hartow, E. y D. Lane. 1988. *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 726 pp.
- Hente, E. S. y S. Linn. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 19095-19098
- Hodgson, E. y P. Levi. 1994. *Introduction to Biochemical Toxicology*. 2ª ed. Appleton and Lange. Norwalk, Connecticut. 588 p.
- Józwik, M. M. Józwik, M. Szczypka, J. Gajewska y T. Laskowska-Klita. (1997). Antioxidant defense of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta*. **267**: 129-142
- Kanzok, S., A. Fechner, H. Bauer, J. Ulschmid, H. Müller, J. Botella-Munoz, S. Schneuwly, R. Schirmer y K. Becker. (2001). Substitution of Thioredoxin System for Glutathione Reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* Vol. 291 **26**: 643-646
- Kaplowitz, N. J. Fernández-Checa y M. Ookhtens. Hepatic glutathione transport. En: Ed. Taniguchi, N., T. Higashi, Y. Sakamoto y A. Meister. 1989. *Glutathione Centennial, Molecular Perspectives and clinical Implications*. Academic Press. San Diego. 441 p

- Keese, M.A., M. Böse, A. Mülsch, R.H. Schirmer y K. Becker. (1997). Dinitrosyl-Dithiol-Iron Complexes, Nitric Oxide (NO) Carriers In Vivo, as potent Inhibitors of human Glutathione Reductase and Glutathione S-Transferase. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 54 1307-1313
- Kitchin, K. (2001). Recent advances in arsenic Carcinogenesis: Modes of action, animal model Systems, and Methylated arsenic Metabolites. *Toxicology and applied pharmacology*. 172: 249-261.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Landis, W. G. y M-H. Yu. 1995. *Introduction to environmental toxicology, Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems*. Lewis Publishers. Boca Raton. 328 pp.
- Leónard, A. y G. Gerber (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of arsenic. *Mutation Research*. 75: 49-62
- Lin, J. 1993. *Free Radicals and disease prevention*. Keats publishing, Inc. New Cannan, Conecticut. 79 pp.
- Nordenrson, I. y L. Beckman. (1991). Is genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum. Hered.* 41: 71-73.
- Machala, M., P. Drábek, J. Kolářová y Z. Svobodová. (1998) Biochemical Markers for differentiation Exposes to Nonplanar Polychlorinated Biphenyls, Organochlorine Pesticides, or 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in trout Liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 107-111
- Marttila, R. M. Róyttä, H. Lorentz y U. K. Rinne. (1988). Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. *Journal of Neural transmission*. 74: 87-95.

- Ed. Marquardt, H., S. G. Schäfer, R. McClellan y F. Welsch. 1999. *Toxicology*. Academic Press San Diego. 1330 pp.
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods in enzymology*. 251: 3-7
- Mullineaux, P. y G. Creissen. 1997. *Glutathione Reductase: Regulation and Role in Oxidative Stress*. En *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. (Ed. J. G. Scandalios). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Pp 667-713.
- Navarro, J. E. Obrador, J. Carretero, I. Petschen, J. Aviñó, P. Pérez y J. Estrella. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells Associate with tumor growth *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 26 ¼: 410-418
- Nordenson, I. y L. Beckman. (1991). En: Kitchin, K. (2001). Recent advances in arsenic Carcinogenesis: Modes of action, animal model Systems, and Methylated arsenic Metabolites. *Toxicology and applied pharmacology*. 172: 249-261.
- NRC. 1992. *Biologic Markers in Immunotoxicology*. National Academic Press. Washington. 206 p.
- Novi, S., C. Pret, A. M. Cognetti, V. Longo, S. Marchetti y P. Gervasi. (1998). Biotransformation Enzymes and their induction by  $\beta$ -naphthoflavone in adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*. 41: 63-81
- Oesch, F. y M. Arand. 1999. *Xenobiotic Metabolism*. In *Toxicology*. Ed. Marquardt, H., S. G. Schäfer, R. McClellan y F. Welsch. Academic Press. San Diego. Pp 83-109.
- Ondarza, R. N., J. L. Rendón y M. Ondarza. (1983). Glutathione reductase in evolution. *Journal of Molecular Evolution* 19: 371-375
- Patra, J y B. B. Panda. (1998). A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. *Environmental pollution* 101 99-105

- Ploch, S., Y. Lee, El MacLean y R. Di Giulio. (1999). Oxidative stress in liver of brown Bullhead and channel catfish. *Aquatic toxicology* **46**: 231-240
- Préville, X., F. Salvemini, S. Giraud, Sylvain, C. Paul, G. Stepien, M. Ursini y A-P. Arrigo. (1999). Mammalian Small Stress Proteins Protect against Oxidative Stress Through Their Ability to Increase Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity and by Maintaining Optimal Cellular Detoxifying Machinery. *Experimental Cell Research* **247**: 61-78
- Ritter, D., J. Knebel, M. Auffderheide y U. Mohr. (1999). Development of a Cell Culture Model System for Routine testing of Substances Inducing Oxidative Stress. *Toxicology in Vitro*. **13**: 745-751
- Rudel, R., T. Slayton y B. Beck. (1996). Implications of Arsenic Genotoxicity for Dose Response Of Carcinogenic Effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **23**: 87-105.
- Salvemini, F., A. Franzé, A. Iervolino, S. Filosa, S. Salzano y M. V. Ursini. (1999). Enhanced Glutathione Levels and Oxidoresistance Mediated by Increased Glucose-&-Phosphate Dehydrogenase Expression. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. **274**, **5**:2750-2757
- Ed. Scandalios, J. 1997. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidante Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 890 pp.
- Selverstone, J., D. L. Wertz, T. J. Lyons, L-L. Liou, J.J. Goto y E. Butler. (1998). The dark side Of dioxygen biochemistry. *Current Opinion yn Chemical Biology* **2**:253-262
- Sen, C. K. (1997). Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional Biochemistry* **8**: 660-672
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*. **27**: 916-921

- Smith, C., D. Jones y T. Guenther. (1996). Compartmentation of Glutathione: implications for the study of toxicity an disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **140**: 1-12
- Staack, R., S. Kingston, M. A. Wallig, y E. H. Jeffery. (1998). A comparison of the Individual and Collective Effects of four Glucosinolate Breakdown Products from Brussels Sprouts on induction of Detoxification Enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **149**: 17-23
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and Aging. *Science* Vol. 257 1220-1224
- Strange, R. C., P. W. Jones y A. A. Fryer. (2000). Glutathione S-transferasa: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters* **112-113**: 357-363
- Štvrtinová, V., J. Jakubovský e I. Hufin, inflammation and fever., Bratislava, Acad. Electronic Press, Internet: <http://www.savba.sk/logos/books/scientific/Inffer.html> (1995)
- Stýblo, M. y D. Thomas. (1995). In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 99 pp 971-977.
- Stýblo, M. S. Serves, W. Cullen y D. Thomas. (1997) Comparative inhibition of Yeast Glutathione Reductase by Arsenicals and Arsenothiols. *Chemical Reserch Toxicology* Vol 10. **1**: 27-33
- Ed Sullivan, J. y G. Krieger. 1992. *Hazardous Materials Toxicology Clinical Principles of Environmental Health*. Williams and Wilkins. Baltimore. Pp 818-822
- Tabacova, S., E. S. Hunter III y B. Gladen. (1996). Developmental Toxicity of inorganic Arsenic in Whole Embryo Culture. Oxidation State, Dose, Time and Gestational Age Dependence. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **138**: 298-307
- Ed. Taniguchi, N., T. Higashi, Y. Sakamoto y A. Meister. 1989. *Glutathione Centennial, molecular Perspectives and clinical Implications*. Academic Press. San Diego. 441 p
- Vaglio, A. y C. Landriscina. (1999) Changes in liver Enzyme activity in the Teleost *Sparus aurata* In response to cadmium Intoxication. *Ecotoxicology and Environment Safety* **43**: 111-116

- Vochringer, D. W. (1999). BCL-2 and Glutathione: Alterations in cellular redox state that Regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 27, 9/10 pp 945-950
- Ed. Wallace, K. B. 1997. *Free Radical Toxicology*. Taylor and Francis. Washington. 442 pp.
- Yan, T. X. Jiang, H. Zhang, S. Li y L. Oberley. (1998). Use of commercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 25, 6: 688-693
- Ye, B., C. Gitler y J. Gressel. (1997). A High-Sensitivity, SingleGel, Polyacrylamide Gel Electrophoresis Method for the Quantitative Determination of Glutathione Reductases. *Analytical Biochemistry* 246: 159-165
- Zar, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2ª ed. Prentice Hall. New Jersey 718 pp.
- Zhang, K., E. Yang, W., Tang, K. Wong y P. Mack. (1997). Inhibition of glutathione reductase by Plant Polyphenols. *Biochemical Pharmacology* Vol. 54: 1047-1053

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



GLUTATIÓN REDUCTASA HUMANA

## XII. APÉNDICE

## XII. APÉNDICE

Algunas de las soluciones más empleadas durante este estudio.

### **Solución de azul de Coomasie**

200ml de ácido acético (20 % final), 1800 ml de H<sub>2</sub>O y 0.5 g de azul de Coomasie (0.025 % final). Mezclar durante una hora y almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución amortiguadora de sales de Fosfato (PBS)**

Solución stock 10x<sup>2</sup>, 1 L, 80 g de NaCl, 2 g KCl, 11.5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, se mezcla y se ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado o KCl 2.7 mM.

### **HCl, 1 M**

Mezclar en el siguiente orden 913.8 ml de H<sub>2</sub>O y 86.2 ml de HCl.

### **KCl, 1 M**

Mezclar 74.6 g KCl y aforar a 1 L con agua.

### **Solución amortiguadora de sales de Tris (TBS)**

Mezclar 100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.9 % (150 mM) NaCl y almacenar hasta por seis meses a 4° C.

### **TBST (TBS-Tween 20)**

0.1 % de Tween 20 en el TBS y se puede almacenar hasta por seis meses a 4° C.

### **OPD (solución de revelado en ELISA)**

4 mg de OPD, 5 ml de agua y 5 ml de buffer de citratos con 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Solución de parado (revelado en ELISA)**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N, con 3.4 ml de ácido sulfúrico concentrado y llevar a 50 ml.

---

<sup>2</sup> Significa que está diez veces concentrada la solución.

**Solución amortiguadora de citratos (ELISA)**

2.43 ml de ácido cítrico 0.1 M, 2.7 ml de fosfato de sodio dibásico (0.2 M) y se ajusta a pH 5.

**BRADFORD**

Para 100 ml se toman 20 ml de Bradford concentrado y se diluyen con 80 ml de H<sub>2</sub>O, se mantiene a 4° C protegido de la luz.

**NaCl 0.15 M**

Pesar 0.876 y llevar a 100 ml