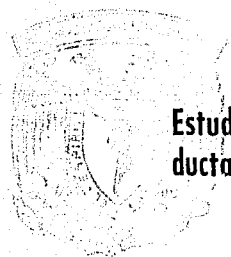


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias



Estudio Comparativo de Algunas Oxido-Reductasas de Disulfuro en el Hígado de Rata

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

presenta:

JAVIER ALFREDO GUTIERREZ MONCLOVA

México, D. F.

1973



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.

El presente trabajo fué realizado
en el laboratorio del Dr. Raul N.
Ondarza en el Dpto. de Bioquímica -
de la Facultad de Medicina de la
U. N. A. M.

La dirección de esta tesis estuvo
a cargo del Biólogo J. Edgardo Es-
camilla Marvan a quien hago paten-
te mi agradecimiento.

A MIS PADRES
CON ADMIRACION Y RESPETO.

A MI ESPOSA
ABUELOS Y
HERMANO.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
a).- Antecedentes	4
b).- Objetivo	17
MATERIAL Y METODOS	18
EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO	21
RESULTADOS	25
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	40

A B R E V I A T U R A S

CDP		Difosfato de citidina
CoASSG		Coenzima A-SS-Glutati3n
CoASH		Coenzima A
CPT		Cofactor prote3nico termoestable
dCDP		Difosfato de deoxicitidina
DEAE		Diethyl amino etil celulosa
DTNB		Acido 5.5 ditio bis nitrobenz3ico
E		Enzima
EDTA		Acido etilen diamino tetrac3tico
FAD		Flav3n aden3n dinucle3tido (oxidado)
FADH		Flav3n aden3n dinucle3tido (reducido)
g		gramo
GSH		Glutati3n (reducido)
GSSG		Glutati3n (oxidado)
Km		Constante de Michaelis
M		Molar
μ l		Micro litro
m μ	(nm)	Milimicra 3 nanometro
μ mola		Micromola
NAD ⁺	(DPN ⁺)	Nicotinamida aden3n dinucle3tido (oxidado)
NADH	(DPNH)	Nicotinamida aden3n dinucle3tido (reducido)
NADP ⁺	(TPN ⁺)	Fosfato de nicotinamida aden3n dinucle3tido (oxidado)
NADPH	(TPNH)	Fosfato de nicotinamida aden3n dinucle3tido (reducido)
RPM		Revoluciones por minuto
XSH		Producto sulfhidrilo
XSSX		Substrato disulfuro (cualquiera)

I N T R O D U C C I O N

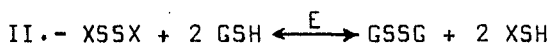
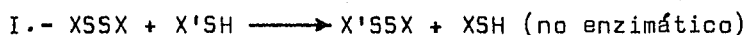
En los últimos años se han presentado pruebas - que indican la presencia de actividades enzimáticas asociadas con la reducción de puentes disulfuros, tanto de substratos proteínicos como no proteínicos. La mayoría de estas actividades son dependientes de NADPH y se encuentran distribuidas en muy diversos tejidos, tanto de animales como de vegetales.

En la célula es de vital importancia la dinámica de los mecanismos de interconversión de los grupos disulfuros en sulfhidrilos debido principalmente a su influencia en la estructura tridimensional de las proteínas nativas que contienen en su molécula puentes disulfuros (1), y en un gran número de procesos fisiológicos como son los mecanismos de óxido-reducción que involucran a la Lipoamida Deshidrogenasa (2), Glutación Reductasa (3), Tiorredoxina-Tiorredoxina Reductasa y sistemas similares que se encuentran relacionados con el transporte de electrones de enlace, también puede citarse la reducción de ribonucleósidos fosfatados (4). Los procesos de óxido-reducción antes mencionados se encuentran presentes en los siguientes casos:

a).- En los cambios estructurales de membrana (5).

- b).- En algunas proteínas nucleares durante la división celular, tanto normal como anormal (6).
- c).- En el mecanismo que regula las actividades enzimáticas de intercambio de disulfuros (7).
- d).- En los tipos de unión o mecanismos de acción de las hormonas que contienen puentes disulfuros (8).
- e).- En los mecanismos de protección a intoxicaciones por oxígeno (9).
- f).- En los daños causados por radiaciones ionizantes (10).

Para la mayor parte de los casos antes citados existen reacciones enzimáticas específicas que no han sido caracterizadas en su totalidad. Dichos sistemas caen dentro de los tres tipos de reacciones siguientes:



Las reacciones I y II son de intercambio sulfhidrilo disulfuro, llamado también de transhidrogenación, puede presentarse tanto en forma intramolecular como in--

termolecular en las cadenas polipeptídicas y puede ser química (I) ó enzimática (II).

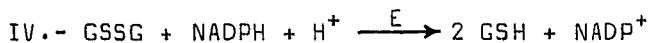
En el tipo de reacción (III) quedan incluidos algunos sistemas reductores de disulfuros dependientes de NAD(P)H que actúan tanto sobre sustratos proteínicos como no proteínicos.

Las óxido-reductasas de este tipo han sido analizadas en plantas, microorganismos y algunos tejidos de animales superiores.

Cuatro de las principales óxido-reductasas que corresponden a este grupo son:

- a).- Lipoamida Deshidrogenasa (33) (EC 1.6.4.3.)
- b).- Glutación Reductasa (2) (EC 1. 6. 4. 2.)
- c).- Coenzima A-S-S-Glutación Red. (18) (EC 1. 6. 4. 6.)
- d).- Tiorredoxina Reductasa (12) (EC 1. 6. 4. 4.)

La ecuación para la Glutación Reductasa se muestra a continuación y se supone que es igual para la CoA--SS-Glutación Reductasa.



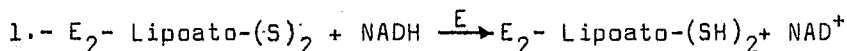
El fenómeno de reducción de disulfuros in vivo podría explicarse por medio del acoplamiento de esta última reacción, con una reacción de intercambio tiol-disulfuro, (I) ó (II).

A N T E C E D E N T E S

LIPOAMIDA DESHIDROGENASA

(EC 1. 6. 4. 3.)

Esta enzima ha sido purificada y caracterizada a partir de extractos de corazón de cerdo (33). Es un componente esencial del complejo enzimático de la deshidrogenasa de los alfa-cetoácidos y corresponde a una flavoproteína dependiente de NAD^+ con un disulfuro en su sitio activo, el cual toma parte en la catálisis según la siguiente ecuación:



El sustrato natural de esta enzima es el ácido lipóico que se encuentra covalentemente unido a la E_2 (Lipoil Reductasa Transacetilasa). La unión se establece mediante un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del ácido lipóico y el épsilon amino de un residuo de lisina de la proteína. Este complejo es conocido como lipoamida, y es la porción de la enzima que interviene en la condensación del oxo-glutarato con la coenzima A y el NAD^+ mediante la descarboxilación del piruvato.

Características de la Enzima de Corazón de Cerdo.

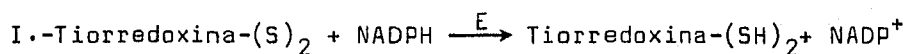
Características de la Enzima de Corazón de Cérdo.

- 1).- Peso molecular 115,000 (3).
- 2).- K_m 1×10^{-4}
- 3).- pH óptimo 6.3
- 4).- La enzima posee dos moléculas de FAD por proteína y dos disulfuros intercadena. Se inhibe fuertemente con arsenito de sodio 10^{-3} M y con altas concentraciones de cobre. También se inhibe irreversiblemente con p-Cloromercu ribenzoato, es altamente sensible a mercaptanos y su especificidad es absoluta para disulfuros. Su velocidad de catálisis es mayor con el NADH, que con el NADPH. El mecanismo de acción que ha sido propuesto es parecido al de la Glutación Reductasa y se sugieren mecanismos semejantes para las siguientes enzimas:
 - a).- CoASS-Glutación Reductasa.
 - b).- Metallo-flavoproteínas.
 - c).- Dihidrorótico-Deshidrogenasa.
 - d).- Xantino-oxidasa.

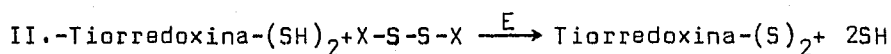
TIORREDOXINA - TIORREDOXINA REDUCTASA

(EC 1. 6. 4. 4.)

La enzima de Escherichia coli (12) ha sido purificada y caracterizada, además existen pruebas de un co-factor proteínico termoestable de bajo peso molecular - - (Tiorredoxina) que es reducido por la Tiorredoxina Reductasa en presencia de NADPH catalizando la siguiente reacción según Reichard (11).



Así mismo se ha informado sobre la reducción inespecífica de disulfuros de acuerdo con la siguiente ecuación:



Acoplando las reacciones I y II se lleva a cabo la reducción enzimática de diversos disulfuros utilizando como coenzima al NADPH (12).

Características de la Enzima de Escherichia coli

- 1).- Peso molecular 68,000
- 2).- K_m 9.6×10^{-6}
- 3).- K_m TPNH 5×10^{-6}
- 4).- pH óptimo 7.4

5).- Contiene 1.4 Moles de FAD por cada 100,000 mg. de -
Tiorredoxina Reductasa.

Su especificidad para los siguientes disulfuros se puede expresar en % de actividad en la siguiente forma: Tiorredoxina 100 %, Glutación 0.67 %, Lipoato Oxidado - 0.11 %, Lipoato Reducido 0.88 % e Insulina 0.11 %.

Se inhibe fuertemente con P-Cloromercuribenzoato 10^{-6} M; con arsenito de sodio la inhibición es moderada - puesto que se requirió una concentración de 10^{-4} M; con - cianuro de potasio la inhibición es completa, observándose un incremento en la actividad a concentraciones de 10^{-2} M; el sulfato de amonio inactiva a la enzima pero se recupera la actividad con la adición de FAD (12).

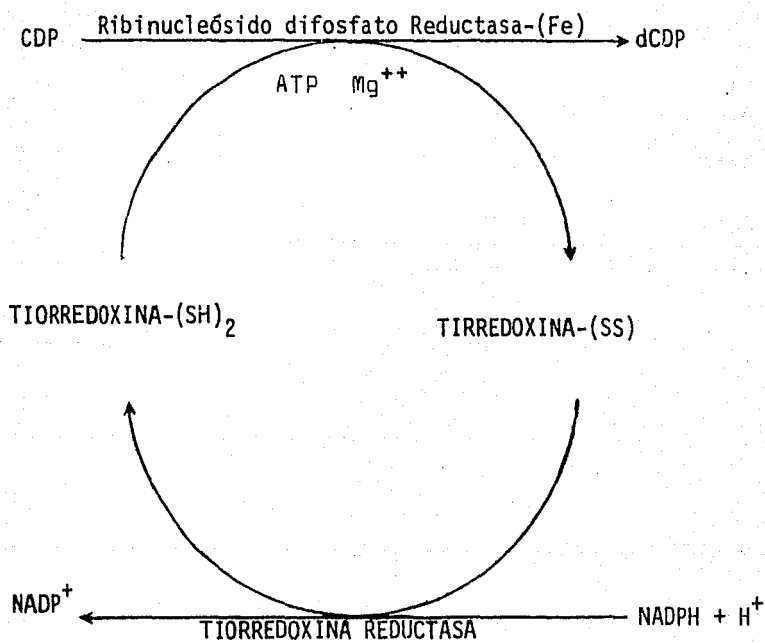
La formación de sulfhidrilos y la oxidación del NADPH estan en relación estequiométrica según Ellman (13).
T i o r r e d o x i n a .

El sistema de cofactor termoestable (Tiorredoxina) que actua como donador final de hidrógenos, tiene las siguientes características según Reichard.

Un peso molecular de 12,000 constando de una sola cadena polipeptídica con un residuo de serina terminal y - un residuo de cistina (S-S) que puede ser reducida química - mente ó específicamente por la Tiorredoxina Reductasa. En presencia de NADPH la Tiorredoxina puede utilizar al -

Lipoato reducido como donador final de hidrógeno, para la reducción del citidín difosfato a deoxicitidindifosfato - en presencia de la enzima citidín difosfato Reductasa (12) (ver figura I).

FIGURA I



MECANISMO DEL SISTEMA CICLICO TIRREDOXINA-TIORREDOXINA REDUCTASA.

GLUTATION - REDUCTASA

(EC 1. 6. 4. 2.)

Esta enzima reductora de disulfuros ha sido previamente purificada y caracterizada en levadura (2), como una flavoproteína dependiente de NADPH en presencia del cual se encuentra completamente reducida.

El NADP⁺ formado en esta reacción se combina con la enzima dando un complejo de transferencia de carga entre el FADH de la enzima y el NADP⁺.

El mecanismo de reacción es típico, pues interactúa con una molécula de substrato para convertirse en una forma modificada antes de reaccionar con una segunda molécula de substrato que la transformará a su forma original. (figura 2). Este mecanismo ha sido descrito de manera semejante para un gran número de flavoproteínas (15),



La GSSG-reductasa ha sido ampliamente estudiada y se ha purificado a partir de muy diversas fuentes como son:

Escherichia coli, levadura, guisantes, eritrocitos de bovino, hepatoma e hígado de rata.

BIBLIOTECA CENTRAL

U N A, M.

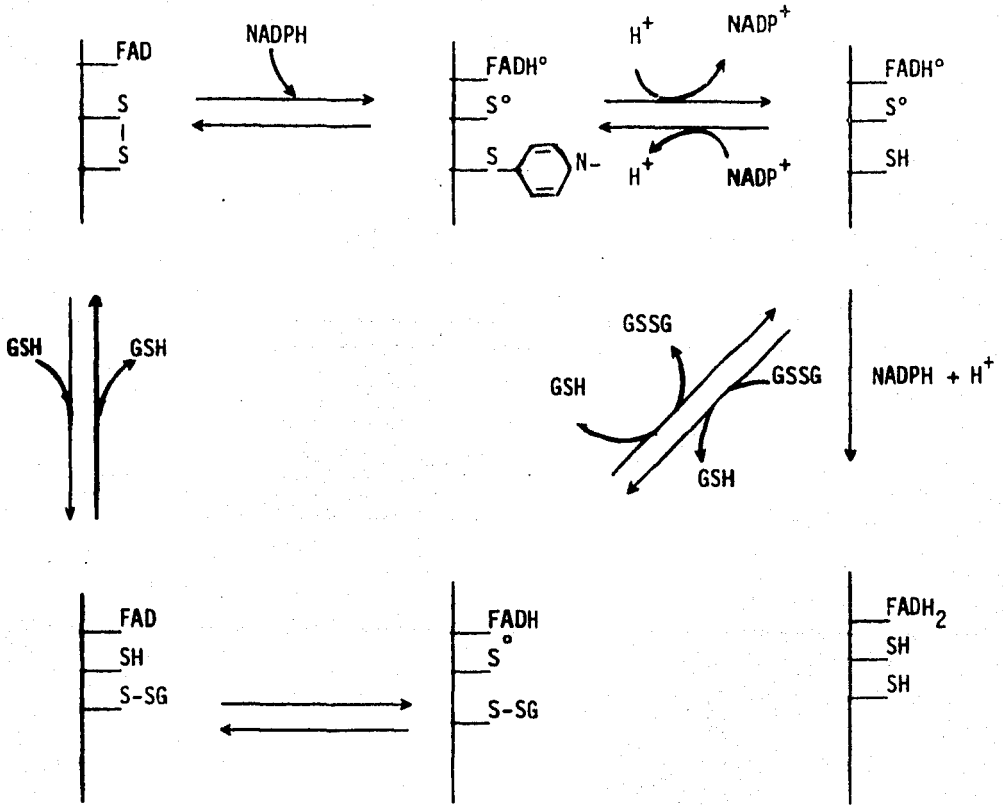
Características de la GSSG-Reductasa de levadura.

- 1).- Peso molecular 116,000
- 2).- K_m GSSG 5.5×10^{-5} M.
- 3).- K_m NADPH 3.8×10^{-6} M.
- 4).- pH óptimo 7.1
- 5).- Punto isoeléctrico 5.9 (17).
- 6).- Su coeficiente de extinción molecular a 280 nm es de 15.4 (15). Existen datos que indican que esta enzima esta formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas ligadas por puentes monovalentes. El grupo prostético FAD, puede ser separado por diálisis o por electroforesis lo cual sugiere una unión no covalente con la cisteína.

Se ha calculado un recambio máximo de 15,000 moles de $NADP^+$ por minuto por mola de enzima ligada al FAD (13).

La enzima completamente reducida por GSH absorbe a 720 nm y a la mitad de su reducción a 580 nm. Se estimu la por el ión fosfato según Woodin y Segal, y se inhibe - reversiblemente por CoASSG (23). La inhibición por mercuriales indica la presencia de un disulfuro como parte del sitio activo de la enzima. La proteína nativa posee por - cada molécula de FAD un solo sulfhidrilo que expuesto por NADPH es activo, es insensible al arsenito de sodio 10^{-4} M y se inhibe fuertemente con Micofur 10^{-4} M. Mecanismo - según (3) en Fig. No. 2

FIGURA 2.

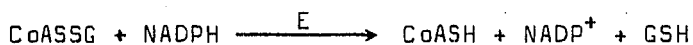


MECANISMO DE ACCION DE LA GSSG-REDUCTASA Y CoASS-GLUTATION REDUCTASA

C o A S S G - R E D U C T A S A

(EC. 1. 6. 4. 6.)

Esta enzima fué descrita recientemente por Ondarza y colaboradores (17) originalmente en hígado de rata (22) y previamente se ha purificado y caracterizado en levadura (18). Es una flavoproteína óxido-reductasa dependiente de NADPH que cataliza la reducción del disulfuro mixto CoASS-Glutatión según la siguiente reacción:



La caracterización y purificación de esta enzima en levadura se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Ondarza y recientemente se ha iniciado su purificación y caracterización en este mismo laboratorio en hígado de rata por Escamilla y colaboradores (21).

El mecanismo propuesto para esta actividad es similar al de la Glutatión Reductasa figura II (3):

Características de la CoASSG-Reductasa en levadura.

- 1).- Peso molecular 107,970
- 2).- K_m 2.0×10^{-4}
- 3).- pH óptimo 5.5
- 4).- Punto isoeléctrico 5.1
- 5).- Esta enzima ha sido descrita como una flavoproteína

debido a los resultados obtenidos con derivados de los 5-nitrofuranos que actúan como competidores de las flavoproteínas. El sitio activo de esta enzima contiene un puente disulfuro como lo demuestran los resultados de inhibición por arsenito de sodio a la concentración de 10^{-1} M. y 10^{-2} M. La actividad enzimática es insensible a bajas concentraciones de arsenito de sodio (10^{-3} M) y es altamente sensible a concentraciones bajas (10^{-4} M) de micofur. La actividad es inhibida en presencia de glutatión oxidado probablemente por competencia por el sitio activo y fuertemente inhibida por el ión fosfato (18).

Las pruebas con diversos sustratos disulfuros muestran que es una enzima específica para reducir al disulfuro mixto CoASS-Glutatión (22).

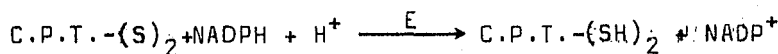
REDUCTASA INESPECIFICA DE DISULFUROS

(DTNB - R E D U C T A S A)

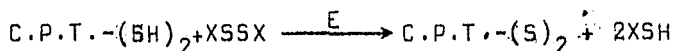
Recientemente ha sido descrita por Tietze una nueva actividad reductora inespecífica de disulfuros (19) en el sobrenadante microsomal de hígado de rata, es una flavoproteína dependiente de NADPH y de un cofactor proteínico termoestable de bajo peso molecular.

Experimentalmente se utiliza ácido 5.5 ditio bis nitro benzóico (DTNB) como substrato de esta reductasa - pues esta tiene una alta reactividad sobre este disulfuro sintético. Esta actividad se manifiesta en ausencia del cofactor proteínico termoestable (C.P.T.) que estimula la actividad de reductasa cuando se trata de otros substratos disulfuros.

El mecanismo propuesto por Tietze (19) para esta actividad en lo que se refiere a la reducción del cofactor proteínico termoestable es el siguiente:



Para la reducción inespecífica sobre otros substratos disulfuros se propone la siguiente reacción química:



Se ha especulado (19), sobre la posibilidad de que la actividad reductora inespecífica de disulfuros descrita por Tietze en el sobrenadante microsomal de un homogenado de hígado de rata (19) y el sistema Tiorredoxina - Tiorredoxina Reductasa en Escherichia coli, y hepatoma de rata corresponden al mismo sistema.

Del mismo modo Tietze (19), planteo la posibilidad de que la actividad de CoASSG-Reductasa descrita previamente por (22), en el hígado de la rata y la reportada por el correspondieran a un mismo sistema enzimático, basado en los siguientes datos:

- 1).- Dependencia de NADPH.
- 2).- Presencia de FAD como grupo prostético.
- 3).- Propiedades cromatográficas muy similares.
- 4).- La poca especificidad de la enzima preparada por él.

Esta duda surgió principalmente debido a la falta de datos publicados sobre la especificidad de la enzima descrita según (22) en el hígado de rata, así como sobre la presencia o ausencia de algún cofactor que estimulara la actividad de la enzima CoASSG-Reductasa.

O B J E T I V O

En el presente trabajo trataremos de establecer las correlaciones, diferencias y similitudes en algunas - de las principales actividades óxido-reductasas de disulfuros dependientes de NADPH, así como sobre la metodología utilizada en nuestro laboratorio para la purificación y caracterización de las actividades óxido-reductoras de disulfuros en hígado de rata. Dar pruebas de que la - - - CoASS-Glutatión y la reductasa inespecífica de Tietze - - (DTNB-Reductasa) son actividades distintas separables por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) y por la técnica de Electroenfoco en Polianfolina. Aportar datos que apoyan la idea de que la Reductas inespecífica de Tietze y su cofactor proteínico presentes en el sobrenadante microsomal de hígado de rata corresponde a los sistemas Tiorredoxina-Tiorredoxina Reductasa reportados previamente en Escherichia coli en levadura y hepatoma de rata.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

El glutati3n oxidado, el trifosfato piridin nu-- cle3tido reducido, la coenzima A, la alb3mina de bovino y los reactivos utilizados para la preparaci3n de solucio-- nes amortiguadoras Trisma Base y EDTA, as3 como los subs-- tratos disulfuros utilizados en la caracterizaci3n fueron adquiridos de la casa Sigma Chemical Co., con excepci3n - del substrato disulfuro mixto CoASSG que fu3 sintetizado en este laboratorio seg3n el m3todo descrito por Ondarza (22). El sulfato de amonio "grado enzim3tico" fu3 adquiri-- do de Schwars Bio-research Co., Inc., el arsenito de so-- dio de K.E.K., el Micofur de Miles, la resina de inter -- cambio DE-22 de Whattman, el Sephadex G-100 y G-150 de - Pharmacia, la Polianfolina de rango de pH 3 a 10 de L.K.B. y el gel de fosfato de calcio de Calbiochem. Los reacti-- vos de uso com3n en el laboratorio fueron adquiridos de - Merck.

Determinaciones de las concentraciones de protef-- nas.

Fueron calculadas a partir de la absorbancia a - 280 mn de acuerdo con la ecuaci3n de Layne (31) y compro-- bada por el m3todo de Lowry (26).

Las mediciones espectrofotom3tricas de las acti--

vidades reductoras de disulfuros, nucleótidos dependien--
tes fueron hechas en un espectrofotómetro de doble rayo -
Pay Unicam 1800 U.V. con graficador incorporado.

Para la medición de las actividades enzimáticas
se siguieron dos métodos diferentes; El primero basado en
la velocidad de oxidación del NADPH seguida a 340 nm en -
amortiguador Tris-HCl., 0.01 M, pH 7.5 con EDTA 0.001 M ó
amortiguador de fosfato con las mismas características, -
solo en el caso de la medición de la actividad CoASSS-Re-
ductasa se usó amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M, -
pH 5.75 con EDTA 0.001 M. En todos los casos se hizo la -
incubación previa del amortiguador, enzima y NADPH duran-
te un minuto, iniciandose la reacción con el substrato di
sulfuro correspondiente.

El segundo método solo fué utilizado para la me-
dición de la reductasa inespecífica de Tietze (DTNB-Reduc-
tasa) en el cual se aprovechó el hecho de que el DTNB en
su estado reducido absorbe fuertemente a 412 nm. La medi-
ción se hizo en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 con -
EDTA 0.001 M. La enzima se preincubó con el amortiguador
y el substrato DTNB y la reacción se inició con la adi--
ción del NADPH midiéndose la velocidad de reducción del -
DTNB a 412 nm.

Solo en los casos en los cuales se midió la re--

ducción inespecífica de disulfuros para la DTNB-Reductasa, se añadió también el C.P.T. en la preincubación.

Los métodos que utilizamos para la medición es --
pectrofotométrica de los experimentos fueron:

- 1).- Actividades enzimáticas con cofactor y sin cofactor.
- 2).- Especificidad enzimática sobre diversos disulfuros.
- 3).- Inhibición por arsenito de sodio y micofur.
- 4).- Características y desarrollo de las columnas que se -
describen en las gráficas o tablas como pie de figura.

EXTRACCIONES Y FRACCIONAMIENTOS

Todos los procedimientos experimentales durante el aislamiento y purificación se llevaron a cabo a una temperatura de 4° C.

- 1).- Se extrajeron los hígados de 50 ratas wistar con un peso aproximado de 200 g c/u, obteniéndose un peso total de 250 g de hígado fresco.
- 2).- Los hígados se lavaron, limpiaron y secaron, picándose en fragmentos, los cuales fueron sometidos a homogenización en un amortiguador Tris-HCl 0.1 M sacarosa 0.25 M EDTA 0.01 M pH 7.5, utilizándose un volumen de 1.5 ml. de amortiguador por gramo de tejido fresco.
- 3).- El homogenado se centrifugó a 18,000 RPM durante 40 minutos.
- 4).- El precipitado fué desechado y el sobrenadante fué nuevamente centrifugado a 105,000 RPM durante 45 min.
- 5).- El sobrenadante microsomal se utilizó como fuente de las tres actividades reductoras de disulfuros dependientes de NADPH y del C.P.T. (cofactor proteínico termoestable).
- 6).- El fraccionamiento del sobrenadante microsomal fué hecho con una solución saturada al 100 % de sulfato

de amonio (grado enzimático) (27).

La fracción de 0 a 40 % de saturación se centrifugó a 100,000 RPM durante 15 min. El precipitado de dicha fracción despues de ser probado para las tres actividades enzimáticas fué desechado y el sobrenadante fué llevado al 65 % de saturación, centrifugandose nuevamente a 10,000 RPM durante 15 min. El precipitado de la fracción 40-65 % se redisolvió en amortiguador y se probó para las tres actividades almacenandose. El sobrenadante de la fracción 65 % fué llevada hasta 80 % de saturación y centrifugado a 10,000 RPM durante 15 min. El precipitado de la fracción 40-65 % se utilizó como fuente directa de las tres actividades enzimáticas. El sobrenadante de la fracción 80 % de saturación fué utilizado como fuente del cofactor proteínico termoestable. (C.P.T.)

Obtención del Cofactor Proteínico Termoestable.

Se obtuvo utilizando la técnica descrita por Tietze (19).

- 1).- El sobrenadante de la fracción 80 % de saturación se recuperó en su totalidad concentrándolo hasta un volumen final de 500 ml.
- 2).- Se dializó este contra un volumen total de cuatro litros de Tris-HCl 0.005 M EDTA 0.001 M pH 7.5 durante 24 horas. Se colocó en baño maría a una temperatura

- de 70° C. durante 10 min., se enfrió y se centrifugó a 10,000 RPM. durante 15 min.
- 3).- Se recuperó el sobrenadante y se llevó a 100 % de saturación de sulfato de amonio, se centrifugó a 10,000 RPM. durante 15 min. y se recuperó el precipitado en 50 ml. de agua tridestilada.
 - 4).- Se dializó contra 9 litros de buffer Tris-HCl 0.005 M EDTA 0.001 pH 7.5 durante 21 horas.
 - 5).- Se concentró con acuacida a un volumen final de 5 ml.
 - 6).- La muestra se cromatografió en una columna de Sephadex G-100 (17.5 X 2.3 cm.) con un flujo de 16 ml. por hora, colectándose fracciones de 10 ml.
 - 7).- Se localizó el CPT utilizando la absorbancia de este a 280 nm, se concentró y almacenó para experimentos posteriores.

La resina de intercambio iónico DE-22 Whattman, polímero de filtración molecular G-100 y G-150 fueron preparados según la metodología descrita por Tietze (19), el gel de fosfato de calcio se preparó según la metodología utilizada por Massey (2) y la columna de Electroenfoque en polianfolina se preparó según las técnicas utilizadas por Severson y Vesteborg (34). Para el desarrollo de la columna de polianfolina se introdujeron 53 mg de proteína correspondiente a la actividad de GSSG-Reductasa y CoASSG-

Reductasa, además de 35 mg. de la actividad reductora inespecífica de disulfuros proveniente de Sephadex G-150. - El gradiente de pH utilizado fué de 3-10 y como líquidos del ánodo y cátodo, ácido fosfórico y etanolamina respectivamente. El gradiente de molaridad de sacarosa empleado fué de 0 a 50 %, la concentración final de la polianfolina fué de 6.6 % y la corrida se realizó durante 96 horas con una corriente constante de 550 volts. no habiéndose registrado el amperaje inicial y final. Las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 1.5 ml. Después de medir el pH de cada fracción en un potenciómetro Radiometer -22 equipado con electrodo único, las fracciones se dializaron por separado contra amortiguador Tris HCl 0.005 M - EDTA 10^{-3} M. pH 7.5.

* Sulfato de sodio anhidro.

R E S U L T A D O S

La purificación de las actividades óxido-reductoras de disulfuros presentes en el sobrenadante microsomal del homogenado de hígado de rata despues del fracciona--- miento con el sulfato de amonio fracción 40-65 % disuelto en amortiguador Tris-HCl 0.005 M pH 7.5, EDTA 10^{-3} M y - dializado contra tres cambios del mismo amortiguador du-- rante 24 horas con un volumen efectivo de diálisis de 9 - litros, fué la siguiente:

La purificación de las tres actividades se realizó en conjunto utilizando para ello cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa.

Este paso de purificación en cromatografía de intercambio fué suficiente para separar dos zonas de actividad. La primera de ellas que designaremos como zona 'A' con actividad de GSSG-Reductasa y CoASSG-Reductasa y la segunda que designaremos como zona 'B' con la actividad de reductasa inespecífica de Tietze. Las fracciones que corresponden a cada uno de los picos de actividad presentados en - la gráfica I se juntaron por separado dializándose durante 24 horas contra dos cambios de amortiguador Tris-HCl - 0.005 M, EDTA 10^{-3} M, pH 7.5. Se centrifugó a 10,000 RPM. durante 10 min. con el fin de eliminar la protefna preci-

pitada, se concentró con acuacide, tomándose una muestra de cada una de las dos fracciones para determinar el grado de pureza de nuestras enzimas las cuales se describen en la tabla I en la sección correspondiente a DEAE celulosa.

Las fracciones provenientes de la columna de - DEAE celulosa fueron recromatografiadas por separado en - columnas de Sephadex G-150, la actividad de DTNB se localizó espectrofotométricamente colectándose las fracciones y concentrándose con acuacide. Se procedió de igual manera con la columna de filtración en la cual se purificaba la GSSG-reductasa y la CoASSG-reductasa las cuales permanecieron unidas y simétricas hasta este paso de purificación, se concentraron con acuacide y se dializaron contra agua destilada, determinándose la pureza de las enzimas en este paso de purificación dichos resultados se muestran en la tabla I (bajo Sephadex G-150).

La fracción con las actividades de la GSSG-reductasa y la CoASSG-reductasa se sometió a un paso de cromatografía en gel de fosfato de calcio y el resultado de esta se muestra en la tabla I. Ambas actividades permanecieron unidas y simétricas durante este proceso.

El paso de purificación final en la columna de - electroenfoque en polianfolina nos dió como resultado la

determinación del punto isoeléctrico para las actividades de Glutación Reductasa y CoASS-Glutación Reductasa siendo éste de 6.85 para ambas actividades que permanecieron unidas y simétricas. El punto isoeléctrico para la reductasa inespecífica de Tietze fué de 5.35 y la purificación alcanzada para las tres actividades se muestra en la tabla I. En la gráfica II mostramos un perfil de elución de la columna de polianfolina.

La determinación del pH óptimo para cada una de las tres actividades, presentado en la gráfica III, fué de 7.0 para la Glutación Reductasa de 5.5 a 6.0 para la CoASS-Glutación Reductasa y de 7.5 para la reductasa inespecífica de Tietze.

La especificidad y el efecto del cofactor proteínico termoestable sobre la Glutación Reductasa y CoASS-Glutación Reductasa presentados en la tabla II nos mostró una alta especificidad por los substratos GSSG, CoASSG y DTNB así como una total insensibilidad al CPT. Por otro lado la reductasa inespecífica de Tietze tuvo actividad sobre todos los substratos disulfuros con que se probó y además fué altamente estimulado por el CPT excepto cuando se probó con el DTNB.

El efecto inhibitorio de los derivados de los 5 nitrofuranos que consiste en un bloqueo del paso de electrones entre el NADPH y el FAD propuesto por Copko (32) -

en la GSSG-reductasa y posteriormente por Ondarza y colaboradores, requiere de una incubación previa de enzima -- inhibidor. El arsenito de sodio ha sido ampliamente conocido por su propiedad de bloquear sitios activos en los -- que intervienen azufres. Las pruebas realizadas por nosotros utilizando estos inhibidores nos proporcionaron los resultados siguientes que a su vez presentamos en la gráfica IV, tanto la GSSG-reductasa como la CoASSG-reductasa mostraron un comportamiento semejante, resultando ser insensible al arsenito y altamente sensible al micofur y la reductasa inespecífica de Tietze que mostró un comportamiento opuesto, pues se mostró insensible al micofur y se inhibió fuertemente con el arsenito de sodio. Para la realización de estos experimentos los inhibidores se añadieron una vez iniciada la reacción.

LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN GRAFICAS Y TABLAS SON:

TABLA I.- Purificación de la GSSG-Reductasa, CoASSG-Reductasa y Reductasa inespecífica de Tietze para cada una de las cinco técnicas empleadas.

GRAFICA 1.- Patrón de elución de la columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa en la que se observa la separación de dos zonas activas.

GRAFICA 2.- Patrón de elución de la columna de electroenfoque en polianfolina con la determinación de los puntos isoeléctricos para dos zonas activas.

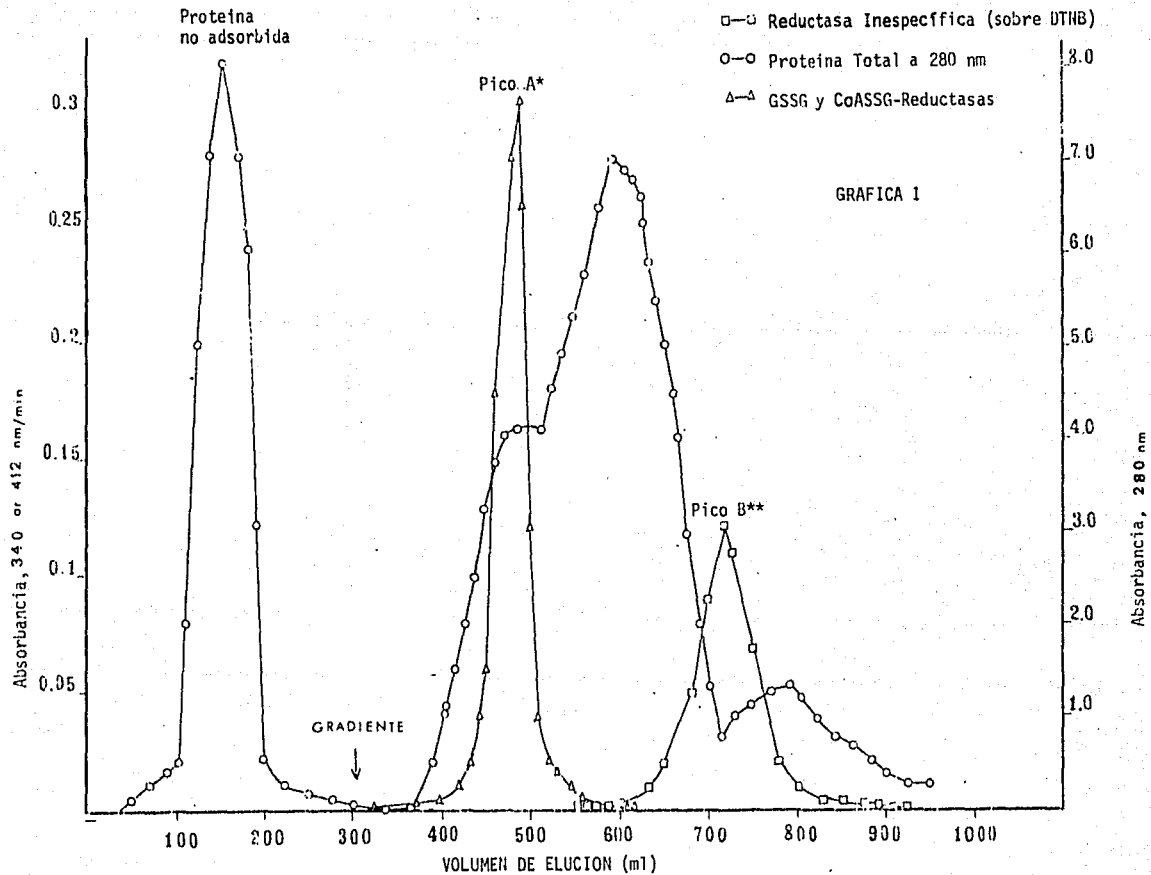
GRAFICA 3.- Determinación del pH óptimo para la GSSG-Reductasa, CoASSG-Reductasa y Reductasa inespecífica de Tietze.

TABLA II.- Ensayos de especificidad de las preparaciones A y B con siete substratos disulfuros y efecto del cofactor proteínico termoestable (CPT).

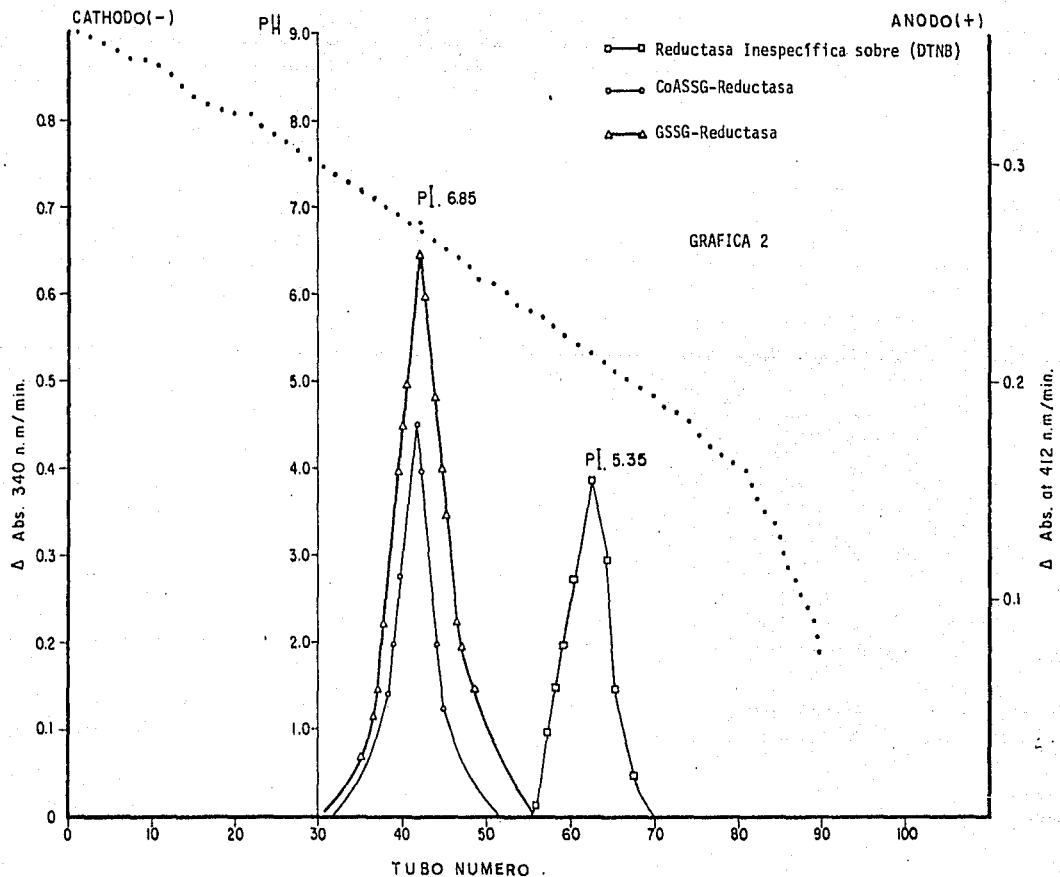
GRAFICA 4.- Efecto de los inhibidores de arsenito de sodio y micofur sobre GSSG-Reductasa, CoASSG-Reductasa y Reductasa inespecífica de Tietze.

TABLA 1: Purificación de GSSG-Reductasa; CoASSG-Reductasa y Reductasa Inespecífica de Tietze sobre (DTNB).

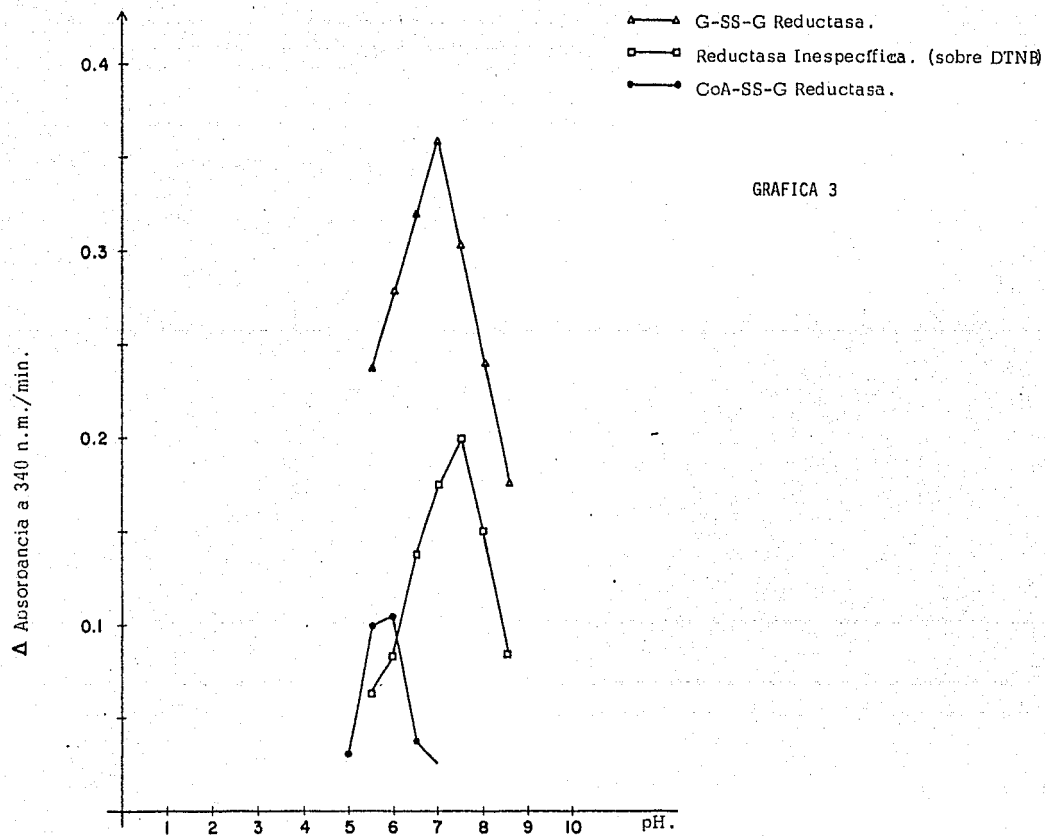
PASO DE PURIFICACION	GSSG-REDUCTASA			CoASSG-REDUCTASA			Cociente GSSG-Red. CoASSG-Red.	REDUCTASA INESPECIFICA (DTNB)		
	Proteína Total mg.	Actividad Específica mUI/mg/min.	Veces de Purifica- ción.	Proteína Total mg.	Actividad Específica mUI/mg/min.	Veces de Purifica- ción.		Proteína Total mg	Actividad Específica mUI/mg/min.	Veces de Purifica- ción.
PRECIPITADO 40-65 % con Sulfato de Amonio	7,800	41.2	1	7,800	4.5	1	9.1	7,800	27.2	1
Columna de DEAE-Celulosa	650	500	12.1	650	55	12.1	9.0	500	150	5.5
Columna de Sephadex G-150	62.2	1,770	42.9	62.2	182	40.4	9.7	15.4	720	24.6
Columna de gel de Fosfato de Calcio	12.6	4,050	98.3	12.6	454	100	9.0	-	-	-
Columna de Polianfolina	0.6	15,870	385	0.6	1,575	350	10	2.18	1,852	68



Perfil de actividades de la columna de DEAE-celulosa (40X2.5cm), flujo 30ml/h. Gradiente de NaCl de 0.0 a 1.0 M. Amortiguador TRIS-HCl 0.005M EDTA 0.001M pH 7.5



Perfil de actividades de la columna de Electroenfoque en poliamfolina, rango de pH 3 a 10 concentración de la poliamfolina 6.6% liquido del ánodo ácido fosfórico, de cátodo etanol amina, gradiente de sacarosa al 50% voltaje 550, tiempo de corrida 96 h.



GRAFICA 3

Fig. 3 . pH Óptimo de las tres actividades reductasas , dependientes de NADPH, de hígado de rata.

Condiciones: Amortiguador de fosfato de sodio 0.1M. (0.05M para la CoA-SS-G Red.) con EDTA. 0.001M. NADPH 350nMolas, G-SS-G 350nMolas, CoA-SS-G 250nMolas y DTNB 350nMolas. Enzimas: G-SS-G Red. 45 gr. CoA-SS-G Red. 140 gr. Reductasa Inespecífica 65 gr.

TABLA II : Actividades oxido-reductoras de disulfuros dependientes de NADPH provenientes de el sobrenadante microsomal de higado de rata.

FRACCION ENZIMATICA

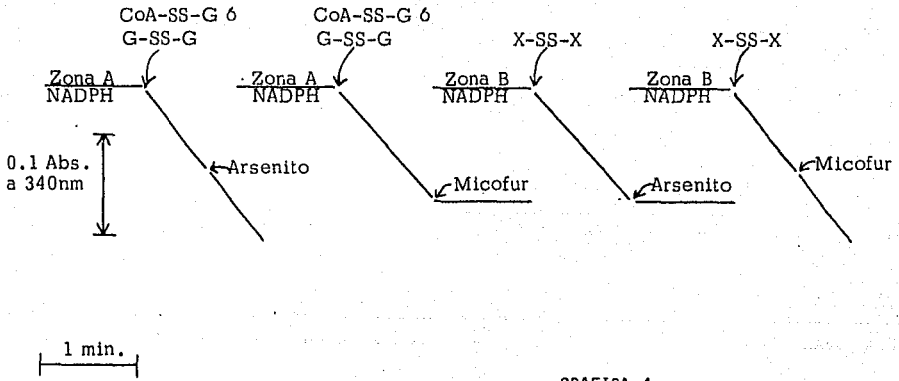
	PICO A*		PICO B**	
	SIN COFACTOR	CON COFACTOR***	SIN COFACTOR	CON COFACTOR***
GSSG	1230	1280	12.8	29
CoASSG	96.6	100	.64	1.28
DTNB	59.0	53.2	1500	1154
CISTINA	1.28	1.28	13.58	41.8
CISTAMINA	2.58	2.58	3.22	58.0
PANTETINA	1.93	1.93	6.44	25.8
INSULINA	1.28	1.28	7.1	71.0

* PICO A: GSSG-Reductasa y CoASG-Reductasa de el pico de la columna de DEAE-celulosa despues de filtración en Sephadex G-150

** PICO B: Actividad reductora inespecifica de Tietze de el pico de la de DEAE-Cel. despues de filtración en Sephadex G-150

*** CPT. Cofactor proteínico termoestable de Tietze

Nota: Todas las actividades estan reportadas en mU/mg/min.



GRAFICA 4

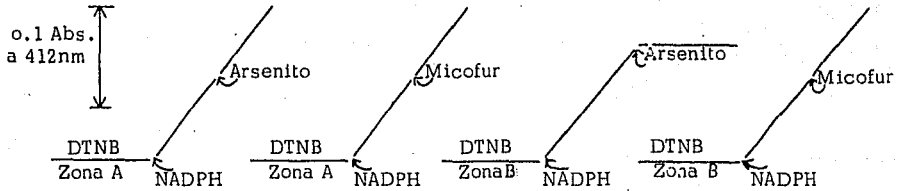


Fig. 5. Efecto del arsenito de sodio y micofur sobre las reductasas de disulfuros dependientes de NADPH, de hígado de rata.

Zona A: Actividades de G-SS-G red. y CoA-SS-G red. despues de DEAE-celulosa.

Zona B: Reductasa inespecifica de disulfuros despues de DEAE-celulosa.

Condiciones: Amortiguador TRIS-HCl 0.1M, pH 7.5 con EDTA 0.001M, excepto - para CoA-SS-G red. que fue medida en amortiguador de fosfatos de sodio 0.05M, pH 5.75 con EDTA 0.001M. NADPH 110nMolas, sustratos 0.0035M, inhibidores 0.001M final.

C O N C L U S I O N E S

La caracterización de cada una de las cinco actividades que presentamos en la introducción de esta tesis - nos muestra un panorama general de las diferencias y similitudes que podemos encontrar entre algunas de las óxido-reductasas de disulfuros más comunes; este es el caso de las tres actividades aquí estudiadas y a las cuales enfocaremos nuestras conclusiones.

Estas tres actividades localizadas en el sobrenadante microsomal de un homogenado de hígado de rata, tiene como características fisiológicas comunes el reducir puentes disulfuros. Como características químicas comunes tenemos la presencia de FAD como grupo prostético. Las tres utilizan como coenzima el NADPH y tienen un disulfuro en el sitio activo.

La separación física de dos actividades en la columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa mostrados en la gráfica 1 y la determinación de sus puntos isoeléctricos utilizando electroenfoque en polianfolina en la gráfica 2, nos mostró dos picos simétricos. El pico A que contiene a la GSSG-reductasa y CoASSG-reductasa y cuyo punto isoeléctrico es de 6.86., El pico B que contiene a la reductasa inespecífica de Tietze con un punto isoeléctrico

de 5.35., Estos nos proporcionan clara evidencia de que se trata de por lo menos dos enzimas diferentes.

La presencia de dos actividades que reducen a disulfuros en la preparación A con un mismo punto isoelectrónico nos hacen suponer una sola enzima con actividad reductora tanto sobre el GSSG como sobre el CoASSG. Esto ha sido confirmado por Rivas de la Chica (30).

Los datos presentados en la tabla II nos muestran la especificidad absoluta de la preparación A sobre el GSSG y el substrato de disulfuro mixto CoASS-Glutatión. La actividad que podemos apreciar de la zona A sobre el disulfuro sintético DTNB es debida probablemente a la alta reactividad de éste, reduciéndose espontáneamente al encontrarse en un medio con agentes reductores, (tioles generados por el NADPH).

En la misma tabla II puede apreciarse la inespecificidad de la actividad localizada en el pico B correspondiente a la reductasa inespecífica de Tietze. El cofactor proteínico termoestable (CPT) aumentó notablemente la actividad de la reductasa inespecífica de Tietze pudiéndose observar incrementos que iban desde 100 % hasta 2000 veces, variando estos incrementos con los diferen-

tes substratos utilizados, lo cual se puede apreciar claramente en la table II de resultados. Es importante hacer notar que el decremento en la actividad de la reductasa inespecífica de Tietze sobre el substrato sintético DTNB, al adicionar CPT, es debida probablemente a una interacción de tipo competitivo entre el substrato oxidado y el CPT oxidado, por el sitio activo de la enzima.

De los datos del efecto de inhibidores que nos muestra la gráfica 4 podemos concluir que los mecanismos de inhibición tanto del transporte de electrones como del sitio activo de la CoASS-Glutatión Reductasa y el de la Glutatión Reductasa son iguales. Esto apoya la posibilidad de que se trate de una sola enzima con una actividad reductora sobre dos substratos diferentes. El efecto de los inhibidores utilizados en la gráfica 4 sobre la actividad del pico B nos muestra una inhibición completamente opuesta a la que ocurrió cuando utilizamos el pico A como fuente enzimática esto apoya fuertemente la conclusión de que las actividades localizadas en la zona A son diferentes de la localizada en la zona B.

Con los datos anteriormente presentados pudimos demostrar que la preparación A contiene en una sola entidad proteínica, actividad reductora sobre el GSSG y el disulfuro mixto CoASS-Glutatión, que las actividades sobre

dos substratos disulfuros antes mencionados, localizados en la zona A, no corresponden a las actividades de reductasa inespecífica localizada en la zona B.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan lo sugerido por Tietze (20) sobre la posibilidad de que la óxido-reductasa inespecífica descrita por él corresponda al sistema enzimático Tiorredoxina-Tiorredoxina Reductasa el cual fué originalmente descrito en Escherichia coli por Reichard (12) y en hepatoma de rata por Collen Moore (24).

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Anfinsen, C. B. Harvy Lec. 61, p 95 (1966)
- 2.- Massey, V; and G. Palmer; J. Biol. Chem. 237, p 2347 (1962)
- 3.- Massey, V; and C. H. Williams Jr. J. Biol. Chem. 240, p 4470 (1965)
- 4.- Reichard, P; Eur. J. Biol. Chem. 3 p 259 (1968)
- 5.- Nickerson, W. J. and Falcone, G. Sulfur in proteins. Benesch et al. Ed. p 409 Academic Press N. Y. (1959)
- 6.- Hartington, J. S; Advan. Cancer Res. 10, p 247 (1967)
- 7.- Nesbakken, and Eldjarn, L; Biochem. J. 87, p 526 (1963)
- 8.- Mirsky, I. A. and Perisuti, G; Biochem. Biophys. Act. 62 p 420
- 9.- Hagard, N; Physiol. Rev. 48, p 311 (1968)
- 10.- Moding, H; Biochem Pharmacol. 17, p 117 (1968)
- 11.- Reichard, P; J. Biol. Chem. 239, p 3445 (1964)
- 12.- Reichard, P. J; Biol. Chem. 239, p 3436 (1964)
- 13.- Ellman, G. L; Arch. Biochem. Biophys. 82, p 70 (1959)
- 14.- Mice, E. CH. et al; J. Biol. Chem. 237, p 1596 (1962)
- 15.- Mavies, D. R; J. Biol. Chem. 243, p 809 (1967)
- 16.- Massey, V. and Gibson, Q. H; Biochem. J. 77, p 431 (1960)
- 17.- Ondarza, R. N. et al. Colowick, S.P. and N. O. Kaplan. Methods in enzymology. Academic Press N. Y. 18, p 7884 (1970)
- 18.- Ondarza, R. N; Abney, R.; Lopez Colomé A; Biochem. Biophys. Acta. 191, p 239 (1969)
- 19.- Tietze, F. Arch. of Biochem. and Biophys. 138, p 177 (1970)
- 20.- Tietze, F. Arch. of Biochem. and Biophys. 220, p 449 (1970)

- 21.- Escamilla, J. E. y colaboradores; Datos no publicados.
- 22.- Ondarza, R. N.; J. Martinez Medellin; Biochem. Biophys. Acta. 113, p 409 (1966)
- 23.- Ondarza, R. N; National Cancer Inst. Monograph 27, p 3445 (1967)
- 24.- Moore, C. E. and Hurlbert, R; Biochem. Biophys. Acta. 55, p 651 (1962)
- 25.- Buzard, J.A. and F. Kopko; J. Lab. Clin. Med. 56 p 884 (1960)
- 26.- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J; J. Biol. Chem. 195, p 265 (1951)
- 27.- Dixon, M. and Webb; Enzymes. Longmans, Green and Co. London (1971)
- 28.- Mahler and Cordes; Biological Chemistry. Harper and Row Ed. (1971)
- 29.- Lehninger, L. A. Biochemistry. Worth Pub. N. Y. (1971)
- 30.- Rivas de la Chica, G; Tesis profesinal Fac. de Ciencias, U.N.A.M
- 31.- Layne, E; Methods in Enzymology Vol. III p 477 Ac. Press N. Y. (1957)
- 32.- Buzard, J. A. and Kopko, F; J. Biol. Chem. 238, p 464 (1963)
- 33.- O. Vestebarger and H. Severson. Acta Chem. Scand. 20 280 (1966).