

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA GLUTATION REDUCTASA POR POLAROGRAFIA CLASICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
HERIBERTO PRADO GARCIA



MEXICO, D. F.



1999

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275018



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.

PASIFACION

DISCONTINUA.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Pedro Villanueva González
Vocal: Prof. José Alejandro Baeza Reyes
Secretario: Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
1er. Suplente: Prof. Elpidio García Ramírez
2do. suplente: Prof. Ma. de Lourdes Ballinas Casarrubias.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Electroquímica Analítica y Enseñanza Experimental. 3 F Anexo Posgrado.

Facultad de Química

Asesor:

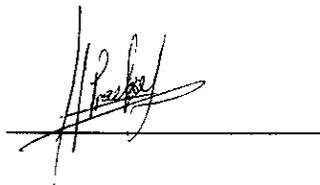
Dr. José Alejandro Baeza Reyes



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. A. Baeza Reyes', written above a horizontal line.

Sustentante:

Heriberto Prado García



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Heriberto Prado García', written above a horizontal line.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Martha Zentella de Piña del Posgrado de la Facultad de Medicina con apoyo de DGAPA (proyecto IN213695).

Agradezco a la Fundación TELMEX por buscar el desarrollo integral de mi persona y de todos los becarios.

A la Fundación UNAM por la beca que me concedieron.

A los profesores Rogelio Rodríguez y Pedro Villanueva, cuyas observaciones y correcciones fueron de gran ayuda en este trabajo.

A Don Pedro Álvarez del Villar por todo lo que me dio y por todo lo que aprendí gracias a él.

Muy especialmente agradezco al Dr. Alejandro Baeza por su inapreciable ayuda y apoyo durante mi carrera.

Dedicatoria

“La felicidad no consiste en hacer siempre lo que queremos; pero sí en querer todo lo que hagamos.”

“El secreto para obtener las cosas es despreciarlas.” Baltasar Gracián.

“La ciencia es verídica. No se deje engañar por los hechos.” Credo de Finagle.

Quiero dedicar este trabajo con mucho cariño a mi mamá, Sofía, a mi hermano, Carlos. Los quiero mucho y son una parte muy importante de mi vida.

A Fidel, un amigo que poseía una gran calidad humana y con quien siempre podía contar, descansa en paz amigo.

A Susana, una amiga muy especial y que gracias a ella aprendí muchas cosas.

A Tere, cuya amistad fue maravillosa y fue alguien a quien quise mucho.

A Francisco por ser un amigo fiel durante todos estos años.

A Margarita, una gran amiga, confidente y por ser de las pocas personas que tiene la paciencia de escucharme (y aguantarme).

ÍNDICE

Esquema Conceptual Del Trabajo Analítico	2
Lista de Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción	5
I) Importancia del Glutatión y la Glutatión Reductasa.....	5
II) Especiación de Glutatión.....	6
III) Propiedades de la Glutatión Reductasa.....	9
IV) Principios De Polarografía Clásica.....	13
V) Principios De Cinética Enzimática.....	19
Propuesta de esta tesis	27
Parte Experimental	29
I) Diseño de la minicelda.....	29
II) Preparación de disoluciones.....	31
III) Programa de perturbación.....	32
Resultados y Discusión	35
I) Estudio polarográfico del glutatión (GSSG/GSH) y del NAD ⁺ /NADPH.....	35
II) Detección polarográfica de la actividad de la Glutatión Reductasa.....	37
III) Determinación de los parámetros cinéticos de la Glutatión Reductasa.....	40
Conclusiones	48
Anexo I. Congresos	49
Bibliografía	50

ESQUEMA CONCEPTUAL DEL TRABAJO ANALITICO

Química Analítica:

Resolución de un problema químico:
medición ⇔ **monitoreo** ⇔ **caracterización**



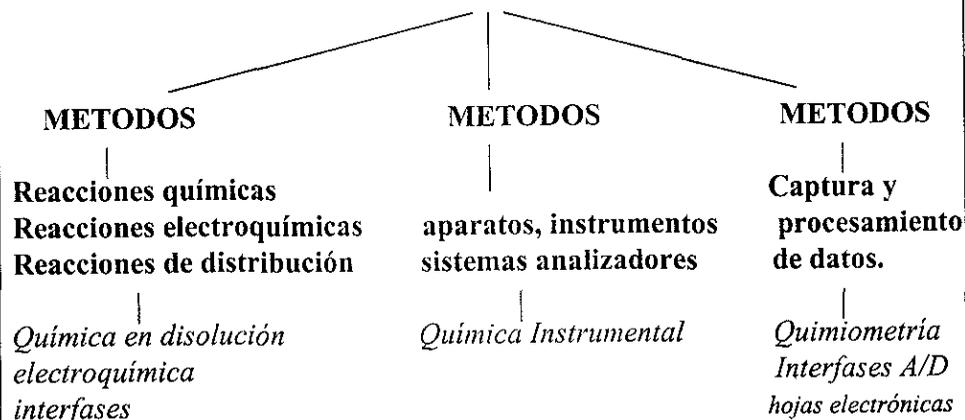
Análisis Químico y Físicoquímico
Caracterización Química



DETERMINACIÓN ANALÍTICA ⇔ **TECNICA OPERATORIA**
(exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, eficiencia)



METODOLOGIA ANALITICA



(A. Baeza, *ALDEQ. En preparación. 1999.*)

Lista De Abreviaturas

C_{BS}= Concentración del amortiguador

DME= Electrodo Goteante de Mercurio

E_{1/2}= Potencial de media onda

E.C.S.= Electrodo de Calomel Saturado

EDTA= Etilendiamino Tetra-acetato

GSH= Glutación Reducido

GSSG= Glutación Oxidado

GR= Glutación Reductasa

i_d= Corriente límite de difusión

K_m= Constante de Michaelis-Menten

n= Coeficiente de Hill

NAD⁺= Dinucleótido de adenina β-nicotinamida oxidado

NADP⁺= Fosfato de dinucleótido de adenina β-nicotinamida oxidado

NADPH= Fosfato de dinucleótido de adenina β-nicotinamida reducido

NEM= N-Etilmaleimida

[S]_{0,5}= Concentración de sustrato en la que $v=0.5V_{max}$

Tris= Tris-hidroximetil-amino-metano

v= Velocidad o actividad enzimática.

V_{max}= Velocidad máxima o velocidad de saturación

RESUMEN

La determinación de glutatión oxidado y glutatión reducido es importante para evaluar el estrés oxidativo al que se enfrenta un organismo. Mediante la glutatión reductasa es posible determinar estas especies ya sea mediante el diseño de un biosensor o por polarografía de corriente directa.

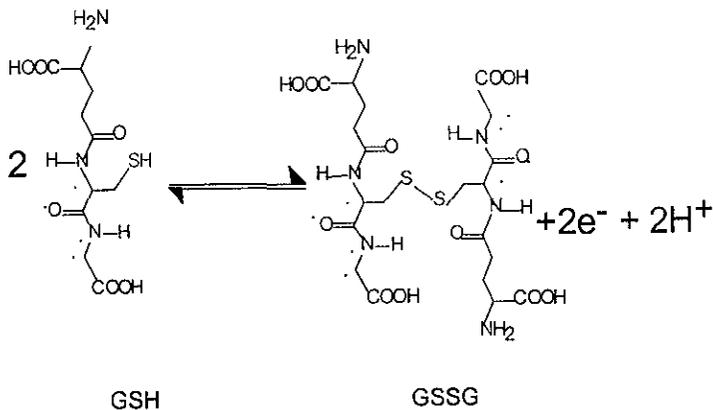
En este trabajo experimental de tesis se evaluó el comportamiento electroquímico de la glutatión reductasa con respecto al glutatión oxidado; en un medio con exceso de NADPH y empleando como medio de disolución amortiguador Tris pH 8.0 de concentración 0.01 M y nitrato de potasio 0.1 F como electrolito soporte. La técnica electroanalítica empleada en la determinación de los parámetros cinéticos de la GR fue la polarografía clásica.

El conocimiento del comportamiento electroquímico de la glutatión reductasa permitirá medir la cantidad presente de GSSG y GSH en muestras biológicas en trabajos posteriores.

INTRODUCCIÓN

D Importancia del Glutatión y la Glutatión Reductasa

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína. Al oxidarse forma un puente de disulfuro con otra molécula de glutatión para producir el glutatión oxidado (GSSG)(1).

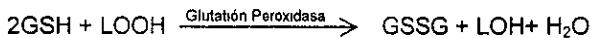
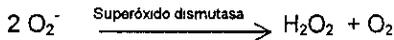


El glutatión participa en los mecanismos de defensa del organismo contra daño oxidativo y en las reacciones de conjugación con xenobióticos. Los compuestos conjugados son especialmente aquellos de carácter electrofílico. Entre los tipos de metabolitos que se pueden conjugar con glutatión se incluyen compuestos N-hidroxilados, uretanos, sulfonamidas, aminas aromáticas, tiofenos, triazinas, éteres, compuestos nitrados, compuestos halogenados, sulfatos, compuestos con dobles enlaces, etc.(2).

El sistema de glutatión peroxidasa pertenece al conjunto de sistemas encargados de la defensa del organismo contra agentes oxidantes. El sistema de glutatión peroxidasa

es el sistema más importante en el manejo intracelular de especies de oxígeno reactivo (3).

El glutatión GSH reduce el peróxido de hidrógeno, producido por la dismutación del superóxido a agua; esta reacción es catalizada por la glutatión peroxidasa. Esta enzima también cataliza la reacción para remover hidroperóxidos lipídicos producidos después de la degradación oxidativa de lípidos de membranas celulares (3).



Es importante mantener los niveles de GSH para poder mantener la actividad de la glutatión peroxidasa. Por tanto, las células contienen la glutatión reductasa para reducir el GSSG inmediatamente a GSH empleando NADPH como cofactor de la enzima (3).

Aunque sólo un pequeño porcentaje del GSSG generado es liberado del interior de las células, cualquier cambio en la formación de GSSG se ve reflejado en cambios similares en la cantidad de GSSG extracelular. Es decir, un incremento significativo de GSSG en bilis o en sangre indica una actividad elevada del sistema de defensa contra especies de oxígeno reactivas, es decir, se refleja un mayor estrés oxidativo en el organismo humano (4).

II) Especiación de glutatión

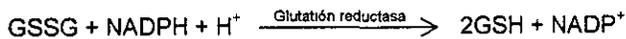
Es importante poder cuantificar el glutatión total, así como cuantificar el GSH y el GSSG; ya que, como ya se mencionó, al poder monitorear la formación de GSSG se tiene

un índice de la actividad del sistema de defensa endógeno contra especies de oxígeno reactivas (4).

La literatura reporta métodos enzimáticos espectrofotométricos y métodos cromatográficos (5,6,7,8,9) para la cuantificación del glutatión.

Entre los métodos enzimáticos para determinar el glutatión cabe citar:

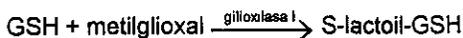
Método enzimático de determinación de glutatión total. La suma de las formas oxidadas y reducidas de glutatión puede ser determinadas empleando un método cinético en el cual las cantidades catalíticas de GSH o GSSG y glutatión reductasa producen una continua reducción de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB debida al NADPH como se muestra en las siguientes reacciones:



La velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de glutatión en valores arriba de 2 μM . También, se pueden determinar únicamente los niveles de GSSG haciendo reaccionar el GSH con NEM, previo al análisis de la muestra. La formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) se sigue espectrofotométricamente a 412 nm. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse midiendo el NADPH por medio de fluorometría (4,6).

Determinación de GSH por el método de la glioxilasa I

El glutatión reducido es convertido específicamente por la glioxilasa I de acuerdo a la reacción:



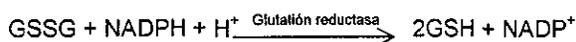
La formación del producto puede ser monitoreada directamente en una longitud de onda de $\lambda = 240$ nm.

Método de o-ftaldialdehído

El GSH forma un complejo fluorescente con o-ftaldialdehído (OPT), el cual muestra un máximo de excitación a 350 nm y un máximo de emisión a 420 nm.

Determinación de Glutatión oxidado

El GSSG es determinado específicamente por medio de la glutatión reductasa como se muestra en la reacción:



La reacción se monitorea directamente por determinación del NADPH consumido mediante espectrofotometría o fluorometría a niveles tan bajos como 0.1 μM (6).

Métodos cromatográficos

La cromatografía acoplada con analizadores de aminoácidos o derivados de DNP ha sido útil en la cuantificación de glutatión en el intervalo de nanomolas. También, se han reportado métodos que se basan en la reacción del ácido yodoacético con derivados de tioles para formar derivados de S-carboximetilo-glutatión, seguido de una derivatización de grupos aminos con reactivo de Sanger; estos métodos incorporan detección espectrofotométrica (7), otro método cromatográfico acopla detección fluorométrica mediante derivatización con cloruro de dansilo (9). Otra metodología reportada es mediante HPLC que incorpora un detector dual electroquímico para determinar glutatión y cisteína (8). Los métodos citados han sido probados en muestras biológicas como plasma, sangre, hígado de rata, etc.

Las determinaciones de glutatión mediante cromatografía presentan una gran sensibilidad pero son muy costosos, requieren derivatización del glutatión y consumen mucho tiempo; los métodos espectrofotométricos tienen la desventaja de que están sujetos a interferencias por un mal tratamiento de la muestra o la presencia de otros tóxicos. Los métodos enzimáticos acoplados a espectrofotometría presentan la ventaja de que son específicos y pueden llegar a ser muy sensibles, pero solamente el método con DTNB es adecuado para realizar determinación de las especies GSH y GSSG en muestras biológicas (4). Tanto en las determinaciones cromatográficas como las espectrofotométricas se requiere una gran manipulación de la muestra y se emplean medios químicos complejos, lo que provoca que aumente el error por la propia manipulación y que se degrade más fácilmente el glutatión

III) Propiedades de la glutatión reductasa

La glutatión reductasa es un miembro de la familia de las oxidoreductasas de disulfuro las cuales catalizan una variedad de reacciones diferentes de oxido reducción. Esta enzima es un dímero cuyas subunidades están covalentemente unidas mediante un puente de disulfuro interno. El peso molecular de la glutatión reductasa de levadura está reportado en 118,000 y 124,000 (10).

Esta enzima cataliza la reacción de oxido-reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) empleando NADPH como cofactor.



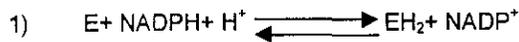
La glutatión reductasa contiene el grupo prostético FAD (dinucleótido de flavina adenina), el cual se encarga de la transferencia de electrones. Las flavinas son sustancias

que contienen un anillo isoaloxazina, este anillo puede reducirse aceptando un hidruro y un protón.

Las constantes cinéticas de la GR obtenida de levadura corresponden a: $K_m(\text{GSSG}) = 55 \mu\text{M}$. $K_m(\text{NADPH}) = 3.8 \mu\text{M}$ y $V_{\text{max}} = 15 \cdot 10^3 \text{ mol}_{\text{NADPH}} / (\text{min} \cdot \text{mol}_{\text{FAD}})$. Estas constantes fueron determinadas en amortiguador de fosfatos pH 7.6 y temperatura 25°C mediante métodos espectrofotométricos (10).

Mecanismo Catalítico

El mecanismo de reacción ocurre vía dos fases (12). En la primer fase de la reacción ocurre la formación de un intermediario estable reducido con dos electrones (EH_2), E representa a la glutatión reductasa en su estado oxidado y EH_2 a la glutatión reductasa en su forma reducida.



Después de la adición de glutatión oxidado, la enzima reducida EH_2 reacciona para formar el GSH y completar el ciclo catalítico.



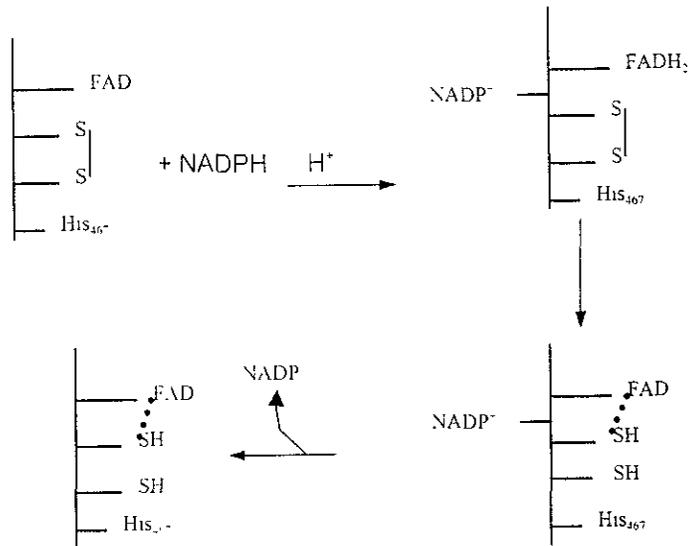
La glutatión reductasa contiene un puente de disulfuro activo el cual en su forma EH_2 ha aceptado un par de electrones y ha sufrido una ruptura para formar un ditiol. La secuencia de aminoácidos de la glutatión reductasa indica que el puente de disulfuro activo se forma entre la cisteína 58 y la cisteína 63.

Fase 1. Reducción de la Enzima.

En el primer paso el NADPH se une a la enzima oxidada E, se reduce inmediatamente la flavina, produciendo NADP^+ . El anión de flavina resultante tiene una existencia breve. Estudios espectroscópicos sugieren que la transferencia rápida de electrones entre la flavina y el puente de disulfuro activo ocurre a través de la formación

un enlace covalente entre el átomo de azufre de la cisteína 63 y el átomo de carbono de la flavina C4a. Esto libera a la Cys58 en su forma aniónica, la cual toma un protón del medio para formar el grupo tiol. El aducto de Cys63-flavina se colapsa en un par de transferencia de carga, éste complejo es de naturaleza no covalente y su formación implica que un par de electrones son parcialmente transferidos de un donador, el ion tiolato Cys63, a un aceptor, en este caso el anillo de flavina oxidado (12)

La liberación del NADP^+ produce a la glutatión reductasa reducida EH_2 .



Esquema 1. Mecanismo catalítico de la GR. Fase 1, reducción de la enzima.

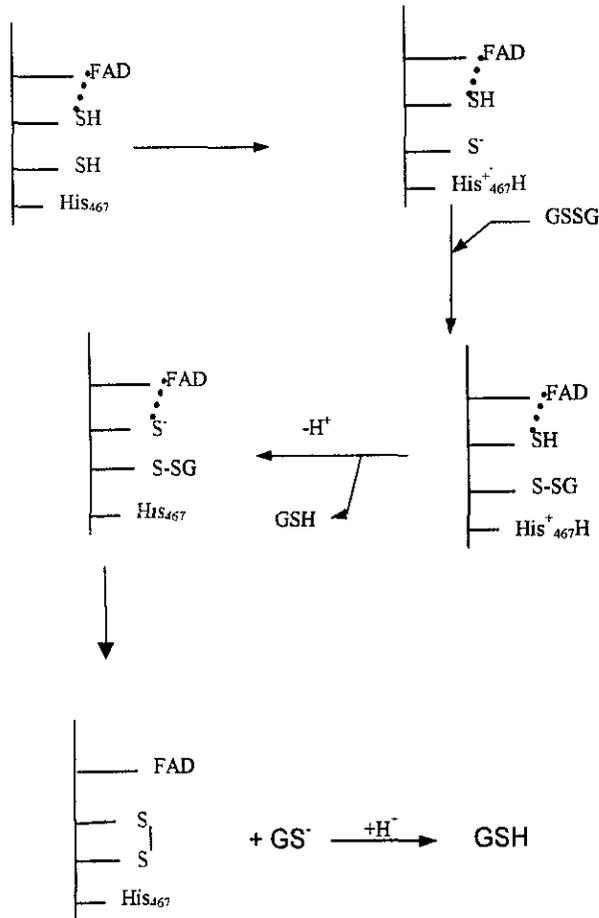
Fase 2. La enzima se regenera a su forma oxidada reduciendo al GSSG

En la segunda fase la reacción comienza con la unión del GSSG a la EH_2 . El átomo de azufre de Cys58 ataca nucleofílicamente al átomo de azufre de la unidad de glutatión GS más cercana a Cys58, formando un puente de disulfuro entre la enzima y el grupo GS

y liberando la otra unidad de glutatión como GS⁻. El His 467' promueve esta reacción mediante la abstracción del protón del átomo de azufre de Cys58.

El grupo GS⁻ es protonado por el His 467' y se libera GSH.

En el paso final de la reacción de la glutatión reductasa el tiolato de Cys63 ataca nucleofílicamente al átomo de azufre de la Cys58 para volver a formar el puente de disulfuro activo y liberar el segundo GSH.



Esquema 2. Mecanismo catalítico de la GR. Fase 2, regeneración de la enzima a su forma oxidada al reducir el GSSG.

IV) Principios De Polarografía Clásica

La voltamperometría abarca un gran número de técnicas analíticas, en las que se determinan las relaciones entre la corriente y el potencial durante los procesos electroquímicos. La polarografía es una rama de la voltamperometría.

La polarografía fue inventada por Jeroslov Heyrovsky en Praga en el año de 1922, y le mereció el premio Nobel en 1959.

En la polarografía, la corriente que circula en la celda se mide en función del potencial del electrodo de trabajo. Esta corriente suele ser proporcional a la concentración del analito. Las técnicas polarográficas más sensibles tienen un límite de detección próximo a 10^{-9} M y precisión cercana a 5%.

En la polarografía de corriente directa ("polarografía clásica"), el electrodo de trabajo es una gota de mercurio suspendida del extremo de un tubo capilar de vidrio. El analito puede ser oxidado o reducido en la gota de mercurio. La corriente circula en un electrodo auxiliar cuya naturaleza es variada (platino, acero, carbón grafito, etc.), y un electrodo de referencia que puede ser un electrodo de calomel saturado o un electrodo de plata/cloruro de plata. *El potencial de la gota de mercurio se mide con respecto al electrodo de referencia, en el que circula una corriente despreciable (12).*

El electrodo de gota de mercurio se utiliza porque la superficie del mercurio expuesta al analito es continuamente renovada. Esto da por resultado una mayor reproducibilidad que con una superficie estática, cuyas características cambian con el uso.

La gran mayoría de las reacciones estudiadas con el electrodo de mercurio son de reducción, debido a que el mercurio puede ser oxidado muy fácilmente.

Aunque el potencial normal de reducción del ion H^+ es de 0.0 V vs E.C.S., existe un sobrepotencial de reducción de H^+ en la superficie de mercurio; por lo tanto, pueden realizarse reacciones termodinámicamente más complejas sin la reducción simultánea y competitiva de H^+ .

Mediante el empleo de electrodos inertes y disolventes apropiados es posible cubrir un amplio dominio de potenciales redox.

Una gráfica de la corriente en función del barrido de potencial aplicado se denomina polarograma.

En una disolución en reposo, el régimen de reducción u oxidación es controlado por la difusión del analito hacia el electrodo. En este caso la corriente límite se llama corriente de difusión. La disolución debe estar perfectamente quieta para alcanzar el límite de difusión en polarografía.

La proporción directa que existe entre la corriente de difusión y la concentración del soluto en el seno de la disolución es la base del empleo de la polarografía en química analítica.

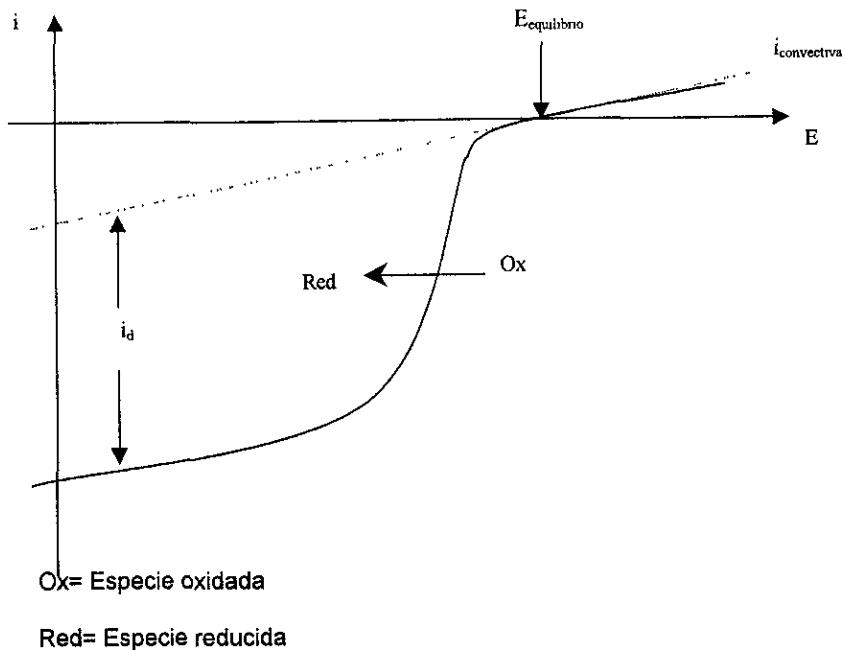
La corriente total medida puede distinguirse entre la corriente capacitiva o residual que obedece al fenómeno eléctrico de la formación de la doble capa eléctrica, esta corriente no puede eliminarse pero se ve disminuida si el área electroactiva del electrodo es pequeña, como es el caso de la gota de mercurio. El otro tipo de corriente que aparece es la faradaica que ya está relacionada con la especie a analizar. Esta corriente faradaica

se debe principalmente a cómo llega la especie electroactiva a la interfase del electrodo de trabajo y a la velocidad de transferencia interfacial.

El transporte del soluto hacia el electrodo depende de tres factores: la difusión, el transporte mecánico (agitación y convección) y la migración por atracción electrostática. En polarografía se trata de minimizar los dos últimos factores. En el caso del transporte mecánico el régimen convectivo se mantiene constante por el empleo del electrodo goteante de mercurio, además la disolución no se agita y se procura eliminar las vibraciones.

La migración por atracción electrostática de los iones del analito se minimiza con el empleo de una alta concentración de electrolito soporte, el cual es una sal inerte.

De esta manera solo la corriente de difusión es la que se registra como variable dependiente.



La magnitud de la corriente de difusión, medida en el límite superior de cada oscilación puede calcularse mediante la ecuación de Ilkovic:

$$i_d = (7.08 \cdot 10^4) n C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6}$$

Donde i_d es la corriente de difusión en el límite superior de las oscilaciones, en μA ; n equivale al número de electrones por molécula implicados en la oxidación o reducción de la especie electroactiva; C es la concentración de la especie electroactiva, en mmol/L ; D representa al coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en m^2/s ; m es el gasto de mercurio, en mg/s y t es el intervalo de goteo, en s .

El número $7.08 \cdot 10^4$ es el resultado de la combinación de diversas constantes cuyas dimensiones son tales que i_d se expresa en μA . En la ecuación de Ilkovic, la cantidad $m^{2/3} t^{1/6}$ se denomina constante del capilar; la cual es aproximadamente proporcional a la raíz cuadrada de la altura (h) de la columna de mercurio medida desde la parte superior del menisco de mercurio hasta el extremo inferior del electrodo de trabajo.

Procesos reversibles e irreversibles

Un proceso es termodinámicamente reversible cuando, si se está situado en el potencial de equilibrio, una variación infinitesimal en un sentido u otro produce un gran paso de corriente en el sentido correspondiente. En polarografía, sin embargo, muchas ondas se obtienen por la aplicación de un amplio sobrevoltaje. Esto ocurre porque alguna de las etapas del proceso electrodo es lenta, ya sea la difusión de las especies reaccionantes o la reacción de la transferencia electrónica en el electrodo.

El primer hecho observado es que una onda polarográfica irreversible no cumple rigurosamente la ecuación de la onda polarográfica:

$$E = E_{1/2} - \frac{0.059}{n} * \log \frac{i}{i_d - i}$$

Donde $E_{1/2}$ es el potencial de media onda, i la corriente, n representa el número de electrones que interviene en el proceso e i_d es la corriente de difusión.

Una onda irreversible no obedece la ecuación anterior en el sentido de que la pendiente de la gráfica E frente a $\log(i/(i_d-i))$ es mayor de $0.059/n$, el cual es el valor característico propio de los procesos reversibles.

También se observa que el potencial de media onda, $E_{1/2}$, de una onda reversible es independiente de la concentración del analito, por lo que una variación significativa de $E_{1/2}$ en función de la concentración es una prueba de irreversibilidad (13).

Máximos polarográficos de corriente.

Muchas especies electroactivas presentan polarogramas donde la corriente rebasa el valor de i_d y luego vuelve a estabilizarse. Estos excedentes de corriente son llamados máximos polarográficos de corriente.

Se han reconocido tres clases de máximos de corriente llamados máximos de primera, de segunda y de tercera clase. La clasificación de los máximos polarográficos de corriente se basa en la identificación de las fuerzas que inician y mantienen el flujo de corriente.

Los máximos de primera clase son comunes y se atribuyen a corrientes de convección cerca de la superficie del electrodo. La adición de trazas de ciertos agentes tensoactivos como gelatina, Triton x-100 o rojo de metilo suele eliminar estas anomalías. Estos agentes se denominan supresores de máximos, e influyen en el comportamiento convectivo de la solución (12,13)

Los máximos de segunda clase resultan del movimiento de la interfase mercurio-solución, lo cual es causado por el flujo del mercurio dentro de la gota producida.

Los máximos de tercera clase pueden provenir de adsorción no uniforme, que produce diferencias de tensión superficial a lo largo de la superficie y consecuente movimiento de la superficie y solución adyacente (21).

Oxígeno

El oxígeno produce dos ondas polarográficas intensas, la primera onda se debe a la reducción de oxígeno hasta peróxido de hidrógeno H_2O_2 y la segunda corresponde a la reducción hasta H_2O

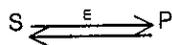
Puesto que en toda solución expuesta al aire se disuelve oxígeno, estas ondas se superpondrían al polarograma del analito si el oxígeno no se eliminara. El burbujeo de nitrógeno gaseoso en la solución elimina suficiente oxígeno para que desaparezcan estas ondas en el trabajo polarográfico ordinario (12)

v) Principios De Cinética Enzimática

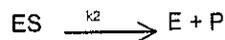
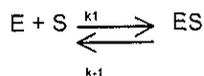
La cinética enzimática es la rama de la enzimología que trata de los factores que afectan la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Entre los factores cuyo efecto sobre una enzima son más interesantes de estudiar se encuentran la concentración de estas enzimas, la concentración de los sustratos, de los productos, los inhibidores, los activadores, el pH, la fuerza iónica y la temperatura (14).

Sistemas monosustrato

Para el estudio de las reacciones catalizadas enzimáticamente, se considera el sistema enzimático más sencillo que implica un solo sustrato (S) proporcionando un único producto (P) en presencia de la enzima (E).



Donde la secuencia de la reacción es

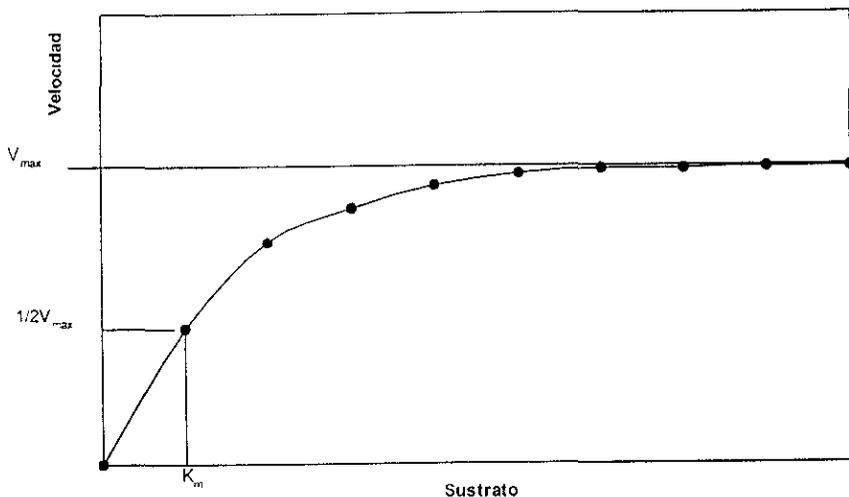


Donde ES se refiere al complejo binario de enzima sustrato. Mediante este modelo se deriva la expresión matemática

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \dots (1)$$

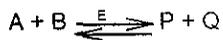
Esta es la ecuación de Henri-Michaelis-Menten, en la que V_{max} representa la velocidad máxima que se observaría si toda la enzima se presenta como el complejo ES, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_m es la constante de Michaelis. La representación gráfica de la ecuación (1) es una hipérbola rectangular con límites de V_{max} y $-K_m$.

A una baja concentración de sustrato, la velocidad inicial de la reacción es casi proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es aproximadamente de primer orden con respecto al sustrato. Sin embargo, conforme se va incrementando la concentración de sustrato, los incrementos en la velocidad de la reacción son menores, por lo que la velocidad de la reacción ya no es proporcional a la concentración del sustrato; en esta zona, la reacción no sigue cinética de primer orden ni de orden cero. Conforme se incrementa la concentración de sustrato, la velocidad de reacción se vuelve independiente de la concentración y se aproxima a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones la cinética de la reacción es de orden cero con respecto al sustrato y la enzima se satura con su sustrato.

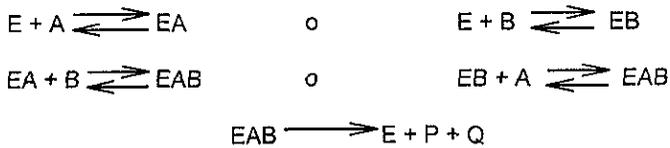


Sistemas multisustrato

En sistemas multisustratos tales como la reacción



el mecanismo puede proceder vía formación de complejos ternarios intermedios mediante diferentes vías secuenciales tales como



Suponiendo que la transformación del complejo ternario a los productos es lenta en comparación a la velocidad de formación del complejo se puede obtener una ecuación de velocidad, cuya forma depende de la secuencia de reacciones de adición de sustratos y de los eventos catalíticos involucrados en el mecanismo de la enzima; de esta forma, en una reacción con adición secuencial y ordenada de sustratos A y B, seguida del evento catalítico, la ecuación resultante es:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{(K_m)_A}{[A]} + \frac{(K_m)_B}{[B]} + \frac{(K_m)_{AB}}{[A][B]}} \dots (2)$$

Si la concentración de A es mucho mayor que su correspondiente K_m , $[A] \gg (K_m)_A$, la ecuación se simplifica quedando de la siguiente forma

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{(K_m)_B}{[B]}} = \frac{V_{max} [B]}{(K_m)_B + [B]} \dots (3)$$

De la misma manera si $[B] \gg (K_m)_B$ la ecuación resultante queda en términos de la concentración de sustrato [A]. Estas ecuaciones corresponden a la ecuación de Michaelis-Menten para un sólo sustrato. Consideraciones semejantes demuestran que este formalismo es aplicable a otro tipo de mecanismos cinéticos (15).

La curva de v frente a $[S]$ es una hipérbola y por tanto es bastante difícil determinar V_{max} y K_m . Para facilitar la determinación de las constantes cinéticas los datos pueden

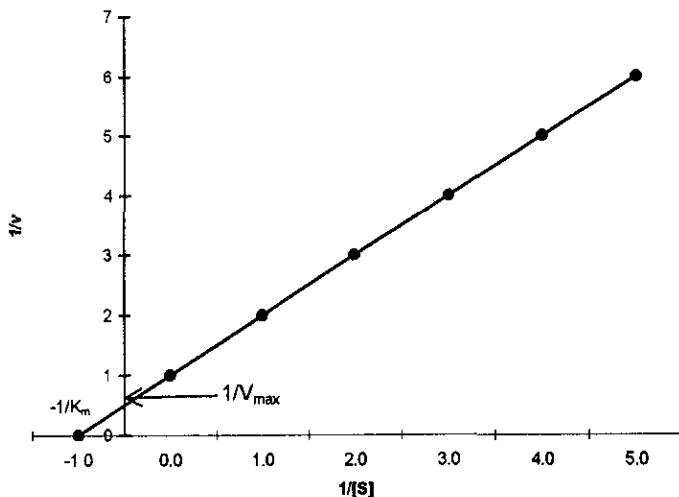
reestructurarse mediante la representación de Lineweaver-Burk, entre muchas otras representaciones gráficas(15).

Representación de Lineweaver-Burk: $1/v$ Vs $1/[S]$

Esta representación se basa en la reestructuración de la ecuación de Henri-Michaelis-Menten en una forma lineal:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \dots (4)$$

De esta forma la ecuación (4) proporciona una línea recta cuya pendiente es K_m/V_{max} y la intersección con el eje y es $1/V_{max}$. Cuando $1/v = 0$, $(K_m/V_{max}) \cdot (1/[S]) = -1/V_{max}$ y por lo tanto, $1/[S] = -1/K_m$. La intersección con el eje x es $-1/K_m$.



Las concentraciones elegidas de sustrato para trazar la representación inversa deben estar en las proximidades del valor de K_m . Si las concentraciones elegidas son muy altas respecto al valor de K_m , la recta será prácticamente horizontal. Esto permitirá determinar V_{max} , pero la pendiente de la recta será casi cero. Por consiguiente será difícil

determinar exactamente K_m . Si las concentraciones de sustrato elegidas son muy bajas respecto al valor de K_m , la recta cortará a ambos ejes demasiado cerca del origen, no permitiendo que puedan determinarse exactamente ni V_{max} , ni K_m . A concentraciones de sustrato muy bajas, la reacción es prácticamente de primer orden. No hay indicios de saturación por lo que V_{max} y K_m parecen ser infinitas.

Existen otras representaciones gráficas empleadas para determinar la K_m y V_{max} , siendo la representación de Lineweaver-Burk una de las más empleadas. Sin embargo, actualmente se prefiere emplear los programas estadísticos por computadora para obtener estos parámetros debido a los errores inherentes a cada representación gráfica.

Enzimas Alostéricas.

Muchas enzimas son oligómeros de distintas subunidades de monómeros. A menudo, las unidades son idénticas, teniendo cada una un sitio catalítico. Si los sitios son idénticos y completamente independientes unos de otros, entonces la presencia de sustrato en un sitio no tendrá efecto ni sobre las propiedades de la unión de los sitios vacantes ni sobre las actividades catalíticas de los otros sitios ocupados. Dicho de otra forma, n moléculas de una enzima con un sitio se comportan idénticamente igual que una molécula de una enzima de n sitios. Tales enzimas dan curvas hiperbólicas de velocidad y obedecen a la ecuación (1).

Si la unión de una molécula de sustrato provoca cambios electrónicos o estructurales que dan por resultado que las afinidades por los sitios vacantes se alteren, la curva de velocidad no se ajustará a la cinética de Michaelis-Menten y la enzima se clasificará como enzima alostérica. Con toda probabilidad, los múltiples sitios de unión al sustrato de las enzimas alostéricas se encuentran sobre diferentes subunidades proteicas. La unión de una molécula de sustrato facilita la unión de la siguiente molécula de sustrato

mediante un aumento en las afinidades de los sitios de unión vacantes. El fenómeno ha sido denominado "unión cooperativa" o "cooperatividad positiva" con respecto a la unión del sustrato o "respuesta homotrópica positiva" (15,20).

La mayoría de las enzimas alostéricas presentan curvas sigmoideas de saturación de ligando. Por consiguiente, el alosterismo ha llegado a ser sinónimo de las respuestas sigmoideas. Sin embargo, no todas las uniones o curvas de velocidad sigmoideas son resultado de las interacciones alostéricas.

La ecuación de Hill.

Considerando una enzima con n sitios equivalentes de unión al sustrato. Si la cooperatividad en la unión del sustrato está muy marcada, entonces las concentraciones de todos los complejos enzima-sustrato que contienen menos de n moléculas de sustrato serán insignificantes para cualquier $[S]$ que sea apreciable comparable con K_s . En estas condiciones, la ecuación de velocidad estará dominada por el término $[S]^n$.

En general:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]^n}{[S]^n + K'} \dots (5)$$

Esta ecuación se conoce como la ecuación de Hill.

n = número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima, también referido como la constante de Hill.

K' = constante que abarca a los factores de interacción a , b , c , etc., y a la constante intrínseca de disociación K_s .

La constante K' en la ecuación anterior ya no es igual a la concentración de sustrato que produce una velocidad semimáxima (excepto cuando n es 1).

Cuando $v=0.5V_{\max}$

$K'=[S]_{0.5}$

$$[S]_{0.5} = (K')^{1/n}$$

La forma simple de la ecuación (5) puede ser empleada para ajustar datos experimentales de curvas enzimáticas de velocidad.

Si la cooperatividad no es muy alta, la ecuación de velocidad no se reducirá a la ecuación de Hill. Sin embargo, las curvas de velocidad pueden expresarse en términos de la ecuación de Hill, aunque n ya no será igual al número de sitios. En este caso n se designará como n_H . Al analizar los datos experimentales de velocidad en términos de la ecuación de Hill, el valor calculado de n será casi siempre menor que el número de sitios reales.

El grado de sigmoicidad de la curva de velocidad es una medida de la fuerza en la cooperatividad entre los sitios de una enzima oligomérica. Se puede medir al expresar la relación entre las concentraciones de sustrato requeridas para dos fracciones cualesquiera de V_{max} , generalmente se emplean concentraciones para las cuales se obtiene $0.9V_{max}$ y $0.1V_{max}$, mejor conocidas como $[S]_{0.9}$ y $[S]_{0.1}$ respectivamente. La proporción $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$, denominada como índice de cooperatividad, está relacionada inversamente con el grado de cooperatividad entre los sitios (20).

El valor del índice de cooperatividad está relacionado con el coeficiente de Hill de la siguiente forma:

$$\frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = \sqrt[n]{81} \quad \text{o} \quad n = \frac{\log 81}{\log \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}} \dots (6)$$

De esta forma el coeficiente de Hill y el índice de cooperatividad para una enzima oligomérica pueden ser relacionados uno con el otro, juntos proporcionan una medida del grado de cooperatividad entre los sitios de unión de la enzima y el número mínimo de estos sitios.

Cinética Sigmoidea para enzimas no alostéricas.

La aparición de una curva de tipo sigmoide en las curvas de velocidad para enzimas alostéricas es un reflejo de la cooperatividad. La misma cooperatividad debe observarse en estudios directos de unión de ligando a la enzima, los cuales pueden ser realizados por diálisis al equilibrio, ciertos métodos espectrofotométricos, etc. Si hay alosterismo, la cooperatividad en la unión de ligandos debe observarse también en este tipo de experimentos. Sin embargo, en algunos casos los experimentos de unión entre el ligando y la enzima no se observa la cooperatividad mostrada en los experimentos de velocidad.

Hay que asumir que tales eventos de unión ligando-enzima son no cooperativos, lo que significa que debe buscarse otra explicación para poder explicar la sigmoicidad de la curva.

Una forma de observar cinética sigmoidea en ausencia de cooperatividad verdadera es al emplear una preparación enzimática que contenga una mezcla de isoformas de la enzima y éstas tengan diferentes valores de K_m para el sustrato. En tales casos la curva de velocidad será el resultado de la superposición de las curvas individuales para las distintas isoformas.

También se ha notado que una enzima de dos sustratos que sigue un mecanismo cuyo orden es aleatorio puede mostrar cinética sigmoidea sin cooperatividad verdadera. Esto ocurre cuando una de las reacciones es más rápida que la reacción competitiva.

Finalmente, la cinética sigmoidea puede ser observada aún para un solo sitio de unión monomérico si el sustrato induce en la enzima un cambio conformacional requerido para la catálisis. Si el paso de isomerización después de la unión del sustrato es un paso limitante, la población relativa de los dos isómeros puede influir en la reacción completa.

PROPUESTA DE ESTA TESIS

Existe un interés creciente por los sensores electroanalíticos con aplicaciones biomédicas. En particular, el departamento de Posgrado de la Facultad de Medicina está interesado en la determinación de glutatión ya que se considera que un aumento en la concentración de GSSG refleja un mayor estrés oxidativo en el organismo humano causado por agentes externos.

Este problema de salud, que involucra la medición y monitoreo de las especies GSSG y GSH, generó como diagnóstico que la metodología analítica a desarrollar debe ser capaz de determinar trazas de glutatión y realizar la especiación de esta especie de forma exacta, precisa, sensible, selectiva y de manera eficiente, es decir, realizar la cuantificación con el menor tratamiento posible de la muestra.

Ya se ha logrado cuantificar el glutatión mediante una técnica electroanalítica(19); sin embargo, se propone desarrollar una metodología electroanalítica enzimática, que incorpore a la glutatión reductasa, porque de esta manera se obtiene selectividad en el ensayo, además de la exactitud, la precisión y la sensibilidad, inherentes a las técnicas electroquímicas. Por estas razones es que se busca desarrollar un biosensor selectivo a glutatión. También, el empleo de un biosensor proporcionará una forma eficiente de cuantificar al glutatión ya que se reduciría al mínimo el tratamiento que pudiera darse a la muestra biológica.

Debido a las razones arriba mencionadas se requiere conocer el comportamiento electroquímico de la glutatión reductasa. Esta enzima ya ha sido estudiada mediante ensayos basados en la espectrofotometría; sin embargo no se han realizado estudios de esta enzima empleando métodos electroanalíticos. Lo cual planteó la siguiente hipótesis.

El glutatión oxidado y el glutatión reducido poseen propiedades oxido-redox y son electroactivos frente al electrodo de mercurio (19); si se emplea la polarografía de corriente directa para monitorear la reacción catalizada por la glutatión reductasa, ya sea mediante la evaluación del consumo de GSSG o la formación de GSH, será posible conocer la actividad de la glutatión reductasa y su comportamiento electroanalítico.

El conocimiento del comportamiento cinético de la GR permitirá diseñar métodos para la cuantificación de GSH y GSSG mediante estudios por polarografía clásica o diseñando un biosensor que incorpore a la glutatión reductasa.

Los objetivos a lograr dentro de esta tesis son:

- Evaluar el comportamiento polarográfico del par GSSG/GSH.
- Observar el comportamiento electroquímico del NAD^+ y el NADPH empleando el DME.
- Monitorear la actividad de la GR a diferentes concentraciones de GSSG empleando la polarografía clásica como técnica electroanalítica.
- Determinar el comportamiento cinético de la GR bajo las condiciones de trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL

I) Diseño de la minicelda polarográfica

Los experimentos fueron realizados a un volumen final de 500 μL para lo cual se diseñó una minicelda de vidrio que se muestra en la figura 1. Como electrodo de trabajo se utilizó el electrodo goteante de mercurio (DME); se empleó como electrodo auxiliar un alambre de acero inoxidable y el electrodo de referencia fue de $\text{AgCl}/\text{Ag}^\circ$, KCl 1M.

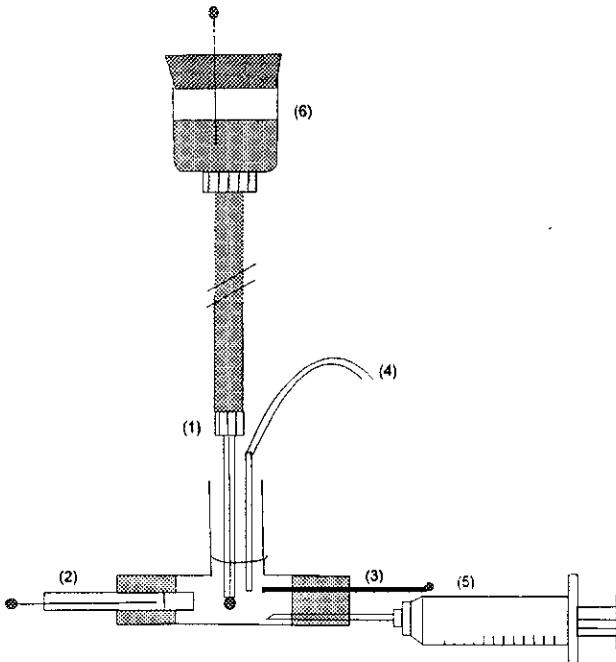


Fig. 1 Minicelda polarográfica. (1) DME. (2) Electrodo de referencia $\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$. (3) Electrodo auxiliar. (4) Entrada de N_2 . (5) Purga de mercurio. (6) Poza de mercurio.

La temperatura a la que se realizaron las medidas de actividad enzimática fue de 26 $^\circ\text{C}$, la temperatura fue regulada por medio de recirculación con agua empleando una manguera de plástico la cual rodeaba a la minicelda. La temperatura del agua que

circulaba por el tubo fue regulada por medio de un termostato. En la figura 2 se muestra esquematizado el sistema de regulación de temperatura de la minicelda.

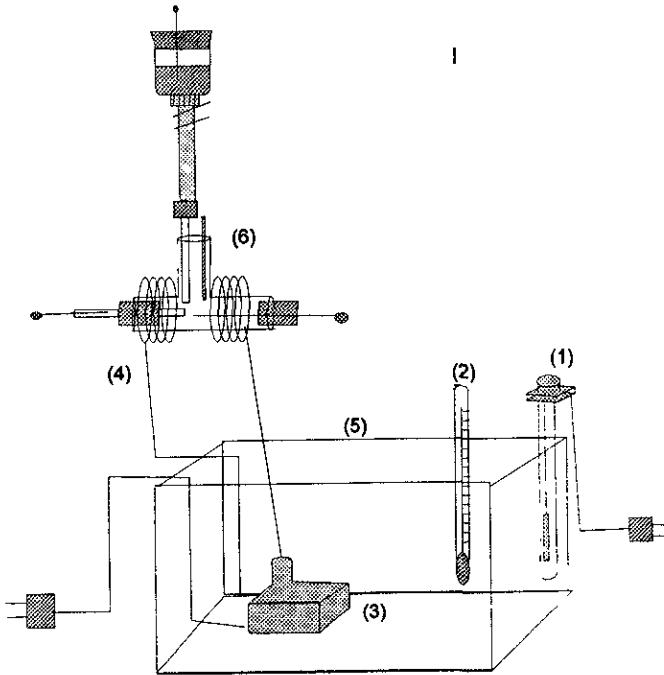


Fig. 2. Equipo para regular la temperatura de la celda. (1) Termostato. (2) Termómetro. (3) Bomba de agua. (4) Manguera de recirculación. (5) Recipiente con agua. (6) Minicelda polarográfica.

El mercurio que se acumuló durante los experimentos se retiró de la celda por medio de una jeringa. En todos los experimentos se burbujeó nitrógeno húmedo durante 3-5 minutos para retirar el oxígeno disuelto en el medio.

Los polarogramas fueron obtenidos con un potenciostato-galvanostato Radiometer Tacussel PGP 201 acoplado a un graficador XY PAR.

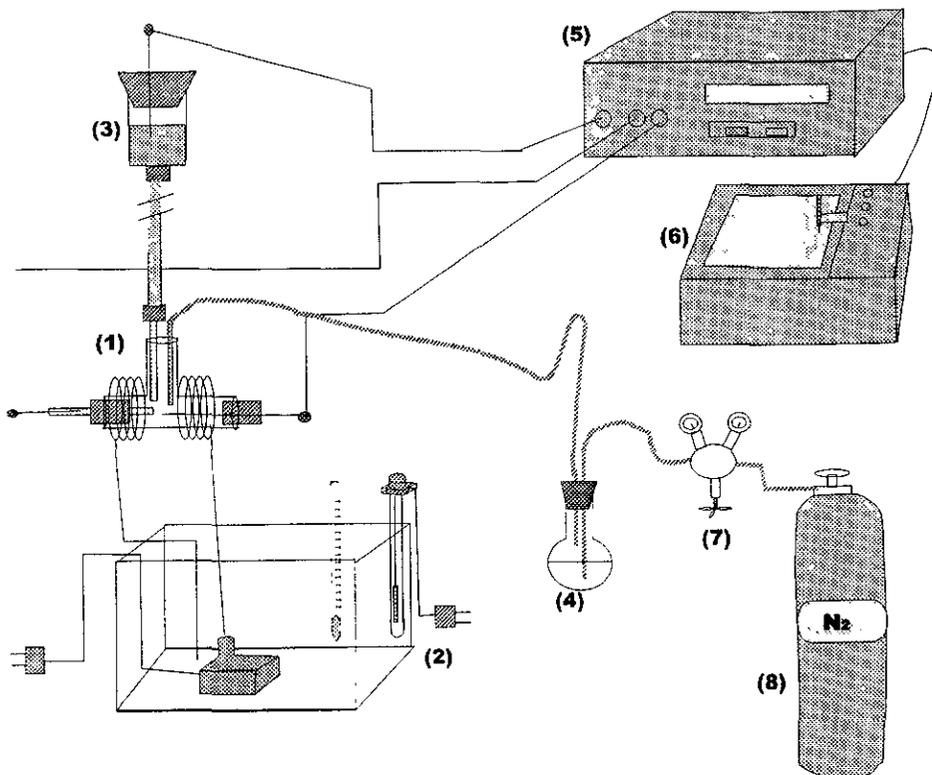


Fig.3 Esquema completo del sistema empleado en las determinaciones experimentales. (1) Minitalda. (2) Equipo regulador de temperatura. (3) Poza polarográfica. (4) Humidificador de N₂. (5) Potenciostato. (6) Graficador. (7) Regulador de presión. (8) Tanque de N₂.

II) Preparación de disoluciones.

Todos los experimentos fueron realizados en amortiguador de Tris pH 8.0 de C_{BS} 0.01 M con nitrato de potasio 0.1 F como electrolito soporte.

La glutatión reductasa de levadura tenía 0.54 mg_{proteína}/mL y 190 U/mg_{proteína} y fue adquirida de "Sigma Chemical Co." (San Luis Mo. USA).

El glutatión oxidado en forma de sal disódica, el glutatión reducido, el NADPH y el NAD⁺ fueron adquiridos de "Sigma Chemical Co." (San Luis Mo. USA).

Se prepararon disoluciones estándar en agua destilada de GSH 0.10 M; GSSG 0.05M así como soluciones de NADPH 0.05 M y NAD^+ 0.05 M.

III) Programas de perturbación.

Para el estudio de la glutatión reductasa se empleó como técnica electroanalítica la polarografía clásica.

Las condiciones que se manejaron para este estudio fueron potencial de inicio E_0 - 0.260 V, potencial final E_i -1.240 V; la velocidad de barrido fue 5 mV/s; el intervalo de corriente al que se trabajó fue de 100 μA . Estas condiciones se encuentran esquematizadas en la figura 4.

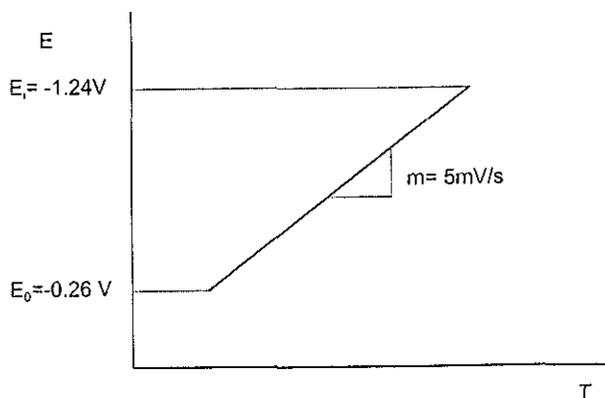


Fig. 4. Programa de perturbación.

Primero se trazó el dominio de electroactividad, posteriormente se hicieron adiciones de 100 μL de glutatión oxidado 0.05 M, en presencia de rojo de metilo, el cual funciona como supresor de máximos polarográficos; se trazaron los polarogramas entre cada adición.

Posteriormente, para estudiar el comportamiento polarográfico del glutatión reducido, se adicionaron tres alícuotas de GSH 0.01 M, una de 100 μL y dos de 50 μL , se trazó el polarograma correspondiente para cada adición.

Adicionalmente, para estudiar la electroactividad del NADPH y del NAD^+ en el DME, en una celda aparte se hicieron adiciones de NADPH 0.05 M de 100 μL y se trazaron los polarogramas después de cada adición. Posteriormente, se agregaron alícuotas de 100 μL de NAD^+ 0.1 M y gotas de rojo de metilo, trazándose los correspondientes polarogramas.

Con la finalidad de conocer el comportamiento polarográfico de la mezcla GSSG y NADPH, en presencia de glutatión reductasa, se realizaron los siguientes ensayos.

Los parámetros impuestos al potencióstato fueron: E_0 de 0.00 V, E_1 de -1.200 V, velocidad de barrido 5 mV/s, el intervalo de corriente al que se trabajó fue 100 μA .

Al igual que en los experimentos anteriores se empleó el amortiguador de Tris 0.1 M pH 8.0 en nitrato de potasio 0.1 F, pero con 0.94 mM EDTA en la celda. Se trazó el dominio de electroactividad, posteriormente, se agregó GSSG 0.05 M para obtener una concentración de 2 mM y se trazó el polarograma; luego, se agregó NADPH 0.05 M, se agitó la disolución durante unos minutos, y nuevamente se trazó el polarograma; a continuación se agregaron 5 μL de glutatión reductasa y después de burbujear unos minutos con nitrógeno húmedo, se trazó el polarograma. Finalmente, se hicieron dos adiciones de NADPH y se volvió a agitar mediante burbujeo con nitrógeno, y se obtuvieron los correspondientes polarogramas.

Con el objeto de determinar el comportamiento electroquímico de la glutatión reductasa con respecto al GSSG como sustrato se realizó lo siguiente:

Las condiciones del potencióstato en este caso fueron las siguientes: E_0 0.0 V, E_c - 0.300 V, velocidad de barrido 10 mV/s, el intervalo de corriente fue de 100 μ A. Se trazó el dominio de electroactividad, posteriormente se adicionó una alícuota de GSSG 0.05 M y se trazó el polarograma; luego, se agregó NADPH 0.05 M a una concentración diez veces mayor a la de glutatión oxidado y se volvió a trazar el polarograma; finalmente, se agregaron 5 μ L de glutatión reductasa y se empezó a medir el tiempo a partir de la adición. Se trazaron los polarogramas de la onda de oxidación de GSH a distintos tiempos. Este experimento se repitió a diferentes concentraciones de glutatión oxidado.

La cantidad de glutatión reducido formado se determinó por medio de una curva patrón. Con los polarogramas obtenidos se realizaron las curvas de altura de la onda de oxidación de GSH en función del tiempo. Ya que la altura de la onda de oxidación es directamente proporcional a la concentración de GSH fue posible deducir la cantidad de GSH producido por unidad de tiempo¹. Conociendo la cantidad de GR agregada, se obtuvo la actividad de esta enzima para la concentración de GSSG ensayada.

¹ Nota. En los polarogramas que se obtuvieron, no fue necesario realizar la conversión de las unidades a μ A ya que en todos los ensayos realizados se trabajó a la misma intensidad de corriente y a la misma escala del graficador, por tanto, involucraba un factor de conversión común a todos los polarogramas, en vista de lo cual, este factor no fue necesario para realizar los cálculos.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

I) Estudio polarográfico del glutatión (GSSG/GSH) y del NAD⁺/NADPH

En la figura 4 se muestra el dominio de electroactividad, así como el polarograma de la onda de oxidación de GSSG 1.45 mM. El potencial de media onda del GSSG es de -0.62 V ($E_{1/2}$).

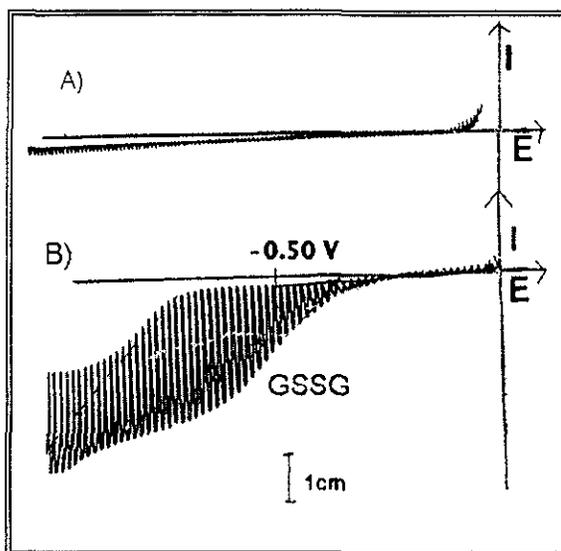


Fig. 4. A) Dominio de electroactividad del amortiguador de Tris 0.01 M pH 8.0. B) Onda de reducción de glutatión oxidado GSSG 1.45 mM.

Después de la adición de GSH a una concentración 2 mM se obtuvo el polarograma de la figura 5, pueden distinguirse las dos ondas de oxidación y de reducción al electrodo del par GSSG/GSH.

Los potenciales de media onda del GSSG y del GSH corresponden a -0.70 V para la onda de reducción del GSSG y -0.325 V para la onda de oxidación del GSH.

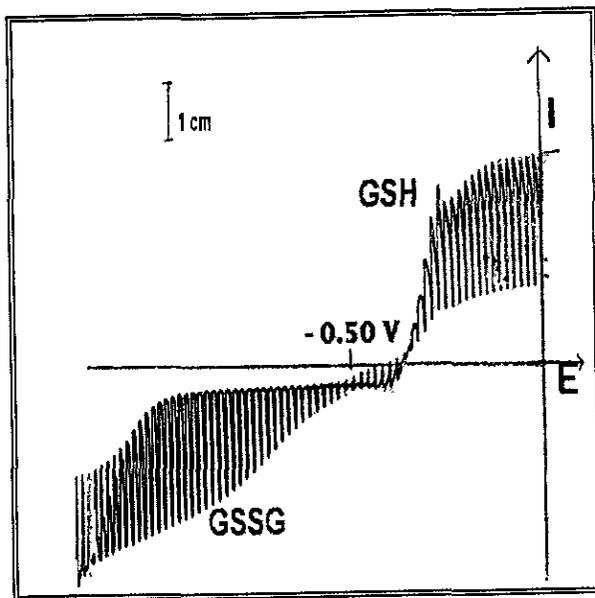


Fig. 5. Polarograma de la mezcla de GSSG 1.45 mM y GSH 2 mM.

El par GSSG/GSH no corresponde a un sistema reversible, puesto que el potencial de media onda para ambas especies es diferente; ya que en los sistemas reversibles el sobrepotencial es despreciable, el potencial de media onda de oxidación y el de reducción es prácticamente el mismo, además, se observa que el potencial de media onda correspondiente al GSSG varía con la concentración del analito. El glutatión reducido presenta un máximo polarográfico el cual desaparece en presencia de rojo de metilo.

No se encontró onda de oxidación para el NADPH, por lo que no es electroactivo en el electrodo goteante de mercurio en buffer de Tris a pH 8.0. En cambio, el NAD^+ sí presentó una onda de reducción como puede observarse en el polarograma de la figura 6, en este polarograma se encontraban disueltos el NADPH y el NAD^+ a la misma concentración 2mM.

El $E_{1/2}$ del NAD^+ corresponde a -0.87 V y como puede observarse en la onda de reducción se presentó un máximo polarográfico, el cual no fue suprimido por la presencia de rojo de metilo, este máximo se atribuye a procesos adsorptivos en la gota de mercurio, es decir, el NAD^+ se está adsorbiendo a la superficie del DME; por lo que el añadir un tensoactivo como el rojo de metilo no se suprime el máximo polarográfico, este máximo detectado corresponde a uno de tercera clase.

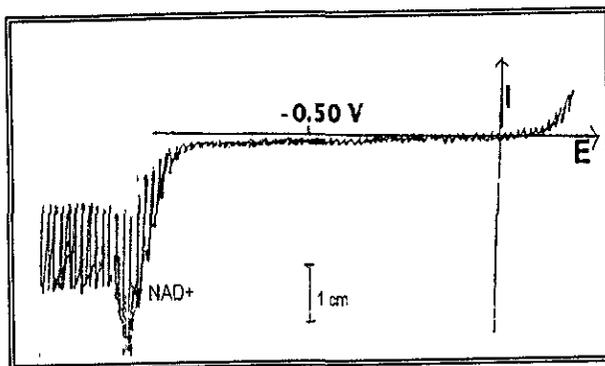


Fig. 6. Onda de reducción de NAD^+ 2 mM en presencia de NADPH 2 mM, el cual no presentó onda de oxidación en amortiguador de Tris pH 8.0. En la onda de NAD^+ se observa un máximo polarográfico.

Se empleo NAD^+ en vez de NADP^+ para observar el comportamiento polarográfico de esta especie ya que no se contaba con NADP^+ ; el empleo del NAD^+ en vez de NADP^+ se justifica ya que ambas especies difieren sólo en un grupo fosfato, además los potenciales de oxido-reducción reportados en la literatura para estas especies son muy similares (13) por lo que se esperaba un comportamiento polarográfico semejante.

A partir de este estudio preliminar puede observarse que la actividad de la glutatión reductasa puede seguirse mediante la formación de GSH y no por el consumo de GSSG, ya que la onda de oxidación de GSSG se superpone con la de NAD^+ . Además, la corriente límite de difusión del GSH es directamente proporcional a la concentración, en un amplio intervalo de concentraciones de GSH (19).

III Detección polarográfica de la actividad de la glutatión reductasa

El polarograma obtenido de una concentración 2 mM de GSSG se muestra en la figura 8a. Después de la adición de NADPH se obtuvo el polarograma de la figura 8b y como puede observarse, la simple adición del cofactor redox no produce GSH. Sin embargo, hay un corrimiento del potencial de media onda para la onda de reducción del glutatión oxidado. Esto puede explicarse por la posible interacción entre el NADPH y el GSSG que produce un desplazamiento en el $E_{1/2}$ de la onda de reducción de GSSG hacia valores de potencial más negativos, sin presentarse la reacción de oxido reducción.

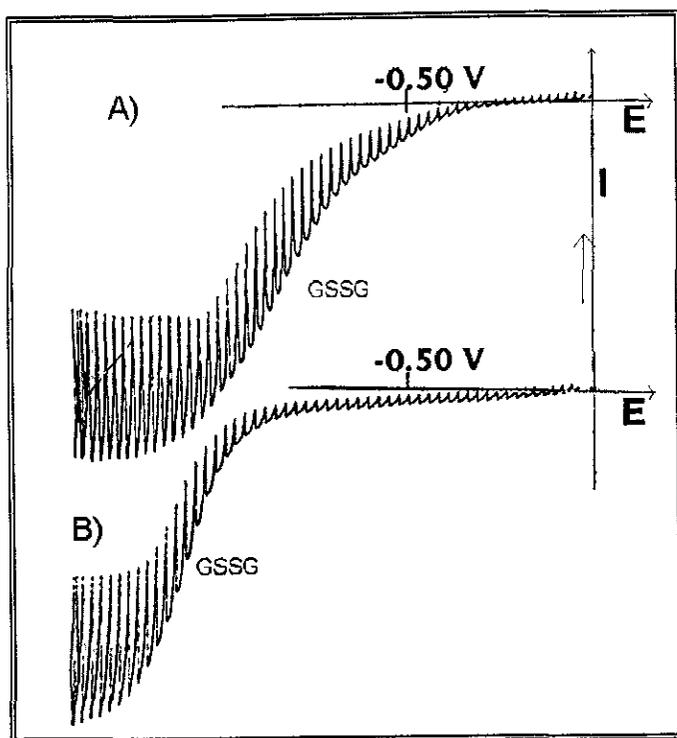


Fig. 8. a) Onda polarográfica de reducción de GSSG 2 mM, sin adición del cofactor redox. b) Onda polarográfica de reducción de GSSG en presencia de NADPH 7.5 mM.

Después de la adición de glutatión reductasa, se observó que aparece la onda de oxidación de GSH; lo que se interpreta como la actividad de la glutatión reductasa, debido a que se detectó la onda de oxidación polarográfica del GSH formado por la reacción catalizada enzimáticamente.

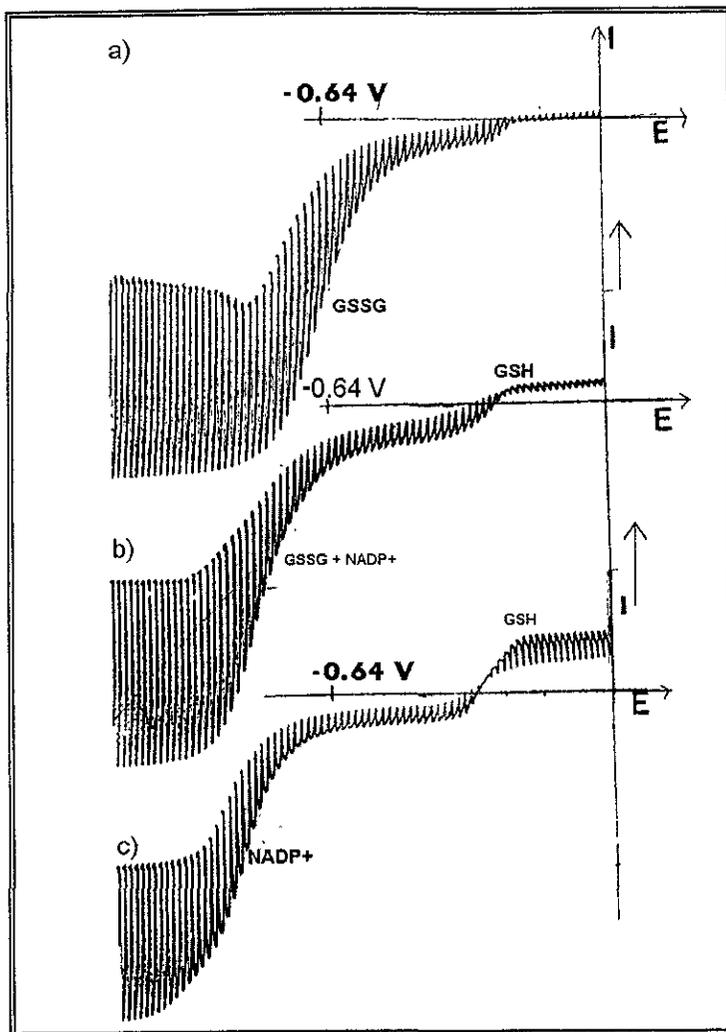


Fig. 9. Polarograma de GSSG 2 mM y NADPH después de la adición de Glutatión Reductasa. (a) $t = 0.0$ min. (b) $t = 26$ min. (c) $t = 30$ min.

La figura 9 muestra la evolución de la formación de GSH, así como el comportamiento del GSSG a diferentes tiempos. Como puede observarse la onda de oxidación del GSH aumenta con respecto al tiempo, mientras que hay un corrimiento de la onda de reducción. Esto se explica porque el GSSG se va consumiendo para formar GSH y se va formando NADP^+ , este último compuesto tiene un potencial de media onda ligeramente menor al GSSG; sin embargo, como el GSSG y el NADP^+ tienen potenciales de media onda semejantes no es posible diferenciar la disminución de la onda de glutatión oxidado, originada por el consumo de este compuesto, de la aparición de la onda de NADP^+ , ambas atribuibles a la actividad de la glutatión reductasa.

III) Determinación de los parámetros cinéticos de la Glutatión Reductasa

La actividad enzimática de la glutatión reductasa se determinó a diferentes concentraciones de sustrato, el glutatión oxidado, empleando como parámetro el incremento en la onda de oxidación del GSH. En la figura 10 puede apreciarse el incremento en la onda de GSH con respecto al tiempo una vez agregada la glutatión reductasa a la mezcla con NADPH y GSSG.

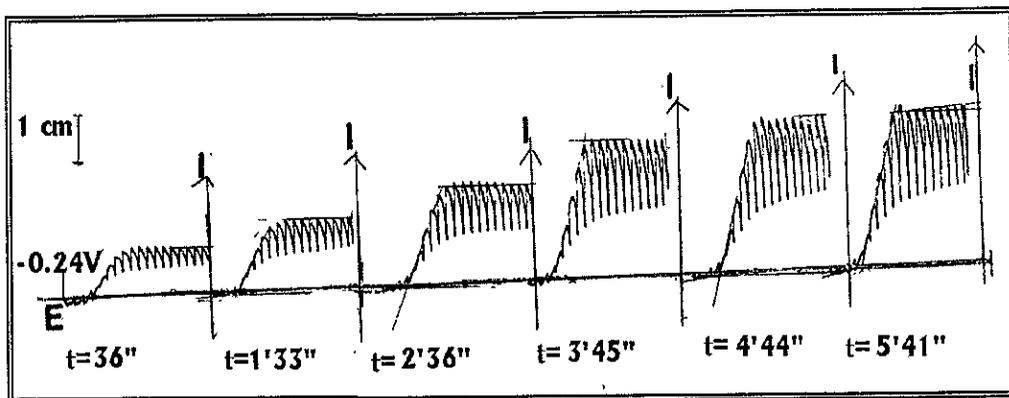


Fig. 10. Evolución de la altura de la onda de oxidación de GSH a distintos tiempos a partir de la adición de la glutatión reductasa al tiempo $t=0$.

No obstante, no se puede establecer la actividad enzimática de la enzima con respecto a la onda de reducción del NADP^+ debido a que, como ya se mencionó, la onda de reducción polarográfica del GSSG se superpone con la onda del NADP^+ , ésta onda sólo puede apreciarse una vez que se ha consumido en su totalidad el glutatión oxidado.

La figura 11 muestra una gráfica típica de altura de la onda de oxidación del glutatión reducido en función del tiempo, para una concentración de glutatión oxidado dada.

La corriente límite de difusión aumenta con respecto al tiempo, lo cual se refleja en un aumento en el tamaño de la onda de oxidación del glutatión reducido, que se está produciendo. La meseta se debe a que el glutatión oxidado presente en la disolución fue convertido en su totalidad a GSH por la acción enzimática.

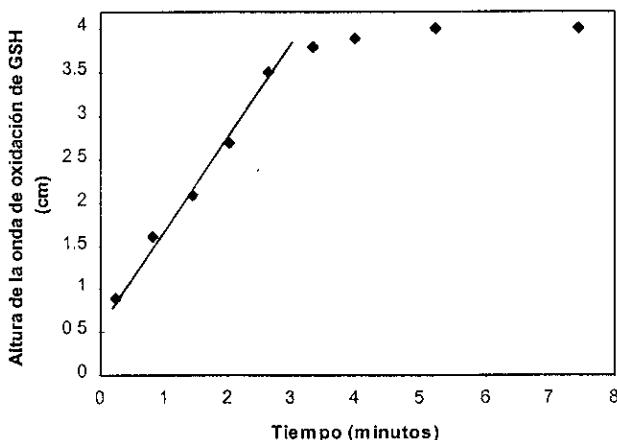


Fig. 11. Gráfica: Altura de la onda de oxidación de GSH frente al tiempo, para una concentración de GSSG 0.76 mM en presencia de NADPH y después de la adición de 5 μL de GR. La línea trazada ($\Delta\text{Altura}/\Delta t$) da una pendiente de 0.795 cm/min, intercepto en el eje Y de 0.618, un coeficiente de correlación de 0.9998 y con 2 grados de libertad.

A cada concentración de GSSG se le determinó la pendiente a partir de los primeros puntos antes del agotamiento del sustrato. En esta zona la formación de glutatión reducido es directamente proporcional al tiempo. Por medio de la pendiente se obtuvo la velocidad de la glutatión reductasa para la concentración de GSSG ensayada. Se determinó la cantidad de GSH formada, con base a la curva de calibración, y con la pendiente se deduce la actividad enzimática en μmol de GSH producido por minuto por miligramo de proteína, $\mu\text{mol}_{\text{GSH}}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteína}}$.

Con los datos de actividad enzimática determinados para cada concentración de glutatión oxidado se elaboró la gráfica que se muestra en la figura 12.

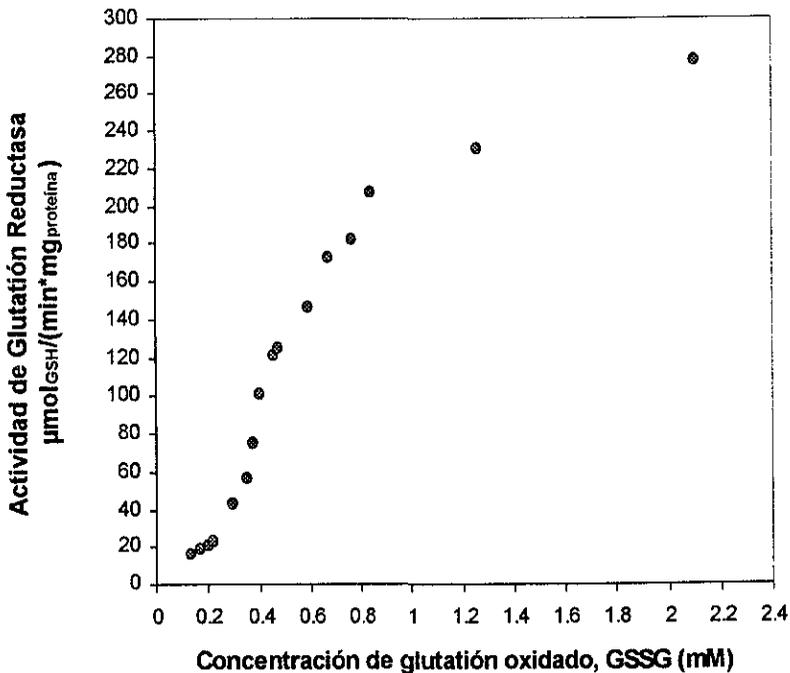


Fig. 12. Gráfica de Michaelis Menten. Actividad de la Glutación Reductasa en función de la concentración de GSSG.

Los datos de actividad enzimática fueron analizados mediante un programa estadístico (Microcal Origin Versión 4.1) a fin de determinar si la gráfica de la figura 12 se ajusta al modelo de Michaelis Menten y de esta forma determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

En la gráfica que se muestra en la figura 13 se observa el modelo de Michaelis Menten ajustado a los datos experimentales.

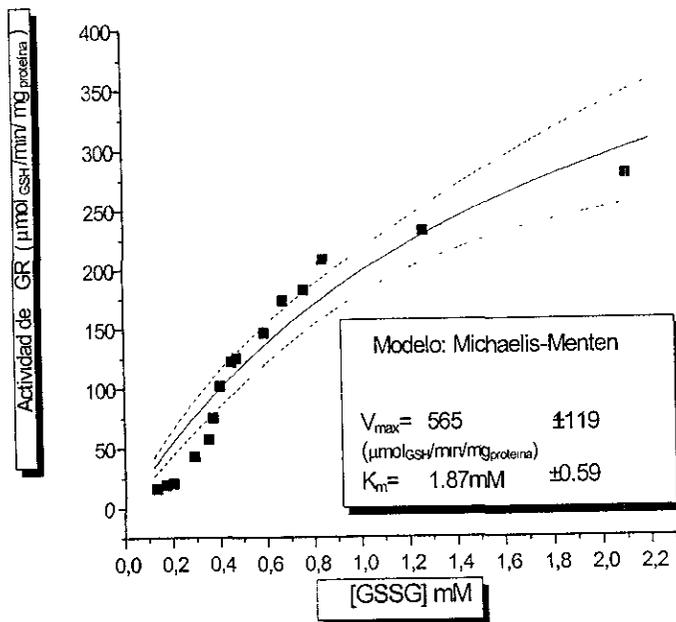


Fig. 13 Gráfica Actividad de GR frente a [GSSG] con el modelo de Michaelis-Menten ajustado.

De la figura 13 puede observarse que la GR no obedece el comportamiento de una enzima de tipo Michaelis Menten. El índice de correlación de los datos es bajo (0.9595), y el valor derivado del ajuste de los datos mediante la minimización por χ^2 es elevado, lo

que indica que los datos experimentales no se ajustan al comportamiento de una hipérbola.

Debido a estas razones se decidió ajustar los datos a otro modelo. El modelo al que se ajustaron los datos fue la ecuación de Hill, también se empleó el programa Microcal Origin. Los datos así ajustados pueden observarse en la gráfica de la figura 14.

Como puede verse, la dispersión de los datos es menor en el modelo de Hill que en el modelo de Michaelis Menten. Esto se refleja en el valor del coeficiente de correlación y el de χ^2 . Además, los intervalos de confianza derivados del modelo de Hill son más estrechos que los que se derivan del modelo de Michaelis Menten, ambos aplicados al mismo intervalo de confianza del 95%. Esto puede observarse en las figuras 13 y 14.

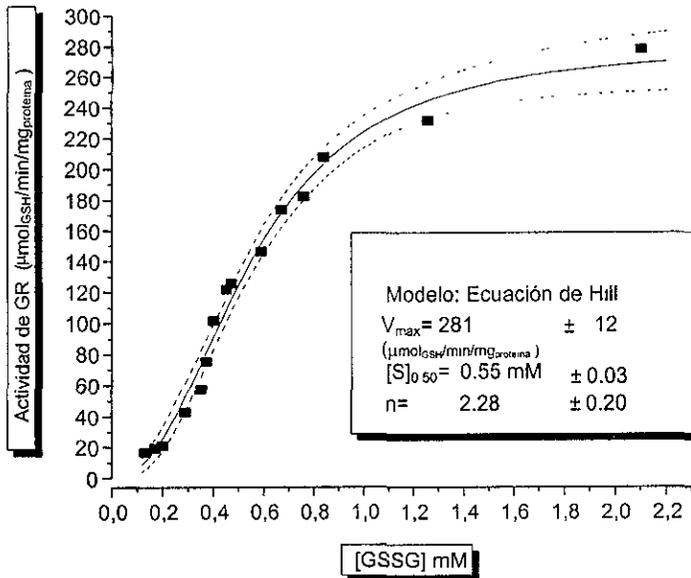


Fig. 14. Gráfica Actividad de GR frente a [GSSG] con el modelo de Hill ajustado.

La tabla 1 contiene los resultados obtenidos a partir de los dos modelos empleados para ajustar los datos experimentales.

Tabla 1

Modelo	Coefficiente de Hill	[GSSG] en la que $v = \frac{1}{2} V_{max}$	V_{max} ($\mu\text{mol}_{\text{GSH}}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteína}}$)	χ^2	Coefficiente de correlación
Michaelis Menten	-	$K_m = 1.87 \text{ mM} \pm 29.9\%$	$565.0 \pm 21.1\%$	580.0	0.9595
Hill	2.3	$[S]_{0.5} = 0.55 \text{ mM} \pm 5.4\%$	$281.12 \pm 4.4\%$	99.7	-0.9937

Los datos experimentales se ajustan al modelo de Hill de mejor manera que al de Michaelis Menten, de la tabla 1 se observa una menor dispersión en los parámetros cinéticos conseguidos con ambos modelos.

Dado que el valor del coeficiente de Hill (n) es 2.3, esto sugiere que existe una cooperatividad positiva. El valor de n indica el número de sitios de unión de sustrato, en este caso el GSSG, a la GR; sin embargo, dado que n es un número fraccionado, no tiene sentido físico que haya 2.3 sitios de cooperatividad elevada. De esto se deduce que el número mínimo de posibles sitios de unión es 3, por lo que el valor de n es 3 y se presenta una cooperatividad moderada (15,20).

Los parámetros cinéticos determinados en las condiciones de trabajo son por tanto: $[S]_{0.5} = 0.55 \pm 0.03 \text{ mM}$, $n=3$ y la velocidad de saturación corresponde a: $281 \pm 12 \mu\text{mol}_{\text{GSH}}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}})$. El valor de V_{max} determinado experimentalmente puede compararse con el reportado por la literatura mediante las conversiones pertinentes, teniendo en cuenta que el peso de la GR de levadura oscila en 118,000 y que existe una

mol de FAD por mol de GR. Así, el valor de V_{max} queda en términos de $\text{mol}_{\text{NADPH}}/(\text{min} \cdot \text{mol}_{\text{FAD}})$ y corresponde a $16.6 \cdot 10^3 \text{ mol}_{\text{NADPH}}/(\text{min} \cdot \text{mol}_{\text{FAD}})$.

Los parámetros reportados en la literatura son: $K_m(\text{GSSG})$ $55 \mu\text{M}$ y V_{max} de $15 \cdot 10^3 \text{ mol}_{\text{NADPH}}/(\text{min} \cdot \text{mol}_{\text{FAD}})$ a 25°C y pH 7.6 (9). La V_{max} obtenida por polarografía difiere en un 9.6% de la reportada por espectrofotometría.

Dentro de la revisión bibliográfica que se realizó, no se encontró ningún reporte que indique que la GR de levadura presenta cooperatividad positiva. Cabe mencionar que se ha reportado que las mutantes construidas de glutatión reductasa obtenidas de *Eschenchia coli* V421H/A422H, V421/A422E y otras que son termodinámicamente inestables presentan un comportamiento sigmoidal (23).

La diferencia presentada entre el comportamiento reportado por métodos espectrofotométricos y el determinado por polarografía clásica puede deberse en parte a que se trabajó a un pH ligeramente mayor del reportado por espectrofotometría(11), pH 8. Además, el medio de reacción en el que se trabajó fue Tris, mientras que los parámetros han sido determinados en un amortiguador de fosfatos.

Conjuntamente, el medio de reacción en el que se realizaron los experimentos tenía una fuerza iónica de 0.1 M, impuesta por el nitrato de potasio, y necesaria para el trabajo en polarografía. Una elevada fuerza iónica modifica la afinidad de la glutatión reductasa por su sustrato, se ha reportado que la glutatión reductasa aumenta el valor de su K_m si se modifica la fuerza iónica del medio; lo cual explica que el valor de $S_{0.5}$ sea diez veces mayor al reportado en la literatura (11).

El modelo de Hill sólo indica si la enzima presenta cooperatividad positiva pero no proporciona información acerca del posible mecanismo catalítico. Además, hay que tener en cuenta que la forma sigmoide de la curva no es necesariamente indicativa de alosterismo (20), puede explicarse si una de las dos reacciones es más rápida que la

otra, o si la afinidad de alguno de los sustratos se ve modificada por la presencia de la enzima unida con el otro sustrato.

Adicionalmente, la cooperatividad positiva puede presentarse como resultado de que la GR es inestable en el medio de ensayo y el GSSG puede estar actuando como un agente estabilizante de la enzima. En consecuencia, a bajas concentraciones de sustrato se presentaría una mayor proporción de enzima inactiva que de enzima activa por lo tanto se subestimaría la actividad de dicha enzima, en cambio, a altas concentraciones de sustrato la proporción de enzima activa es mayor que la de enzima inactiva. Así, la actividad de la GR aumenta más rápido de lo esperado conforme se incrementa la concentración de GSSG lo que da como resultado una curva aparentemente sigmoide (24).

Es posible que en nuestras condiciones de trabajo éste sea el caso, ya que el pH y la fuerza iónica empleados se alejaron de la estabilidad óptima de la GR(11).

CONCLUSIONES

Mediante la evaluación del comportamiento electroanalítico de la glutatión reductasa por polarografía de corriente directa será posible diseñar métodos para la cuantificación de glutatión total (GSSG y GSH) y glutatión en su forma oxidada y/o reducida en muestras biológicas mediante el empleo de técnicas electroanalíticas; ya sea al diseñar un biosensor que incorpore a la glutatión reductasa o por medio de la polarografía clásica directa.

El comportamiento de la enzima difiere con el reportado debido a las distintas condiciones en las que se desarrolló el experimento.

La técnica aquí desarrollada puede emplearse en la determinación de parámetros cinéticos de enzimas cuyos sustratos y/o productos sean electroactivos en el electrodo goteante de mercurio.

Aunque pueden aplicarse otros tipos de modelos para ajustar los datos y tener una idea del mecanismo catalítico de la glutatión reductasa bajo las condiciones de trabajo, esta información no es vital para el desarrollo del biosensor. Se requieren realizar estudios posteriores acerca de unión de sustrato a la enzima para poder determinar si existe una verdadera cooperatividad positiva en las condiciones de trabajo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO I. CONGRESOS.

A continuación se presentan las copias de las memorias de los congresos en que se presentaron parte de los resultados de este trabajo experimental de tesis.

Estos resultados se presentaron en el XIII Congreso Nacional de Electroquímica realizado en Guanajuato en 1997, y en el XIII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica 1998, realizado en Chile.

86. III: DETERMINACIÓN POLAROGRÁFICA DE LA K_m DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA

Heriberto Prado, Patricia Díaz, Alejandro Paez⁽¹⁾, Martha Zentella de Peña⁽²⁾

(1) Departamento de Química Analítica, Fac. Química, Tel. 622-37-30

(2) Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina
Ciudad Universitaria DF Del Coahuacán CP 04510

Introducción

La glutatión reductasa catalisa la reacción redox, entre los pares conjugados glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y NADPH/NADP⁺, siguiente [1]:



Esta enzima actúa en combinación con la catalasa, la superóxido-dismutasa y la glutatión peroxidasa, en los mecanismos de defensa contra los agentes oxidantes exógenos y endógenos, en un ciclo de reacciones de naturaleza óxido-reductora [2]. La determinación de la actividad de estas enzimas ha sido hecha espectrofotométrica de absorción [3]. Básicamente, sólo la catalasa ha sido estudiada por métodos electroanalíticos [4]. En consecuencia el estudio de estas enzimas sugiere un gran número de experimentos en *Biotelequímica aplicada* [5].

En particular la glutatión reductasa, GR, es de interés en nuestro grupo, ya que el glutatión oxidado es muy importante en Biomedicina y Biotecnología ya que se considera al aumento de glutatión oxidado como un posible indicador de estrés oxidativo (daño celular) por agentes exógenos (contaminación del aire, etc) [6,7].

La caracterización de una enzima implica la determinación de su constante de velocidad *michaeliana*, K_m, y de su velocidad máxima, v_{max} [8]. Es posible acceder a la determinación de estos parámetros no sólo por métodos espectrofotométricos, sino también por metodología electroanalítica [9].

Este trabajo corto presenta la determinación electroanalítica de la K_m y v_{max} de la glutatión reductasa por polarografía clásica, no reportadas en la literatura por estos métodos. Estos estudios permitirán obtener información para la determinación del glutatión oxidado, GSSG, por determinación polarográfica o bien por medio de la construcción de un biosensor con la enzima GR inmovilizada

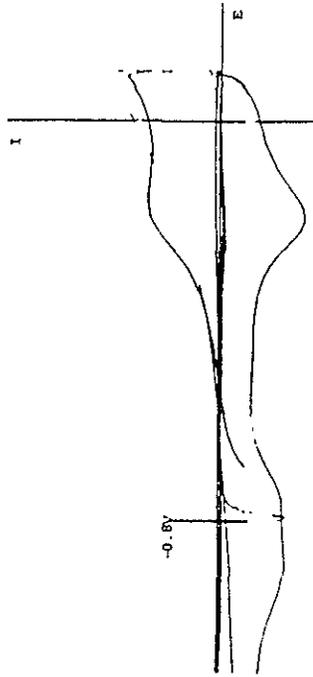


Figura 2 Voltamperograma típico de GSHg depositado sobre ILME durante 20 minutos a E_{dep} = -0.1V obtenido en medio de reacción TBS pH=8.3 KNO₃ 0.1M, v=400 mV/s.

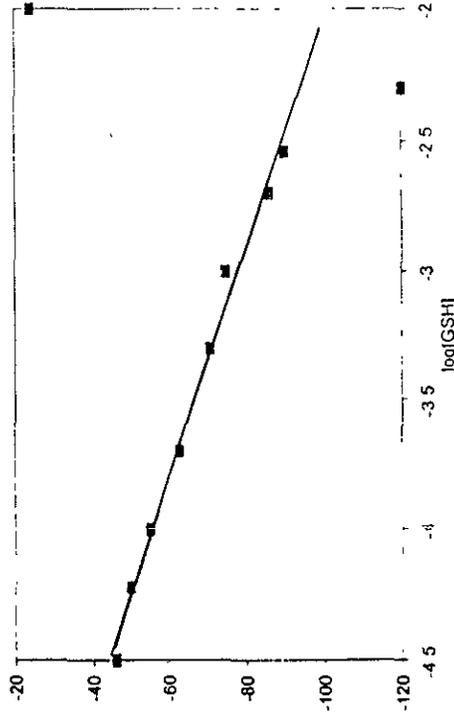


Figura 3 Curva de calibración típica, E_{ox} = (log [GSH]₀ + 0.5), de la celda potenciométrica: Au(II)[GSH]g/solución GSH, pH=9/BECS

La linearización de la función Actividad = $f(\text{GSSG})$, genera la ecuación Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[\text{GSSG}]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

donde v = actividad enzimática. La figura 5 muestra la gráfica $1/v = f(1/[\text{GSSG}])$. El análisis de regresión lineal arroja la ecuación siguiente

$$(1/v) = 1.165 \pm 0.142 + 2.031 \pm 0.162 (1/[\text{GSSG}])$$

De esta ecuación se deduce que $v_{\max} = 0.8581 \mu\text{mol/min}/\mu\text{E}$, y $K_m = 1.74 \text{ mM}$. El valor reportado en la literatura por el método espectrofotométrico habitual es 0.61 mM a $\text{pH} = 7.6$ (3).

Los resultados obtenidos permiten diseñar futuros experimentos para la determinación enzimática de GSSG en muestras diversas y a que es posible poner a punto curvas de calibración del tipo $(i_{\text{cat}}) = f([\text{GSSG}])$ de manera similar a las determinaciones por espectrofotometría. Por otro lado la determinación de K_m y v_{\max} permitirán poner a punto un posible sensor con la enzima Glutathion reductasa inmovilizada

Los autores agradecen a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM el apoyo al proyecto IN2131695

Bibliografía

- 1) P. D. Boyer, "The Enzymes", 3rd Edition, Vol. XIII, Academic Press Inc, Pag. 129 (1976)
- 2) H. Jaeschke and J. R. Mitchell, "Oxidant stress in perfused organs" *Methods in Enzymology*, 186(1990):52-755
- 3) J. Bergmeyer and M. Grafl, "Methods of Enzymatic Analysis", 3rd Ed., Vol. II, Ed. Verlag Chemie, Pag. 210 (1983)
- 4) J. Garcia, A. Baeza, I. González, "Modificación de la interfase mercapto-disolución de la enzima catalasa" *Memoria de curso del VI Simposio de estudiantes de Posgrado en Química "Fernando Romo"*, Mexico 1992
- 5) J. Koryta, "What is Bioelectrochemistry", *Electrochimica Acta* 29(1984):1291-1292
- 6) Sues H. and Cadenas E., "Oxidative stress: Damage to intact cells and organs" *Philos. Trans. Soc. London* 331(1995):617
- 7) R. Nordman, C. Ribiere and H. Rouach, *Free Rad. Biol. Med.* 12(1992):219
- 8) I. H. Segel, "Calculus of Biochemistry", 2a Ed. Ed. Acrbia, 1982
- 9) M. K. Colkcs and J. Jordan, "Comparison of Spectrophotometric and Amperometric Rate Parameters of Enzyme Reactions" *Analytical Chemistry* 65(1993):164-168

Parte Experimental

Los polarogramas se obtuvieron con un potencióstato-galvanostato *Radiometer-Tacussel FGP 201* y un graficador XY PAR. Como un electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de gota de Hg, DME, ($t = 1s$), Se usó un alambre de acero inoxidable como electrodo auxiliar y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl 1M. El medio de reacción utilizado es un amortiguador de Tris-hidroxi-metil-aminio-metano, TBS, $\text{pH} = 8.0$, $C_{\text{Tris}} = 0.01 \text{ M}$, EDTA 0.96 mM . El volumen de trabajo es de $500 \mu\text{L}$ para lo cual se empleó la inyección que se muestra en la Figura 1. Se saturó a las disoluciones de trabajo con nitrógeno húmedo y se trabajó en presencia de un supresor de máximos polarográficos

Primero se traza el dominio de electroactividad, posteriormente se adicionan NADPH a una concentración inicial de 7.4 mM , GSSG a concentración inicial 0.25 mM y $5 \mu\text{L}$ de glutatión reductasa $5/0.1/4$ (102.6 U.E./mL). Se trazan los polarogramas de la onda de oxidación de GSH a distintos tiempos. Se repite el experimento anterior variando la concentración inicial de GSSG. Se ensayan aproximadamente 10 concentraciones hasta un valor de 3 mM

Resultados y Discusión

La figura 2 muestra a modo de ejemplo, la evolución de los polarogramas clásicos para $0, 26$ y 30 minutos de acción enzimática. Se observa una onda de reducción a $E_{1/2} = -0.645 \text{ V}$ que corresponde a la reducción del NADP. La onda de reducción del GSSG aparece muy cercana a la anterior por lo que prácticamente no se resuelve. Se observa una onda correspondiente a la oxidación del GSH, $E_{1/2} = 0.273 \text{ V}$, generado en solución y que aumenta con el tiempo. El NADPH no es electroactivo

Determinación de K_m y v_{\max}

La figura 3 muestra la variación del aumento de la intensidad de corriente límite de difusión de la oxidación del GSH, i_{lim} , producido por acción enzimática en solución, con respecto al tiempo. Dependiente de esta recta y del valor de i_{lim} en condiciones de estado estacionario enzimático (condiciones de Michaelis-Menten), se deduce la actividad enzimática en unidades de μmol de GSH producido por minuto por unidad enzimática, $\mu\text{mol/min}/\mu\text{E}$

Se determina la actividad enzimática para cada concentración de sustrato ensayado. La figura 4 muestra la actividad enzimática a con respecto a la concentración de sustrato

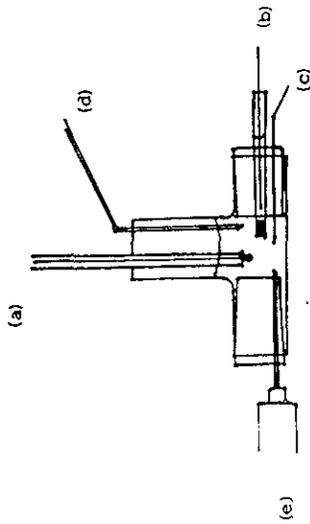


Figura 1 Mini celda polarográfica, $V_0=0.5$ mL. a) EGM; b) ER Ag/AgCl(KCl); c) EA. d) N_2 ; e) purga de lig.

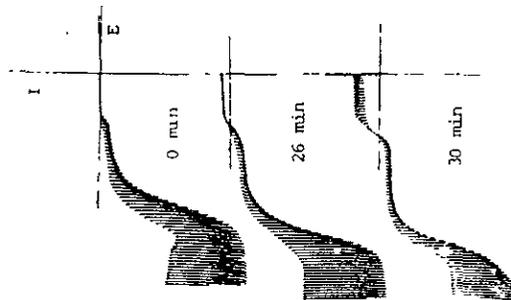


Figura 2 Evolución típica de los polarogramas clásicos para 0, 26 y 30 minutos de acción enzimática. $v=10$ mv/S; $t=1$ s; en PBS pH=8.0 20 mM.

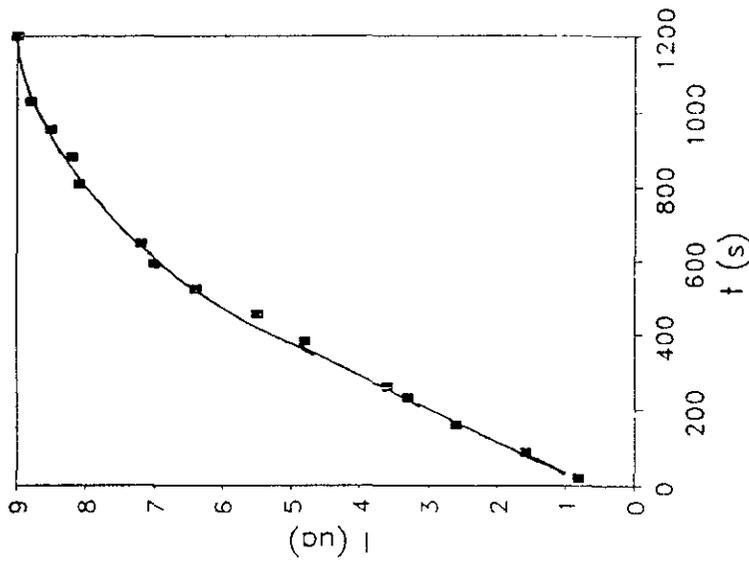


Figura 3 Variación del aumento de la intensidad de corriente límite de difusión de la oxidación del GSH, t_{lim} , producido por acción enzimática en solución, con respecto al tiempo.

INDUCCION DE MECANISMOS DE REACCION MEDIANTE LA ESTIMACION DEL NUMERO DE ELECTRONES

Mónica Galicia y Felipe J. González

Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Apdo. Postal 14-740 México D.F.,
Tel 7 47 70 00, ext 4070, Fax: 7 47 71 13

Introducción

La voltimetría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más utilizadas para el estudio de procesos de transferencia de carga asociados a reacciones químicas acopladas [1-2]. Generalmente, esta técnica se emplea en las primeras etapas de investigación con el propósito de obtener información cualitativa acerca del mecanismo que gobierna la reducción u oxidación de alguna especie electroactiva de interés [3]. La observación directa de la forma, posición y número de picos voltamétricos, permite en la mayoría de los casos plantear algunas hipótesis acerca de las diferentes etapas de reacción que se pueden presentar en el sistema bajo estudio [4-6]

Cuando los sistemas presentan un sólo pico, el análisis voltamétrico no necesariamente es más fácil de realizar que en aquellos casos que presentan muchos picos, debido a que en un sólo pico pueden estar ocultos una gran variedad de procesos. En estos casos, es conveniente realizar un análisis cuantitativo para obtener información acerca de las diferentes reacciones que podrían ocurrir en la zona de potencial en la que se encuentra este pico único. Por ejemplo, se pueden analizar las variaciones del potencial de pico (E_p) y la anchura del pico ($E_p-E_p/2$) en función de la velocidad de barrido (v) y la concentración del sustrato electroactivo (C^*). Generalmente este tipo de análisis permite proponer un mecanismo de reacción sobre la base de predicciones teóricas [7]. Para que este mecanismo pueda ser considerado como correcto, es necesario además que sea consistente con los productos formados en experimentos de electrolisis preparativa. Sin embargo, esta prueba de consistencia tiene la desventaja de que requiere de períodos de experimentación muy largos, que implican la separación, purificación y caracterización de los productos de reacción formados. Con el propósito de obtener información mecanística sin recurrir a la electrolisis preparativa, se puede adoptar una prueba alternativa de consistencia mecanística basada en la estimación del número de electrones estequiométrico de la reacción (número de electrones aparente, n_{app}). Aunque este tipo de estimaciones puede realizarse mediante una gran variedad de métodos [8-11], en este trabajo se utiliza un método voltamétrico que resulta particularmente sencillo y rápido de aplicar. Este método consiste en la normalización de la corriente pico mostrada

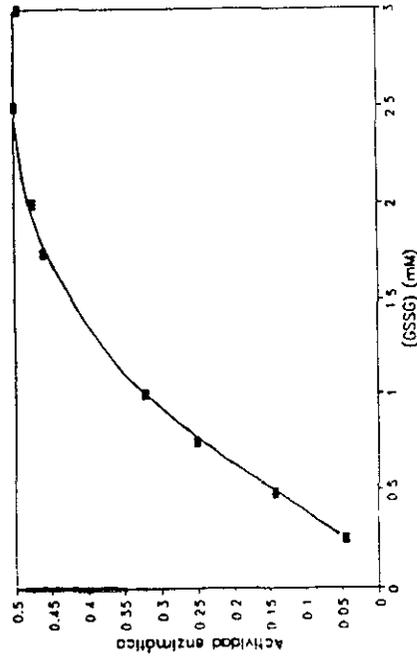


Figura 4 Actividad enzimática de la glutatión reductasa con respecto a la concentración de sustrato. La actividad está expresada en $\mu\text{mol de GSH}/\text{min}/\mu\text{E}$.

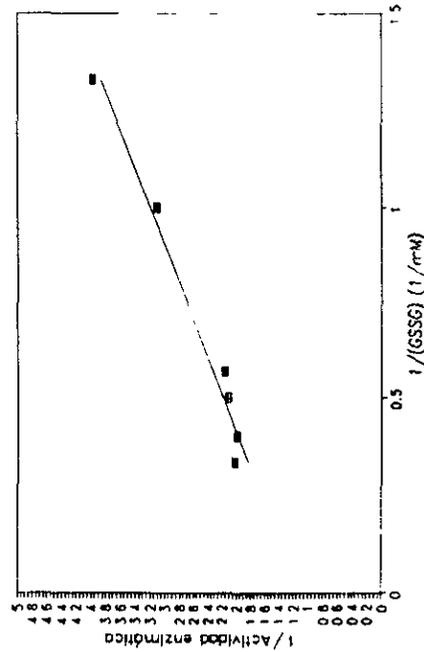


Figura 5 Gráfica de Lineweaver-Burk, $1/v = (1/v_{max}) + (1/(K_m \cdot v_{max}))$ para la glutatión reductasa en presencia de NADPH.

Determinación electroanalítica de la Km' de la Glutatión Reductasa

JOSE LUIS ORTIZ, HERIBERTO PRADO,
PATRICIA DÍAZ, ALEJANDRO BAEZA*
Departamento de Química Analítica, Fac. Química;
Ciudad Universitaria DF Del Coyoacán CP 04510
México DF
baeza@servidor.unam.mx

Introducción

La glutatión reductasa cataliza la reacción redox, entre los pares conjugados glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y NADPH/NADP⁺, siguiente (1):



Esta enzima actúa en combinación con la catalasa, la superóxido-dismutasa y la glutatión peroxidasa, en los mecanismos de defensa contra los agentes oxidantes exógenos y endógenos, en un ciclo de reacciones de naturaleza óxido-reductoras [2]. La determinación de la actividad de estas enzimas ha sido hecha por espectrofotometría de absorción [3]. Básicamente, sólo la catalasa ha sido estudiada por métodos electroanalíticos. En consecuencia el estudio de estas enzimas sugiere un gran número de experimentos en *Bioelectroquímica aplicada* [4].

En particular la glutatión reductasa, GR, es de interés en nuestro grupo, ya que el glutatión oxidado es muy importante en Biomedicina y Biotecnología ya que se considera al aumento de glutatión oxidado como un posible indicador de estrés oxidativo (daño celular por agentes externos (intoxicación alcohólica, contaminación del aire, etc.).

La caracterización de una enzima implica la determinación de su constante de velocidad *michaelseana*, K_m , y de su velocidad máxima, v_{max} . Es posible acceder a la determinación de estos parámetros no sólo por métodos espectrofotométricos, sino también por metodología electroanalítica [5].

Este trabajo corto presenta la determinación electroanalítica de la K_m y v_{max} de la glutatión reductasa por polarografía clásica, no reportadas en la literatura por estos métodos.

Se presenta un estudio previo por voltamperometría cíclica para asignar las reacciones electroquímicas a las ondas polarográficas encontradas. Estos estudios permitirán obtener información para la determinación del glutatión oxidado, GSSG, por determinación polarográfica directa, o bien por medio de la construcción de un biosensor con la enzima GR inmovilizada, en un futuro.

Parte Experimental

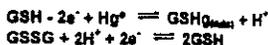
Los polarogramas se obtuvieron con un potencióstato-galvanostato Radiometer-Tacusej PGP 201 y un graficador XY PAR. Como el electrodo de trabajo, se utilizó un electrodo de gota de Hg, DME, ($t=1s$). Se usó un alambre de acero inoxidable como electrodo auxiliar y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl 1M. La voltamperometría cíclica se realiza con un electrodo de gota suspendida, HDWE, VA STAND Metrohm. El medio de reacción utilizado es un amortiguador de Tris-hidro-metil-amino-metano, TBS, pH=8.0 y $C_{TBS}=0.01$ M, y EDTA 0.96 mM. El volumen de trabajo es de 500 μ L para lo cual se emplea una micropipeta. Se satura a las disoluciones de trabajo con nitrógeno húmedo y se trabaja en presencia de un supresor de máximos polarográficos.

El estudio voltamperométrico se realiza con GSH 1 mM y GSSG 1 mM tanto adicionado al medio como por oxidación con peróxido y posterior eliminación de éste con catalasa y burbujeo con nitrógeno. En el estudio polarográfico, primero se traza el dominio de electroactividad, posteriormente se adicionan NADPH a una concentración inicial de 7.4 mM, GSSG a concentración inicial 0.25 mM y 5 μ L de glutatión reductasa SIGMA (102.6 U.E./mL). Se trazan los polarogramas de la onda de oxidación de GSH a distintos tiempos. Se repite el experimento anterior variando la concentración inicial de GSSG. Se ensayan aproximadamente 20 concentraciones hasta un valor de 3 mM.

Resultados y Discusión

La evolución de los voltamperogramas cíclicos muestran que la oxidación del GSH sobre Hg genera un producto de adsorción en capa progresiva de características reversibles. La reducción del GSSG ocurre a potenciales más reducidos con características irreversibles. Con base a la evolución de los

voltamperogramas se proponen las siguientes reacciones:



Las ondas polarográficas correspondientes coinciden con las señales voltamperométricas encontradas.

La evolución de los polarogramas clásicos con el tiempo de acción enzimática, muestran una onda de reducción a $E_{1/2} = -0.645 \text{ V}$ que corresponde a la reducción del NADP⁺. La onda de reducción del GSSG aparece muy cercana a la anterior por lo que prácticamente no se resuelve. Se observa una onda correspondiente a la oxidación del GSH, $E_{1/2} = -0.272 \text{ V}$, generado en solución y que aumenta con el tiempo. El NADPH no es electroactivo.

Determinación de K_m y v_{max} .

La variación del aumento de la intensidad de corriente límite de difusión de la oxidación del GSH, i_{lim} , producido por acción enzimática en solución, con respecto al tiempo es de tipo Michaeliana. De la pendiente de la recta inicial y del valor de i_{lim} en condiciones de estado estacionario enzimático (condiciones de Michaelis-Menten), se deduce la actividad enzimática en unidades de μmol de GSH producido por minuto por unidad enzimática, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{UE}$

Se determina la actividad enzimática para cada concentración de sustrato ensayado. La actividad enzimática con respecto a la concentración de sustrato se linealiza. La linealización de la función Actividad = $f([GSH])$, genera la ecuación Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[GSSG]} + \frac{1}{v_{max}}$$

donde v = actividad enzimática. La gráfica $1/v = f(1/[GSSG])$ es lineal. El análisis de regresión lineal arroja la ecuación siguiente

$$(1/v) = 1.165 \pm 0.142 + 2.031 \pm 0.162 (1/[GSSG])$$

De esta ecuación se deduce que

$v_{max} = 0.8581 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{UE}$, y $K_m = 1.74 \text{ mM}$. El valor reportado en la literatura por el método espectrofotométrico habitual es 0.61 mM a $\text{pH} = 7.8$ [3].

Conclusiones.

Los resultados obtenidos permiten diseñar futuros experimentos para la determinación enzimática de GSSG en muestras diversas ya que es posible poner a punto curvas de calibración del tipo $(i_{lim})_{\text{pH}7.8} = f([GSSG])$ de manera similar a las determinaciones por espectrofotometría. Por otro lado la determinación de K_m y v_{max} permitirán poner a punto un posible sensor con la enzima Glutatión reductasa inmovilizada.

Los autores agradecen a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM el apoyo al proyecto IN213695.

Bibliografía

- 1) P. D. Boyer, "The Enzymes" 3rd Edition, Vol. XIII, Academic Press Inc, Pag 129 (1976)
- 2) H. Jaeschke and J. R. Mitchell, "Oxidant stress in perfused organs" *Methods in Enzymology* 186(1990)752-755
- 3) J. Bergmeyer and M. Grafl, "Methods of Enzymatic Analysis", 3rd Ed., Vol II, Ed. Verlag Chemie, Pag. 210(1983)
- 4) J. Koryta, "What is Bioelectrochemistry", *Electrochimica Acta* 29(1984)1291-1292
- 5) M. K. Ciolsz and J. Jordan, "Comparison of Spectrophotometric and Amperometric Rate Parameters of Enzymatic Reactions" *Analytical Chemistry* 65(1993)164-168

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Nordman, R., Ribiere, C. y Rouach, H. *Free Rad. Biol. Med.* 12(1992)219.
- 2) Sies, H. y Cadenas, E. "Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. " *Philos. Trans. Soc. London.* 311(1985)617.
- 3) Jaeschke, H. y Mitchell, J.R. "Use of Isolated Perfused Organs in Hypoxia and Ischemia/Reperfusion Oxidant Stress". *Methods in Enzimology.* 186(1990)752-758.
- 4) Viña, José. *Glutathione Metabolism and Physiological Functions.* CRC Press. USA Cap. 23.(1990) 237-239.
- 5) Burk, R.F. y Hill, K.E. "Use of Perfused Organs in Measurement of Drug Induced Oxidant Stress". *Methods in Enzimology.* 186(1990)759-767.
- 6) Akerboom, T.P. y Sies, H. "Assay Of Glutathione, Glutathione Disulfide, And Glutathione Mixed Disulfides In Biological Samples". *Methods in Enzimology.* 77(1981)373-382.
- 7) Asensi, M. *et al.* "A High-Performance Liquid Chromatography Method For Measurement Of Oxidized Glutathione In Biological Samples". *Analytical Biochemistry.* 217(1994)323-328.
- 8) Richie, J. P. y Lang, A.L. "The Determination Of Glutathione, Cyst(e)ine And Other Thiols And Disulfides In Biological Samples Using High-Performance Liquid Chromatography With Dual Electrochemical Detection". *Analytical Biochemistry.* 163(1987)9-15.
- 9) Martin, J. y White, I.N. "Fluorometric Determination Of Oxidised And Reduced Glutathione In Cells And Tissues By High-Performance Liquid Chromatography Following Derivatization With Dansyl Chloride". *Journal of Chromatography,* 568(1991)219.
- 10) Bergmeyer, J. *Methods of Enzymatic Analysis.* 3rd Ed., Verlag Chemie II(1983)210-211.

- 11) Boyer, P.D., *The Enzymes*. Vol. XIII. 3rd Ed. Academic Press. USA. (1976)129-142.
- 12) Voet, D. y Voet, J. *Biochemistry*. 2nd Ed. John Wiley and Sons. USA. (1995)400-407.
- 13) Harris, D. C. *Análisis Químico cuantitativo*. Grupo Editorial Iberoamericana. México. (1991)329, 451-464.
- 14) Almagro Huertas, V. *Polarografía*. Ed. Alhambra. España. (1971)52, 53, 57-59.
- 15) Segel, I. H. *Cálculos de Bioquímica*. Acribia. España.(1982)283-285, 288, 289, 307-310.
- 16) Ciolkosz, M. K. y Jordan. "Comparison of Spectrophotometric and Amperometric Rate Parameters of Enzymatic Reactions", *J. Anal. Chem.* 65(1993)164-168.
- 17) Neilands J.B. y Stumpf, P.K. *Principios de Enzimología*. John Wiley and Sons. España. (1967)107-110.
- 18) Fersht, Alan. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd Ed. W.H. Freeman and Company. USA. (1995)106-107.
- 19) Prado, H., Baeza A., Rocha A., Zentella de Piña M.. "Determinación de glutatión en muestras biológicas". *Memorias del XI Congreso Nat. De la Soc. Mex. De Electroquímica*. Jalapa, Ver. (1996)92-96.
- 20) Copeland, R. A. *Enzymes. A Practical Introduction To Structure, Mechanism And Data Analysis*. VCH Publishers. USA. (1996)279-296.
- 21) Bergmeyer, J. *Methods of Enzymatic Analysis* 3rd Ed., Ed. Verlag Chemie III(1983)258-260.
- 22) Nuño, Manuel. *Polarografía*. Internacional Científica. México. (1979)105-115.
- 23) Bashir, A et al."Altering Kinetic Mechanism And Enzymatic Stability By Mutagenesis Of The Dimer Interface Of Glutathione Reductase." *Biochemical Journal*. 312(1995)527-533.
- 24) Dixon, M. y Webb, E. C. *Enzymes*. 3rd Ed., Academic Press. USA. (1979)460-467.