

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE CORTISOL EN MICROSOMAS
(CORTISOL EIA KIT)**

NÉSTOR DAVID DÍAZ DUQUE

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI**

2015

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE CORTISOL EN MICROSOMAS
(CORTISOL EIA KIT)**

NÉSTOR DAVID DÍAZ DUQUE

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

DIRECTOR: ARAM JOEL PANAY ESCOBAR Ph. D

CO-DIRECTOR: GUILLERMO MONTOYA Ph. D

SANTIAGO DE CALI

2015

Contenido

Resumen del proyecto	4
Abstract.....	5
1. Introducción	6
2. Descripción del proyecto.....	7
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia	7
2.2. Marco teórico y estado del arte	8
2.2.1. El cortisol y la enzima 11 β -HSD1	8
2.2.2. Cortisol EIA Kit y otras metodologías.....	11
2.3. Objetivos	14
2.3.1. Objetivo general.....	14
2.3.2. Objetivos específicos	14
2.4. Metodología.....	14
2.4.1. Cuantificación de grupos sulfhidrilos en microsomas hepáticos de humano.....	14
2.4.2. Verificación de la funcionalidad de la reacción enzimática para la producción de cortisol.....	15
2.5. Resultados y discusión.....	17
2.6. Conclusiones.....	29
2.7. Recomendaciones.....	29
3. Bibliografía	30

Resumen

El cortisol es un glucocorticoide presente en el organismo, el cual se encarga de controlar distintos procesos metabólicos. En el hígado, su función es regulada principalmente por la enzima 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), encargada de catalizar el paso de cortisona a cortisol. Algunos estudios, han descubierto que la sobreexpresión de esta enzima, se relaciona con la aparición de factores característicos del síndrome metabólico, tales como obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Actualmente, se puede estudiar la actividad de la enzima 11 β -HSD1 a través de la tecnología HTRF, sin embargo, el desarrollo de esta técnica requiere de una alta inversión económica. Este proyecto tiene el propósito de implementar el ensayo Cortisol EIA Kit y determinar si es posible cuantificar el cortisol producido por la enzima 11 β -HSD1 en microsomas de hígado; con el fin de realizar futuros estudios de la actividad inhibitoria de nuevas moléculas sobre la síntesis de cortisol, las cuales puedan ser utilizadas en futuros tratamientos contra la diabetes tipo 2.

Para llevar a cabo este proyecto, se comprobará si la presencia de microsomas interfiere con el desarrollo del ensayo, posteriormente, se deberá adaptar el ensayo de cortisol EIA Kit en el laboratorio de la universidad Icesi, y finalmente, se quiere evidenciar la capacidad del ensayo para cuantificar el cortisol producido por la enzima. Al realizar este trabajo, se encontró que los microsomas utilizados poseían una baja cantidad de grupos sulfhidrilos, por lo cual no se espera una interferencia de estas moléculas con el kit. También se realizó un gran avance en la verificación de la efectividad de la reacción de la enzima 11 β -HSD1 para producir cortisol, la cual es fundamental antes de utilizar el kit. Finalmente, se comprobó que el cortisol presente en los microsomas puede ser detectado y que este proceso no se ve afectado por la naturaleza y tratamiento de la muestra. Con estos resultados, se espera tener los argumentos suficientes para continuar con la implementación del kit sin incurrir en mayores riesgos y esperar resultados positivos en el nuevo uso de esta metodología, que ampliará las puertas de la investigación a más instituciones.

Abstract

Cortisol is a glucocorticoid in the body, which is responsible for controlling various metabolic processes. In the liver, its function is regulated primarily by the enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD1), responsible for catalyzing the passage of cortisone to cortisol. Some studies have found that overexpression of this enzyme is related to the appearance of characteristic factors of the metabolic syndrome, such as obesity and type 2 diabetes mellitus. Currently, one can study the activity of the enzyme 11β -HSD1 through HTRF technology, however, the development of this technique requires a high economic investment. This project aims to implement Cortisol EIA Kit test and determine if it is possible to quantify the cortisol produced by the enzyme 11β -HSD1 in liver microsomes; in order to future studies of the inhibitory activity of new molecules on the synthesis of cortisol, which can be used in future treatments for type 2 diabetes.

To carry out this project, we will check whether the presence of microsomes interfere with assay development, then must adapt the assay of cortisol EIA kit lab Icesi college, and finally the ability of the assay to be measured quantify the cortisol produced by the enzyme. In performing this work, we found that the microsomes used had a low amount of sulfhydryl groups, thus interference of these molecules is not expected in the kit. A breakthrough was also performed in verifying the effectiveness of the reaction of the enzyme 11β -HSD1 to produce cortisol, which is critical before using the kit. Finally, it was found that the present cortisol in microsomes can be detected and that this process is not affected by the nature and treatment of the sample. With these results, we expect to have sufficient grounds to continue the implementation of the kit without incurring greater risks and expect positive results in the new use of this methodology, which will expand the doors of research at the institutions.

1. Introducción

Una de las enfermedades que más afecta a la sociedad en los tiempos actuales, es la conocida diabetes mellitus tipo 2, de acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2025 cerca de 300 millones de personas serán diabéticas y en la actualidad, la prevalencia para la diabetes tipo 2 en personas mayores de 30 años es del 7% en Colombia (Salud, 2015). Lo anterior, refleja la necesidad de investigaciones en busca de nuevos tratamientos contra esta enfermedad y a su vez, el uso de nuevas metodologías que mejoren la capacidad de grandes y pequeños laboratorios, para indagar en la búsqueda de estas alternativas farmacológicas.

En los últimos años, diferentes investigaciones han dirigido sus esfuerzos en el estudio de un nuevo blanco molecular conocido como la enzima 11β -HSD1, destacada como la llave principal del metabolismo del cortisol en el hígado. El cortisol es un glucocorticoide presente en el organismo, el cual se encarga de controlar distintos procesos metabólicos. En el hígado, su función es regulada principalmente por la enzima 11β -HSD1, encargada de catalizar el paso de cortisona a cortisol y es en este órgano donde se reporta su mayor actividad (Chapman, Holmes, & Seckl, 2013). Por lo anterior, las investigaciones en este tema utilizan los microsomas de hígado para llevar a cabo sus estudios, en donde han descubierto que la sobreexpresión de esta enzima, se relaciona con la aparición de factores característicos del síndrome metabólico, tales como obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007). Actualmente, se puede estudiar la actividad de la enzima 11β -HSD1 a través de la tecnología de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF), sin embargo, el desarrollo de esta técnica requiere de una alta inversión económica.

De manera general, el objetivo del proyecto consiste en la implementación de un kit cuantificador de cortisol, desarrollado por la empresa Cayman, del cual no se reporta utilidad alguna de su uso sobre microsomas de hígado humano, pero si en otras matrices como plasma, orina y heces; por lo cual, se hizo un análisis de los microsomas por espectrofotometría en un lector de platos, para detectar posibles interferencias que podrían presentarse durante el desarrollo del kit; además se hizo uso de equipos como el HPLC y el UPLC, para comprobar la producción de cortisol por la enzima 11β -HSD1 presente en los microsomas. Todo esto era fundamental, para descubrir problemas que pudieran causar un fracaso en el uso del kit y de esta manera plantar unas bases sólidas, que permitieran su uso con el menor de los riesgos posibles, evitando pérdida de dinero y tiempo.

2. Descripción del proyecto

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia

Los microsomas son fragmentos del retículo endoplasmático, formados cuando las células o tejidos de un determinado órgano se fragmentan (Martin & Hine, 2008); es por esto, que los microsomas de hígado proveniente de humanos, están cada vez más involucrados en investigaciones, debido a las numerosas enzimas que contienen y a la importancia de estas para las funciones vitales del organismo. Una de esas enzimas es la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), involucrada en la reacción de activación del cortisol, lo que significa que contribuye en gran medida en el metabolismo de los alimentos y en el desarrollo de algunas enfermedades como el síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus tipo 2, cuando su funcionamiento no es el adecuado (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007). Lo anterior, hace que la implementación de una metodología que permita determinar el cortisol producido por esta enzima, sea de gran interés y utilidad para la comunidad científica, ya que las metodologías actuales requieren de equipos y tecnologías que no son asequibles para algunas instituciones; esta es una de las razones por las cuales no hay evidencia del desarrollo de este tipo de investigaciones en Colombia. En la búsqueda de artículos, en los que se haya llevado a cabo la cuantificación de cortisol en microsomas destacan dos métodos: el primero, corresponde a una investigación en la cual buscaban estudiar la actividad de la enzima 11 β -HSD1, a través de una microdiálisis acoplada con cromatografía líquida y espectrometría de masas (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007); el otro método, consiste en un kit desarrollado por la empresa Cisbio para la cuantificación de cortisol en diferentes muestras, utilizando tecnología de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) (BMG LABTECH). El problema con las técnicas anteriores, radica en la dificultad de acceder a estos equipos, impidiendo la puesta en marcha de proyectos innovadores por parte de nuevas instituciones.

Con el propósito de encontrar un método más económico, que no requiera de la tecnología HTRF y que sirva como herramienta para futuras investigaciones, se ha realizado el siguiente planteamiento problema. ¿Es posible implementar un ensayo colorimétrico con la capacidad de cuantificar el cortisol producido en microsomas, haciendo uso del lector de platos y de las instalaciones de la Universidad Icesi? Para responder esta pregunta, se ha decidido trabajar con el ensayo de cortisol EIA Kit, el cual es fabricado por la empresa Cayman Chemical y es utilizado para cuantificar el cortisol en muestras de orina, plasma y heces, sin embargo se desconoce su efectividad en una matriz con microsomas. (Cayman, 2015).

La posibilidad de implementar satisfactoriamente este tipo de ensayo, abre las puertas para futuras investigaciones en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica y que puedan ser llevadas a cabo en diferentes instituciones del país, gracias a su método más sencillo y asequible. Un ejemplo, es la evaluación de la actividad inhibitoria de triterpenos pentacíclicos sobre la 11 β -HSD1, producidos por la *Cecropia telenitida*, una planta presente en Colombia. El desarrollo de esta investigación, podría proporcionar una herramienta para el estudio de moléculas como las producidas por esta planta y dar un paso adelante en el desarrollo de nuevos medicamentos, en alianza con industrias farmacéuticas nacionales o internacionales.

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. El cortisol y la enzima 11 β -HSD1

El cortisol es una hormona glucocorticoide producida por la corteza adrenal, involucrada en la regulación de procesos fisiológicos como el metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y algunas respuestas inmunológicas sobre el estrés y la inflamación. El mecanismo de acción del cortisol consiste en su difusión a través de la membrana, gracias a su buena liposolubilidad, luego se une a proteínas receptoras que le permiten su entrada al núcleo de la célula, para inducir o reprimir la transcripción de determinados genes. (Guyton & Hal, 2006). En el metabolismo del cortisol, las isoenzimas 11 β -HSD toman un papel muy importante en la regulación de sus niveles en el organismo, al catalizar la conversión de cortisona a su forma activa cortisol y viceversa, utilizando el NADP⁺ o NADPH como sustrato, (Kasuya, Yokokawa, Takayama, Shibasaki, & Furuta, 2003) tal y como se muestra en la imagen 1. Algunos estudios han demostrado que sobreexpresiones de la isoenzima 11 β -HSD1, la cual cataliza la formación de cortisol a partir de cortisona, contribuye con el desarrollo de algunas patologías como el síndrome metabólico, obesidad y aumenta el riesgo de adquirir diabetes tipo 2 (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007). Existen varias vías por las cuales el exceso de este glucocorticoide en el cuerpo, puede desencadenar en estas enfermedades: el primero consiste en que el cortisol promueve la gluconeogénesis en el hígado, lo cual significa una mayor cantidad de azúcar en sangre; un segundo mecanismo es la inhibición de las células β en el páncreas, las cuales se encargan de regular los niveles de azúcar por medio de la producción de insulina; y finalmente, un exceso de cortisol promueve la lipólisis en los adipocitos, en donde se generan compuestos que tienen responsabilidad en la resistencia de los receptores a la insulina (Antidiabetic Drug Laboratory & University, 2011). Desde que se conoció la importancia de esta enzima, muchas investigaciones han girado en torno a su aislamiento y caracterización, lo cual ha permitido identificar su presencia en el hígado, tejido adiposo, músculo, riñón y

cerebro. Estudios más recientes corroboran los resultados anteriores, al encontrar una alta actividad de la enzima 11 β -HSD1 en microsomas de hígado humano y de otros animales (Chapman, Holmes, & Seckl, 2013).

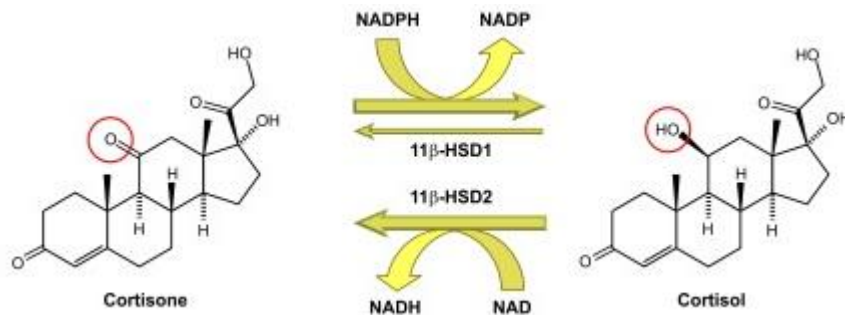


Figura 1. Reacciones catalizadas por la isoenzima 11 β -HSD (Chapman, Holmes, & Seckl, 2013).

Los microsomas son fragmentos del retículo endoplasmático, formados cuando las células o tejidos de un determinado órgano se fragmentan (Martin & Hine, 2008). En múltiples publicaciones, se puede evidenciar el uso de microsomas para diferentes investigaciones en relación con el cortisol; por ejemplo microsomas de hígado utilizados para observar el metabolismo del cortisol en humanos a través de fluorocortisol (S.M. Abel, 1993); estudios sobre el efecto inhibitorio del zinc en la enzima 11 β -HSD2 utilizando microsomas placentarios (P. Niu, 2002) y el uso de microsomas de riñón para evaluar una posible actividad inhibitoria del cortisol sobre la enzima 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en ratas (Imamura, Takada, Kamizono, & Otagiri, 2001). Los microsomas más utilizados en investigaciones, son los extraídos a partir de hígado humano, lo anterior debido a que estos microsomas presentan una gran variedad de enzimas metabolizadoras de medicamentos, lo cual los hace comúnmente utilizados en el desarrollo de fármacos para soportar las fases de absorción, distribución, metabolismo y excreción *in vitro* (XenoTech, s.f.). La enzima 11 β -HSD1, catalizadora de la reacción de cortisona a cortisol, se encuentra expresada principalmente en el hígado humano (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007), lo cual convierte a los microsomas de hígado en herramientas esenciales para el estudio de esta enzima.

En un estudio realizado por investigadores de varias universidades de Europa y Estados Unidos, demostraron la relación entre la enzima 11 β -HSD1 y la diabetes tipo 2, a partir de la creación de ratones transgénicos, los cuales poseían una sobreexpresión de la enzima en cuestión (Masuzaki, y otros, 2001); los resultados de la investigación exhibieron una resistencia a la insulina, hiperlipidemia, entre otras factores asociados al síndrome metabólico. Lo anterior, ha motivado a los investigadores a desarrollar inhibidores selectivos de la 11 β -HSD1 como tratamiento contra la diabetes, como es el caso del KR-67105, un fármaco

desarrollado por científicos en Corea, cuya actividad preventiva y en el tratamiento de la diabetes tipo 2 ha sido probada con éxito (Park, y otros, 2013).

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por una hiperglucemia, es decir, altos niveles de azúcar en la sangre. Según cifras de la federación internacional de diabetes, cada año mueren cuatro millones de personas en el mundo a causa de esta enfermedad, lo cual ha hecho que la OMS la posicione dentro de las cuatro enfermedades no transmisibles prioritarias, junto con la enfermedad cardiovascular, el cáncer y la enfermedad respiratoria crónica. Existen dos tipos de diabetes: diabetes tipo 1, en la cual el sistema inmune ha destruido las células productoras de insulina en el páncreas, haciendo necesaria la inyección de insulina para sobrevivir; y diabetes tipo 2, que es la más frecuente y asintomática debido a que el cuerpo produce insulina pero en menor cantidad o ha adquirido resistencia a la misma. (FID, 2011). Algunas investigaciones, han asociado el síndrome de resistencia a la insulina con el síndrome de Cushing's o exceso de glucocorticoides; esta afirmación se basa en el hecho de que el mecanismo de acción del cortisol es opuesto a la acción de la insulina, produciendo una pérdida en la afinidad de los receptores de unión a insulina. Es por esto que nuevas estrategias farmacológicas que ayuden a controlar la acción glucocorticoide, pueden ser probadas en el tratamiento de personas con diabetes tipo 2 (WALKER, 1999).

Como se ha podido observar, el cortisol presenta una relación estrecha con el desarrollo de la diabetes tipo 2, haciendo énfasis en la actividad de la enzima 11β -HSD1. Lo anterior, se puede ver resumido en un estudio sobre la actividad inhibitoria de un nuevo medicamento para la diabetes, que actualmente acaba de completar la fase clínica 2; para ello, se realizó un estudio in vitro de la enzima en microsomas de hígado de ratón, utilizando tecnología HTRF (Soo Young Byuna, 2015). En otro artículo, se estudia la actividad de la enzima 11β -HSD1 en microsomas de hígado a través de una metodología de microdiálisis, la cual está acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida (Sun, Stenken, Yang, Zhao, & Musson, 2007). Estos dos métodos, se basan en la cuantificación de cortisol producido en la reacción enzimática de la 11β -HSD1 para evaluar la actividad inhibitoria de moléculas pequeñas. Sin embargo, la tecnología necesaria para el HTRF no es fácilmente asequible para todas las instituciones por su elevado valor, además, la fluorescencia puede verse afectada por algunos factores, tales como la presencia de otras moléculas, lo que hace importante el contar con una metodología alterna para su cuantificación.

En el presente proyecto, se buscó implementar un ensayo para medir las cantidades de cortisol producidas por la enzima 11β -HSD1, presente en microsomas de hígado humano, haciendo uso de un lector de platos con detección de absorbancia en el visible, un kit de cortisol EIA (Cayman, 2015) y material

básico de laboratorio. Al cumplir con este proyecto, se estaría proporcionando una herramienta más sencilla y al alcance de más sectores investigativos, para la evaluación de nuevas moléculas con actividad sobre la 11 β -HSD1.

2.2.2. Cortisol EIA Kit y otras metodologías

El ensayo que se espera implementar, corresponde al desarrollado por la empresa Cayman Chemical y que se encuentra comercialmente con el nombre de Cortisol EIA Kit. Este producto, permite la cuantificación de cortisol en algunas matrices como plasma, orina o heces; sin embargo, ni los proveedores ni artículos científicos confirman o descartan su uso en matrices como los microsomas. El principio del ensayo se basa en la competencia del cortisol libre de la muestra y el cortisol unido a la acetilcolinesterasa (trazador), por los anticuerpos específicos de cortisol; debido a que la concentración del trazador es siempre la misma y el cortisol libre varía según la muestra, la cantidad del trazador unido a los anticuerpos será inversamente proporcional a la cantidad de cortisol libre. Una vez se han formados los complejos anticuerpo-cortisol, se realiza un lavado con el fin de eliminar cualquier reactivo libre; posteriormente se agrega un reactivo conocido como el reactivo de Ellman`s, el cual también contiene el sustrato de la enzima acetilcolinesterasa, que al reaccionar produce una coloración amarilla y una absorbancia a 412nm. Este ensayo fue diseñado para realizarse en una placa de 96 o 480 pozos y medir la intensidad de la coloración con el uso de un lector de platos a través de espectrofotometría.

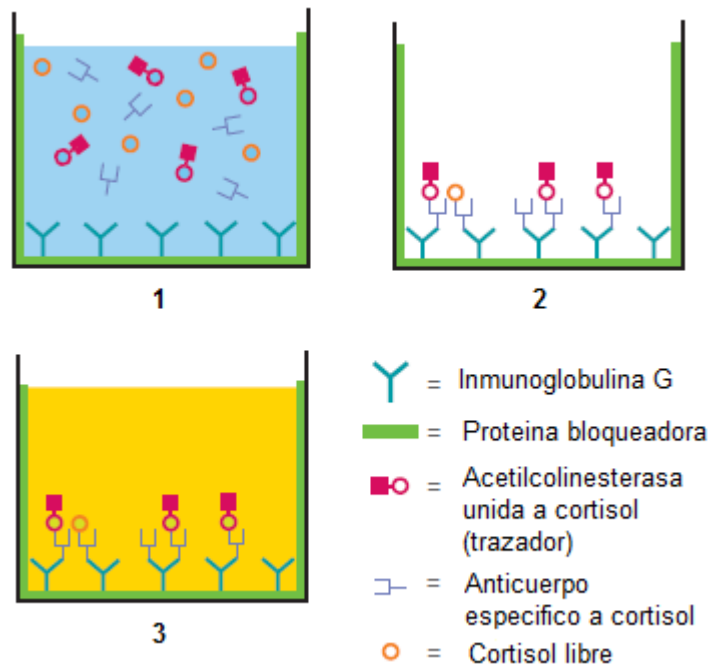


Figura 2. Esquema del ensayo Cortisol EIA Kit

1. Incubación con anticuerpos, trazador y muestra. **2.** Lavado para remover los reactivos no enlazados. **3.** Adición del reactivo de Ellman`s.

La reacción que se lleva a cabo al adicionar el reactivo de Ellman`s y el sustrato de la acetilcolinesterasa se puede observar en la figura 3. En ella se puede observar que el ensayo está relacionado con la actividad de la acetilcolinesterasa, ya que su función es hidrolizar la acetiltiocolina obteniendo como producto la tiocolina. Esta última molécula posee un grupo sulfhidrilo, el cual reacciona con el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) conocido como reactivo de Ellman`s; su reacción se da gracias a la presencia de un ambiente básico, lo cual permite que la tiocolina se encuentre en su estado ionizado y actúe como un agente nucleofílico, rompiendo el enlace disulfuro del reactivo de Ellman`s y dando como resultado final el ácido 5-tio-2- nitrobenzoico; reactivo responsable de la coloración amarilla y que presenta una fuerte absorbancia a 412nm (Cayman, 2015).

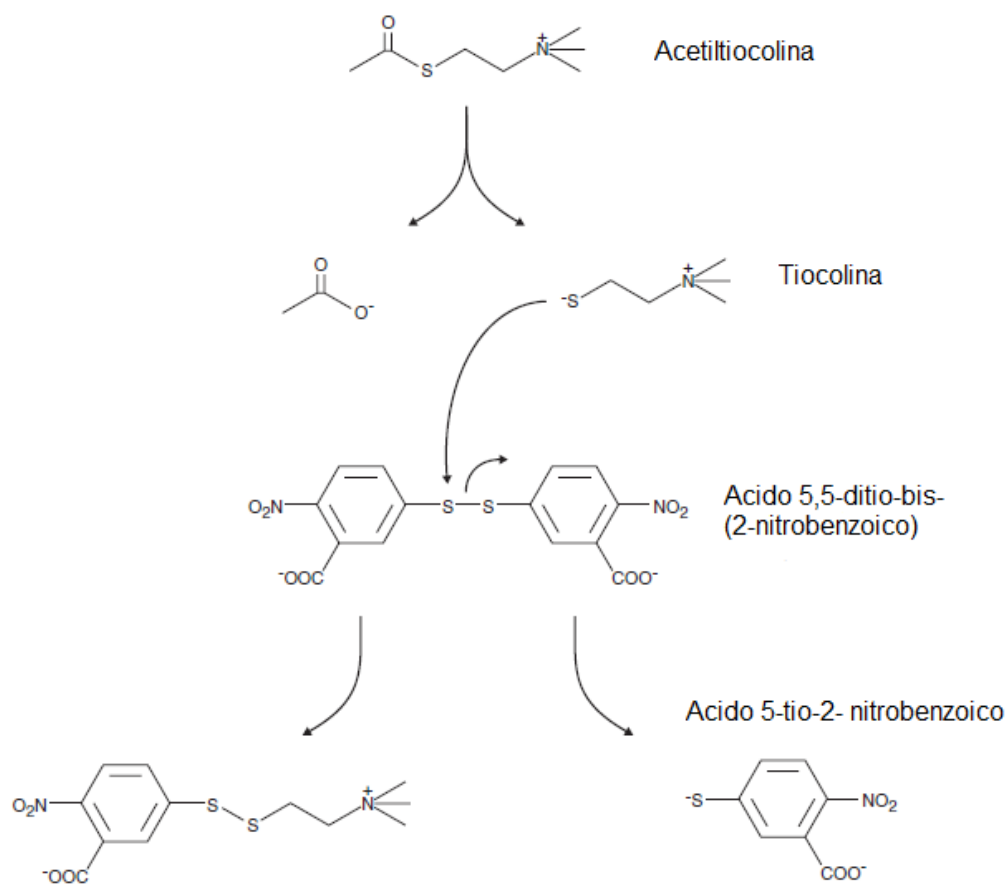


Figura 3. Reacción catalizada por la acetilcolinesterasa.

Otras metodologías son utilizadas para cuantificar cortisol y cortisona en muestras de saliva y orina, como parte de estudios para detectar cuadros clínicos, tales como síndrome Cushing's o enfermedad de Addison's, donde el paciente tiene mayor riesgo de presentar condiciones de hipertensión o hipotensión, alteración en la circulación de hormonas, entre otras. Estas metodologías utilizan la cromatografía líquida como principio y hace uso de equipos como el HPLC y UPLC, donde se reportan buenos límites de detección y su validación (Elio F. De Palo, 2009). Estos métodos serán utilizados en este proyecto tomando como referencias las condiciones cromatográficas de estos estudios y sus resultados.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Implementar el ensayo Cortisol EIA Kit en la universidad Icesi y comprobar si puede ser utilizado en la cuantificación de cortisol, producido por la enzima 11 β -HSD1 presente en microsomas de hígado humano.

2.3.2. Objetivos específicos

- Comprobar si la presencia de microsomas interfiere con el ensayo.
- Implementar el ensayo de cortisol EIA Kit en el laboratorio
- Evidenciar la capacidad del ensayo para cuantificar el cortisol producido por microsomas.

2.4. Metodología

La metodología que se presenta a continuación, representa la forma como se analizaron posibles inconvenientes, los cuales podrían presentarse al momento de implementar el ensayo Cortisol EIA Kit, en la cuantificación de cortisol producido por microsomas de hígado humano. Cada uno de estos procedimientos fue realizado en las instalaciones de la universidad Icesi.

2.4.1. Cuantificación de grupos sulfhidrilos en microsomas hepáticos de humano

Equipos y materiales

- Lector de platos Synergy H1
- Placa de 96 pozos fondo plano
- Microsomas de hígado humano 20mg/mL XenoTech
- L-Cisteína 97% Aldrich
- Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) 98% Sigma

En esta actividad, se tomó como base el procedimiento para la cuantificación de grupos sulfhidrilos usando un estándar de cisteína, el cual es explicado por la empresa Thermo Scientific como una de las aplicaciones de uno de sus productos

(ThermoFisherScientific, 2015). Este procedimiento fue adaptado para realizarse en un lector de platos, por lo cual el volumen final de los estándares fue ajustado a 200 μ L.

Preparación de estándares y muestra

A cada uno de los pozos marcados como estándar, blanco o muestra se le adicionó 178 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1M pH 8. Posteriormente se disolvieron 4mg del reactivo de Ellman`s en 1mL de buffer y de esta solución se agregó 4 μ L a todos los pozos utilizados. Luego se preparó una solución madre de cisteína (1,5mM) para preparar los estándares del 1 al 6, por lo cual se adicionó 3, 6, 9, 12, 15 y 18 μ L de la solución madre respectivamente. Finalmente se completaron los 200 μ L en cada pozo con buffer.

En los pozos marcados en la figura 4 como muestras, se adicionó 178 μ L de buffer, 4 μ L de solución de Ellman`s y 1 μ L de microsomas, equivalente a 20 μ g de proteína. El volumen de los pozos se completó nuevamente con buffer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				MTA1	MTA1	MTA1						
B	BLK	BLK	BLK									
C	STA1	STA1	STA1									
D	STA2	STA2	STA2									
E	STA3	STA3	STA3									
F	STA4	STA4	STA4									
G	STA5	STA5	STA5									
H	STA6	STA6	STA6									

Figura 4. Esquema plato de 96 pozos.

Lectura de la placa

Una vez estuvo preparada la placa, fue llevada al lector de platos en donde se realizó una incubación a 25 $^{\circ}$ C durante 10 minutos, posteriormente se agitó por 3 minutos de manera orbital y finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412nm. Se llevó a cabo el tratamiento de los datos y se obtuvo la gráfica de las curvas.

2.4.2. Verificación de la funcionalidad de la reacción enzimática para la producción de cortisol

Equipos y materiales

- HPLC
- UPLC Waters H-class/E11SDI422M

- Columna
- Microsomas de hígado humano 20mg/mL XenoTech
- NADPH (sodium salt) 95% Cayman Chemical
- Cortisona 98% Sigma
- Hidrocortisona Sigma

Identificación de tiempos de retención y límite de detección para cortisona y cortisol usando HPLC

Para confirmar que la reacción enzimática estaba funcionando correctamente y que por lo tanto se estaba produciendo cortisol por la 11 β -HSD1 en los microsomas, se realizó el análisis de una muestra con la reacción por cromatografía líquida. Previamente, fue necesario identificar el tiempo de retención del cortisol y de la cortisona con el mismo método instrumental y de manera simultánea conocer el límite de detección de la metodología; por lo cual se prepararon soluciones de cortisol en metanol a dos concentraciones: 0,14mM y 2,76uM. Igualmente se prepararon soluciones de cortisona en metanol a 0,14mM y 2,77uM. Una vez obtenidos los resultados se evidenció que la metodología no era lo suficientemente sensible para detectar las concentraciones de cortisol y cortisona en la reacción enzimática, por lo que se decidió cambiar al equipo UPLC.

Procedimiento HPLC

El equipo HPLC consta de un detector UV y se trabajó con la columna Kromasil 100-5-C18 (4,6 x 250mm), el gradiente utilizado fue una mezcla de solventes compuesta por Agua (A) y acetonitrilo (B) y se programó de la siguiente manera: 90-80% A de 0-4 minutos, 80-45% A de 4-9 minutos, 45-5% A de 9 a 15 minutos, 5% A de 15-20 minutos, 5-90% A de 20-21 minutos, 90% de 21-30 minutos. El volumen de inyección fue de 10 μ L, se utilizó un flujo de 1mL/min para la fase móvil, la absorbancia fue medida a 239nm y la temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Las soluciones fueron previamente filtradas con filtro de 0,44 μ m hidrofílico y depositadas en insertos para disminuir el volumen requerido en el vial.

Reacción enzimática

La reacción enzimática fue realizada en tubos eppendorf en un volumen total de 200 μ L. Los componentes de la reacción se adicionaron en el siguiente orden y concentración final: Agua tipo 1, buffer Tris pH 7 20mM, EDTA pH 6 5mM, NADPH 250uM, cortisona 200nM y 1 μ L de microsomas. Posterior a la mezcla de todos los componentes anteriores, se llevó el tubo eppendorf a un baño maría para incubarlo a 37°C por 3 horas. Una vez terminada la incubación se precipitaron los microsomas por centrifugación a 15.000rpm y se extrajo el sobrenadante. Se realizaron dos reacciones enzimáticas que diferían en el volumen de microsomas agregados, en una se agregaron 0,5 μ L y en otra 1 μ L, lo anterior con el propósito

de observar el efecto de una mayor cantidad de enzimas sobre la producción de cortisol

Adicionalmente se prepararon 2 muestras controles para obtener una mayor veracidad en los resultados. Se realizó un control negativo, en donde se agregaron los mismo componentes de la reacción a excepción de los microsomas y un control positivo, donde se reemplazó la cortisona por una concentración igual de cortisol, este último también sin microsomas. Cabe resaltar que los controles fueron sometidos a los mismos procesos de incubación y centrifugación.

Procedimiento UPLC

El equipo UPLC consta de un detector UV y se trabajó con la columna Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m (2,1 x 100mm), el gradiente utilizado fue una mezcla de solventes compuesta por Agua (A) y acetonitrilo (B) y se programó de la siguiente manera: 90-70% A de 0-3 minutos, 70-50% A de 3-5 minutos, 50-5% A de 5 a 9 minutos, 5-90% A de 9-9,1 minutos, 90% de 9,1-12 minutos. El volumen de inyección fue de 5 μ L, se utilizó un flujo de 0,3mL/min para la fase móvil, la absorbancia fue medida a 239nm y la temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Las soluciones fueron previamente filtradas con filtro de 0,22 μ m hidrofílico y depositadas en insertos para disminuir el volumen requerido en el vial.

2.5. Resultados y discusión

Como se explicó anteriormente, el Cortisol EIA Kit se basa en la cuantificación de los grupos sulfhidrilos de la tiocolina, los cuales serían una medida inversamente proporcional a la cantidad de cortisol en la muestra. Por lo anterior, se consideró necesario realizar un análisis de los microsomas, en busca de estos grupos, con el fin de evitar falsos positivos al momento de utilizar el kit. Para llevar a cabo dicho análisis, se realizaron dos curvas de calibración con el aminoácido L-cisteína, el cual cuenta con un grupo sulfhidrilo en su estructura; los resultados se evidencian en las figuras 5 y 6, en las cuales también se puede observar la ecuación de la recta y coeficiente de correlación de cada una.

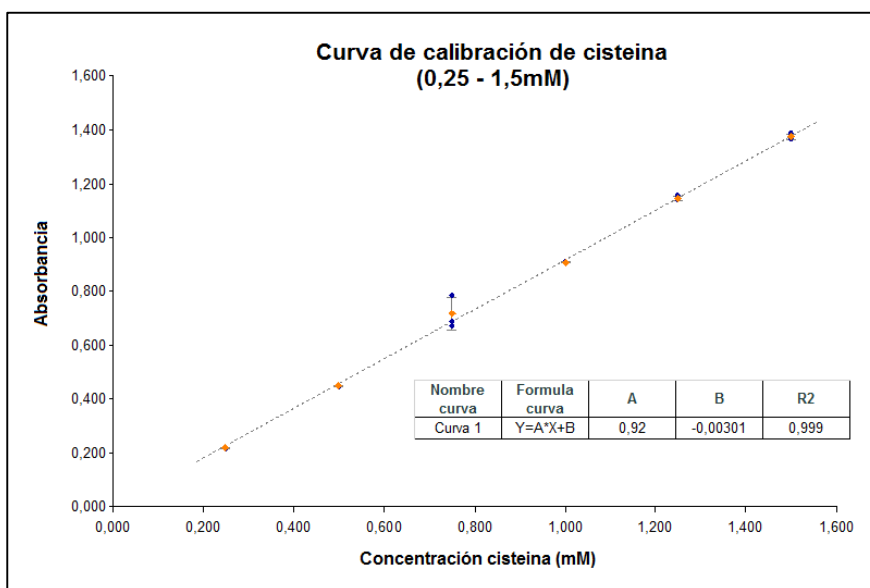


Figura 5. Curva de calibración de L-cisteína (0,25-1,25mM) en el lector de platos.

La imagen anterior, muestra que la curva de calibración estuvo bien realizada, debido a linealidad que presenta, a pesar de tener absorbancias mayores a 1, la baja desviación entre las repeticiones y su coeficiente de correlación cercano a la unidad. Lo anterior permitió que se analizaran las muestras de microsomas, llevando a cabo el procedimiento explicado en la metodología. La muestra se analizó por triplicado y la absorbancia promedio fue de $0,150 \pm 0,068$, lo cual corresponde a una concentración de 0,17mM. Realizando los cálculos estequiométricos pertinentes, se obtiene que la concentración obtenido corresponde a $0,37\mu\text{g}$ de cisteína, sin embargo como el reactivo de Ellman's no es específico, es posible afirmar que en los microsomas hay presencia de aproximadamente $0,37\mu\text{g}$ de grupos sulfhidrilos libres.

Los resultados obtenidos son de gran importancia, ya que esos grupos químicos seguramente interferirán con el ensayo, sin embargo, una vez conocida esta información se pueden evitar falsos positivos y realizar las correcciones que sean necesarias para obtener resultados más exactos.

Los siguientes resultados, giran en torno a la verificación de la producción de cortisol, por parte de la reacción enzimática de la enzima $11\beta\text{-HSD1}$ presente en los microsomas a través de cromatografía líquida. Inicialmente se identificaron los tiempos de retención del cortisol y la cortisona, en el procedimiento por HPLC ya descrito, obteniendo como resultados lo siguientes cromatogramas.

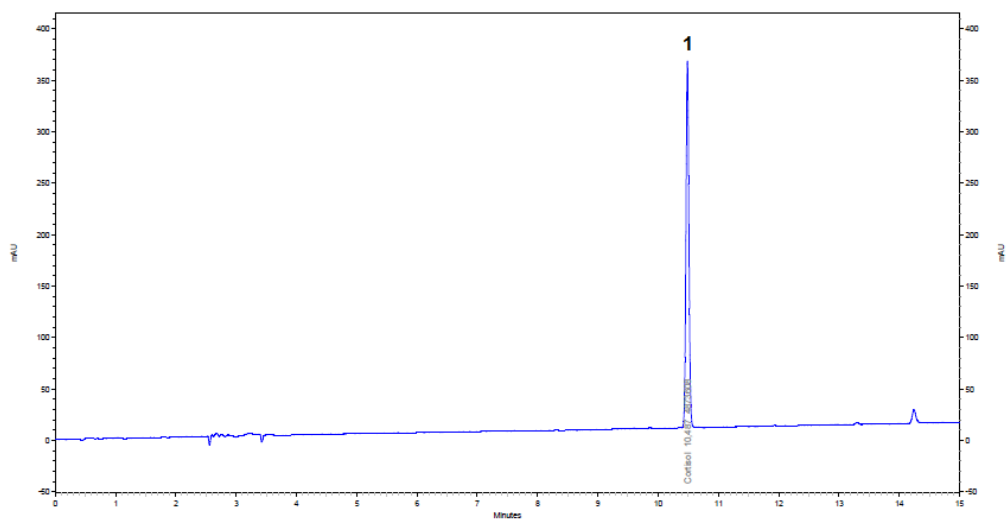


Figura 6. Cromatograma en HPLC. (1) Cortisol 0,14mM Tr: 10,4 min

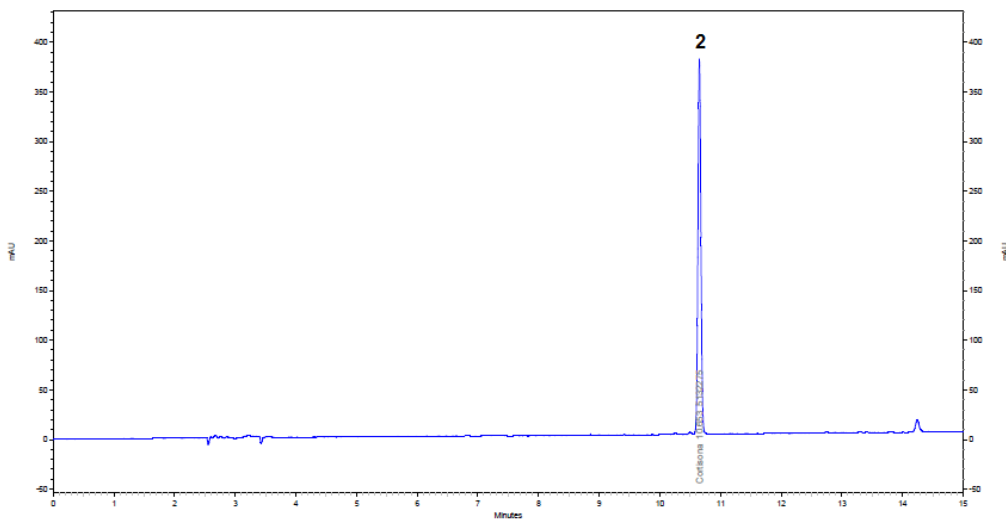


Figura 7. Cromatograma en HPLC. (1) Cortisona 0,14mM Tr: 10,6 min

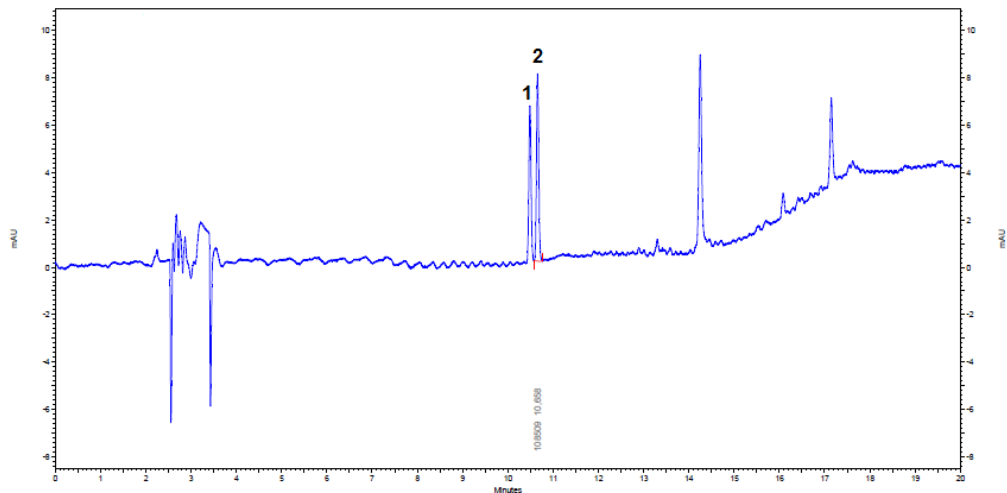


Figura 8. Cromatograma en HPLC. (1) Cortisol 2,76uM Tr: 10,4 min; (2) Cortisona 2,77uM Tr: 10,6

Como se puede evidenciar, los picos son fácilmente detectables y según la figura 8, también poseen una buena resolución, ya que para este cromatograma se preparó una mezcla de los dos glucocorticoides y ambos picos se logran separar uno del otro. Con los resultados anteriores, se dio vía libre al análisis de la reacción enzimática por HPLC. Como se explicó en la metodología, se prepararon dos reacciones en las que se varió la cantidad de microsomas, con el fin de observar si aumentaba la producción de cortisol. Además se prepararon un control de cortisol y uno de cortisona, con el propósito de tener una referencia de los resultados esperados, si se producía el cortisol en su totalidad o si por lo contrario el sustrato no era utilizado.

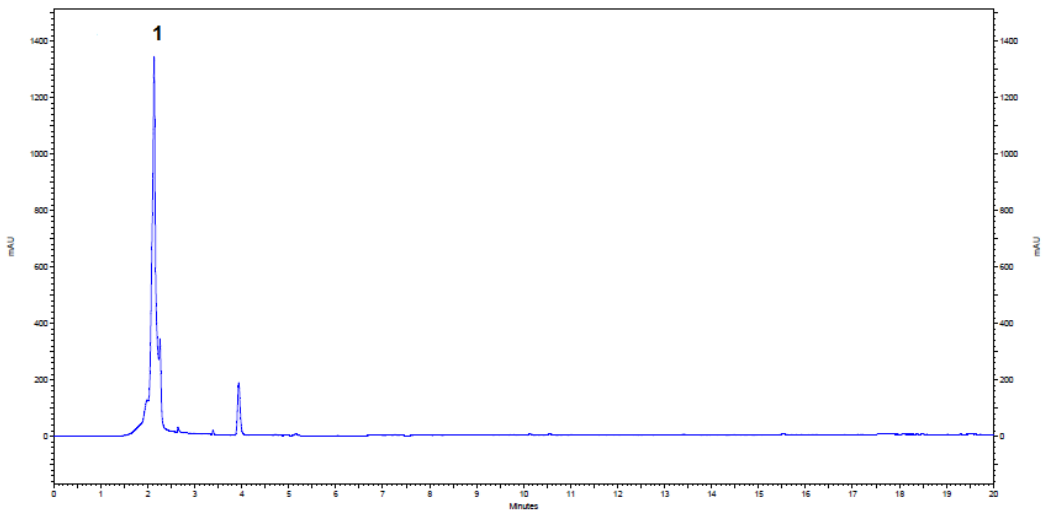


Figura 9. Cromatograma en HPLC. Reacción enzimática con 20µg de microsomas.

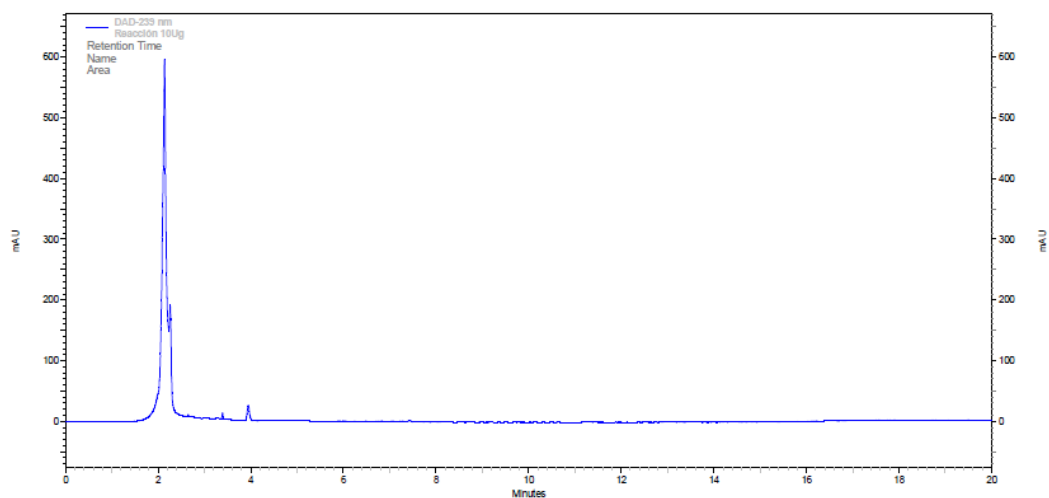


Figura 10. Cromatograma en HPLC. Reacción enzimática con 10 μ g de microsomas.

En las figuras 10 y 11 se observan los cromatogramas obtenidos de las reacciones enzimáticas con 20 μ g y 10 μ g de microsomas respectivamente, debido a que en ambos casos no se detectó el pico de cortisol, se pudo pensar que no se llevó a cabo la producción; sin embargo tampoco se observó el pico de cortisona, el cual debería aparecer en su totalidad ya que es el sustrato que no fue utilizado. Al analizar los resultados de los controles, figuras 12 y 13, se pudo afirmar que el problema consistía en la falta de detección del equipo, ya que nuevamente los picos de cortisol y de cortisona estuvieron ausentes, y que por lo tanto, la aproximación del límite de detección que se utilizó al inyectar un volumen de muestra menor fue errónea. Para confirmar lo anterior, se realizó un control final, el cual contenía una concentración más alta de cortisol y cortisona, con el objetivo de verificar si estos analitos seguían eluyendo en el mismo tiempo de retención, o si podía existir algún desplazamiento por los demás componentes del ensayo. La figura 14 muestra evidentemente los picos de cortisol y cortisona con los tiempos de retención que se habían identificado.

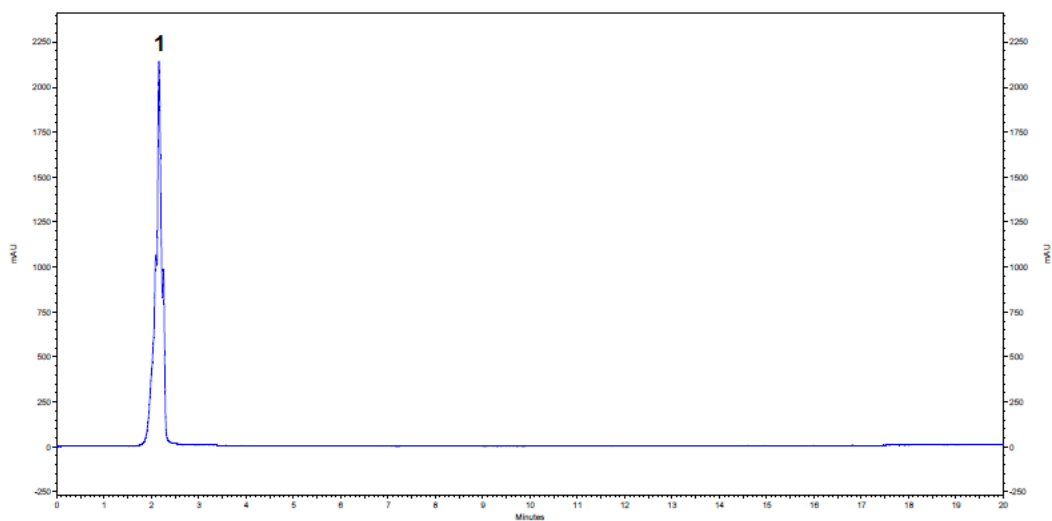


Figura 11. Cromatograma en HPLC. Control cortisol sin microsomas.

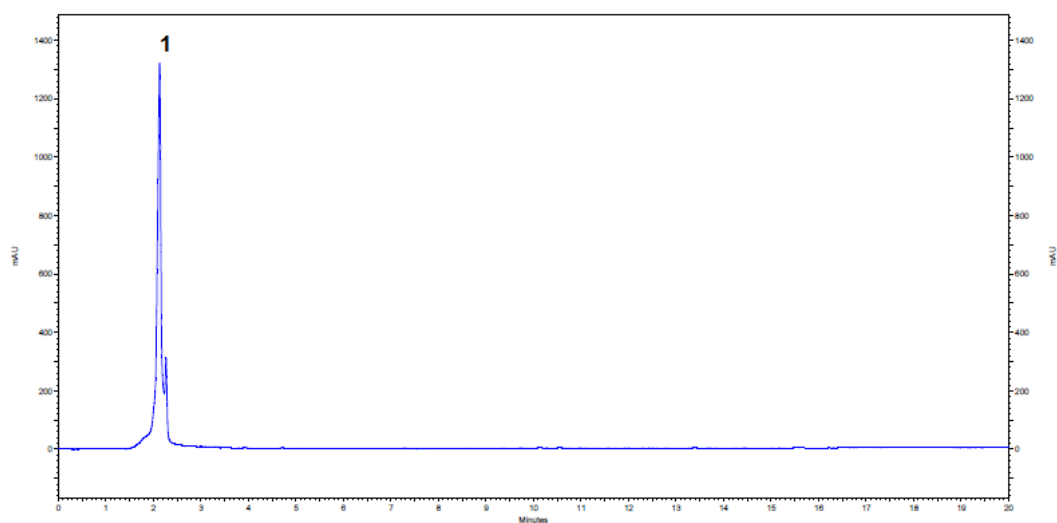


Figura 12. Cromatograma en HPLC. Control cortisona sin microsomas.

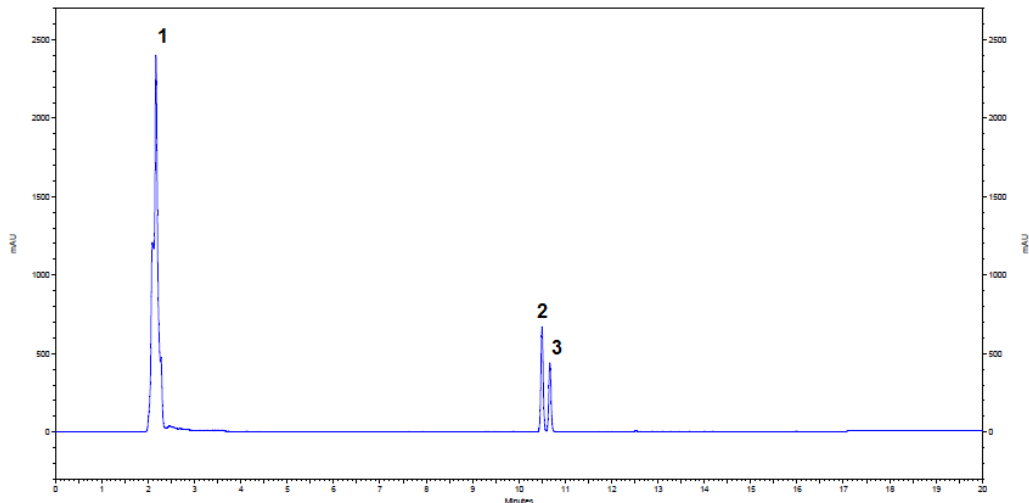


Figura 13. Cromatograma en HPLC. Mezcla control cortisona y cortisol sin microsomas. (1) Cortisol 0,15mM Tr: 10,4 min; (2) Cortisona 0,15mM Tr: 10,6.

Como se observó en estos últimos cromatogramas, la elucidación de un pico bastante intenso al inicio de las corridas fue constante, lo cual nos llevó a analizar los demás componentes de la reacción por separado. Los resultados se aprecian en las figuras 15 y 16, en donde se detectó el NADPH y el EDTA respectivamente. Con ellos se puede confirmar que el pico de las reacciones enzimáticas corresponde a las moléculas del NADPH y del EDTA, que poseen un tiempo de retención similar y por lo tanto sus picos se encuentran solapados.

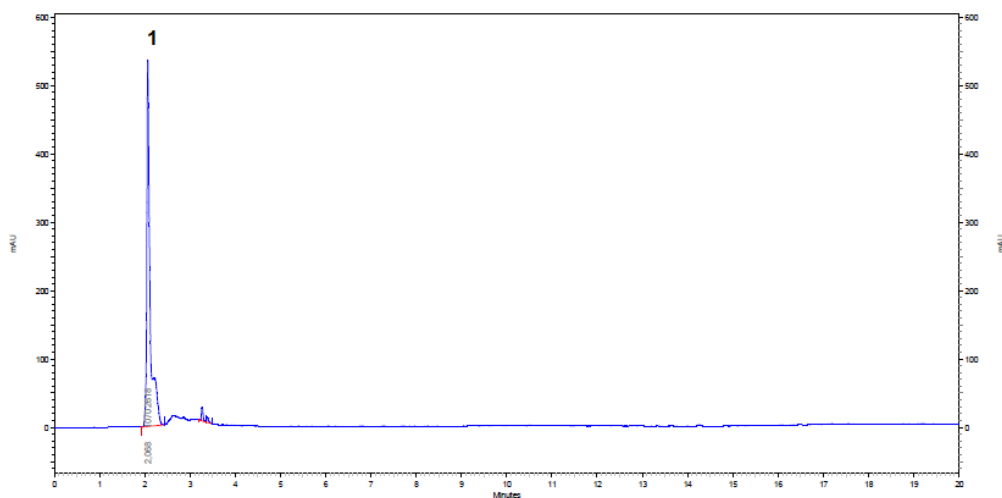


Figura 14. Cromatograma en HPLC. (1) NADPH Tr: 2,0

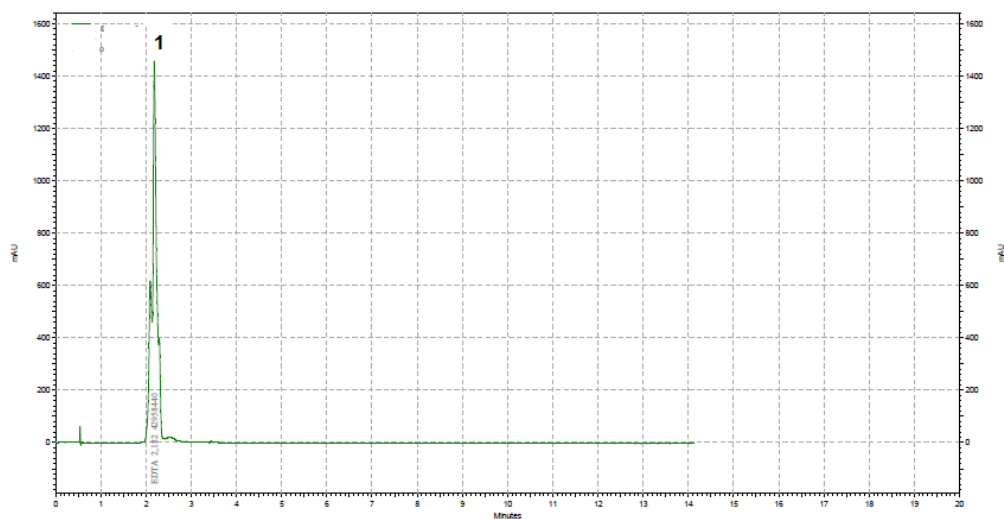


Figura 15. Cromatograma en HPLC. (1) EDTA Tr: 2,1

Debido a que el HPLC no cumplió con la sensibilidad que requería la metodología, se decidió continuar por la misma línea de la cromatografía líquida para verificar la producción de cortisol por parte de la enzima 11β -HSD1; razón por la cual, se hizo uso del UPLC con un detector PDA, el cual poseía una celda de flujo mucho más pequeña comparada con el detector del HPLC, lo que permite que el equipo analice volúmenes más bajos en cada lectura y por lo tanto pueda tener una mayor sensibilidad. Lo anterior, abrió el paso a que se realizara el análisis de 3 soluciones mezcladas de cortisol y cortisona, para identificar nuevamente sus tiempos de retención y el límite de detección. Estas nuevas soluciones se realizaron en buffer Tris, el cual era uno de los componentes del ensayo y a concentraciones mucho más bajas en un rango de 0,138uM a 2,77uM; los resultados fueron satisfactorios y se observan en la figura 17 a 19.

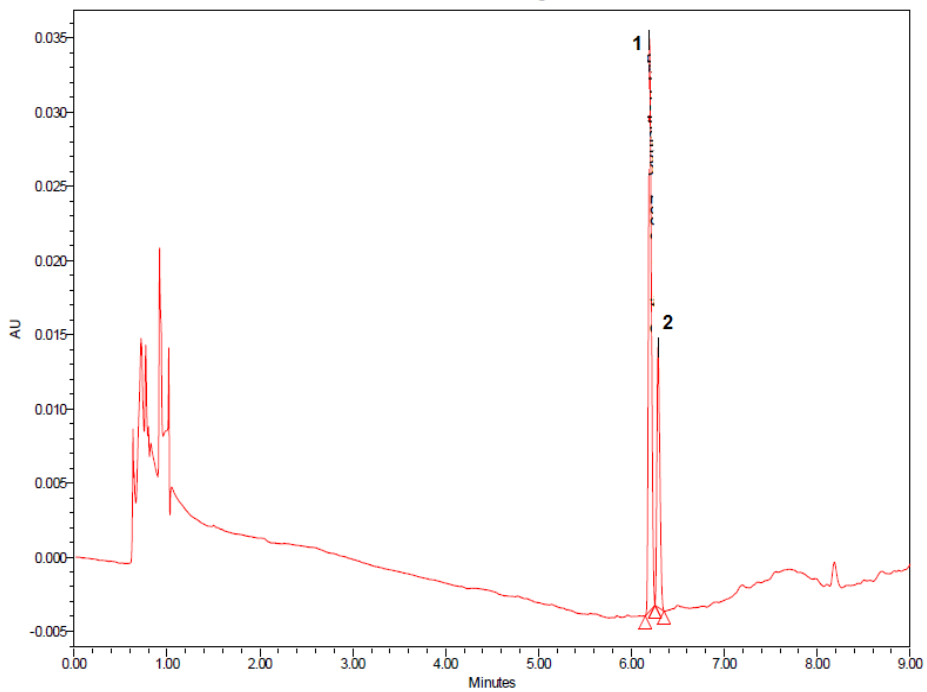


Figura 16. Cromatograma en UPLC. (1) Cortisol 2,77 μ M Tr: 6,2 min Área: 84560; (2) Cortisona 2,77 μ M Tr: 6,3 Área: 38757 Resolución: 1,4

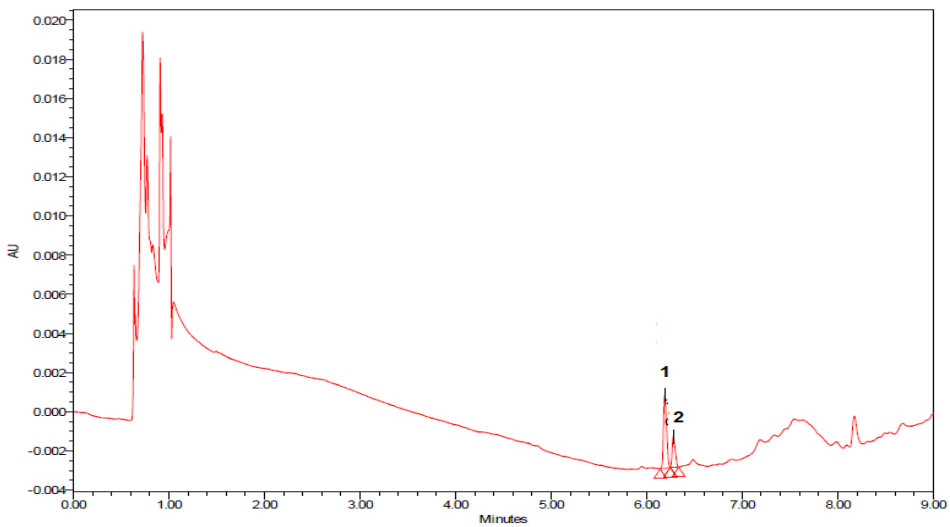


Figura 17. Cromatograma en UPLC. (1) Cortisol 276nM Tr: 6,2 min Área: 8352; (2) Cortisona 276nM Tr: 6,3 Área: 3459 Resolución: 1,4

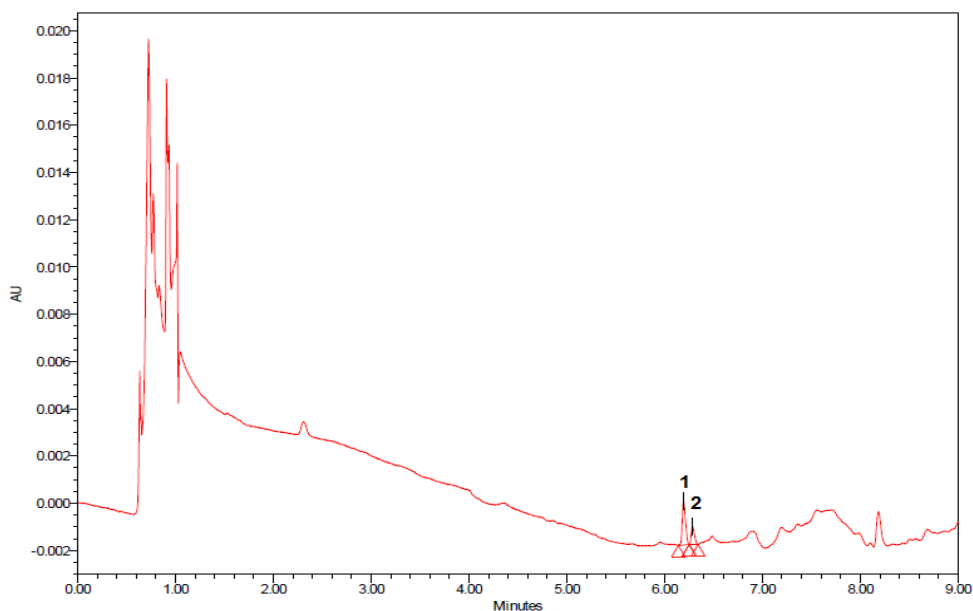


Figura 18. Cromatograma en UPLC. (1) Cortisol 138nM Tr: 6,2 min Área: 4226; (2) Cortisona 138nM Tr: 6,3 Área: 1715 Resolución: 1,4

Los cromatogramas anteriores, reflejaron una mejoría en la sensibilidad del método, ya que la figura 19 representa una solución a una concentración por debajo de la utilizada en el ensayo y se logra detectar efectivamente. El tiempo de retención de los analitos fue identificado y corresponden a 6,2 y 6,3 minutos para cortisol y cortisona respectivamente. Además la resolución de los picos fue mayor a la exigida por la farmacopea americana, lo cual significa que los picos se encuentran separados óptimamente. Estos resultados permitieron que se continuara con el análisis de la reacción enzimática y obtener resultados a cerca de la producción de cortisol.

Nuevamente se prepararon 2 reacciones con diferentes cantidades de microsomas y 2 controles. Sus cromatogramas se pueden observar en las figuras 20 a la 23 y arrojaron resultados muy prometedores.

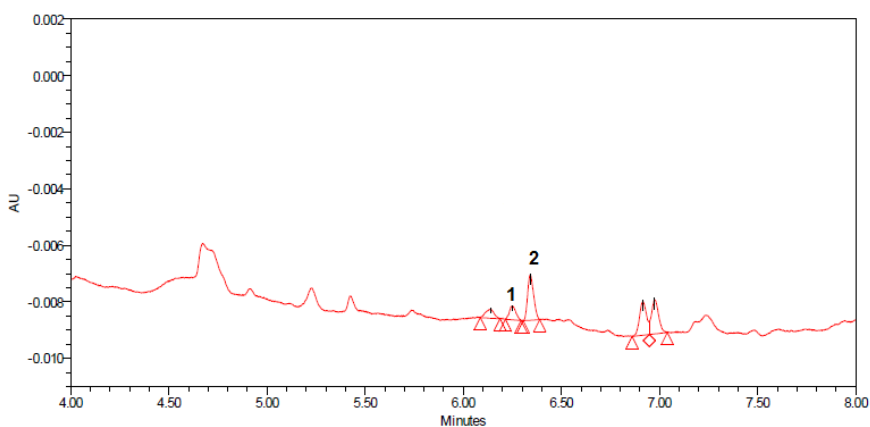


Figura 19. Cromatograma en UPLC. Reacción enzimática con 20µg de microsomas. (1) Cortisol Tr: 6,2 min Área: 1124; (2) Cortisona Tr: 6,3 Área: 3414

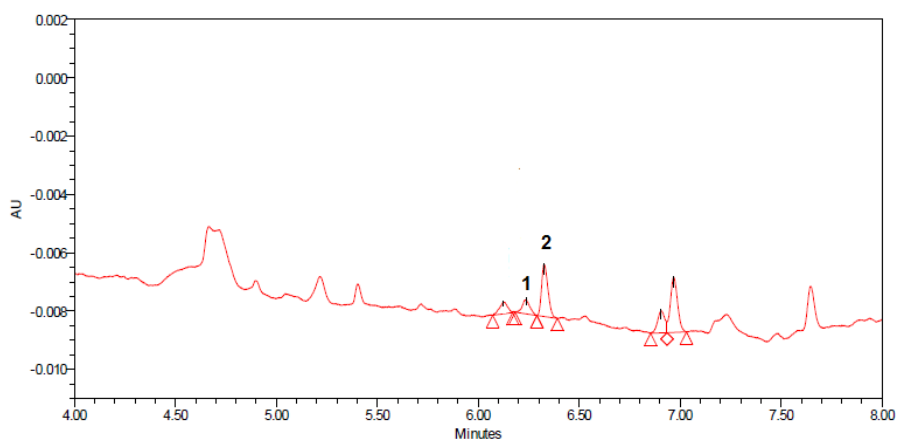


Figura 20. Cromatograma en UPLC. Reacción enzimática con 10µg de microsomas. (1) Cortisol Tr: 6,2 min Área: 1270; (2) Cortisona Tr: 6,3 Área: 3907

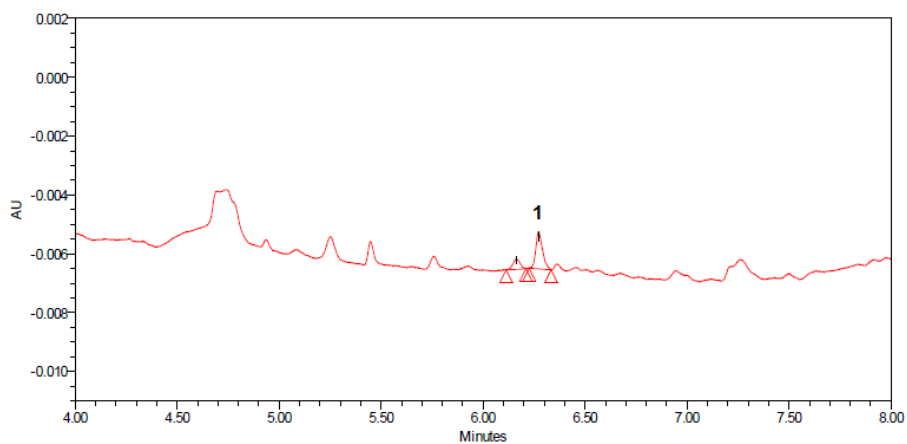


Figura 21. Cromatograma en UPLC. Control cortisol sin microsomas. (1) Cortisol Tr: 6,2 min Área: 2891

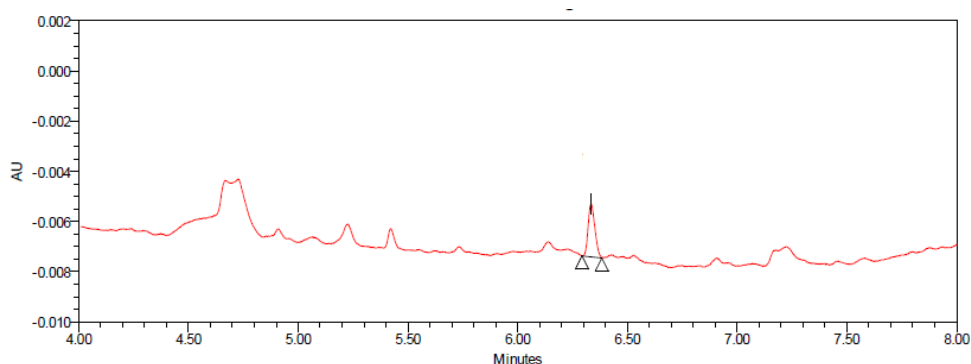


Figura 22. Cromatograma en UPLC. Control cortisona sin microsomas. (1) Cortisol Tr: 6,3 min Área: 4524

Las figuras 20 y 21 representan las reacciones realizadas con 20 μ g y 10 μ g de microsomas respectivamente, en ellas se puede observar el pico de cortisona con la mayor área y el tiempo de retención esperado de 6,3 minutos. También se detectó un pequeño pico, que por el tiempo de elucidación se identificó como cortisol, lo que demostraría que la reacción si está produciendo este metabolito en muy bajas cantidades. Otro aspecto a resaltar, es que no hubo diferencia significativa entre las reacciones por su cantidad de microsomas, e incluso el pico del cortisol en la reacción con 10 μ g tiene un área mayor, lo que daría a pensar que se produjo más cortisol. Lo anterior abre la posibilidad de que no se haya producido el compuesto y que los resultados encontrados pertenezcan a una carga inicial de cortisol en los microsomas. Por otro lado, se puede pensar que existe un factor limitante en la reacción con 20 μ g de microsomas, ya que el cofactor y el sustrato de la enzima continuaron en las mismas concentraciones, lo cual pudo limitar el aumento en la producción de cortisol al agregar más microsomas. Para confirmar las anteriores hipótesis, se recomienda realizar un control adicional, donde haya microsomas pero no se adicione cortisona ni NADPH, con el fin de observar si se detecta cortisol endógeno.

Es importante recordar que los microsomas son fragmentos del retículo endoplasmático y que por lo tanto poseen membranas que pueden formar vesículas y encerrar sustancias como el cortisol dentro de ellas; sin embargo, al detectar el cortisol con la metodología por UPLC, además de garantizar su producción se está descartando esta posibilidad, ya que de lo contrario si el cortisol no saliera de las vesículas, ambos se quedarían en el filtrado previo a la inyección de la muestra. Adicionalmente, se pueden observar fácilmente, en las figuras 20 y 21, otros dos picos antes del minuto 7, los cuales tiene un área considerable y no se encuentran presentes en los controles (figuras 22 y 23); esto podría significar que en la reacción se están produciendo otros compuestos que están siendo detectados, o que simplemente venían como carga inicial en los microsomas. Lo importante de estos resultados, es que se ha comprobado que es posible detectar el cortisol presente en los microsomas y que es posible que la

reacción de la enzima 11 β -HSD1 si se esté llevando a cabo, aunque se requiere de más análisis para su verificación.

2.6. Conclusiones

La presente investigación, ha permitido adquirir argumentos que aumentan la probabilidad de éxito en la implementación del Cortisol EIA Kit, para cuantificar cortisol producido por la enzima 11 β -HSD1 en microsomas de hígado humano. Dichas pruebas giran en torno a la baja cantidad de grupos sulfhidrilos que poseen los microsomas, por lo cual no se espera interferencia de estas moléculas con el kit. Un segundo argumento, consiste en la producción de cortisol por parte de la enzima, para la cual se obtuvieron resultados que apuntan favorablemente, y solo se requiere de un análisis adicional para confirmar la efectividad de la reacción. Por último, se confirmó que el cortisol presente en los microsomas, no se ve afectado por la naturaleza y tratamiento de la muestra y por lo tanto puede ser detectado por cromatografía líquida, lo cual son excelentes noticias para su cuantificación con el kit. De esta manera, se han dejado construidas las bases para finalizar la implementación del kit y así cumplir con todos los objetivos planteados en el proyecto, los cuales no se pudieron alcanzar en su totalidad por limitaciones de tiempo, mas no porque los resultados hayan sido negativos.

2.7. Recomendaciones

Al finalizar parcialmente este proyecto, conocer y analizar los diferentes resultados obtenidos, las siguientes recomendaciones tienen el objetivo de brindar más seguridad a la investigación antes del uso del kit. En primer lugar, se retoma la necesidad de analizar un control adicional de la reacción, en donde la presencia de todos los componentes de la reacción a excepción de la cortisona y el NADPH, como sustrato y cofactor respectivamente, permita evidenciar si el cortisol detectado pertenece a una carga inicial en los microsomas, o si es generado por la reacción de la enzima 11 β -HSD1 en estudio. La segunda recomendación, consiste en proporcionar las condiciones necesarias para que la producción de cortisol aumente y de esta manera sea más sencillo confirmar si la reacción está ocurriendo; para ello, una opción es la adición de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual puede regenerar el cofactor de nuestro interés, es decir el NADPH, y de esta manera evitar que este sea un factor limitante en la reacción de la enzima 11 β -HSD1, mejorando las condiciones de producción de cortisol. Una opción adicional para comprobar la producción de cortisol en los microsomas, es utilizar un inhibidor de la enzima 11 β -HSD1 y analizar si la cantidad de cortisol detectado se ve disminuida.

3. Bibliografía

- Antidiabetic Drug Laboratory, S. I., & University, V. K. (2011). *Ukrainica Bioorganica Acta*, 3-13.
- BMG LABTECH, G. I. (s.f.). *Cisbio Assays*. Recuperado el 10 de Marzo de 2015, de <http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/cortisol-assay>
- Cayman, C. (21 de Enero de 2015). *Cayman Chemical*. Recuperado el 12 de Marzo de 2015, de Cayman Chemical: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/500360>
- Chapman, K., Holmes, M., & Seckl, a. J. (2013). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiological Reviews*, 1139–1206.
- Chemical, C. (s.f.). *Cayman Chemical*. Recuperado el 12 de Marzo de 2015, de <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/500360>
- Elio F. De Palo, G. A. (2009). Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse. *Clinica Chimica Acta*, 60-65.
- FID, F. I. (2011). *International Diabetes Federation*. Recuperado el 9 de Mayo de 2015, de International Diabetes Federation: <http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/GDP-Spanish.pdf>
- Guyton, A. C., & Hal, J. E. (2006). *Libro de psicología médica*. ELSEVIER.
- Imamura, Y., Takada, H., Kamizono, R., & Otagiri, M. (2001). Hormonal regulation of male-specific 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase with carbonyl reductase-like activity present in kidney microsomes of rats. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 373–378.
- Kasuya, Y., Yokokawa, A., Takayama, S., Shibasaki, H., & Furuta, T. (2003). Evaluation of 11 β -HSD activities in vivo following oral administration of cortisol-13C₄,2H₁ to a human subject. *Steroids*, 167-176.
- Martin, E., & Hine, R. (2008). *Oxford Reference*. Recuperado el 9 de Mayo de 2015, de Oxford Reference: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199204625.001.0001/acref-9780199204625-e-2766?rskey=zAARJ7&result=3160>

- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science*, 2166-2170.
- P. Niu, K. Y. (2002). The 11L-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human placental microsomes is inactivated by zinc and the sulfhydryl modifying reagent N-ethylmaleimide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 364-371.
- Park, S. B., Jung, W. H., Kang, N. S., Park, J. S., Bae, G. H., Kim, H. Y., . . . Kim, K. Y. (2013). Anti-diabetic and anti-inflammatory effect of a novel selective 11 β -HSD1 inhibitor in the diet-induced obese mice. *European Journal of Pharmacology*, 70-79.
- S.M. Abel, D. B. (1993). Cortisol metabolism by human liver in vitro—IV. Metabolism of 9 α -fluorocortisol by human liver microsomes and cytosol. *ELSEVIER*, 833–839.
- Salud, M. d. (27 de Noviembre de 2015). *Ministerio de Salud*. Obtenido de Ministerio de Salud: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/32Atencion%20de%20la%20Diabetes%20tipo%202.PDF>
- Soo Young Byuna, Y. J. (2015). A novel highly potent and selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, UI-1499. *Life Sciences*, 1-7.
- Sun, L., Stenken, J. A., Yang, A. Y., Zhao, J. J., & Musson, D. G. (2007). An in vitro microdialysis methodology to study 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme activity in liver microsomes. *370*(26-30).
- ThermoFisherScientific. (15 de Agosto de 2015). *ThermoFisher*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22582>
- WALKER, R. C. (1999). Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical Science*, 513-523.
- XenoTech. (s.f.). *XenoTech*. Recuperado el 9 de Mayo de 2015, de XenoTech: <http://www.xenotechllc.com/products/subcellular-fractions/human/liver/microsomes>