

UN METODO SIMPLIFICADO PARA LA DETERMINACION DE SUPEROXIDO DISMUTASA

F. Hernández Rosales, M. Prats Góngora y M. González Rico.

Centro Investigaciones del Ozono, Calle 230 y Avenida 15, Siboney, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 1993.

RESUMEN. Con el objetivo de normalizar un método sencillo para la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos, se realizaron algunas modificaciones al procedimiento descrito en 1979 por Minami y Yoshikawa. Se caracterizaron las condiciones óptimas de la reacción: tiempo de incubación, estabilidad, influencia del pH y la sustitución del agente secuestrante DTPA por EDTA. En tales condiciones la repetibilidad y reproducibilidad del método mejoraron. Las modificaciones realizadas hacen a este método más confiable y apropiado para su uso clínico.

ABSTRACT. The aim of this work was the standardization of a simple method for measuring erythrocyte superoxide dismutase activity. Some modifications to the Minami and Yoshikawa's method were performed on 1979. Optimal reaction conditions as incubation time, stability, pH influence and substitution of chelant agent DTPA by EDTA were carefully analyzed. In such conditions method repetibility and reproducibility improved reached values of 3,31 and 5,03 %, respectively. From performed modifications this method is suitable and reliable for clinical use.

INTRODUCCION

El descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich¹ en 1969, posibilitó conocer el papel fundamental que juega en la defensa antioxidante de las células.^{2,3} A partir de entonces, muchas investigaciones se realizaron para conocer las características estructurales, genéticas y terapéuticas de la enzima,⁴⁻⁷ así como para establecer los procedimientos más convenientes para su determinación.

Uno de los métodos más usados para la determinación de la SOD, se fundamenta en la reducción de citocromo C por el anión superóxido (O_2^-), el cual origina un derivado estable de Fe (II), cuya reacción fue conocida mediante pulsos radiolíticos.^{1,8} En este procedimiento la actividad se mide en términos de la capacidad de la enzima para inhibir la reducción del citocromo C.

Otros procedimientos utilizan la reducción fotoquímica de las flavinas para generar el anión superóxido mediante reoxidación en el aire, utilizando también el citocromo C como detector del anión superóxido.⁹

Existen métodos más simples que incluyen aquellas sustancias que se autooxidan produciendo el radical superóxido y que adicionan un producto cromóforo para la determinación cuantitativa de la reacción. Tales métodos consisten en un sistema simple tanto para la producción como la detección del anión. Son generalmente métodos muy sensibles, pero algo limitados por las restricciones que imponen las condiciones de ensayo, ya que la autooxidación debe estar plenamente relacionada con el radical. Estos métodos incluyen a la adrenalina,¹⁰ el pirogalol¹¹ o a la 6-hidroxi dopamina^{12,13} como sustancias autooxidables.

También se conocen, los llamados métodos directos, en los cuales se determina cuantitativamente la descomposición del anión superóxido sin el acoplamiento a una segunda reacción.^{14,15} Más recientemente, se han desarrollado nuevos métodos basados en la aplicación de tecnologías de avanzada y el empleo de anticuerpos monoclonales¹⁶ y compuestos quimioluminiscentes.¹⁷

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar una posible metodología para realizar la determinación cuantitativa de la actividad de la SOD en eritrocitos, a partir de un procedimiento desarrollado originalmente por Minami y Yoshikawa,¹⁸ con el empleo de pirogalol, como generador de radicales superóxido y azul de nitrotetrazolio como aceptor.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Amortiguador Tris-cacodilato. Se preparó una solución amortiguador Tris-cacodilato 72,4 mmol/L pH 8,2 que contenía 3,5 mmol/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Solución de pirogalol. A partir de una solución madre de pirogalol 9 mmol/L, la de trabajo se preparó diluyendo 10 veces en HCl 1; 0,1 y 0,01 mol/L; unos minutos antes de ser utilizada.

Solución de azul de nitrotetrazolio (ANT). Se empleó solución de azul de nitrotetrazolio 0,98 mmol/L.

Solución de Triton X-100. Se utilizó solución de Triton X-100 de 170 g/L.

Solución de SOD. Se utilizó una preparación comercial de SOD (Boehringer Mannheim No. 567680), a partir de la cual se prepararon soluciones de 600 y 60 mg/L.

Solución amortiguadora de ácido fórmico. Se preparó una solución de ácido fórmico 2 mol/L pH 3,5 que contenía 160 mL de Triton- X-100 por litro de solución.

Procedimiento

En un tubo de ensayos se vertieron 0,5 mL de la solución amortiguadora de Tris-cacodilato, 0,1 mL de la solución de Triton X-100, 0,25 mL de la solución de ANT y 0,25 mL de extracto de sangre o de la solución de SOD comercial. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 5 min y se añadió 0,01 mL de la solución de pirogalol de trabajo. Para detener la reacción, se agregó 0,3 mL de la solución amortiguadora de ácido fórmico. La absorbancia de la mezcla fue medida en un espectrofotómetro a 540nm. El **blanco** se preparó de igual

forma, pero sin adicionar el extracto de sangre o la solución de SOD comercial.

Preparación del extracto de sangre

Se hemolizó 0,1 mL de sangre total heparinizada en 0,9 mL de agua bidestilada fría. Para eliminar la hemoglobina, se añadieron 0,25 mL de cloroformo y 0,5 mL de etanol (en frío) y se agitó vigorosamente la mezcla por varios minutos. Mediante centrifugación en frío a 18 000 g durante 60 min, se obtuvo el extracto para la determinación, el cual conservó su estabilidad durante 30d a -20 °C.

Unidad enzimática

Se consideró como unidad enzimática, la cantidad de enzima necesaria para obtener una inhibición del 50% de la absorbancia del blanco según McCord y Fridovich.¹

RESULTADOS Y DISCUSION

Autoxidación del pirogalol y reducción del ANT en función del tiempo de incubación

Es conocido que el pirogalol se autooxida rápidamente en solución acuosa formando varios productos intermedios. En un inicio, la solución puede tomar un color amarillo-marrón, varios minutos después, se puede tornar verde y finalmente después de varias horas, amarilla.

Para conocer el tiempo óptimo de generación de los iones superóxido y su correspondiente detección, se realizó un ensayo en blanco a diferentes tiempos de incubación (Fig. 1).

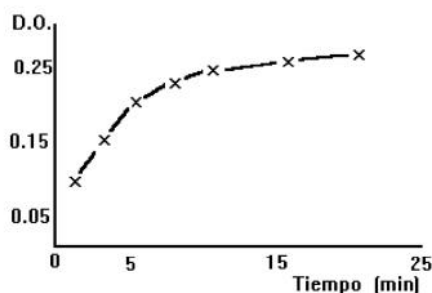


Fig. 1. Generación del anión superóxido en el curso de la reacción, utilizando SOD comercial.

Se pudo observar que en los primeros 5 min existe una relación lineal entre la absorbancia y el tiempo, con tendencia a alcanzar un valor máximo después de los 20 min. Se comprobó que la velocidad de autoxidación resulta constante durante esta primera etapa, tal como lo observaron Minami y Yoshikawa.¹⁸

Estabilidad de la reacción en dependencia de la pureza química del pirogalol

Debido a que los iones superóxidos generados por la autoxidación del pirogalol pueden reaccionar con sustancias que contaminan a éste, se procedió a estudiar la cinética de la reacción en condiciones de pureza de la sustancia autoxidable. La purificación química se realizó por el método de sublimación a partir de pirogalol para análisis (Merck).

Se obtuvo unac inéticap lana entrel os3y2 0m in de incubación (Fig. 2), demostrándose que el comportamiento observado después de los 5 min de incubación (Fig. 1), se debe fundamentalmente, a reacciones colaterales del anión superóxido con algunos contaminantes. Esto demuestra lo importante que resulta la utilización del pirogalol altamente purificado para obtener una eficiente estabilidad de la reacción.

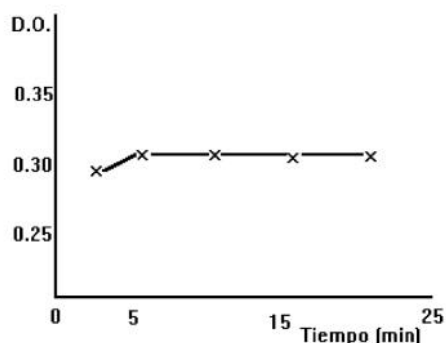


Fig. 2. Estabilidad de la producción de anión superóxido a partir de pirogalol purificado.

Influencia del pH en la reacción del sistema pirogalol-ANT

La mayor influencia del pH en el sistema pirogalol-ANT, se ejerce sobre el proceso de autoxidación del primero. La reacción puede llevarse a cabo a valores de pH entre 7,8 y 9,0, aunque la mayor velocidad para la reacción se alcanza a pH cercano a 8,0¹¹. Sin embargo, la sensibilidad de la SOD disminuye con el incremento de aquel, debido posiblemente a alteraciones de la estructura terciaria.

El pH final de la reacción varía en dependencia de la concentración de HCl empleada para disolver el pirogalol a pesar de estar presente la solución amortiguadora (Fig. 3).

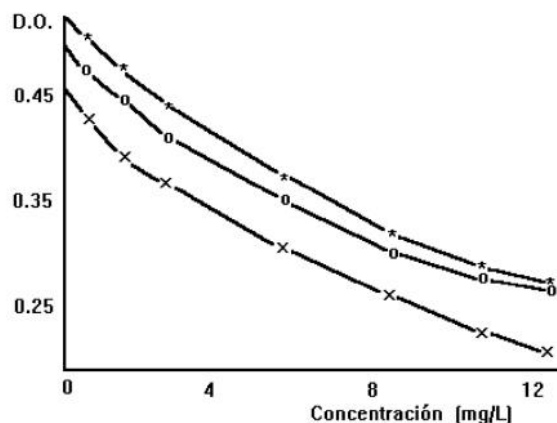


Fig. 3. Efecto del pH sobre la autoxidación del pirogalol. X = pH 7,7 o = pH 8 □ = pH 8,2

Se comprobó que la solución madre de pirogalol preparada en soluciones de HCl 1,0; 0,1 y 0,01 mol/L presentaba un pH de reacción de 7,7; 8,0 y 8,2, respectivamente y que a pH 7,7, se obtenían valores de densidad óptica muy por debajo de los alcanzados a pH 8,0 y 8,2 (Fig. 3).

Asimismo, se demostró que la inhibición alcanza su mayor valor a pH 8,2 (50%) (Fig. 1), mientras que en el procedimiento original llevado a cabo por Minami y Yoshikawa¹⁶ empleando HCl 1 mol/L, la inhibición máxima sólo alcanzó un 45%. Estos resultados validan el empleo de HCl 10mmol/L en este sistema con tales propósitos.

Sustitución del agente quelante

Se conoce que los iones Cu^{+2} y Mn^{+2} no afectan la autoxidación del pirogalol cuando en la mezcla de reacción está presente el EDTA a una concentración de 1 mmol/L aunque, los iones Fe^{+2} permanecen activos (inhibición de la sensibilidad de la SOD).¹¹ Debido a esto, algunos autores han utilizado el ácido dietiltriainopentaacético (DTPA) que es un potente quelante de los metales de transición.

En este trabajo, la concentración final de EDTA se incrementó hasta 1,58 mmol/L, ya que Marklund y Marklund¹¹ demostraron que hasta una concentración de 2 mmol/L, la autoxidación del pirogalol resulta independiente de la concentración del agente quelante.

Utilizando el EDTA, la inhibición máxima de la reducción del ANT alcanzó el 47 %, valor más alto que el que obtuvieron Minami y Yoshikawa¹⁸ (45 %) utilizando DTPA (Fig. 4).

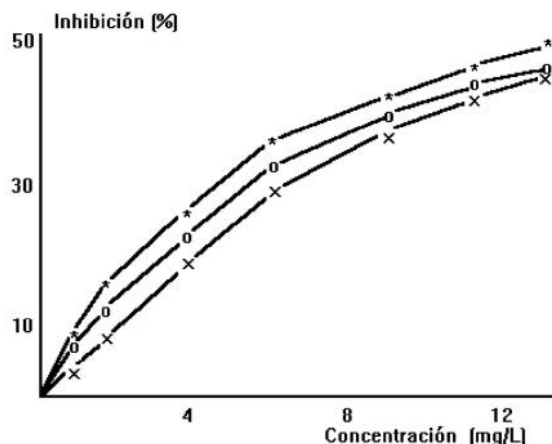


Fig. 4. Efecto del pH sobre la inhibición de la reducción del ANT.
X = pH 7,7 o = pH 8 * = pH 8,2

Estandarización del procedimiento

Después de la caracterización del sistema de reacción se halló la curva de calibración correspondiente (Fig. 5).

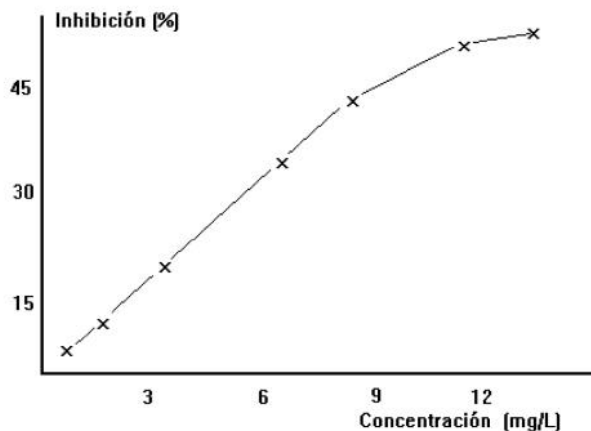


Fig. 5. Curva de calibración.

El comportamiento fue lineal hasta la concentración de 8,91 mg/L de SOD bovina y está representado por la ecuación $y = 4,60x + 5,04$, por tanto una unidad enzimática equivale a 9,77 mg de SOD bovina por mililitro de reacción.

Además, se evidencia que es conveniente trabajar con cantidades de muestra que inhiban la reducción de ANT por debajo del 40% .

En la tabla I se presenta la variación intra e inter ensayo, observándose coeficientes de variación (CV) de 3,31 y 5,03 %, respectivamente.

En el procedimiento original, se informa un CV de 5,10% para la reproducibilidad.

TABLA I
Precisión intra e inter-ensayo

Parámetros	Repetibilidad	Reproducibilidad
N6		6
\bar{X}	29,50	30,74
DE	0,97	1,55
CV	3,31	5,03

Valores expresados como inhibición (%) de la reducción del ANT.

En la búsqueda de la exactitud del método, se mezclaron cantidades conocidas de una solución de SOD bovina (concentración 60m g/L) con cantidades definidas de una mezcla de extracto de sangre humana. La recuperación de la actividad alcanzó valores de alrededor de un 100% (Tabla II). El valor medio del contenido de SOD en los eritrocitos de personas adultas aparentemente sanas fue de 35,38 kUI/L de sangre total obtenido en seis individuos.

TABLA II
Valores de la exactitud del método

Teórico (mg/L)	Real	Recuperación (%)
10,69	10,71	100,1
9,29	9,54	102,9
7,87	7,97	101,3
7,17	6,86	95,5

CONCLUSIONES

El método para la determinación de superóxido dismutasa, simplificado y normalizado en este trabajo, puede ser una herramienta útil en el laboratorio clínico debido a su sencillez, rapidez y confiabilidad, lo que lo hace ideal para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades relacionadas con la actividad de la enzima superóxido dismutasa.

BIBLIOGRAFIA

- McCord J.M. and Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- Sun Y. *Free Radical Biol. Med.*, **8**, 583, 1990.
- Sies H. *Amer. J. Med.*, **91**, 3C-315, 1991.
- Hassan H.M. *Free Radical Biol. Med.*, **5**, 377, 1988.
- Bannister W.H., Bannister J.V., Barra D., Bond J., and Bossa F. *Free Rad. Res. Commun.*, **349**, 12, 1991.
- Touati D. *Free Radical Biol. Med.*, **5**, 393, 1988.
- Muizelaar J.P., Marrarou A., Young H.F., Chol S.C., Wolf A., Schneider R.L. and Kontos H.A. *J. Neurosurg.*, **78**, 375, 1993.
- Fielden E.M., Roberts P.B., Bray R.C. and Calabrese L. *Biochem. J.*, **139**, 49, 1974.
- Beauchamp C.H. and Fridovich I. *Anal. Biochem.*, **44**, 276, 1971.
- Misra H.P. and Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170, 1972.
- Marklund S. and Marklund G. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469, 1974.
- Heikkila R.E. and Cabbat F. *Anal. Biochem.*, **75**, 356, 1976.
- Crosti N., Servidel T., Bajer J. and Serra A. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **25**, 265, 1987.
- Marklund S. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7504, 1976.
- Bolann B.J. and Ulvik R.J. *Clin. Chem.*, **37**, 1993, 1991.
- Portsmann T., Wietschke R., Schmechta H., Grunow R., Portsmann B., Bleiber R., Pergande M., Stachat S., and von Baehr R. *Clin. Chim. Acta.*, **171**, 1, 1988.
- Kimura H. and Nakano M. *FEB*, **29**, 347, 1988.
- Minami M. and Yoshikawa H. *Clin. Chim. Acta*, **92**, 337, 1979.