

Valores de referencia de la enzima glutatión S-transferasa eritrocitaria en una muestra poblacional

Idania G. Alvarez Vera y Frank Hernández Rosales.

Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y 230, No. 1313, Siboney, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de febrero de 1997. Aceptado: 12 de febrero de 1998.

Palabras clave: glutatión S-transferasa eritrocitaria, glutatión reducido.
Key words: erythrocyte glutathione S-transferase, glutathione reduced.

RESUMEN. En este trabajo se describe el montaje y normalización del método para determinar la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) de eritrocitos. La determinación enzimática se llevó a cabo con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y el glutatión reducido (GSH) como sustratos. Se midió la absorción del conjugado CDNB-GSH espectrofotométricamente a 340 nm. La actividad fue expresada en unidades internacionales (UI) por gramo de hemoglobina (g Hb). El método presentó una variación intraensayo del 9,49 % y la estabilidad de la enzima en el hemolizado de eritrocitos y en eritrocitos lavados almacenados a -80 y 4 °C respectivamente fue menor de 48 h. Para la búsqueda del intervalo de referencia de una muestra poblacional se analizó la sangre de 180 individuos aparentemente sanos y de ambos sexos. El valor mínimo encontrado fue 1,10 UI/g Hb y el máximo de 16,07 UI/g Hb. El intervalo de referencia para el diagnóstico habitual fue 2,87-19,57 UI/g Hb, espacio estadístico en el cual se encontraba el 81 % de los valores.

ABSTRACT. The assembly line and standardization of a procedure for erythrocyte glutathione S-transferase determination was described. The 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and reduced glutathione (GSH) were used as substrates measuring GST activity by the absorption at 340 nm from CDNB-GSH conjugate. The activity was expressed as International Units (UI) per gram of haemoglobine (g Hb). The intraassay variation was 9.49 % and the stability of the enzyme in the haemolysed and washed erythrocytes stored at -80 and 4 °C respectively, was less than 48 h. Blood samples from 180 healthy donors from both sexes were analysed in order to determine the reference range of a population sample. The minimum value obtained was 1.10 UI/g Hb and the maximum one was 16.07 UI/g Hb. The diagnostic habitual reference range was 2.87-19.57 UI/g Hb, statistical space where the 81 % of the values were found.

INTRODUCCION

La glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18) (GST) es una enzima dependiente de glutatión (GSH) que pertenece al sistema enzimático antioxidante del organismo. Es una familia de proteínas que participan en la detoxificación de los compuestos electrofílicos reactivos de origen endógeno o exógeno en los organismos aeróbicos. Además, participa en el transporte y almacenamiento de las hormonas, los metabolitos, las drogas y una gran variedad de otros

compuestos no sustratos de naturaleza hidrofóbica.^{1,2}

La GST se encuentra en una amplia variedad de tejidos y órganos de origen animal.^{3,4} Está localizada en el citoplasma, en la membrana de las mitocondrias, microsomas y en el núcleo.⁵⁻⁸ La función de la GST es catalizar el ataque nucleofílico del anión tiolato del GSH (GS⁻), sobre el centro electrofílico del segundo sustrato.

Esta enzima está formada por una superfamilia de isoenzimas

múltiples, las cuales son codificadas por cinco genes diferentes. Hasta el momento, se han identificado cuatro clases de GST citosólicas: alfa (α), Mu (μ), Pi (π) y Theta (θ). Estas han sido caracterizadas sobre la base de sus propiedades enzimáticas y bioquímicas, su reactividad inmunológica y la composición de sus subunidades.^{9,10} También se han descrito dos formas de GST microsomal, las cuales presentan estructuras diferentes al compararlas con las GSTs citosólicas⁷

Se conoce que la GST eritrocitaria puede ser de la clase π o θ . El papel fisiológico de esta enzima en los eritrocitos no se conoce. Su localización en los eritrocitos resulta importante para eliminar los xenobióticos del organismo.¹¹ Sin embargo, el sustrato normal de la GST en eritrocitos no ha sido determinado.

El objetivo del presente trabajo consistió en montar y normalizar el procedimiento analítico para determinar la actividad de la GST eritrocitaria, así como los valores de referencia de una muestra poblacional seleccionada.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las muestras y preparación del hemolizado

Se utilizó sangre total con EDTA disódico como anticoagulante. El hemolizado se obtuvo a partir de 1 mL de eritrocitos lavados con disolución salina y se le adicionaron 3 mL de agua desionizada. La muestra se dejó

en reposo por 10 min a 4 °C y se centrifugó a 3 000 g durante 5 min a 4 °C.

Determinación de la actividad de la GST eritrocitaria

La actividad de la enzima se determinó según el método reportado por Habig et al.¹² El ensayo se llevó a cabo con una alícuota de hemolizado, 2 375 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0,1 mol/L a pH 6,5, utilizando el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno y el GSH como sustratos. La actividad enzimática se midió a través de la formación del conjugado GSH CDNB a 340 nm y se expresó en Unidades Internacionales/gramo de hemoglobina (UI/g Hb).¹³ El contenido de hemoglobina fue determinado por el método de la cianometahemoglobina.

Condiciones de almacenamiento para la determinación de la estabilidad en la actividad de la GST

Este estudio se llevó a cabo con eritrocitos lavados y hemolizado de eritrocitos almacenados a 4 y -80 °C respectivamente durante 5 d .

RESULTADOS

Con el objetivo de conocer el tiempo óptimo de medición de la actividad enzimática, se estudió el comportamiento de diferentes volúmenes de hemolizado durante 5 y 10 min de reacción (Figuras 1 y 2). Se observaron cinéticas lineales a partir de los valores de las pendientes (Tabla 1), muy similares a los que se conocen ($7,81 \cdot 10^{-3}$),^{14,15} lo que demuestra que a estos tiempos de reacción, existe proporcionalidad directa con la respuesta de la actividad enzimática. Además, se observaron incrementos de la densidad óptica, con el volumen de hemolizado.

La figura 3 representa la velocidad de reacción a diferentes volúmenes de hemolizado. En esta figura se observa que en el intervalo de 5 a 25 mL, la velocidad de reacción es lineal. Se seleccionó el volumen de 15 mL para la continuación del trabajo.

Para 10 repeticiones se obtuvo un coeficiente de variación (CV) de 9,49 % de una muestra que presentó una media de 9,80 UI/g Hb y una desviación estándar (DE) de 0,93 (Tabla 2). En el experimento de estabilidad los porcentajes de actividad enzimática disminuyeron a partir del tercer día de almacenamiento. La enzima mostró estabilidad por debajo de las 48 h (Tabla 3).

Para conocer los valores de referencia de la actividad de la GST eritrocitaria de una muestra poblacio-

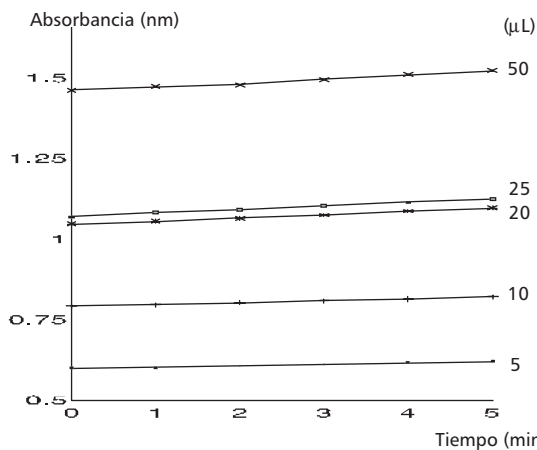


Fig. 1. Calibración del tiempo de medición durante 5 min de reacción.

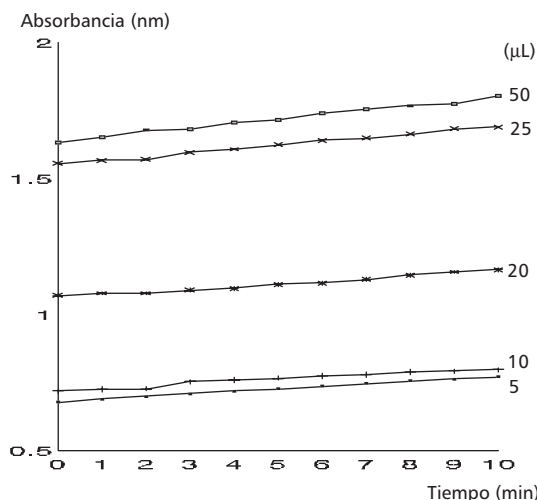


Fig. 2. Calibración del tiempo de medición durante 10 min de reacción.

Tabla 1. Relación de los valores de las pendientes obtenidas a diferentes volúmenes de hemolizado.

Tiempo (min)	Hemolizado (µL)				
	5	10	20	25	50
	Pendiente				
5	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$
10	$9,5 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	$1,12 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$	$1,53 \cdot 10^{-2}$

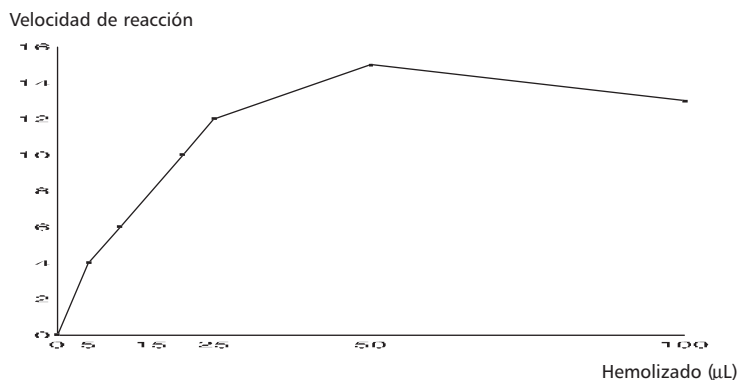


Fig. 3. Calibración del volumen de hemolizado.

Tabla 2. Precisión intraensayo del método.

n	\bar{X}	DE	CV
	(UI/g Hb)		
10	9,80	0,93	9,49

Tabla 3. Estabilidad de la actividad enzimática.

Día	Eritrocitos lavados		Hemolizado de eritrocitos	
	Actividad enzimática (UI/g Hg)	(%)	Actividad enzimática (UI/g Hg)	(%)
1	8,77	100	11,62	100
2	9,50	108	10,79	93
3	4,40	50	6,53	56
4	4,19	48	3,38	29
5	3,43	39	4,92	42

Tabla 4. Valores de referencia de la determinación de la GST eritrocitaria de una muestra poblacional.

n	\bar{X}	DE	Intervalo total	Intervalo de diagnóstico habitual de referencia
	(UI/g Hb)			
180	5,62	1,51	1,10-16,07	2,87-19,57

nal, se analizaron 180 donantes voluntarios aparentemente sanos, de ambos sexos, entre 20 y 45 años de edad (Tabla 4). Los valores de actividad de la GST obtenidos a partir de esta población fueron procesados automatizadamente mediante el programa estadístico NCSS. El histograma de frecuencias de la GST que se obtuvo, indicó que esta enzima siguió una distribución tipo log-normal. El intervalo de diagnóstico habitual de referencia resultó 2,87-19,57.

DISCUSION

El método que se empleó en este estudio es uno de los más utilizados¹² para la determinación de esa enzima. Aunque se usan sustratos específicos para la determinación de las diferentes isoenzimas de la GST, el sustrato CDNB que emplea Habig en su método se ha generalizado debido a que las distintas isoenzimas tienen cierta actividad frente a él.¹⁶ Sin embargo, al parecer es el específico para la determinación de la actividad de la GST eritrocitaria.

Se ha reportado que el cambio de absorbancia por minuto es una función lineal de la concentración de la enzima y del tiempo para al menos tres minutos de reacción, cuando la

velocidad del cambio de absorbancia por minuto es menor que 0,050 0 unidades de densidad óptica por minuto.¹² En este estudio, el cambio de absorbancia por minuto para 5 y 10 min de reacción estuvo entre 0,006 2y 0,017 3 unidades de densidad óptica por minuto. Esto sugiere que en estas condiciones el tiempo de reacción puede variar desde 3 hasta 10 min. Se seleccionó 5 min, considerando que es el tiempo medio óptimo. Hay otros autores que también utilizan 5 min de reacción.¹⁷ En el presente trabajo se demostró que el volumen necesario de hemolizado para la determinación enzimática puede estar entre 10 y 25 mL, sin variación en la velocidad de reacción. Por lo general, se han utilizado entre 5 y 25 mL.¹⁷⁻²⁰

La repetibilidad de la determinación de la actividad de la GST en eritrocitos obtenida en este estudio resultó inferior al 10 %, lo que da un valor aceptable para ensayos enzimáticos (Tabla 2). La reproducibilidad no pudo ser determinada en términos del ensayo en paralelo, debido a que la estabilidad de la enzima tanto en los eritrocitos lavados como en el hemolizado de eritrocitos no pasó de las 48 h (Tabla 3). Habitualmente, la GST se determina en he-

molizados almacenados a -80 °C lo que supone que este tipo de muestras tiene una cierta estabilidad, pero no se informa durante qué tiempo se ha mantenido la estabilidad de la actividad enzimática.²⁰ La media geométrica de una muestra poblacional cubana es 5,62 UI/g Hb (Tabla 4), valor muy similar a los reportados por otros investigadores para otras poblaciones.^{14,15}

CONCLUSIONES

Se logró montar y normalizar un método de ensayo para la determinación cuantitativa de la actividad catalítica de la glutatión S-transferasa y se pudo establecer que la población cubana presenta un intervalo de valores de referencia para el diagnóstico comprendido entre 2,87 y 19,57 UI/g Hb.

BIBLIOGRAFIA

- Morrow CS. and Cowam KH. Glutathione-S-Transferase and drug resistance. **Cancer Cells**, **2**, 15, 1990.
- Rushmore S.W.T.H., Pickett C.B.P. Glutathione-S transferase, structure, regulation, and therapeutic implications. **J. Biol. Chem.**, **268**, 11475, 1993.
- Gian M.P. Marina F. Cesare C. and *et al.* Glutathione-S transferase in humans: development and tissue distribution. **Arch. Toxicol.**, **61**, 265, 1988.
- Aalbert J.B. Hasan M. Clema E.M. Seth P. K. and Krishma. M.C.R. Glutathione-S transferase activity in rat and human tissues and organs. **Comp. Biochem. Physiol.**, **70C**, 88, 1981.
- Wahländer A. Soboll S. Sies H. Linke I. & Müller M. Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH- S- transferases. **FEBS Lett.** **97**, 138, 1979.
- Harris J.M. Meyer D. J. Coles B. and Ketterer B. A novel glutathione transferase (13-13) isolated the matrix of rat mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. **Biochem. J.**, **278**, 137, 1991.
- Morgenstern R. DePierre J.W. and Journall H. Microsomal glutathione transferase. Primary structure. **J. Biol. Chem.**, **260**, 13976, 1985.
- Bennett C.F. Spector D.L. and Yeoman L.C. Nontristone proyein BA is a glutathione-S transferase localized to interchromatinic regions of the cell nucleus. **J. Cell. Biol.**, **102** 600, 1986.
- Mannervik, B., and Danielsson, U.H. Glutathione transferase structure and catalytic activity. **C.R.C. Crit. Rev. Biochem.**, **23**, 283, 1988.
- Meyer D.J. Coles B. and Gilmore K.S. Fraser G.M. Pemble S.E. and Ketterer B. Theta; a new class of glu-

- tathione transferase purified from rat and man. **Biochem. J.**, **247**, 409-414, 1991.
11. Marcus C.J. Habig W.H. and Jakoby W.B. Glutathione transferase from human erythrocytes. Non-identity with the enzyme from liver. **Arch. Biochem. Biophys.**, **188**, 287, 1978.
 12. Habig W.H. and Jacoby W.B. **Meth. Enzymol.**, **77**, 398, 1981.
 13. Faraji B. Kang H.K. and Valentine J.L. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. **Clin. Chem.**, **33**, 539, 1987. Modificación al método de Thonson C.D. Rea H.M. Doesburg V.M. and Robinson M.F. (Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. **J. Nutr.**, **37**, 457, 1977.
 14. Kurata M. Susuki M. and Nihal S.A. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. **Comp. Biochem. Physiol.**, **106B**, 477, 1993.
 15. Kurata M. Susuki M. and Takeda K. Differences in levels of erythrocyte glutathione and its metabolizing enzyme activities among primates. **Comp. Biochem. Physiol.** **104B**, 169, 1993.
 16. Clark A.G. Smith J.N. and Speir T.W. Cross specificity in some vertebrate and insect glutathione-transferases with methyl parathion (dimethyl p-nitrophenyl-N-phosphorothionate), 1-cloro-2,4-dinitrobenzene and S-crotonyl-N-acetylcysteamine as substrates. **Biochem. J.**, **135**, 385, 1973.
 17. Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods (3rd edition), 1984.
 18. Schramm V.L. McCluskey R. Emig F.A. and Litwack G. Kinetic Studies and Active Site-binding Properties of Glutathione-S-transferase Using Spin-labeled Glutathione, a Product Analogue. **25**, 714, 1984.
 19. Wheatley J.B. Kelley K.M. Montali J.A. Berry O.A.C. Schmidt D.E. Examination of glutathione S-transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography. **663**, 53, 1994.
 20. Rompelberg C.J.M. Vogels J.T.W.E. Volge N. Bruijntjies R.G.C. Stenhuis W.H. Bogaards J.J.P. and Verhagen H. Effect of short-term dietary administration of eugenol in humans. **15**, 129, 1996.

¿Problemas con el sueño?

La Clínica de Sueño le puede ayudar a resolverlos felizmente.



Es conocido que siempre han existido personas que sufren trastornos relacionados con el sueño, pero sólo en la última década, se le ha dado a las alteraciones del sueño la significación requerida como problema de salud que causa no sólo serias enfermedades médicas, sino también, que afecta las relaciones sociales y los negocios de las personas, sin límites de edad o profesión.

La Clínica de Sueño reúne a un colectivo profesional multidisciplinario con más de 20 años de experiencia en el estudio del Sistema Nervioso Humano y está dotada con moderna tecnología que le permite un rápido y eficaz diagnóstico y con novedosas técnicas de tratamiento de los diferentes trastornos del sueño.

Esta institución ha sido concebida para la evaluación y rehabilitación de los pacientes con trastornos del sueño aquejados de:

- Dificultades para iniciar o mantener el sueño o sueño no restaurador (insomnios) de todos los tipos y en todas las edades.
- Somnolencia excesiva diurna (hipersomnias) con sospecha de narcolepsia, síndrome de apnea de sueño y otras causas.
- Sospecha de alteraciones asociadas al sueño como crisis epilépticas, asma nocturna, movimientos periódicos de las piernas, etcétera.
- Alteraciones del ciclo normal día-noche (cambio de huso horario y en los turnos laborales, patrones de sueño-vigilia irregulares, síndromes de fase atrasada y adelantada de sueño, etc.).
- Parasomnias mal soportadas, con riesgos de accidente o de larga evolución (sonambulismo, terrores nocturnos, pesadillas, etc.).

- Problemas del sueño relacionados con enfermedades neuropsiquiátricas (asociadas a enfermedades neurológicas, traumas craneales, depresiones enmascaradas).



CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA

Teléfonos: 33 6003; 21 9966.
Fax: (537) 33 6339; 33 2420; 33 6302.
Telefax: 33 6028.