



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## Porfiria experimental por hexaclorobenceno : estudios sobre porfirinógeno carboxilasa y ferroquelatasa

Ríos de Molina, María del Carmen  
1982

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# PORFIRIA EXPERIMENTAL POR HEXACLOROBENCENO

Estudios sobre Porfirinógeno carboxiliasa y Ferroquelatasa

MARIA DEL CARMEN RIOS DE MOLINA

Director: Dra. Leonor C. San Martín de Viale

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS.

1982

1698

Ej=2

Universidad de Buenos Aires.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

PORFIRIA EXPERIMENTAL POR HEXACLOROBENCENO.  
Estudios sobre Porfirinógeno carboxi-liasa y Ferroquelatasa.

AUTOR: Lic. María del Carmen Ríos de Molina.  
DIRECTOR: Dra. Leonor C. San Martín de Viale.  
LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Química Biológica.  
Departamento de Química Biológica.

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

A mis padres.

A mi esposo e hijos.

## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leonor C. San Martín de Viale quien me brindó, mediante los medios y consejos necesarios, la posibilidad de realizar el presente trabajo de Tesis y colaboró en forma fundamental en el desarrollo del mismo.

Al Dr. Moisés Grinstein y a la Dra. M. J. Tomio, quienes junto con la Dra. Viale me iniciaron en el campo de la investigación en Química Biológica y me brindaron su permanente consejo y estímulo.

A mis compañeros y ex-compañeros de laboratorio por su franca colaboración, en especial a las Lics. Rosa W. de Calmanovici, Cristina Taira y Silvia Billi cuya ayuda en cierta parte de este trabajo fué de fundamental importancia.

Al Sr. Francisco Ortega, Srta. Hilda Gasparoli y Sra. Carmen Aldonatti de Olivar, por la gran ayuda brindada en todo momento.

A la Sra. Liliana I. Vázquez de Espoille por el trabajo dactilográfico.

Aprovecho la oportunidad para hacer extensivos los agradecimientos a las siguientes personas, que brindándome su ayuda a nivel personal y su permanente estímulo, me permitieron concretar este trabajo:

En primer lugar a mi esposo e hijos, por todo.

En segundo lugar a la Dra. Alcira Aragonés, a la Dra. Miquela Lapacó de Trípoli, a los parientes más allegados y al personal de la Guardería Núñez de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dependiente de la Obra Social de la Universidad de Buenos Aires.

A todos GRACIAS.

## ABREVIATURAS Y EQUIVALENCIAS.

Suc-Co A	: succinil coenzima A.
ALA	: Acido $\delta$ aminolevúlico.
PBG	: Porfobilinógeno.
Uro	: Uroporfirina = porfirina de 8-COOH = porfirina octacarboxílica.
Firia	: Firiaporfirina = porfirina de 7-COOH = porfirina heptacarboxílica.
Hexa	: Hexaporfirina = porfirina de 6-COOH = porfirina hexacarboxílica.
Penta	: Pentaporfirina = porfirina de 5-COOH = porfirina pentacarboxílica.
Copro	: Coproporfirina = porfirina de 4-COOH = porfirina tetracarboxílica.
Proto	: Protoporfirina = porfirina de 2-COOH = porfirina dicarboxílica.
Uro'gen, Firia'gen, Hexa'gen, Penta'gen, Copro'gen y Proto'gen:	los correspondientes porfirinógenos.
cit	: citocromo.
EDTA	: etilendiaminotetraacetato.
GSH	: glutation reducido.
DEAE-celulosa	: dietilaminoetil - celulosa.
PPy	: fosfato de piridoxal.
HCB	: hexaclorobenceno.
PCF	: pentaclorofenol.
Suc Co A-S	: succinil CoA sintetasa.
ALA-S	: $\delta$ ALA sintetasa.
ALA-D	: $\delta$ ALA dehidrasa.
PBG-asa	: complejo PBG deaminasa Uro'gen III cosintetasa: Porfobilinogenasa.
PCL	: porfirinógeno carboxi-liasa.
CPO	: Copro'gen oxidasa.
PPO	: Proto'gen oxidasa.
MD	: malato dehidrogenasa.
CcO	: citocromo c-oxidasa.
MAO	: monoaminoxidasa.
PAI	: porfiria aguda intermitente.
PCT	: porfiria cutánea tarda.
PV	: porfiria variegata.
CH	: coproporfiria hepática.
PAH	: porfiria aguda hepática.

BAL	: British anti lewicite.
DTC	: dietilditiocarbamato.
DTNB	: 55' ditiobis- (ácido 2 nitrobenzoico).
FB	: fenobarbital.
Hb	: hemoglobina.
PCMB	: para-cloro mercuribenzoato.
P.M.	: peso molecular.
PPNa	: pirofosfato de sodio.
SDS	: dodecil sulfato de sodio.
TCDD	: tetracloro dibenzo-p-dioxina.
PCB	: pentaclorobenceno.
TCB	: tetraclorobenceno.
PCTF:	: pentaclorotiofenol,
TCTF	: tetraclorotiofenol,
TCTA	: tetraclorotioanisol,
PCTA	: pentaclorotioanisol,
PCTA-0	: 1 CH <sub>3</sub> -(2,3,4,5,6 pentaclorofenil) sulfóxido.
PCTA-0 <sub>2</sub>	: 1 CH <sub>3</sub> -(2,3,4,5,6 pentaclorofenil) sulfona.
TCdi-TA	: tetracloroditioanisol.

## INDICE.

<u>INTRODUCCION</u> .....	1.
PORFIRINAS.....	1.
- Generalidades.....	1.
- Estructura.....	2.
- Propiedades.....	8.
PORFIRINOGENOS.....	9.
BIOSINTESIS DE PORFIRINAS.....	12.
- Esquema general.....	12.
- Succinil CoA Sintetasa.....	15.
- Formación de $\delta$ ALA.....	17.
- Conversión de $\delta$ ALA en PBG.....	21.
- Modo de acción del sistema PBG-asa.....	24.
- Porfirinógeno carboxilasa.....	27.
a) Generalidades.....	27.
b) Características de la reacción enzimática.....	28.
c) Pasos de la descarboxilación del Uro'gen.....	34.
- Descarboxilación oxidativa del Copro'gen.....	40.
- Actividad Proto'gen oxidasa.....	41.
- Ferroquelatasa.....	43.
a) Generalidades.....	43.
b) Características de la reacción enzimática.....	43.
c) Métodos de determinación.....	45.
d) Localización subcelular.....	48.
e) Purificación y propiedades.....	48.

f) Especificidad de la enzima hacia sus sustratos.....	55.
g) Efectos y cofactores.....	60.
h) Mecanismo de reacción.....	65.
- Localización de las enzimas involucradas.....	69.
- Interrelación con otros caminos metabólicos.....	71.
- Los porfirinógenos como verdaderos intermediarios.....	73.
 PORFIRIAS.....	 73.
- Generalidades.....	73.
- Clasificación.....	74.
- Porfiria por HCB.....	75.
a) Antecedentes.....	75.
b) Principales características.....	78.
c) Alteración a nivel enzimático y en la concentración de hemoproteí- nas microsomales.....	79.
d) Desarrollo en función del tiempo de intoxicación.....	82.
e) Comparación con PCT humana.....	84.
f) Existencia y caracterización de porfirinas tetracarboxiladas en heces.....	84.
 HEXACLOROBENCENO.....	 88.
- Generalidades.....	88.
- Formación de metabolitos.....	89.
 <u>OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO</u> .....	 93.
 <u>MATERIALES</u> .....	 94.
 SISTRATOS Y TESTIGOS.....	94.
 DROGAS Y MATERIALES AUXILIARES.....	94.

- Adsorbentes.....	94.
- Solventes.....	95.
- Otras drogas.....	96.
- Material auxiliar.....	96.
ANIMALES.....	97.
<u>METODOS</u> .....	97.
PORFIRINAS.....	97.
- Separación cromatográfica de Uro III a partir de turacina.....	97.
- Inducción de porfiria en ratas.....	98.
- Esterificación de porfirinas.....	98.
- Pasaje a cloroformo.....	99.
- Purificación de porfirinas por cromatografía en columna.....	99.
a) Sobre $\text{CO}_3\text{Ca}$ .....	99.
b) Sobre $\text{OMg}$ .....	100.
- Aislamiento de porfirinas de distintos órganos.....	101.
a) Hígado, bazo y riñón.....	101.
b) Glándula de Harder.....	101.
c) Hemolizado de sangre.....	102.
- Identificación de porfirinas por cromatografía en papel.....	102.
- Determinación cuantitativa de porfirinas.....	103.
a) Determinación de la concentración de porfirinas libres.....	103.
b) Determinación de porfirinas con distinto número de $-\text{COOH}$ .....	104.
c) Determinación de cantidades pequeñas de porfirinas.....	105.
- Método fluorimétrico.....	105.
a) Patrones.....	105.
b) Medición de unidades de fluorescencia.....	106.
PORFIRINOGENO CARBOXI-LIASA.....	109.
- Preparación de amalgama de sodio.....	109.
- Preparación de porfirinógenos.....	109.
- Preparación de extractos enzimáticos.....	110.
a) Sangre.....	110.
b) Hígado, riñón y bazo.....	112.
c) Glándula de Harder.....	113.
- Incubaciones.....	113.

a) Materiales y aparatos.....	113.
b) Sistema de incubación.....	113.
- Aislamiento e identificación de las porfirinas libres de los medios de incubación.....	113.
a) Para incubaciones con sangre como fuente enzimática.....	114.
b) Para incubaciones con distintos órganos de rata.....	114.
- Determinación de la actividad.....	115.
- Resultados.....	115.
a) Expresión de los resultados.....	115.
b) Correcciones.....	115.
c) Tratamiento estadístico de los resultados.....	116.
- Purificación.....	116.
- Fotooxidación.....	118.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	118.
FERROQUELATASA.....	119.
- Preparación y purificación de Proto.....	119.
- Preparación de la solución patrón de Proto para el sistema de incubación.....	119.
- Curva de calibración para las determinaciones de hemo.....	120.
- Extractos enzimáticos.....	121.
- Determinación del producto formado.....	123.
- Métodos de solubilización de mitocondrias.....	124.
a) Congelamiento y descongelamiento.....	124.
b) Sonicación.....	124.
c) Tratamiento con detergente.....	124.
- Expresión de los resultados.....	125.
- Localización submitocondrial de ferroquelatasa.....	125.
- Preparación de las fracciones de membrana.....	125.
- Malato deshidrogenasa.....	127.
- Citocromo c-oxidasa.....	128.
- Monoamino-oxidasa.....	129.
- Actividad ferroquelatasa.....	129.
DETERMINACION DE PROTEINAS.....	130.

RESULTADOS.....	131.
CONTENIDOS DE PORFIRINAS EN DISTINTOS TEJIDOS DE RATAS NORMALES E INTOXICADAS CON HCB.....	131.
CONTENIDOS DE PORFIRINAS EN SOBRENADANTE DE 11.000 g.....	134.
EFECTO DEL TRAMIZAJE MOLECULAR SOBRE LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD PCL.....	142.
ACTIVIDAD PCL EN DISTINTOS TEJIDOS DE RATAS NORMALES Y PORFIRICAS POR HCB.....	142.
ACTIVIDAD PCL HEPATICA FRENTE A LOS PORFIRINOGENOS DE LA SERIE ISOMERICA I Y III COMPARATIVAMENTE.....	147.
EFECTO DEL HCB SOBRE LA DESCARBOXILACION DE LOS DISTINTOS PORFIRINOGENOS DE LA SERIE III, AÑADIDOS A SATURACION EN EL MEDIO.....	151.
EFECTO DEL HCB SOBRE EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO.....	156.
INVESTIGACIONES SOBRE LA EXISTENCIA DE UN POSIBLE INHIBIDOR DE LA PCL EN HIGADO DE RATAS PORFIRICAS POR HCB.....	161.
- Ensayos cruzados y de calentamiento.....	161.
- Efecto "in vitro" del HCB y varios compuestos relacionados.....	167.
- El PCF como probable inhibidor.....	172.
LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA PCL.....	172.
PURIFICACION HASTA GEL DE FOSFATO.....	176.
- Fraccionamiento salino.....	176.
- Adsorción sobre gel de fosfato en batch.....	176.
CONDICIONES DE INCUBACION.....	181.
- Condiciones generales.....	181.
- Efecto del GSH.....	183.
- Efecto del pH.....	183.
- Efecto de la temperatura de incubación.....	183.
PROPIEDADES.....	185.
- Efecto de sales, agentes quelantes y de otro protector de grupos sulfhidrilos.....	185.
- Detección de grupos fotooxidables en el centro activo.....	187.
- Estabilidad térmica.....	190.
- Estabilidad al almacenamiento.....	192.
PASOS FINALES DE LA PURIFICACION.....	194.

- Columnas de DEAE-celulosa.....	194.
- Columnas de Sephadex G-200.....	197.
- Columnas de Sephadex G-100.....	198.
- Cuadro final.....	202.
FERROQUELATASA.....	204.
PUESTA A PUNTO DEL METODO DE DETERMINACION.....	204.
SOLUBILIZACION DE MITOCONDRIAS. Estabilidad al almacenamiento.....	208.
CONDICIONES DE ENSAYO.....	210.
- Condiciones generales.....	210.
- Actividad en función del tiempo de incubación.....	212.
- pH óptimo.....	215.
EFFECTO "IN VIVO" DEL HCB SOBRE LA ACTIVIDAD FERROQUELATASA.....	215.
MESO COMO SUSTRATO DE LA FERROQUELATASA.....	217.
ESTABILIDAD TERMICA.....	218.
DETERMINACION DE $K_m$ .....	220.
EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL PRODUCTO SOBRE LA ACTIVIDAD....	221.
INVESTIGACIONES ACERCA DEL MECANISMO DE ACCION DEL HCB.....	221.
- Efecto del HCB, PCF y porfirinas.....	221.
- Efecto del tamizaje molecular.....	225.
- Ensayos cruzados y de calentamiento.....	227.
- Cofactores.....	230.
PCL EN ERITROCITOS HUMANOS.....	238.
<u>DISCUSION</u> .....	241.
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u> .....	289.

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Fig. 1: Porfina : Fórmula desarrollada y fórmula abreviada de Fischer.....	3.
Fig. 2: Nomenclatura de los núcleos porfirina según IUPAC.....	3.
Tabla I: Posición y naturaleza de las cadenas laterales de distintas porfi.	5.
Fig. 3: Estructura y química de los cuatro isómeros de la etioporfirina....	6.
Fig. 4: Protoporfirina..-.....	7.
Fig. 5: Porfirinas recientemente descubiertas.....	10.
Fig. 6: Estructura general de los porfirinógenos.....	10.
Fig. 7: Camino metabólico del hemo.....	13.
Fig. 8: Ciclo del succinato - glicocola.....	14.
Fig. 9: Porfobilinógeno.....	12.
Fig. 10: Mecanismo de formación de δ ALA desde glicina y succinil-CoA.....	19.
Fig. 11: Mecanismo de ALA-D.....	23.
Fig. 12: Dipirrimetanos isómeros.....	26.
Fig. 13: Mecanismos de formación del Uro'gen III.....	26.
Fig. 14: Los últimos pasos de la decarboxilación de Uro'gen a Copro' gen III.....	39.
Fig. 15: Localización subcelular de las enzimas del camino metabólico del hemo.....	70.
Fig. 16: Interrelación del camino biosintético del hemo con otras vías metabólicas.....	72.
Tabla II: Clasificación de algunos tipos de porfirias.Características.....	75.
Fig. 17: Biosíntesis del hemo y sitios de parciales bloqueos enzimáticos en porfiria.....	77.
Fig. 18: Estructura de porfirinas tetracarboxiladas extraídas de heces de pacientes con PCT y ratas con porfiria por HCB.....	86.
Fig. 19: Origen postulado de las porfirinas fecales tetracarboxílicas.....	87.
Fig. 20: Destino metabólico del HCB en ratas.....	90.
Fig. 21: Expectro de excitación y expectro de emisión de porfirinas en ClH 5%.....	107.
Fig. 22: Expectros de excitación de Uroporfirina a distintas concentra- ciones en ClH 5%.....	108.
Fig. 23: Curvas de calibración para fluorimetría.....	111.

Fig. 24: Localización del punto de bifurcación de la arteria aorta a los fines de extracción de la sangre.....	111.
Fig. 25: Espectro diferencial del piridín-hemocromógeno.....	122.
Fig. 26: Curva de calibración para el método del piridín-hemocromógeno usando solución patrón de hemina.....	122.
Tabla III: Efecto del HCB sobre la acumulación total de porfirinas en tejidos de ratas.....	132.
Tabla IV: Contenido de porfirinas en sobrenadante de hemolizado y de homogenato de distintos tejidos de rata.....	135.
Tabla V: Separación de porfirinas endógenas de hígado y riñón de ratas intoxicadas con HCB, por pasaje a través de columnas de Sephadex G-25.....	138.
Tabla VI: Efecto del pasaje a través de Sephadex G-25 sobre la PCL.....	141.
Fig. 27: Espectros de excitación correspondientes a distintos tejidos de ratas normales y porfíricas.....	132'.
Tabla VII: Actividad PCL en distintos tejidos de ratas normales e intoxicadas con HCB.....	144.
Tabla VIII: Efecto de la intoxicación con HCB sobre la decarboxilación de los isómero I y III del Uro'gen.....	149.
Fig. 28: Efecto de distintas concentraciones, en el medio de incubación de los sustratos involucrados en el pasaje de Uro'gen a Copro'gen, sobre la PCL hepática de ratas.....	152.
Tabla IX: Efecto "in vivo" del HCB sobre la actividad PCL a nivel de los distintos pasos de la decarboxilación total del Uro'gen III.....	153.
Fig. 29: Efecto del HCB en función del tiempo de intoxicación sobre las actividades hepáticas: PCL y Ferroquelatasa.....	157.
Fig. 30: Actividad PCL de sobrenadante de homogenato de hígado de ratas normales y porfíricas por HCB.....	160.
Tabla X: Efecto de preparaciones de hígado porfírico desproteinizadas por calentamiento sobre la actividad PCL de hígado de ratas normales..	163.
Tabla XI: Efecto del agregado de una preparación enzimática proveniente del hígado de ratas porfíricas sobre la actividad PCL hepática de ratas normales.....	166.
Tabla XII: Efecto "in vitro" del HCB y varios compuestos relacionados sobre la actividad PCL de hígado de ratas normales.....	168 y 168'.

Fig. 31: Relación estructura-efecto inhibitorio de varios compuestos aromáticos sobre la actividad PCL de ratas normales.....	170.
Fig. 32: Efecto de diferentes concentraciones de PCF sobre la actividad PCL de hígado de ratas normales.....	173.
Tabla XIII: Localización subcelular de la PCL hepática de ratas.....	175.
Tabla XIV: Fraccionamiento salino y adsorción sobre gel de fosfato de Ca.	177.
Fig. 33: Actividad PCL de hígados de ratas normales e intoxicadas con HCB.	180.
Tabla XV: Influencia de los distintos componentes de la mezcla de incubación en la determinación de la actividad PCL.....	182.
Fig. 34: Efecto del GSH.....	184.
Fig. 35: Curva de pH.....	184.
Fig. 36: Temperatura de incubación.....	184.
Tabla XVI: Respuesta de la PCL hepática ante distintos agregados al sistema de incubación.....	186.
Fig. 37: Efecto de la fotooxidación sobre la actividad PCL.....	189.
Fig. 38: Efecto del precalentamiento a 60°C por 5 min.....	191.
Tabla XVII: Estabilidad al almacenamiento.....	193.
Fig. 39(a) y (b): Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	196.
Fig. 40: Cromatografía en columna de Sephadex G-200.....	199.
Fig. 41: Curva de calibración de la columna de Sephadex G-100.....	199.
Fig. 42(a) y (b): Cromatografía en columna de Sephadex G-100.....	201.
Tabla XVII': Tabla de purificación.....	203.
Tabla XVIII: Actividad ferroquelatasa de mitocondrias solubilizadas por distintos métodos y su estabilidad al almacenamiento.....	209.
Fig. 43: Efecto de distintas concentraciones de los compuestos del sistema de incubación sobre la actividad Ferroquelatasa.....	211.
Fig. 44: Actividad Ferroquelatasa en función del tiempo de incubación y/o de preincubación.....	214.
Fig. 45: Curva de pH.....	216.
Fig. 46: Efecto "in vivo" del HCB sobre la actividad Ferroquelatasa.....	216.
Fig. 47: Actividad Ferroquelatasa frente a Mesoporfirina.....	219.
Fig. 48: Estabilidad al calentamiento de la Ferroquelatasa de ratas normales e intoxicadas con HCB.....	219.
Fig. 49: Determinación de $K_m$ respecto de $Fe^{++}$ .....	222.

Fig. 50: Efecto de 1 hemo.....	222.
Tabla XIX: Efecto "in vitro" del HCB, PCF y porfirinas.....	224.
Fig. 51: Efecto de la filtración por Sephadex G-25.....	226.
Tabla XX: Efecto de preparaciones desproteinizadas por calentamiento sobre la actividad Ferroquelatasa del hígado normal.....	228.
Tabla XXI: Actividad Ferroquelatasa normal en presencia de una preparación proveniente de ratas porfíricas.....	231.
Tabla XXII: Investigación sobre la existencia de cofactores.....	233.
Tabla XXIII: Distribución submitocondrial de la Ferroquelatasa.....	236.
Fig. 52: Actividad PCL de eritrocitos humanos en función de la concentración de Uro'gen III.....	240.
Fig. 53: Actividad PCL en eritrocitos de controles normales y pacientes con PCT.....	240.

## INTRODUCCION.

### PORFIRINAS.

#### - Generalidades.

Las porfirinas son compuestos tetrapirrólicos fundamentales para todos los organismos vivos, tanto animales como vegetales, salvo para algunas bacterias estrictamente anaeróbicas y el lactobacilli, que obtienen energía por fermentación de compuestos orgánicos.

En los restantes organismos son constituyentes de las hemoproteínas, proteínas conjugadas cuyo grupo prostético es el hemo e incluyen una serie de compuestos que cumplen funciones importantísimas en la célula. Así podemos citar: la hemoglobina, relacionada al transporte de oxígeno; los citocromos, que son agentes de transferencia de electrones y varias enzimas, tales como catalasas y peroxidasas. En todos estos casos la proteína incolora (que es quien determina la actividad biológica específica) está ligada a un compuesto hierroporfirina. Las porfirinas pueden estar también ligadas a otros metales, siendo el ejemplo más importante la clorofila, derivado porfirínico que contiene magnesio y es el agente de captación de energía radiante y por ende de importancia vital.

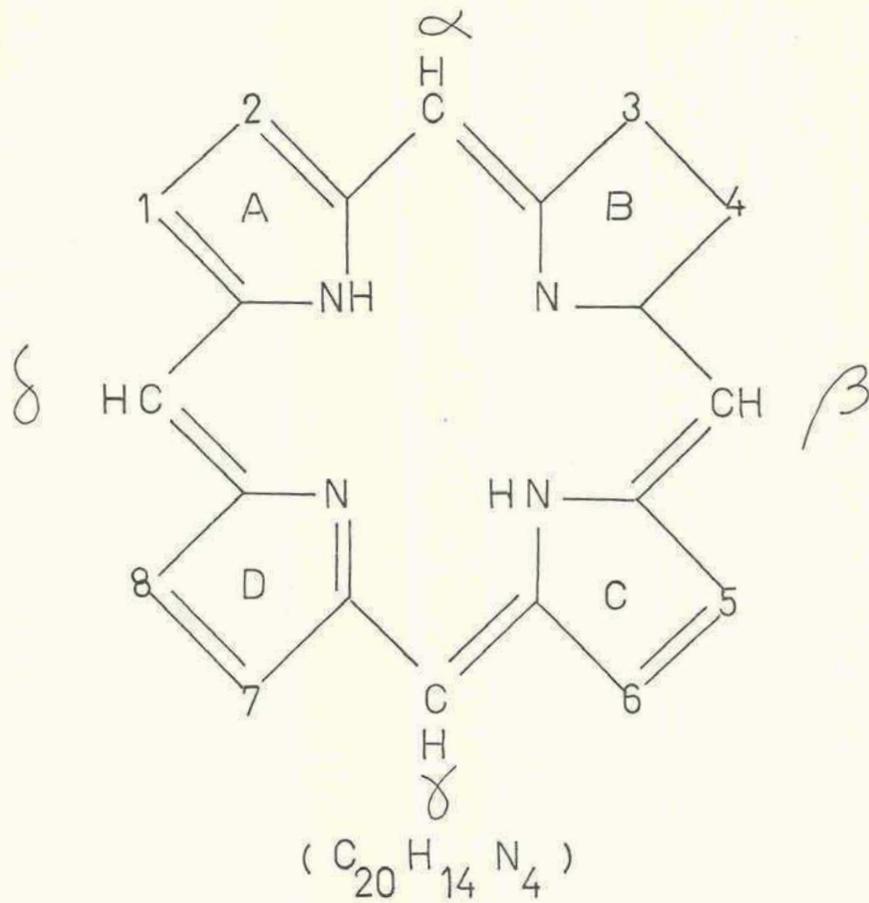
Por otra parte se han hallado porfirinas derivadas de la clorofila en el petróleo, carbón de piedra, aceites y asfaltos e inclusive en excrementos fosilizados de cocodrilo, lo que nos estaría indicando que los compuestos esenciales que funcionaban hace millones de años no difieren mayormente de aquellos que funcionan en la actualidad.

- Estructura.

Ya en el año 1871 Hoppe-Seyler (1) realizó los primeros estudios acerca de las porfirinas, pero recién en 1915, Hans Fischer (2) logró aislar dos porfirinas en forma cristalina (Copro y Uro). De allí en más se realizaron numerosos trabajos que llevaron a poder dilucidar perfectamente la estructura de las mismas y actualmente se han sintetizado la mayoría de las porfirinas naturales, las cuales son derivados de una sustancia fundamental: la porfina (fig. 1) que contiene cuatro anillos pirrólicos ligados por cuatro grupos =CH o metenos, puentes en un sistema en anillo con dobles ligaduras conjugadas, lo cual le confiere gran estabilidad.

La identificación de los átomos de C sobre el anillo porfina presentada en la fig. 1 es la propuesta por Fischer. En 1960 la IUPAC (3) propuso un sistema diferente, el cual se ve en

Fig.1 PORFINA. Fórmula desarrollada



Fórmula de Fischer  
(abreviada)

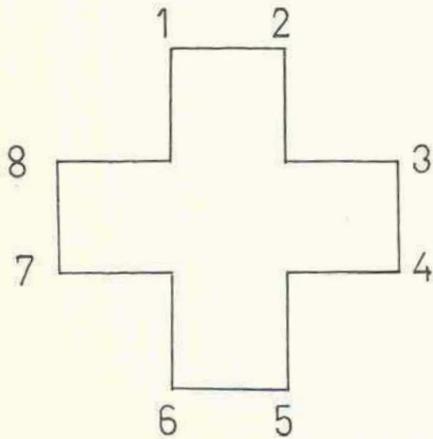
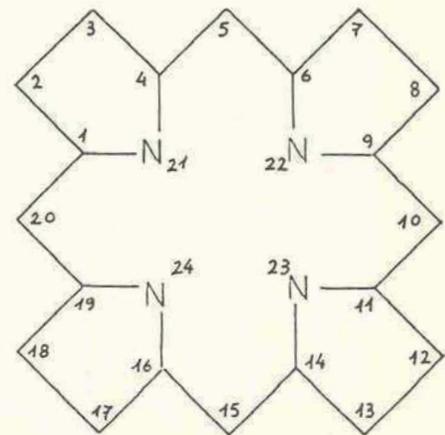


Fig.2 Nomenclatura de los núcleos porfirina según la IUPAC



la fig. 2, sin embargo el sistema propuesto por Fischer es el más utilizado y será usado en el presente trabajo.

La porfina fué sintetizada por Fischer y Glein en 1935, el compuesto no se ha encontrado en la naturaleza. Las porfirinas que se han hallado en la naturaleza son todas compuestos en los cuales los ocho átomos de H numerados en los anillos pirrólicos de la porfirina están sustituidos por cadenas laterales.

Cada nombre de porfirina de la tabla I representa un gran grupo de sustancias ya que un considerable isomerismo es posible.

El ejemplo más simple serían Etio, Copro o Uro, para los cuales cuatro isómeros son posibles en cada caso. Sin embargo sólo dos de ellos se encuentran en la naturaleza (tabla I) y estos han sido designados como tipo I y III por Fischer, que fué también quien propuso la numeración romana que aparece en la fig. 3 para designar los isómeros de la Etio y también propuso que todas las porfirinas se refirieran a ésta para asignarles su grupo isomérico.

Cuando tres tipos de cadenas laterales están presentes, como en el caso de la Proto (fig. 4) el número de isómeros posibles es 15. La Proto III es llamada comunmente Proto IX, porque fué la novena porfirina list\_ada por Fischer. Es la única fisiologica-

TABLA I Posición y naturaleza de las cadenas laterales de distintas porfirinas

TIPO I

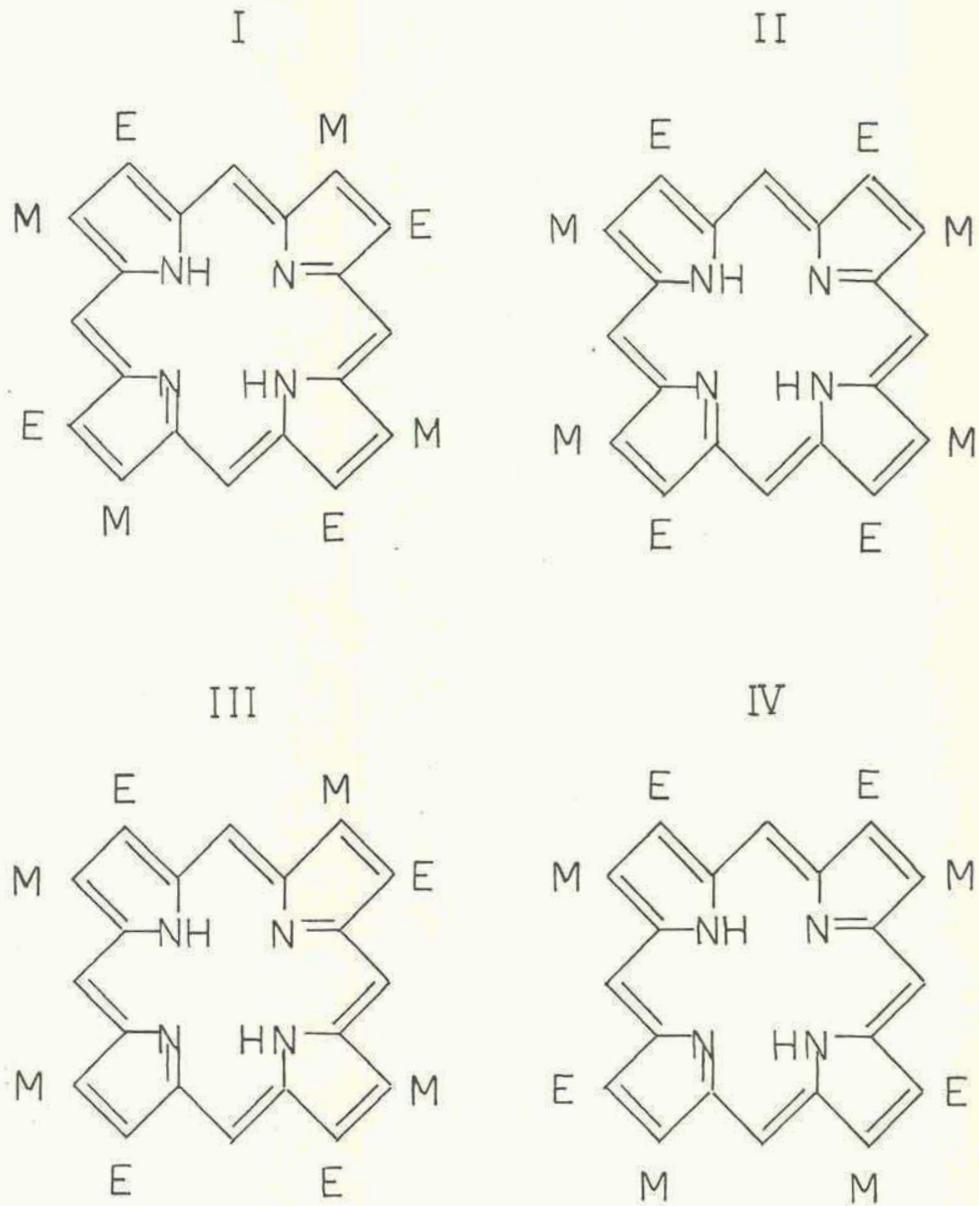
TIPO III

Etio	1, 3, 5, 7-M; 2, 4, 6, 8-E	1, 3, 5, 8-M; 2, 4, 6, 7-E
Meso	1, 3, 5, 7-M; 2, 4-E; 6, 8-P	1, 3, 5, 8-M; 2, 4-E; 6, 7-P
Proto	1, 3, 5, 7-M; 2, 4-V; 6, 8-P	1, 3, 5, 8-M; 2, 4 V; 6 7-P
Copro	1, 3, 5, 7-M; 2, 4, 6, 8-P	1, 3, 5, 8-M; 2, 4, 6, 7-P
Uro	1, 3, 5, 7-A; 2, 4, 6, 8-P	1, 3, 5, 8-A; 2, 4, 6, 7-P
Deutero	1, 3, 5, 7-M; 2, 4-H; 6, 8-P	1, 3, 5, 8-M; 2, 4 H; 6, 7-P
Hemato	1, 3, 5, 7-M; 2, 4-EOH; 6, 8-P	1, 3, 5, 8-M; 2, 4 EOH; 6, 7-P

M = metilo =  $-\text{CH}_3$   
 A = acetilo =  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$   
 E = etilo =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

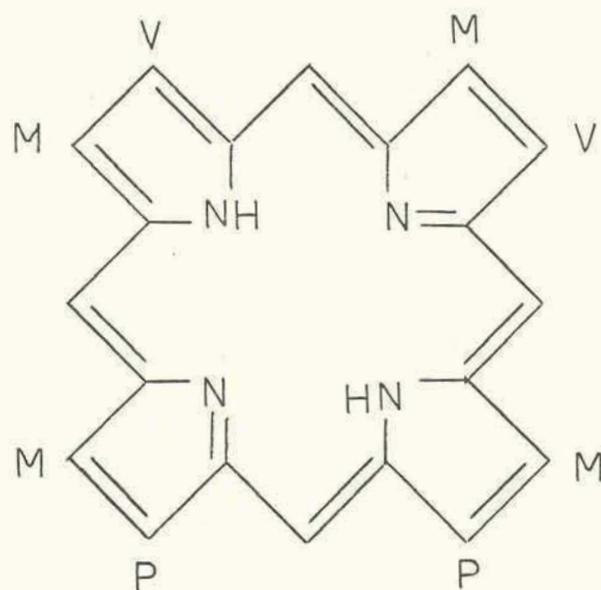
P = propiónico =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$   
 EOH = hidroxietilo =  $-\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_3$   
 H = hidrógeno =  $-\text{H}$

Fig.3 Estructura química de los cuatro isómeros de la Etioporfirina.



M = Metilo = (-CH<sub>3</sub>)      E = Etilo = (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)

Fig.4 PROTÓPORFIRINA



M = metilo = ( -CH<sub>3</sub> )

P = ácido propiónico = ( -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH )

V = vinilo = ( -CH=CH<sub>2</sub> )

mente activa para dar hemoglobina; está presente también en la mioglobina y en los citocromos.

Día a día se sigue investigando acerca de estos compuestos dada la importancia vital de los mismos y así recientemente se han descubierto una serie de porfirinas (fig. 5) aisladas de mamíferos, la primera de las cuales probablemente sea un intermedio normal del camino biosintético del hemo ( 6, 4, 5).

- Propiedades.

1.- Las porfirinas poseen una estructura con un gran número de enlaces conjugados, con alto grado de resonancia, por lo que muestran un marcado espectro de absorción en el visible. Cada porfirina posee un espectro característico de cuatro picos (\*) más alto, llamado Soret, está entre 400 - 410 nm y es el que permite detectarlas aún en cantidades muy pequeñas. Por el contrario los porfirinógenos sólo presentan una banda en el infrarrojo a aproximadamente 220 nm.

2.- Al ser irradiadas con luz U.V. presentan fluorescencia roja, mientras que al reducir las a porfirinógenos, donde el sistema de dobles ligaduras desaparece, pasan a ser incoloras y no fluorescentes (propiedad que se utiliza para seguir el proceso de

(\*) en el visible, cuando están esterificadas, y otro

reducción) no obstante conservan las propiedades químicas, solubilidad, etc, ya que los sustituyentes son iguales.

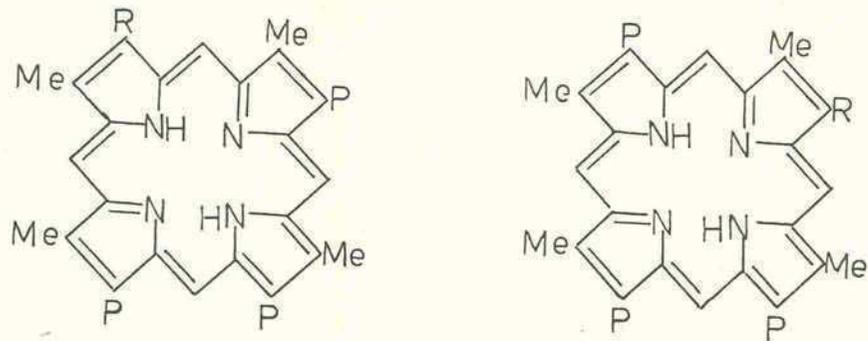
3.- Los carboxilos permiten esterificar estos compuestos, con lo que se hacen más solubles en medios orgánicos. Por dichos grupos son solubles en medio alcalino y por tener grupos nitrogenados en el núcleo son solubles en medio ácido; esto trae como consecuencia un carácter anfotérico y la existencia de un pH al cual son fácilmente precipitables: su pI que está entre 3 - 4,5.

#### PORFIRINOGENOS.

Si a las porfirinas las hidrogenamos, obtendremos los porfirinógenos (fig. 6), estos compuestos son los verdaderos intermediarios del camino biosintético del hemo. Son tetrapirril metanos cíclicos, llamados también hexahidroporfirinas, por ser el producto de la captación de seis átomos de hidrógeno por el anillo porfirínico; cuatro de los cuales van a los metenos y dos a los nitrógenos de los anillos pirrólicos (7).

Los primeros hallazgos de porfirinógenos en orina de pacientes porfíricos han sido reportados por Fischer en 1937 (8). Mientras que Rimington y Ziegler (9) observaron gran acumulación de Uro'gen y Copro'gen en hígado de animales porfíricos.

Fig. 5 Porfirinas recientemente descubiertas



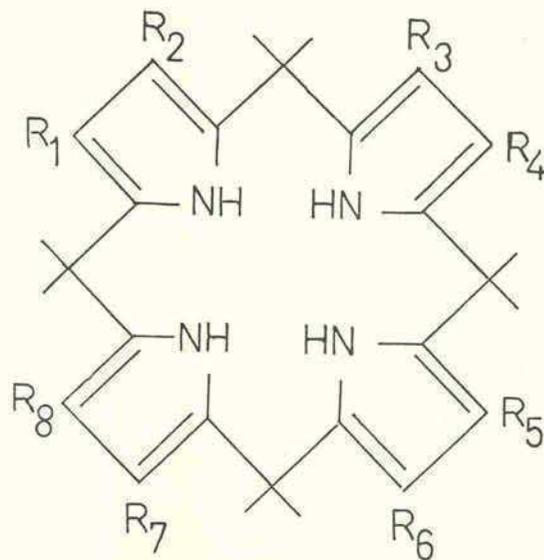
Harderoporfirina      R: CH=CH<sub>2</sub>      isoharderoporfirina

"S 411"porfirina      R: CH=CH CO<sub>2</sub>H      "iso S 411"porfirina

Pemptoporfirina      R: H

Dehidroisocoproporfirina      R: CH=CH<sub>2</sub> y CH-CO<sub>2</sub>H en  
lugar del Me del anillo B (serie Isocopro-fig.18-)

Fig. 6 Estructura general de los porfirinógenos



Mauzerall y Granick (10) estudiaron la autooxidación de estas sustancias, hecho que es muy importante desde un punto de vista práctico ya que, por ejemplo, al analizar los productos de decarboxilación del Uro'gen, conviene oxidarlos a las correspondientes porfirinas, para poder analizarlos mediante distintos métodos que se basan en la fluorescencia que ellas presentan a la luz U.V. o en su espectro visible. De los citados estudios llegaron a demostrar que, en soluciones neutras, la oxidación sufre autocatálisis y es estimulable por luz. Mientras que GSH, 2-mercaptoetilamina y  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  la inhiben. Por lo tanto para mantener a los porfirinógenos como tales conviene trabajar en condiciones anaeróbicas, oscuridad y en presencia de un agente inhibidor de la fotooxidación, tal como GSH, (que son las condiciones en que se determina actividad decarboxilasa).

Por el contrario la reducción de porfirinas para dar porfirinógenos ocurre en atmósfera inerte y oscuridad, mediante la intervención de agentes reductores tales como  $\text{H}_2/\text{Pd}$  (11, 12),  $\text{BH}_4\text{K}$  o amalgama de sodio (7, 10, 12 - 15).

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS.

- Esquema general.

En la fig. 7 está esquematizado el camino biosintético del hemo y se ha demostrado que es el mismo para todos los seres vivos. Si bien se conocen todos sus pasos, aún quedan numerosos interrogantes por resolver. Dada la importancia y amplitud de este campo, diversos centros de investigación trabajan sobre el mismo y periódicamente aparecen actualizaciones sobre el tema (16-18).

Shemin y col. propusieron en 1955 (19) un ciclo, llamado de la glicocola-succínico o ciclo de Shemin, que permite interpretar la formación de ALA a partir de glicocola y succinato y que a su vez está relacionado con el ciclo de los ácidos tricarbónicos, como puede verse en la fig. 8.

El segundo paso es la condensación de dos moléculas de ALA para dar un monopirrol, el PBG (fig. 9):

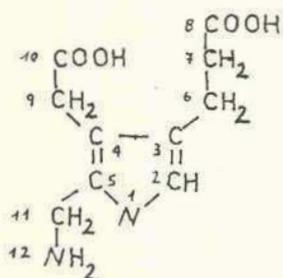


Fig. 9. Estructura y numeración del PBG.

Fig 7 Camino metabólico del hemo

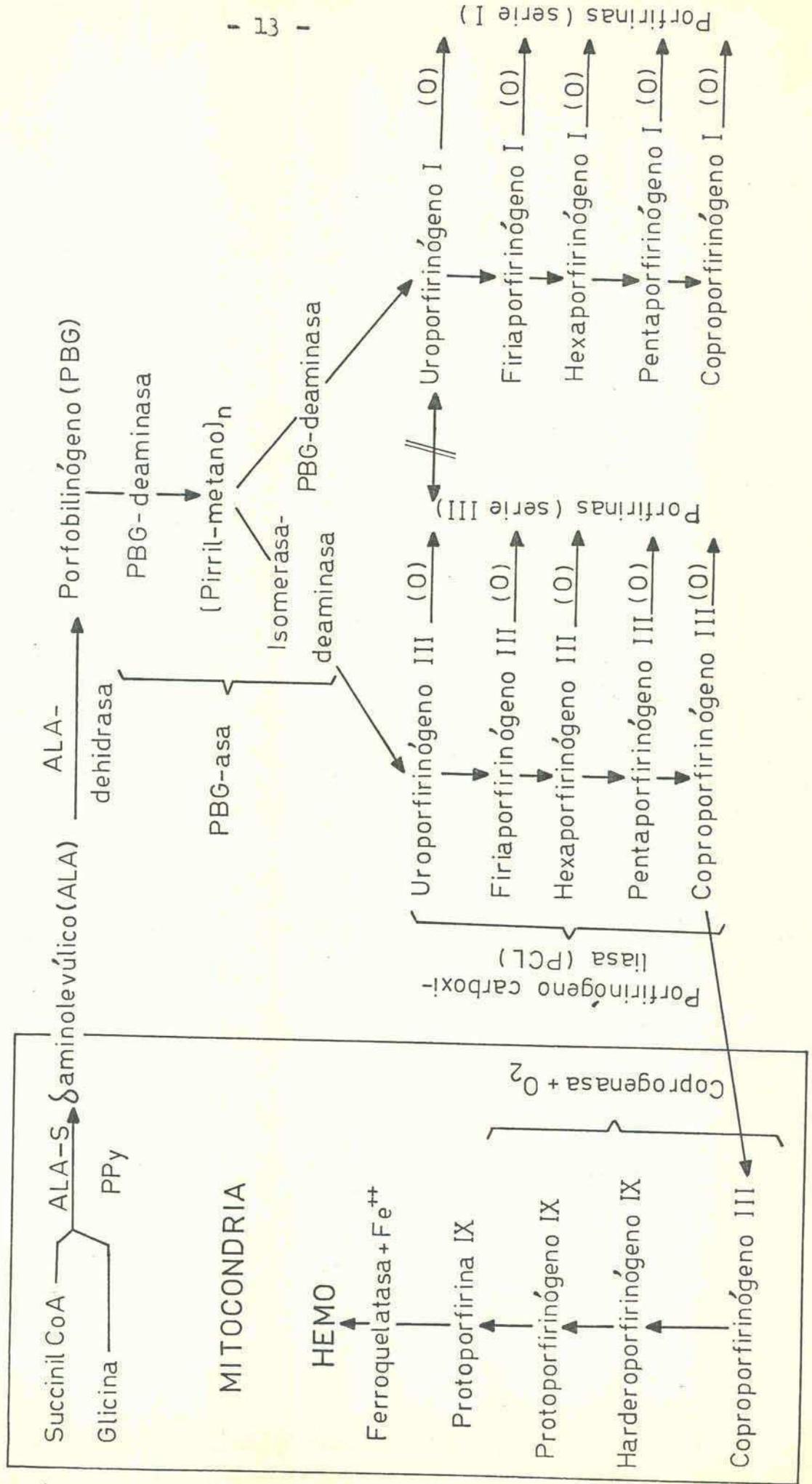
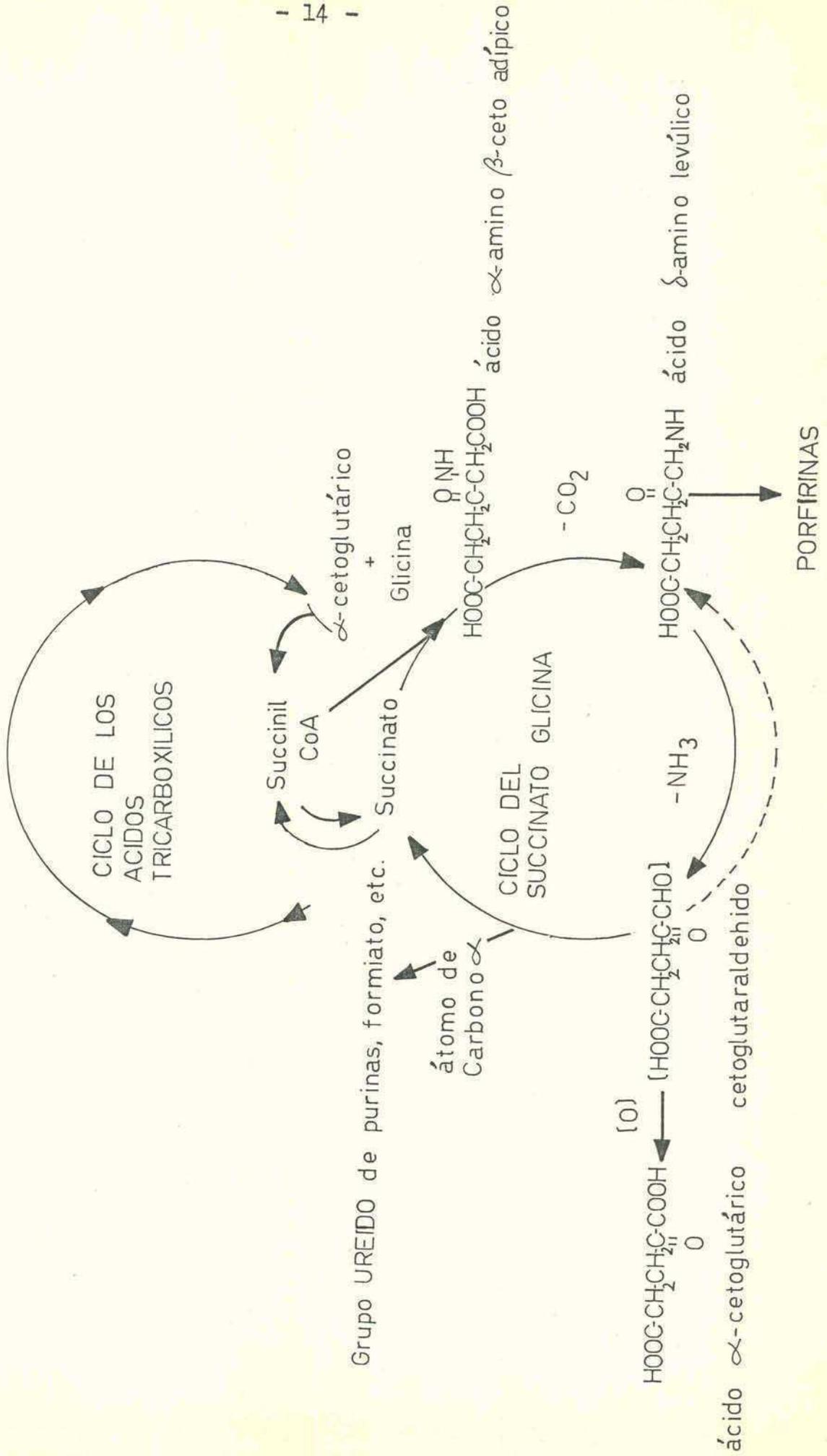


Fig 8 Ciclo del succinato-glicocola



y a continuación cuatro moléculas de PBG forman el anillo tetrapirrólico de Uro'gen, que en condiciones aeróbicas se transforman en Uro.

Como se puntualiza en la página 4 , la Uro presenta cuatro isómeros posibles, pero sólo el I y el III se encuentran en la naturaleza; estos son decarboxilados, con eliminación de cuatro moléculas de  $\text{CO}_2$  a partir de los restos acéticos de las posiciones 1, 3, 5 y 7 y 1, 3, 5 y 8 respectivamente, según un mecanismo que veremos más adelante.

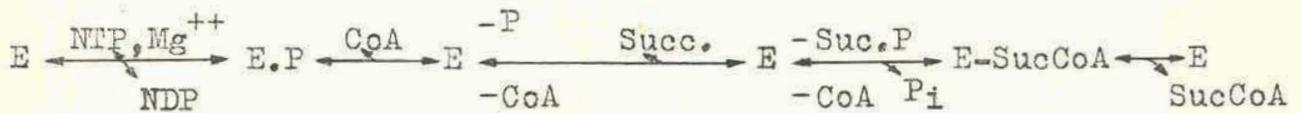
Se obtienen así los Copro'gen I y/o III, pero de ellos sólo el III sufre descarboxilación oxidativa de dos de las cadenas laterales propiónicas de los anillos A y B para dar los grupos vinilos presentes en el Proto'gen. Este por pérdida de seis átomos de H del anillo tetrapirrólico, pasa a Proto IX, la cual se une al  $\text{Fe}^{++}$  para dar el producto final HEMO.

#### - Succinil CoA Sintetasa.

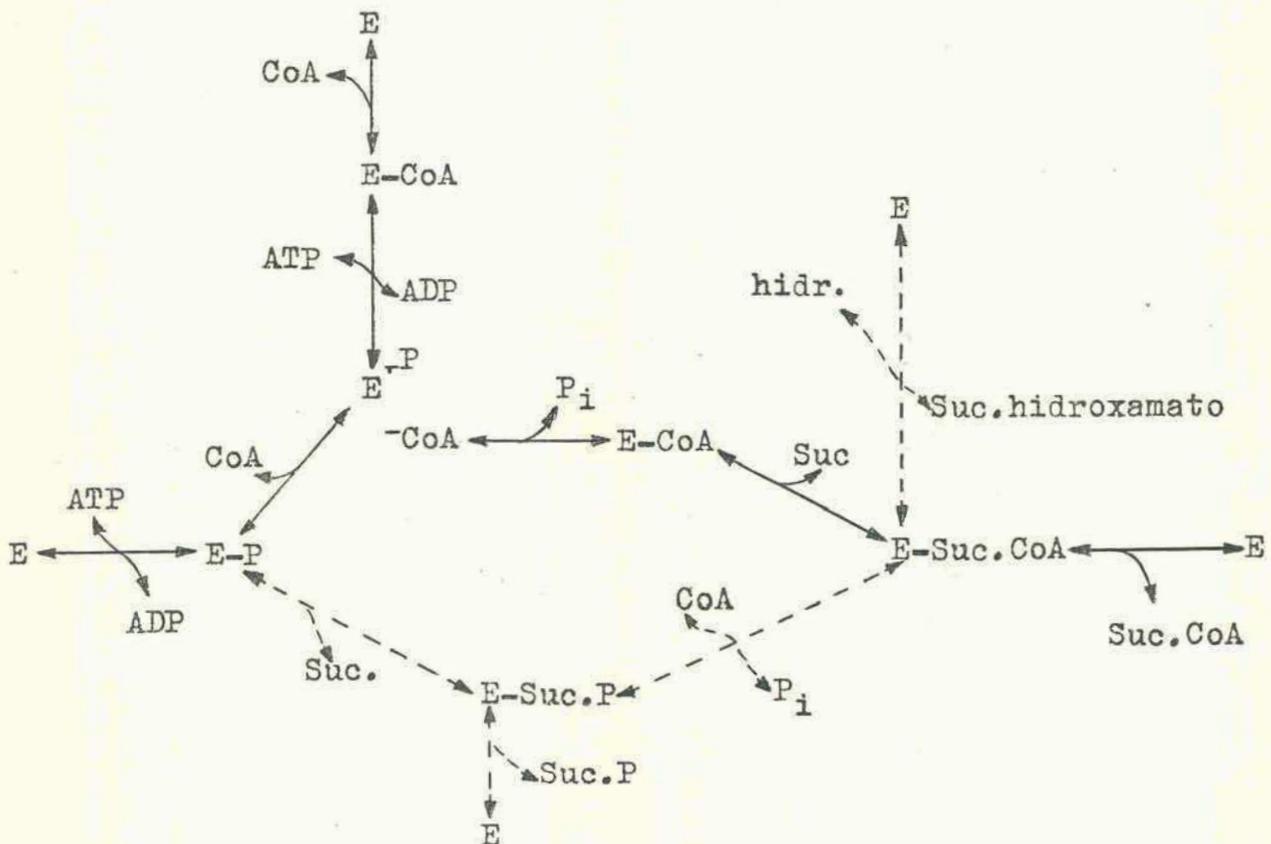
Estudios utilizando ratones intoxicados con drogas porfirinogénicas (20) han demostrado que la Succinil CoA Sintetasa (Suc. CoA-S, succinato: CoA ligasa, ADP, E.C. 6.2.15)) juega un rol directo en la síntesis de porfirinas y por ello se incluye en es-

te análisis del camino metabólico del hemo.

Se ha propuesto que actúa según el mecanismo que aparece en el siguiente esquema, utilizando un nucleótido trifosfato como cofactor (21, 22).



Trabajos más recientes proponen la existencia de diferentes caminos, involucrando reacciones alternativas, catalizadas por la misma enzima (23, 24).



- Formación de  $\delta$ ALA.

El primer paso ya dentro del camino biosintético del hemo en sí, es la formación del ácido  $\delta$ amino levúlico (  $\delta$ ALA) catalizado por la  $\delta$ amino levúlico sintetasa ( ALA-S; E.C.2.3.1.37.) por consiguiente ésta es la primer enzima del camino y ha sido demostrado (en hígado de mamíferos y de aves) que es la enzima que limita la velocidad del mismo (25 - 28).

Esta enzima ha sido encontrada tanto en mitocondrias( 29 - 32) como en citoplasma ( 31, 33) aunque esta última sólo en muy baja concentración, razón por la cual para su estudio se hizo necesario activar el sistema, para ello en general se usa la acción de drogas porfirinogénica tales como AIA y DDC (29, 31 - 35) bajo estas condiciones se acumula ALA-S citoplasmática y hay autores que postulan que el ALA-S citoplasmática acumulada es un precursor en tránsito hacia la matriz mitocondrial (36).

La formación de  $\delta$ ALA es un paso clave en el camino biosintético del hemo y como tal está estrictamente regulado por el producto final del mismo, la hemina, que actúa tanto a nivel de inhibición (29, 37) como de represión (38 - 41).

La ALA-S es inducida por diversas drogas (31-35, 41, 42) como así también se encuentra elevado su nivel en todos los casos

de porfiria tanto humana como experimental.

En 1976 Whiting y Granick (34) lograron purificarla hasta banda única en gel de poliacrilamida y basándose en estudios de P.M. llegaron a la conclusión de que se trataría de un dímero. Trabajos más recientes sobre purificación y mecanismo (35, 43, 44) apoyan esta hipótesis.

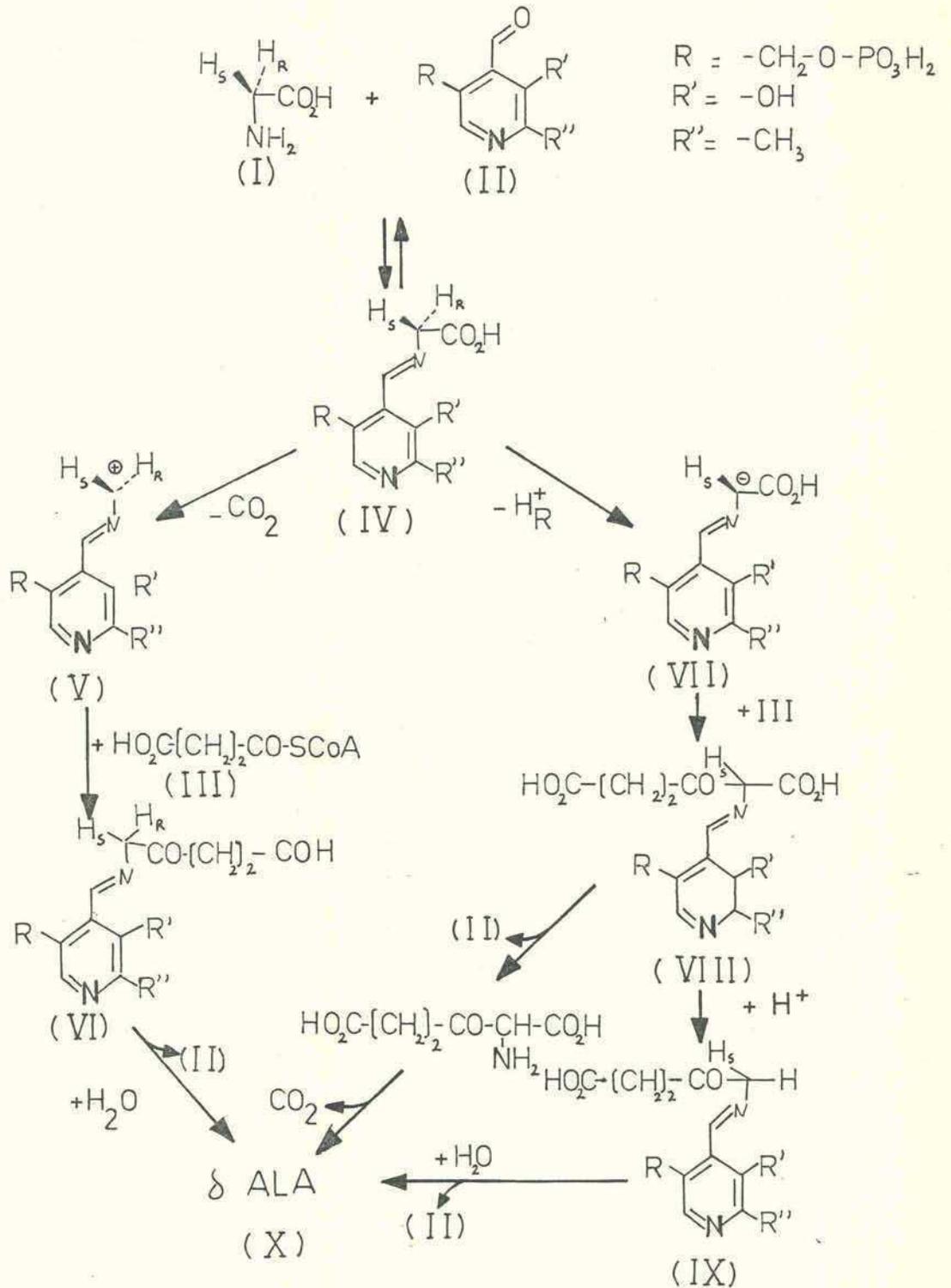
Al menos dos mecanismos pueden considerarse para la formación de  $\delta$ ALA desde glicina y suc. CoA (fig. 10). En el mecanismo I se forma primero una base de Schiff (IV) entre la glicina y el fosfato de piridoxal (PPy) por decarboxilación da un carbanión (V) el cual se condensaría con suc. CoA con retención de los dos H del C<sub>2</sub> y finalmente por hidrólisis daría  $\delta$ ALA.

En el mecanismo II la pérdida de un H<sup>+</sup> desde el C<sub>2</sub> da otro carbanión (VII) el cual reacciona con suc. CoA para dar la base de Schiff del ácido  $\alpha$ -amino  $\beta$ -oxoadípico y PPy. El último intermedio puede llegar a  $\delta$ ALA por dos caminos distintos VIII  $\rightarrow$  IX u VIII  $\rightarrow$  X.

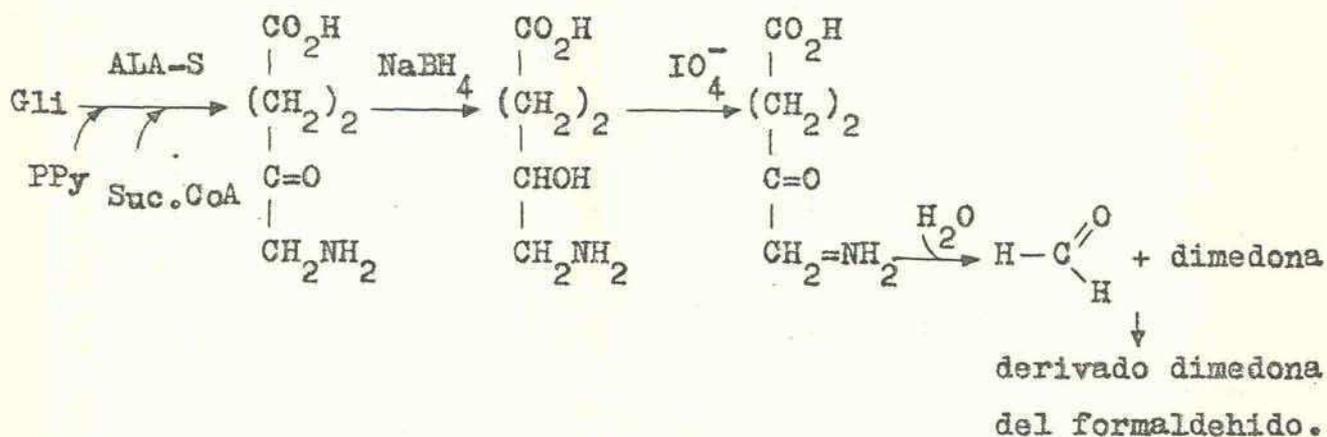
Zaman y col. (45) analizando la quiralidad de los productos formados a partir de glicina estereoespecíficamente marcada con tritio llegaron a dilucidar el verdadero camino.

Para ello incuban glicina [2 R - <sup>3</sup>H] ó [2 S - <sup>3</sup>H] con PPy

Fig.10 Mecanismo de formación de  $\delta$  ALA desde glicina y succinil-CoA.



en el medio apropiado para la síntesis de  $\delta$ ALA y ALA-S purificada de *Rhodopseudomonas spheroides*. El producto fue reducido con borohidruro de sodio, aislado por cromatografía, tratado con meta-periodato de sodio y el formaldehído fue separado como el derivado dimedona correspondiente, según la siguiente serie de reacciones.



Y encontraron que cuando incubaban Gli [2 R -  $^3\text{H}$ ] se perdía un 97% de la marca, mientras que con Gli [2 S -  $^3\text{H}$ ] se conservaba la marcación total, por consiguiente el  $\delta$ ALA se produce por pérdida de un solo H, el de la posición pro-R, con lo que quedaría descartado el mecanismo I.

Faltaría dilucidar el mecanismo a seguir después del  $\delta\text{NH}_2-\beta$  cetoalídico unido al PPy. A raíz de la inestabilidad del  $\delta$ ALA, particularmente respecto a los átomos de H de la posición 5, el  $\delta$ ALA mismo no sirve para estudios estereoquímicos; por ello Abboud

y col. (46) desarrollaron un sistema por el cual el  $\delta$ ALA apenas se forma se convierte en PBG, pasando así los átomos en cuestión a ocupar una posición estable. El PBG se acetila, oxida y finalmente hidroliza dando como producto final glicina. Estudiando la estereoquímica de este compuesto llegaron a la conclusión de que el átomo de H pro S de la glicina es retenido y ocupa la configuración pro S en la posición 5 del  $\delta$ ALA mientras el pro R es removido con lo que queda descartado el paso VIII  $\rightarrow$  X.

- Conversión de  $\delta$ ALA en PBG.

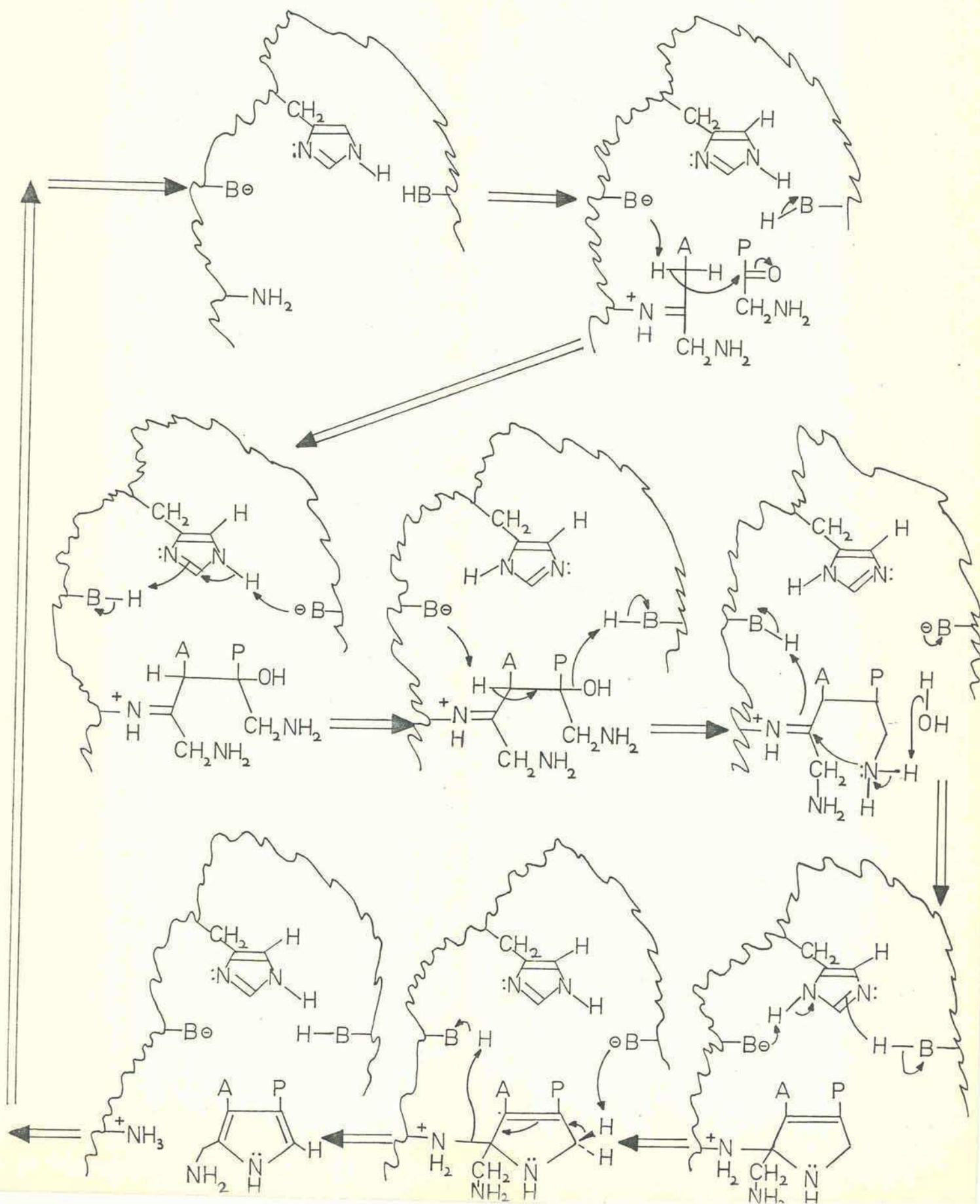
Este paso está catalizado por la enzima  $\delta$ ALA-dehidrasa ( $\delta$ ALA-D; E.C. 4. 2. 1. 24). En Rps. sphaeroides se ha demostrado que es una enzima alostérica (47) que presenta cinética normal en presencia de iones  $K^+$ ,  $Rb^+$  ó  $NH_4^+$ . Tiene un PM de 250.000 y está formada por subunidades de PM 100.000 y 130.000. Mientras que la enzima proveniente de hígado bovino tiene un PM de 285.000 y está compuesta por 8 subunidades de PM 35.000 (48, 49), lo cual al microscopio electrónico se visualiza como lóbulos discretos ubicados en las cuatro esquinas de un cuadrado; la apariencia de la enzima al microscopio electrónico puede concordar con la existencia de 8 subunidades si se postula que las 8 subunidades están acomodadas

en las esquinas de un cubo, es decir con una simetría diédrica(50). Aparentemente sólo 4 de las 8 subunidades tendrían poder catalítico, reaccionando con el sustrato a través del grupo  $\epsilon$ -amino de un resto de lisina (51). Otro grupo esencial sería un sulfhidrilo, del cual depende en gran medida la actividad enzimática (52); dicho grupo pertenecería a un resto cisteína y participaría en la catálisis ácido-base requeridas para las secuencias de protonación - deprotonación enzimáticas involucradas en la síntesis del PBG.

Durante las modificaciones químicas de grupos funcionales de AIA-D Tsukamoto y col. (53) encontraron evidencias de que restos histidina podían estar involucrados como otro grupo funcional y así lo demostraron por ensayos de fotooxidación y tratamiento con dietilpirocarbonato.

La estructura mínima activa sería un dímero (54) . En cuanto al mecanismo (fig. 11), aquí también se forma una base de Schiff intermediaria, entre la enzima y el sustrato(48,51) Luego se produce un ataque nucleofílico, por el anión intermediario sobre el átomo de C carbonílico de la molécula de  $\delta$ ALA. Se forma así un aldol, éste pierde agua y el grupo amino libre desplaza al grupo amino de la enzima, dando PBG. La afinidad del sustrato por la enzima depende de la facilidad para dar la base de Schiff y también de la for-

Fig 11 Mecanismo de acción de ALA-dehidrasa (ALA-D)



mación de una unión iónica entre el grupo carboxilo del sustrato y una carga positiva sobre la enzima a una distancia particular.

- Modo de acción del sistema PBG-asa.

La biosíntesis del Uro'gen III se produce a través de una reacción catalizada por el complejo enzimático PBG-deaminasa (PBG-D) - Uro'gen III Cosintetasa I (Porfobilinogenasa, PBG-asa) (55); para ello en alguna etapa se debe romper uno o más de uno de los grupos metileno del C<sub>11</sub> de las cuatro moléculas de PBG que lo forman; en los reordenamientos posibles los cuatro puentes metilénicos (C-  $\alpha$  -  $\beta$  -  $\gamma$  y -  $\delta$ ) difieren en su origen respecto a la posición previa en la molécula de PBG. Biosintetizando Uro'gen III con (2, 11 - <sup>13</sup>C) PBG, se determinó que sólo el puente C-  $\gamma$  provenía de un reordenamiento (56- 57) en tanto que en la biosíntesis de Uro'gen I catalizada por PBG-D ninguno sufría reordenamiento (58).

Se han realizado numerosos trabajos para determinar a qué nivel se produce el reordenamiento. Carpenter y Scott por una parte y Battersby y McDonald por otra, llegaron a la conclusión de que no es a nivel de monopirrol (56, 57); mientras que el grupo de Frydman (59-62) es coincidente con el de Batterby en que

tanto el dipirrol III como el IV (fig. 12) no son incorporados, pero difieren en lo que respecta a los dipirrilmetanos I y II. El grupo de Frydman (59) llegó a la conclusión de que I es sólo incorporado en Uro'gen I por la PBG-D y no por el sistema PBG-asa, que incorpora el II, mientras que el grupo de Battersby encontró que también incorpora el I. En base a esto, los Frydman, al igual que Cookson y Rimington (63) y Bullock y col (64) sugieren que el reordenamiento se produce a nivel de formación del dipirril metano, mientras que Battersby sugiere que se produce a "posteriori" por un mecanismo semejante al de la "espiro hipótesis" de Matheuson y Corwin (65) (fig. 13 a).

Trabajos posteriores de Battersby y col. han demostrado que el bilano b-I (fig. 13 b) resultó ser el mejor sustrato para el sistema PBG-asa, frente a todos los otros probados (66). Más recientemente el grupo de Scott (67) encontró, por estudios de incorporación de PBG  $^{13}\text{C}$ , usando NMR, la existencia de un intermediario del tipo a que denominó pre-Uro'gen y que espontaneamente se convierte en Uro'gen I, mientras que por acción de la isomerasa da el Uro'gen III; de ello sugieren que el precursor del pre-Uro'gen sería un bilano del tipo b.

Fig 12 Dipirrilmetanos isómeros

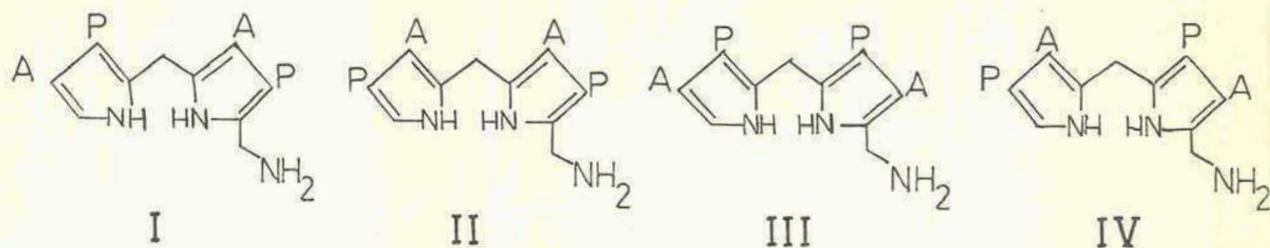
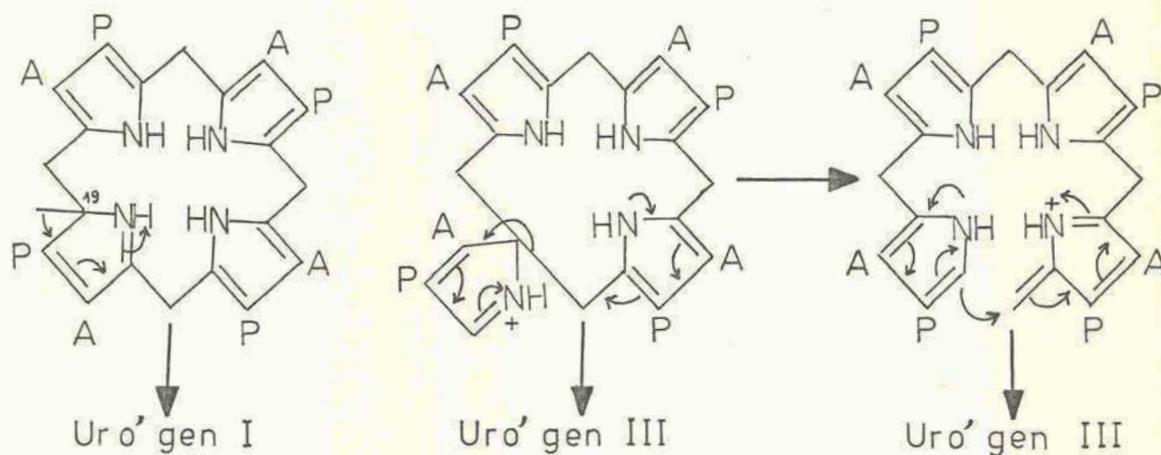
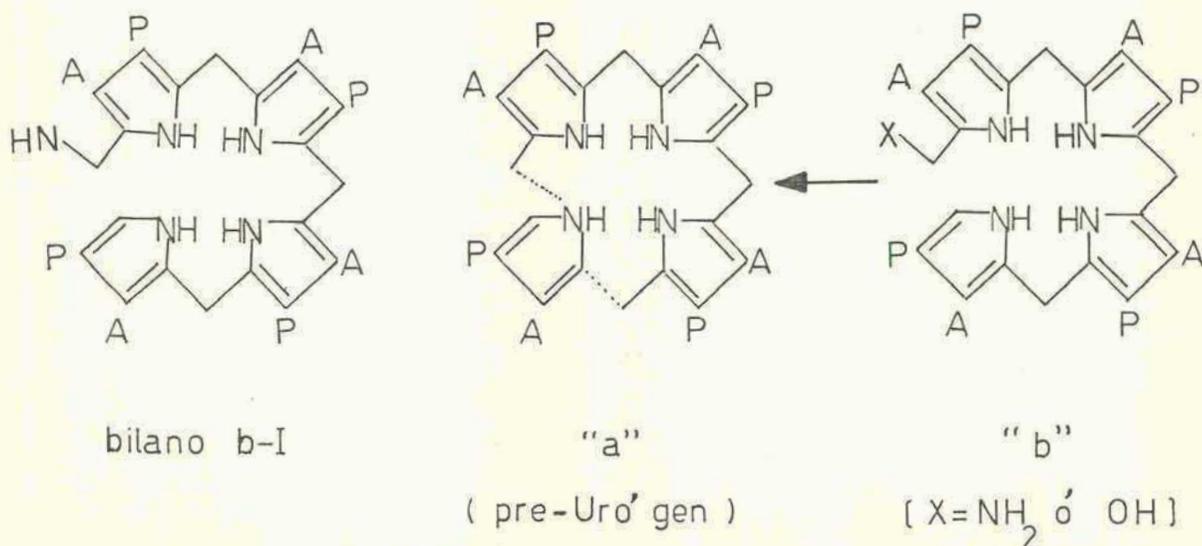


Fig 13 Mecanismo de los últimos pasos en la formación de Uro'gen III

a)



b)



- Porfirinógeno Carboxi-liasa (PCL).

a) Generalidades.

La porfirinógeno carboxi-liasa (68), llamada también Uroporfirinógeno decarboxilasa o Uro'gen decarboxilasa, cataliza la reacción total:



Ha sido estudiada en:reticulocitos de conejos (10), Rhodopseudomonas spheroides(13), eritrocitos de pollo(6,68-71) hígado de ratas normales (70,72,73) e intoxicadas con HCB(74-76), células rojas humanas (77, 78) y de conejos normales e intoxicados con Pb(79, 80), hígado de cerdo(81), en hojas de tabaco (82) en bazo de ratón (83).

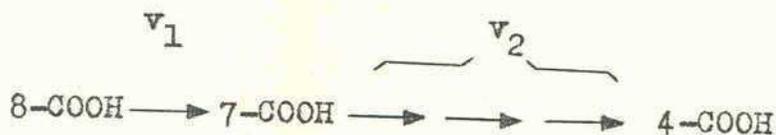
La enzima ha sido parcialmente purificada y alguna de sus propiedades estudiadas. Así Mauzerall y Granick (10) encontraron que se inactiva en ausencia de GSH y en presencia de metales pesados, iodoacetamida, PCMB u oxígeno; sufre inhibición por sustrato, el  $K_m$  aparente es  $5 \times 10^{-6}$  M y el pH óptimo 6,8.

Por su parte Hoare y Heath (13) comprobaron también la inactivación por metales pesados e inhibición por productos de reoxidación parcial de los porfirinógenos.

b) Características de la reacción enzimática.

Tomio y col. (68) lograron purificar 220 veces la enzima proveniente de eritrocitos de pollo, obteniendo homogeneidad en gel de poliacrilamida. Con esta preparación encontraron que la enzima era lábil al calentamiento, sufría inhibición por sales de Na y aumentaba su actividad con EDTA, GSH y extracto calentado de hígado de rata; encontrando además que la remoción del segundo carboxilo es más susceptible que la del primero, a la mayoría de los agentes físicos y químicos probados, siendo su velocidad de decarboxilación menor que la del primero.

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta la relativamente alta acumulación de Firia observada "in vivo" e "in vitro", frente a pequeñas y constantes cantidades de Penta y Hexa, sugieren dos etapas metabólicas en el mecanismo de decarboxilación, a saber:



Esta hipótesis fué confirmada por los trabajos de García y col.(71) que midieron  $v_1$  y  $v_2$ , corroborando que  $v_1 > v_2$  y además graficando  $\lg v_i = f(1/t \text{ } ^\circ \text{K})$  obtuvieron una constan-

te, que, si bien no puede ser considerada igual a la energía de activación, representa una relación no conocida pero que involucra principalmente las constantes de velocidad de los distintos pasos y el hecho de que para dichas constantes se cumpla que  $E_1 < E_2$ , podría implicar una mayor velocidad para la primer decarboxilación.

También encontraron que la decarboxilación del Uro'gen III es llevada a cabo aún a 0°C, siendo Fíria el único producto acumulado, no detectando otros productos de decarboxilación. Similares resultados obtuvieron a 25°C, usando tiempos de incubación más cortos (10-15 min.). Si bien dos etapas metabólicas estarían involucrados en la reacción total, teniendo en cuenta que el grado de purificación y el rendimiento son aproximadamente iguales para ambas etapas, se sugirió que una sola enzima con función catalítica múltiple sería la responsable de la reacción total (68) y el comportamiento de esta proteína frente a agentes tales como calentamiento y ClNa, que afectan en muy distinto grado a ambas etapas, podría estar de acuerdo con la existencia de al menos dos sitios catalíticos distintos.

Por su parte Aragonés y col. (70) realizaron un estudio comparativo de las propiedades de la enzima proveniente de

eritrocitos de pollo respecto de la de hígado de rata, comparando también sus resultados con los correspondientes a otras fuentes enzimáticas, obtenidas por otros grupos de trabajo. Señalan así que en general el Uro'gen III es decarboxilado a mayor velocidad que el I (10, 70, 78) salvo con la enzima de bazo de ratón, que presenta igual velocidad ante ambos sustratos(83). En cuanto a las velocidades para la primera y segunda etapa Mauzerall y Granick (10) en reticulocitos de conejo consideran que la primer decarboxilación es la limitante ya que no encontraron acumulación de intermediarios; Romeo y Levín (83) en bazo de ratón tampoco encuentran acumulación de intermediarios, pero no descartan la posibilidad de que se forme una pequeña cantidad de los mismos. Mientras que en los dos sistemas estudiados por Aragonés y col.(70) encuentran una notable acumulación de Fíria, lo cual indicaría que la primer decarboxilación no es la determinante de la velocidad.

La anaerobiosis favorece la reacción (10, 70), pues mantiene a los porfirinógenos al estado reducido y quizás por un efecto sobre la enzima misma, lo que se ve apoyado por el hecho de que es necesario proteger la enzima con agentes sulfhidrúlicos en etapas de purificación largas.

Cornford (78) estudiando eritrocitos humanos encontró que el ClNa inhibía la eliminación del segundo carboxilo, lo cual sería un buen sistema para estudiar la primer etapa aisladamente. Pero Aragonés y col. (70) al tratar de repetir la experiencia encontraron que si bien el ClNa afecta la 2a. etapa, afecta también a la 1a. aunque en menor grado y que ni aún a altas concentraciones de ClNa (400 mM) se llega a un bloqueo total de la segunda etapa.

Varios trabajos han informado la existencia de un factor ultrafiltrable y termoestable, obtenido de distintas fuentes, que es capaz de estimular la formación de Copro e inclusive restaurar la capacidad de formar porfirinas a sistemas que habían perdido su actividad. Fue hallado en: microorganismos (13, 84), sangre de pollo (13,85), levadura de panadería (13, 87) e hígado de cerdo(13).

La naturaleza del cofactor proveniente de hígado de cerdo es aún oscura, en cambio en eritrocitos de pollo se cree que se trataría de un polipeptido (85). Quizás pueda estar relacionado con el comportamiento observado ante el agregado de un extracto cocido de homogenato de hígado de rata de la enzima de eritrocitos, que incrementó su actividad catalítica

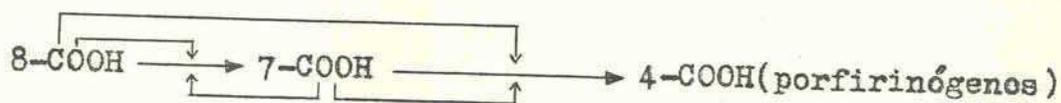
no así la hepática (70); mientras que sistemas decarboxilantes de *Rhodopseudomonas Spheroides* (13) y de eritrocitos humanos (78) guardaron un comportamiento semejante al de eritrocitos de pollo.

Estudiando la especificidad de la enzima por su sustrato San Martín de Viale y col. (72) llegaron a las siguientes conclusiones: i) la enzima proveniente de hígado de rata decarboxila los 4 isómeros del Uro'gen, incluso el IV, a una velocidad mayor que a su sustrato normal, el III. ii) la eliminación de un -COOH de un resto acético localizado entre una cadena lateral acética y un propiónico, parece ocurrir antes que el de un acético localizado entre dos propiónicos ó entre un metilo y un propiónico; iii) la presencia de una cadena lateral propiónica vecinal en posición 6 y 7 es un requerimiento importante, pero no esencial para la unión de la enzima al perfirinógeno, ya que el Uro'gen I se decarboxila, aunque a menor velocidad, por consiguiente deben intervenir otros factores; iv) el Copro'gen III inhibe marcadamente la decarboxilación del Uro'gen, como así también la hemina aunque en mayor grado, quizás por un efecto adicional del  $Fe^{+++}$ . Los propiónicos localizados en 2 y 4, son factores importantes en la

unión a la enzima ya que Meso'Deutero' y Proto'gen IX que no tienen propiónicos en A y B no exhiben efecto inhibitorio; v) el estado reducido del anillo es esencial para que la reacción ocurra, quizás permitiendo que las cadenas laterales adopten una posición estérica que facilite su unión a la enzima.

Estos hallazgos junto con el efecto observado de los clorofenoles sobre la enzima de hígado de rata (76) sugieren la posibilidad de que el sustrato, a través de una carga negativa del propiónico se una a un sitio positivo de la enzima.

García y col. (71) estudiando el efecto inhibitorio que ejercían el Uro'gen III y Firia'gen III sobre el proceso de decarboxilación, llegaron a la conclusión de que ambos inhiben sus propias decarboxilaciones y también la de los restantes porfirinógenos (en el sistema de eritrocitos de ave)



En cuanto a si la PCL es una única enzima o un complejo enzimático, Granick supone lo primero (86, 87), mientras que los estudios realizados por Cornford (78) harían pensar en un sistema mucho más complejo. El, al igual que otros investigadores (68, 88, 89) sugieren que dos o más enzimas o una enzima

con más de un sitio activo sería la que actúa. Estudios más recientes sugieren que la PCL tendría al menos dos sitios catalíticos diferentes sobre una única proteína (68, 89).

Elder y col. (74), presuponiendo que una única enzima es la que cataliza la conversión de los porfirinógenos a Copro'gen, proponen un método para medir PCL, usando como sustrato Penta'gen, es decir miden sólo el paso final de la conversión a Copro'gen, y extrapolan las conclusiones de sus resultados a la reacción total.

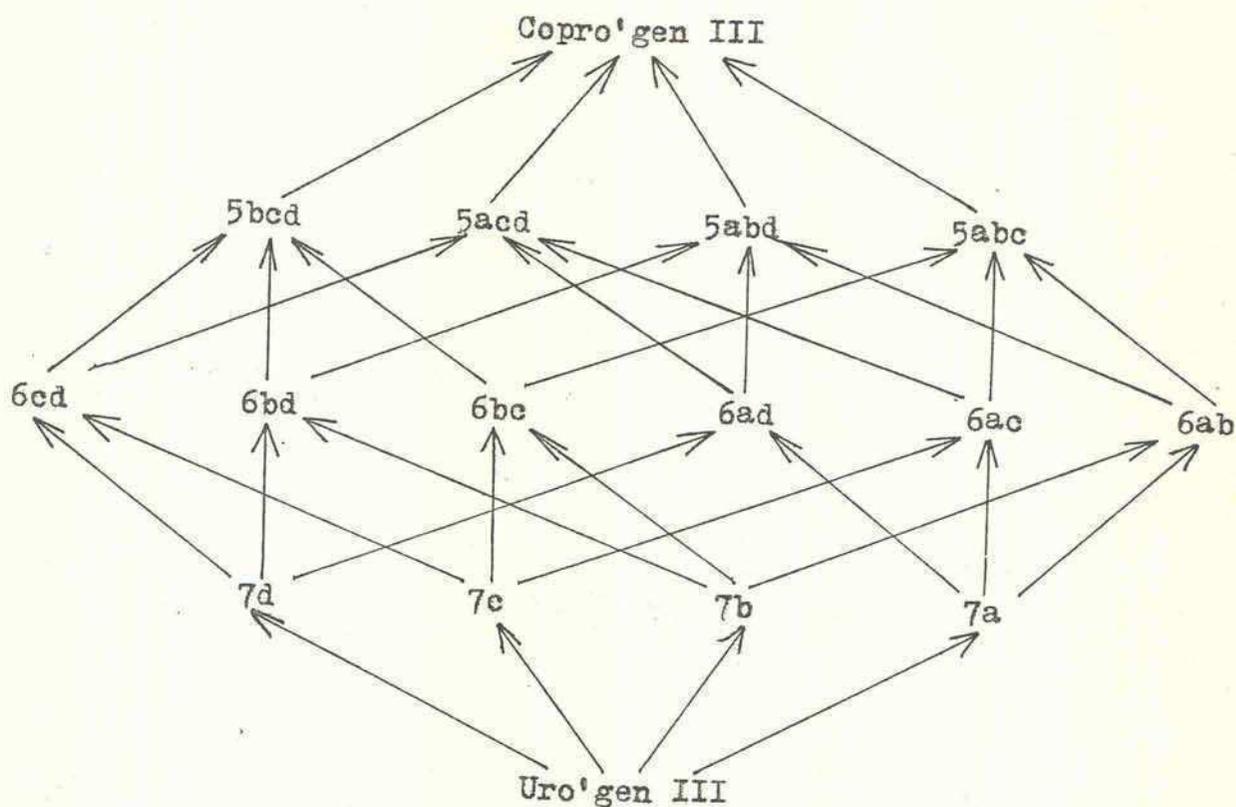
c) Pasos de la Decarboxilación del Uro'gen.

Numerosos estudios habían demostrado la existencia de porfirinas de 8- a 2-COOH ligados al sistema decarboxilante, del camino del hemo, proveniente de distintas fuentes (11, 15, 17, 69, 84, 88, 90-95).

Las primeras evidencias de que el pasaje desde Uro'gen a Copro'gen ocurría en pasos sucesivos fueron presentadas por Mauzerral y Granick, quienes usando Uro'gen I y III como sustrato y glóbulos rojos de conejo como fuente enzimática, obtuvieron, por decarboxilación parcial, porfirinas de 5- a 7-COOH, al oxidar los productos intermedios (10).

En 1962, Batlle y Grinstein (17, 96) demostraron definitivamente, empleando técnicas de dilución isotópica, en hemolizados de glóbulos rojos de pollo, que un porfirinógeno heptacarboxílico era intermediario en la decarboxilación del Uro'gen. Y en 1968, San Martín de Viale y Grinstein (97) demostraron que los porfirinógenos de 5- y 6-COOH eran también intermediarios de este proceso.

Aclarado ya que los porfirinógenos de 5- a 7-COOH eran los productos intermediarios en el pasaje de Uro'gen a Copro'gen, faltaba dilucidar en cual anillo comenzaba el proceso o si era completamente al azar e igualmente cual era el siguiente anillo a decarboxilar y así sucesivamente hasta llegar a Copro. Como puede verse en el siguiente esquema, el Uro'gen tiene 15 posibles productos de decarboxilación con 24 ( 4!) posibles rutas para llegar desde él hasta Copro'gen III (6).



Jackson y col. (6) quisieron investigar la existencia o no de una ruta específica (o preferida) y si ésta sería la misma para el metabolismo normal y el anormal.

Para ello separaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) las porfirinas de 7-, 6- y 5-COOH halladas en heces de ratas intoxicadas con HCB y las caracterizaron mediante el análisis de los espectros de resonancia nuclear magnética (RMN) de los complejos bi-dentados de dichas porfirinas con distintas concentraciones de Europio. Este elemento hace que la señal de-

bida a los H-meso de los puentes metenos cercanos a dos grupos éster sufran un corrimiento en el espectro RMN, no así los que están cercanos a dos alquiles o a un alquilo y un éster (los primeros no forman el complejo y los segundos quedan sólo debilmente unidos) que mantienen su posición cercana a la de los puentes originales o sea en ausencia de Europio . Teniendo en cuenta esto, de los seis isómeros posibles de la Hexa, cinco de ellos tendrían dos señales corridas y dos en el lugar de origen. Mientras que el que tiene los anillos A y D decarboxilados presentaría tres señales corridas y una no; eso es lo que encontraron al analizar por este método la porfirina proveniente de ratas intoxicadas con HCB; es decir que se trataría del intermediario que hemos llamado ( 6ad ).

En el caso de la Penta, a priori se inclinaron a pensar que el isómero natural era el ( 5abd ), en el que el residuo acético permanece en el anillo C, a causa de que el porfirinógeno correspondiente es presumiblemente el precursor del dehidroisocoproporfirinógeno (fig. 5) y del Copro'gen III. Por análisis con Europio podía ser éste o el isómero ( 5acd), ya que se corrían dos señales, mientras que con los otros dos isómeros sólo se correría una. Esta hipótesis fue confirmada por síntesis

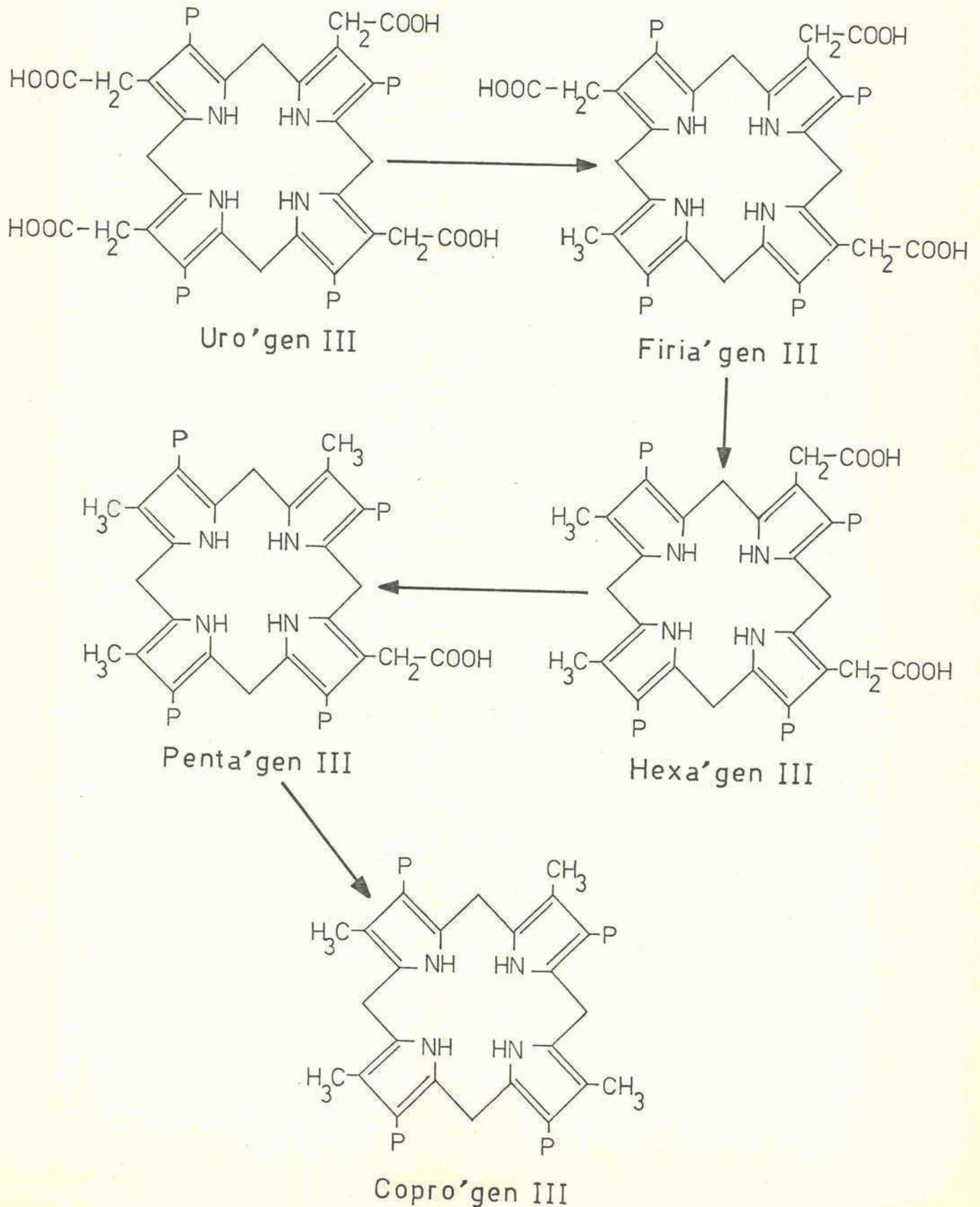
y comparación de los productos con el aislado de fuentes naturales en cuanto a propiedades tales como P.F. y espectro R.M.N.

En el caso de la heptacarboxílica el producto aislado de heces de ratas parecía ser idéntico a la Firia de Batlle y Grinstein (15), a la "porfirina-208" de Grinstein y col. (98) y a la pseudouroporfirina de Falk y col. (92).

Se sintetizaron los cuatro isómeros posibles y las determinaciones del P.F. de mezclas sugirieron que el isómero natural era el que tenía el grupo metilo sobre el anillo D. Posteriores estudios de RMN con Europio confirmaron esta suposición. Finalmente cuatro isómeros de la Firia y tres de la Penta en su forma reducida fueron incubados con eritrocitos de pollo y todos fueron convertidos en Proto IX pero a distinta velocidad. Sobre la base de éstas y otras evidencias concluyen que la decarboxilación del Uro'gen III a Copro'gen III es un proceso en pasos, en el que los grupos acéticos son decarboxilados en un modo secuencial, comenzando por el que está sobre el anillo D y siguiendo según el sentido de las agujas del reloj o sea por A, B y C consecutivamente. Este camino preferencial ocurre tanto en el metabolismo normal como en el anormal (fig. 14).

Se obtiene así el Copro'gen III, que sufre descarboxila-

Fig. 14 Ultimos pasos de la descarboxilación de Uro'gen III a Copro'gen III



ción oxidativa de dos de las cadenas laterales propiónicas de los anillos A y B para dar los grupos vinilos presentes en el Proto'gen.

- Decarboxilación oxidativa del Copro'gen.

Elder (99) estudió la localización de la Coproporfirinógeno oxidasa (CPO) determinando en primer lugar su localización subcelular y luego, sabiendo que se encontraba principalmente en mitocondrias, por tratamiento de éstas con digitonina (la cual rompe selectivamente la membrana mitocondrial externa) comprobó que el sobrenadante se enriquecía en dicha enzima, al igual que en otras enzimas marcadoras del espacio intermembrana (adenilato quinasa y sulfito oxidasa); a cantidades crecientes de digitonina las enzimas marcadoras eran soltadas antes que la CPO, lo que podría indicar que esta última estuviera ligeramente adherida a la superficie de las membranas en el espacio intermembrana, aunque la localización de una pequeña fracción dentro de la mitocondria no puede descartarse.

Para este paso (catalizado por la Coprogenasa, Copro'gen decarboxilasa oxidativa o coproporfirinógeno oxidasa) Battersby (100) demostraron mediante el uso de formaldehido deuterado, con el cual sintetizaron PBG marcado en el resto propiónico, que el H que se pierde es el del  $C_{\beta}$  con retención de los dos del  $C_{\alpha}$ .

En cuanto al mecanismo de reacción, Sano (101) propuso que ocurre una hidroxilación seguida de una deshidratación descarboxilativa del intermediario del Proto'gen que posee en las posiciones 2 y 4 un resto - CHOH - CH<sub>2</sub> - COOH, o sea que ambos restos propiónicos son convertidos en hidroxipropionato antes que en vinilo; mientras que Sano y Granick (102) propusieron que los intermediarios son las especies conteniendo un vinilo y tres propiónicos. Estas dos teorías podrían ser compatibles en términos de la no especificidad del sistema coproporfirinogenasa.

Los trabajos realizados por Cavaleiro y col. (4) apoyan la segunda de estas hipótesis. Este grupo de trabajo, mediante el uso de síntesis de los distintos posibles intermediarios marcados y comparación de estos con los componentes naturales, en cuanto a su estructura y en cuanto a su utilización como sustrato de la enzima proveniente de un sistema libre de células de *Euglena gracilis*, llegaron a la conclusión de que la secuencia biosintética es aquella en la cual el propionato de la posición 2 es modificado antes que el de la posición 4 (4, 103) o sea que la secuencia normal sería: Copro'gen III → Hardero'gen → Proto'gen IX.

- Actividad Proto'gen oxidasa.

El Proto'gen IX por pérdida de 6 átomos de H del anillo

tetrapirrólico, pasa a Proto IX.

Este paso no se sabía si era de naturaleza enzimática o no, pero existían evidencias indirectas de que en hígado de mamíferos había actividad proto'gen oxidasa (102, 104), sin embargo la enzima de mamíferos que cataliza la oxidación de Proto'gen a Proto, nunca fue aislada en ausencia de actividad coproporfirinogenasa y ferroquelatasa (102).

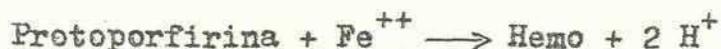
Por otra parte, la reacción no enzimática es poco probable ya que: i) el medio intracelular es desfavorable para la autooxidación del Proto'gen, ii) la reacción es enzimática en unicelulares, iii) existen evidencias químicas que indican que la oxidación del Proto'gen a Proto "in vivo" debe ser enzimática (105).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes Poulson (106) se abocó a la tarea de aislar, purificar y caracterizar la proto-porfirinógeno oxidasa (PPO) de una fracción de membrana de mitocondria de hígado de rata, demostrando así la naturaleza enzimática del pasaje de Proto'gen IX a Proto IX y encontrando además que la enzima involucrada es semejante a la que se encontró previamente en extractos de levadura (107) y se conoce como Proto'gen deshidrogenasa o Proto'gen oxidasa (106, 107). Finalmente la Proto IX se une al  $Fe^{++}$  para dar el producto final HEMO.

- Ferroquelatasa.

a) Generalidades.

El último paso en el camino biosintético del hemo, involucra la quelación del ión ferroso por Proto para dar hemo y puede ser representado por la siguiente ecuación estequiométrica.



Varios trabajos han sugerido que esta reacción ocurre enzimáticamente (14, 108-111) y que bajo las condiciones de ensayo la quelación no enzimática es despreciable, a pesar de ello hay grupos de trabajo que sostienen la naturaleza no enzimática de la misma (112-114) o al menos de parte de ella (115). Cualquiera de las dos hipótesis deben aún ser conclusivamente demostrada.

b) Características de la reacción enzimática.

La protohemo ferro-liasa (E.C. 4.99.1.1) ha sido designada también como: ferroquelatasa (16, 109, 116), hemo sintasa (117) hemo sintetasa (118) o IPCE (iron-protoporphyrin chelating enzyme) (119).

Fue investigada a partir de numerosas fuentes: en eri-

trocitos de ave (108, 111, 120, 121) en hígado de cerdo (109, 110, 115) y de rata (14, 108, 119, 120, 122-125) y en rata se ha estudiado también en homogenato de corazón, riñón, bazo, músculo, médula ósea y mucosa intestinal (116), en homogenato de hígado, bazo, riñón, cerebro, corazón y músculo (125), en médula ósea de perro (126), en mitocondrias de hígado, de riñón y de corazón de conejo (127) en mitocondria de hígado de vaca (114), en plantas de cebada (128), en hojas de lechuga (129); de espinaca (130), en brotes de haba y avena, hojas de espinaca y tubérculo de papa (131), en levaduras (118). Su presencia en microorganismos surgió a raíz de la demostración de la síntesis de protohemo en *Rh. spheroides* (132). Además, el hecho que la Proto podía reemplazar al protohemo como un requerimiento del crecimiento del *Haemophilus influenzae* (133) podía explicarse postulando la existencia de una ferroquelatasa en estos organismos. Varios trabajos posteriores demostraron su presencia en otros microorganismos y estudiaron sus características (110, 117, 127, 134, 135). En cuanto a tejidos humanos se ha investigado en: eritrocitos y reticulocitos (136, 137) cultivo de fibroblastos de piel (138-140) biopsias de hígado. (138).

c) Métodos de determinación.

Los valores encontrados para las distintas constantes físicas y/o químicas, varían mucho, según la fuente enzimática pero también, inclusive, según el medio de incubación, sobre todo teniendo en cuenta que hay muy distintos sistemas para la determinación de la actividad; se han utilizado medios basados en desaparición de sustrato y otros en aparición de producto, y aún dentro de ellos se utilizaron distintas técnicas de determinación. Dentro de los métodos que miden desaparición de sustrato tenemos: a) determinación de velocidad de desaparición de Proto, mediante la medida de la absorbancia en la banda de Soret, durante el curso de la reacción (108, 116, 119, 123, 124), b) usando Meso como sustrato, se hace reaccionar la porfirina remanente al final de la incubación con el reactivo de piridina alcalino de Paul (141) y luego se determina fluorimétricamente a 618 nm, estimulando con irradiación con luz a 500 nm (142), c) determinación de la concentración de las porfirinas remanentes mediante el ensayo espectrofotométrico continuo de longitud de onda dual, ya que existe una correlación entre el cambio en la absorbancia a la longitud de onda del máximo decrecimiento del espectro

y la concentración de porfirinas remanentes (143), d) Goldin y Little (128) informan otros 2 sistemas de determinación: en uno usan Proto y Zn como sustrato y después de incubar 1 hora extraen la Zn- protoporfirina con éter y leen a 404 y 415 nm y en el otro usan el mismo sistema pero incuban 4hs., agregan acetona:  $\text{OHNH}_4$  (9:1, v/v), centrifugan y miden fluorescencia a 585 nm (excitando a 400 nm).

En cuanto a los métodos que miden aparición de producto están: a) el método del piridín hemocromógeno, que es específico para las distintas metaloporfirinas (109, 110, 115, 142) y una modificación del mismo, que agrega iodoacetamida al final de la incubación para evitar la destrucción del hemo formado (128, 142). b) el método isotópico que se basa en la utilización de  $^{59}\text{Fe}$  como sustrato y posterior aislamiento de la hemina radioactiva al final de la incubación, la cual se aísla usando Hb como carrier (14, 109, 119, 120, 123-125, 143). c) recientemente se ha puesto a punto un rápido ensayo espectrofotométrico para la determinación de ferroquelatasa en preparaciones que contienen altas concentraciones de Hb (144), ya que ésta dificulta tanto la medición de desaparición de sustrato como el método del piridín hemocromó-

geno, por consiguiente en esos casos sólo serviría el método de incorporación de  $^{59}\text{Fe}$ , pero ello involucra el aislamiento y purificación del hemo formado hasta actividad específica constante, lo cual es largo y tedioso. El método propuesto por Porra involucra la medida del mesohemo IX formado enzimáticamente desde Meso IX ya que puede ser determinado con precisión en presencia del Protohemo IX endógeno, midiéndolo por el método del piridín hemocromógeno, ya que los picos del espectro, correspondientes a ambas porfirinas, están bien desplazados.

Las principales ventajas y desventajas de los métodos mencionados serían: A) en las mediciones de desaparición de porfirinas: i) los resultados no son afectados por subsecuente degradación del hemo formado, en presencia de tioles, ii) no identifican el hemo formado, iii) sufren interferencia por turbidez y por altas concentraciones de hemoglobina; B) en las determinaciones de hemo: i) simultaneamente se mide e identifica el producto, ii) no requiere purificación del producto, iii) la turbidez no interfiere, iv) el producto es inestable, pero se puede superar esta desventaja utilizando considerables cantidades de catalasas, agregando iodoacetami-

da al final de la reacción o usando bajas concentraciones de GSH.; - en las mediciones de  $^{59}\text{Fe}$ : i) es necesario el aislamiento y purificación del hemo formado, hasta actividad específica constante, lo cual es largo y tedioso; pero no presenta otras desventajas. ii) es sumamente sensible.

d) Localización subcelular.

En cuanto a la localización subcelular, si bien la mayor parte de la actividad siempre ha sido encontrada en mitocondrias, también se ha encontrado en microsomas, sobrenadante de 100.000 xg y núcleo (125) aunque en esta última fracción se supone que es por contaminación durante el fraccionamiento. Nishida y Labbé prácticamente no encontraron actividad en microsomas y sobrenadante (14). Mientras que según los trabajos de Goudy y col. (116) está concentrada en la fracción mitocondrial y ausente en microsomas y encuentran que el 20% de la actividad total del hígado está en el sobrenadante de 100.000 xg.

e) Purificación y propiedades.

Se ha logrado solubilizarla mediante el uso de detergentes tales como: Tween 20 (108, 109, 119, 123, 124, 142),

colato de sodio (120, 122), desoxicolato (119) pero éste interfirió el ensayo espectrofotométrico, Emasol 4130 (110) o digitonina (145). También fueron efectivos para tal fin, los siguientes tratamientos: ultrasonificación (142), shock osmótico (143), homogenización a alta velocidad (14), congelamiento y descongelamiento (114).

En algunos casos se ha logrado purificarla parcialmente: así Minakami (125) solubiliza la enzima obtenida a partir de mitocondrias de hígado de rata, por tratamiento con colato, la precipita con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  50-75%, disuelve en buffer fosfato 1/15 M y dializa toda la noche contra agua. Nishida y Labbé (14) suspenden las mitocondrias en agua, mezclan a alta velocidad por 5 min., centrifugan el sobrenadante así obtenido a 100.000 xg, 30 min., con lo que se clarifica y obtienen una purificación de 4,5 veces. Mientras que Goldin y Little (128) mediante el uso de Sephadex G-150 lograron purificar 30 veces la ferroquelatasa de hojas de cebada. Wagner y col. (146) lograron con Sephadex G-200 purificar la enzima de mitocondrias de hígado de rata a 2,6 veces, con un rendimiento del 70%, resultando una preparación estable por 7 días a 5°C. También se ha tratado de ubicar la locali-

zación submitocondrial de la enzima y los datos aportados hasta el momento indicarían a la membrana mitocondrial interna como el locus de la ferroquelatasa (143, 145).

Aunque en general se cree que sólo una enzima está involucrada en esta reacción, hay datos experimentales que hacen suponer la existencia de más de un tipo de ferroquelatasa, aunque su rol fisiológico es aún incierto (119, 147). Así Schwartz y col. trabajando con preparaciones de eritrocitos de pello han dividido a la enzima en dos preparaciones, lábiles al calentamiento, no dializables, pero una de estas fracciones puede estimular la reacción sin participar en ella como una enzima (147). Por otra parte Porra y Jones (110) realizando estudios de especificidad por el sustrato porfirínico, dedujeron que en *Thiobacillus X* deben existir 2 sistemas de ferroquelatasa, los cuales difieren en su labilidad y en su especificidad por la porfirina: así los extractos de células frescas fueron capaces de sintetizar tanto meso - como monoformildeutero - hemo, pero extractos de células guardadas 3 meses a  $-16^{\circ}\text{C}$  fueron capaces de formar meso-hemo solamente. En el mismo trabajo (110) se demuestra que si bien el Emasol 4130 inhibe la formación de proto-hemo, estimula la de meso-

hemo, esto podría deberse a la presencia de dos enzimas con diferente susceptibilidad al detergente.

Porra y Skyring presentaron en el 1er. congreso Internacional de Porfirinas (148) un trabajo que sugiere la existencia, en *Desulfotomaculum nigrificans*, de dos ferroquelatasas: una ferroquelatasa clásica "dicarboxílica" para la formación de hemos dicarboxílicos del cit b y c y otra ferroquelatasa "octacarboxílica" para insertar  $Fe^{++}$  en tetrapirril octacarboxílicos, tales como Uro III (148).

Labbé y Hubbard han propuesto que la ferroquelatasa es una enzima sulfhidrúlica (119, 123, 128) al encontrar estimulación de la actividad por medio de ácido ascórbico, GSH y compuestos similares que son activantes de grupos sulfhidrilos; aunque no excluyen la posibilidad que uno ó más de ellos puedan tener una función adicional, tal como mantener al hierro reducido, como sugirió Golberg (149).

Sin embargo Goudy y col. (116) como así también Porra y Jones(8) descartan esta posibilidad. El primer grupo sostiene su aseveración basándose en el hecho de que las enzimas sulfhidrúlicas son inactivadas por grupos peróxidos y sensibles a la irradiación (150, 151) mientras que sus resultados del

estudio de esta enzima después de la irradiación "in vivo" e "in vitro" indicarían que la ferroquelatasa no posee grupos sulfhidrilos muy sensibles, aunque también es posible que la enzima esté protegida por otras proteínas durante la irradiación y que además esté espacialmente separada de los peróxidos lipídicos formados en las mitocondrias, durante la incubación al aire. Por su parte Porra y Jones estudiando el efecto del GSH sobre la formación de mesohemo, no encuentran estimulación de la actividad tanto en los ensayos de incubación como en los de preincubación de la enzima sola en presencia de GSH y de ello concluyen que sus intentos por confirmar la naturaleza sulfhidrónica de la enzima fueron inútiles.

Se ha determinado el pH óptimo de la ferroquelatasa, a partir de diversas fuentes, encontrándose los siguientes valores: para la enzima proveniente de hígado de rata: 7 (125), 7,4(14), 8,2(119) y 8,4(120); para la enzima soluble de cebada 8,1 (128).

En cuanto a la de mitocondria de hígado de cerdo Porra y Jones (109) encontraron que la curva de actividad vs. pH presentaba 2 picos, cuyos valores de pH eran 7,8 y 9,0 para la formación de mesohemo y 7,9 y 8,9 para la formación de protohemo; para

eliminar la posibilidad que la actividad incrementada a pH 9,0 pueda deberse al efecto del pH alto sobre la solubilidad de las porfirinas, todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de Emasel 4130, 1% (p/v) y además bajo estas condiciones también se aseguraban de que no ocurriera incorporación no enzimática. Teniendo en cuenta que entre pH 7,8 y 9,0 los carboxilos de Meso y Proto están completamente ionizados mientras que los nitrógenos del pirrol permanecen completamente no ionizados (152) parece improbable que los picos asimétricos de la curva de pH sean debidos al comportamiento de ionización de las porfirinas, y ellos se inclinarían a explicarlo mediante la existencia de 2 enzimas que poseen diferente pH óptimo. Por su parte Jones (141) también encontró 2 picos en la curva de pH de ferroquelatasa de cloroplastos de espinaca, siendo sus valores 7,5 y 8,0, y 9,0 y 9,5 para el 1er. y 2do. pico en la formación de proto y meso-hemo respectivamente; aquí también propone que el 2do. máximo puede deberse a la presencia de 2 enzimas de especificidades distintas o a la presencia de un grupo ionizable de alto pK, por ejemplo el hidroxilo de la tirosina, cerca del sitio activo de la enzima; o, como sugiere Phillips (153) esto podría re-

flejar la existencia de dos caminos de reacción diferente para la misma enzima. El menor pH óptimo podría estar ligado al mecanismo de incorporación del ión metálico, con una subsecuente disociación de  $2H^+$  y el pH óptimo mayor a un mecanismo en el cual se pierden los 2 protones, desde el N central y luego el anión porfirínico resultante reacciona con el catión metálico.

Por último en las experiencias de actividad en función de pH, realizadas con mitocondrias de hígado de vaca, no se observó relación entre ambos valores, en el rango 7,4 a 8,8 (114).

Los  $K_m$  aparentes, informados, para la incorporación de distintos sustratos metálicos son: a) de  $Fe^{++}$  en Proto, en mitocondrias de hígado de cerdo  $60 \mu M$  (120), en mitocondrias de hígado de rata  $20 \mu M$  (108),  $59 \mu M$  (154) y  $126$  y  $22 \mu M$  en presencia de GSH ó ácido ascórbico respectivamente (146),  $8 \mu M$  en cloroplastos de espinaca; b) de  $Fe^{++}$  en "Meso"  $36 \mu M$  en cloroplastos de espinaca (130) y  $62 \mu M$  en hojas de cebada (128); c) de  $Zn^{++}$  en Proto  $40 \mu M$  en Rh. spheroides (127) y  $51 \mu M$  en hojas de cebada (128).

En cuanto al  $K_m$  aparente respecto del sustrato porfi-

rínico fue: a)  $\text{Fe}^{++}$  en Proto  $0,2 \mu\text{M}$  en cloroplastos de espinaca (130),  $100 \mu\text{M}$  en mitocondrias de hígado de cerdo (120); b)  $\text{Zn}^{++}$  en Proto  $200 \mu\text{M}$  (127) y  $10 \mu\text{M}$  (128); c)  $\text{Fe}^{++}$  en Meso  $0,4 \mu\text{M}$  (130) y  $25 \mu\text{M}$  (128).

f) Especificidad de la enzima hacia sus sustratos.

Muchos trabajos se han realizado acerca de la especificidad de la enzima por sus sustratos y en general se acepta que es mucho más específica para el ión metálico que para el sustrato porfirínico; lo cual es lógico que así sea, ya que en la célula la enzima puede estar rodeada de diversos iones en cambio es poca la diversidad de las porfirinas presentes (en general sólo Proto).

Ampliando estos estudios preliminares Nishida y Labbé(14) puntualizaron que los hallazgos de que el Uro'gen es un precursor del hemo (7) y que el Copro'gen puede quelar hierro para formar coprohemo (154) indicarían la existencia de Proto'gen (Proto reducida), la cual posiblemente podría ser un precursor del hemo. Pero años más tarde Porra y Jones (109) demostraron la incapacidad de la ferroquelatasa para utilizar Proto'gen y de ello sugieren que ésta es la la. reacción en

la biosíntesis del hemo que usa una porfirina como sustrato. También informan que se han presentado evidencias (109) de que las mitocondrias de hígado contienen Proto'gen oxidasas. Nishida y Labbé (14) también demostraron la incapacidad de la enzima solubilizada para pasar Proto'gen a hemo, pero en cambio informaron que en presencia de homogenato de hígado, al aire, esta transformación ocurre, mientras que bajo  $N_2$  el Proto'gen en un 20-40% es menos efectivo que la Proto como sustrato. Estos resultados indican una posible oxidación enzimática del Proto'gen por una enzima presente en homogenato pero grandemente disminuída en las mitocondrias, o como sugieren Porra y Jones (109) sería posible que por un proceso oxidativo secundario, en estas preparaciones crudas, se mantengan condiciones anaeróbicas alrededor de la inserción del Fe. Por su parte Neuberger y Tait (127) si bien encontraron incorporación de Proto'gen, informaron que éste fue completamente inactivo en presencia de ácido ascórbico, quizás, porque este último inhibe la oxidación del Proto'gen a Proto, que es el verdadero sustrato.

Respecto a la especificidad por el sustrato porfirínico en sí, hay también numerosos trabajos y cierta relación estruc-

tura-afinidad ha podido establecerse en algunos casos. Labbé y col. (124), trabajando con hígado de rata, encontraron que:

- 1) los grupos vinilo en posición 2 y 4, como en la Proto, no fueron esenciales para que la porfirina fuera sustrato,
- 2) introducción de sustituyentes que quitan electrones, como en la 2,4 dibromodeutero y 2,4 diacetildeutero porfirina (DAD) o de un voluminoso grupo, ácido propiónico, como en la Copro, disminuyen o previenen completamente la utilización de la misma,
- 3) grupos carboxilos libres sobre cadenas laterales de ácido propiónico en posición 6 y 7 fueron esenciales para que sirvan como sustrato,
- 4) las porfirinas que fueron alteradas en las posiciones 2 y 4 solamente (Copro, DAD y 2,4-bis (2-carboxilciclopropildeutero)) no fueron utilizadas, quizás por un efecto estérico que interfiere con la unión a la enzima; la Uro tampoco fue sustrato,
- 5) cinco porfirinas que tenían el grupo carboxilo sobre la cadena propiónica en 6 y 7 bloqueada tampoco lo fueron,
- 6) el Proto'gen fue utilizado a una velocidad mucho menor que la Proto. De todas estas observaciones concluyen que: el carácter electrodonante o que quita electrones de los sustituyentes periféricos y que afectan la basicidad del nitrógeno porfirínico (144, 152) pueden influir

sobre la velocidad de incorporación del hierro y en general la disminuyen más cuanto mayor es el valor de  $pK_3$ , sin embargo las velocidades relativas de Deutero y Meso, no siguen tal correlación, pero puede ser por un efecto estérico adverso, de los grupos etilo de la Meso respecto de los hidrógenos de la Deutero. El bloqueo del grupo propiónico podría resultar en una incapacidad de las porfirinas para unirse a la enzima, pero también podría afectar su solubilidad en agua, por lo cual, permanecerían como una micela en Tween-20 y no estarían disponibles a la enzima.

Porra y Jones (110) trabajando con mitocondrias de hígado de cerdo, llegaron a las siguientes conclusiones: 1) solamente las porfirinas dicarboxílicas fueron convertidas en hemo, pero no todos los compuestos dicarboxílicos ensayados fueron sustrato (por ej.: diformildeuteroporfirina y porfirina a) 2) la pirroporfirina XV, que tiene sólo una cadena lateral propiónica, dió resultados negativos, 3) las porfirinas tetracarboxílicas también dieron resultados negativos (Copro y porfirina c) como así también los dimetil éster de Meso y Deutero 4) la Meso I dió Meso-hemo; por consiguiente la agrupación vecinal de las cadenas laterales propiónicas no sería esencial

para la incorporación enzimática; pero el examen de modelos moleculares muestra que los grupos carboxilo de las series I y III pueden ser orientados para ocupar igual relación espacial. La electronegatividad creciente de los sustituyentes de la periferia del anillo porfirínico aumenta la carga positiva en el centro y disminuye la tendencia a formar complejos con los iones metálicos. En este trabajo, a diferencia del anterior (124) no encuentran una correlación entre  $pK_3$  y la formación enzimática de hemo, lo cual indicaría, según los autores, que otros factores están involucrados en la formación del hemo por extractos de hígado de cerdo; uno de estos podría ser la presencia de dos o más enzimas (109).

En cuanto al sustrato metálico: el  $Fe^{++}$  es considerado el sustrato natural de la enzima (109, 155) no así el  $Fe^{+++}$ , que no es incorporado al anillo porfirínico, salvo en presencia de un agente reductor (14, 108, 109, 123, 130) lo que es favorecido por condiciones anaeróbicas (14, 109), de aquí que el rol del GSH sobre la actividad, observado por varios investigadores (14, 113, 119, 123, 128, 142) pueda deberse no a la protección de grupos sulfhidrilos esenciales de la enzima sino a la capacidad del GSH para mantener al hierro al estado ferroso,

bajo condiciones que no son estrictamente anaeróbicas (109, 114, 128, 149) y ésta también puede ser la causa de la sensibilidad al  $O_2$  (109, 130).

Según Labbé y Hubbard (123) el  $Co^{++}$  se comporta de manera muy semejante al  $Fe^{++}$  y experiencias de dilución isotópica indican que el  $Co^{++}$  fue utilizado no selectivamente por la enzima proveniente de mitocondrias de hígado de rata, vía el mismo mecanismo biosintético que el  $Fe^{++}$  mientras que el  $Mn^{++}$  a bajas concentraciones fue incorporado solo trazas a mayores concentraciones fue inhibidor no competitivo respecto del  $Fe^{++}$ , no atacando aparentemente los grupos  $-SH$ . El  $Sn^{++}$  no fue sustrato, mientras que otros metales fueron inhibidores.

g) Efectores y cofactores.

Se ha probado también el efecto de distintos metales, actuando no ya como sustratos de la enzima, sino en cuanto a su efecto sobre la actividad específica, encontrándose que: el  $Mn^{++}$   $5 \times 10^{-5}$  M produce una inhibición del 53% (123), igualmente fueron inhibitorios  $Sn^{++}$  y  $Mg^{++}$  mientras que el  $Ni^{++}$  y el  $Cu^{++}$  parecen formar sales metálicas de la Proto antes

que quelatos . Neuberger y Tait (127) informaron al  $Zn^{++}$  como un inhibidor no competitivo de la ferroquelatasa de Rh. spheroides.

Un estudio más exhaustivo sobre el tema fue llevado a cabo por Wagner y Tephly (154) quienes encontraron que los elementos alcalinos probados ( $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ ) no produjeron inhibición apreciable; los metales pesados ( $Pb^{++}$  y  $Cd^{++}$ ) produjeron inhibición aunque menor que la producida por los metales de transición ( $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ); mientras que el  $Cu^{++}$  aumentaba la actividad. También se ha informado que altas concentraciones de  $Fe^{++}$  inhiben la reacción enzimática, probablemente a través de una reacción con los grupos sulfhidrilos (123). Más recientemente Wagner y col. (146) continuando sus estudios al respecto encontraron que el  $Cu^{++}$  permitía recuperar la actividad perdida al dializar, lo cual parecería estar en desacuerdo con otros trabajos (123, 156) que mostraron que el  $Cu^{++}$  es un inhibidor de la ferroquelatasa; pero estos autores piensan que la divergencia podría explicarse por ciertas diferencias experimentales, tales como la no inclusión de GSH en el medio de incubación, ya que este último compuesto es importante en el efecto restaurador del

$\text{Cu}^{++}$  sobre la ferroquelatasa; así también son efectivos para tal fin otros agentes reductores de grupos  $-\text{SH}$ , tales como mercaptoetanol. También probaron el efecto del Co, Zn y Mn, encontrando que todos ellos disminuyen considerablemente la actividad, siendo la respuesta dependiente de la concentración del metal. Proponen por lo tanto que los metales a través de su inhibición de la ferroquelatasa, pueden proveer un posible control sobre la biosíntesis del hemo.

En cuanto a otros efectores, se ha demostrado que los lípidos activan la inserción del metal (157), como así también la globina (158).

Para estudiar el requerimiento de cofactores Labbé y Hubbard (119) probaron el efecto de: citrato, adenosina, inosina, timidina y vit B-12, pero todos ellos fueron no-estimulatorios. La adición de enzima calentada no tuvo efecto. El NADP al igual que el ácido ascórbico estimuló la incorporación pero a una concentración 100 veces menor que este último. Mientras que agentes que se unen a metales, tales como  $\text{CN}^-$   $2,5 \times 10^{-2}\text{M}$ , BAL  $8 \times 10^{-3}\text{M}$  y EDTA a una concentración menor que  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  fueron inhibitorios. La bilirrubina inhibió, al menos en parte, por competición con la Proto (159).

Fué inhibida también por los reactivos alquilantes iodoacetato e iodoacetamida y por un reactivo capaz de formar mercáptidos, el PCMB, mientras que el BAL, que comunmente es utilizado como activador de grupos sulfhidrilos, fue un potente inhibidor de la enzima. Por otra parte, Porra y col (142) encontraron que agentes reductores, tales como GSH, cisteína y ácido ascórbico producían disminución del producto formado, y al mismo tiempo demostraron que producían destrucción del anillo tetrapirrólico, ya que la banda Soret, común a hemos y porfirinas, estuvo ausente al completarse la reacción. La catalasa inhibe esta destrucción de hemos y quizás a esto se deba la diferencia con respecto a los resultados de Oyama y col. (111) y Yoneyama y col. (122), pues sus preparaciones podrían tener altas concentraciones de catalasas; la acción protectora de estas últimas sugiere que la destrucción aeróbica de hemo libre en presencia de tioles involucra peróxidos libres. Por otra parte la actividad ferroquelatasa fué inactivada por oxígeno y GSSG (agente oxidante) y, por consiguiente, activada por incubación bajo  $N_2$  (14), por GSH, homocisteína (o cisteína) y por ácido ascórbico.

Nishida y Labbé (14) probaron que el NAD y NADH incre-

mentaban 4-6 veces la actividad y el 1º inclusive restaura la actividad disminuída de preparaciones enzimáticas guardadas. El NADP y NADPH son menos activos. La histidina aumentó 50 a 100% la actividad y el FAD actuó en forma semejante, pero no dan demasiado significado a esta pequeña estimulación pues trabajan con enzima impura. El ATP, ergotionina, cisteína y glucosamina no tuvieron efecto.

El requerimiento de condiciones anaeróbicas (14, 109, 113) y el efecto estimulante del GSH sobre la formación por extractos celulares puede interpretarse en términos de la especificidad por  $Fe^{++}$ . El  $Fe^{++}$  es rápidamente oxidado en soluciones acuosas a pH neutro y alcalino tales que condiciones aeróbicas puede esperarse que resulten en una completa inhibición de la formación de hemo (113). En el mismo trabajo se menciona que la menor velocidad de formación bajo condiciones anaeróbicas en ausencia de GSH, puede deberse a que el GSH es también un ligando, el cual puede acomplejar al  $Fe^{++}$ , entonces la concentración de Fe disminuye y en consecuencia la velocidad de formación de hemo también. Sin embargo, Porra y col. años más tarde (142) dice que el efecto del oxígeno sobre la formación de hemo por ferroquelatasa, ana-

lizado mediante el método del piridín hemocromógeno puede reflejar una total destrucción del hemo recientemente formado antes que una inhibición por  $O_2$ . Para probar esta hipótesis analizaron espectrofotométricamente la simultánea desaparición de porfirinas y encontraron que el  $O_2$  causa los 2 efectos o sea la inhibición de la actividad enzimática y la destrucción del producto formado y proponen 3 posibles causas inhibitorias: 1) inactivación de la enzima por oxidación de grupos tioles esenciales, 2) oxidación del  $Fe^{++}$  a  $Fe^{+++}$  (120), 3) efecto indirecto a través de la producción de peróxidos, los cuales, de acuerdo a Mazanovska y col. (160) puede oxidar una fracción lipídica esencial para la actividad enzimática.

El efecto de los lípidos sobre actividad ferroquelatasa también fué mencionado por Jones (145), quien al trabajar con polvos cetónicos de cloroplastos de espinaca, a veces no encontraba actividad decía que podía deberse a la remoción de algunos lípidos necesarios para la actividad máxima.

#### h) Mecanismo de acción.

Acerca del mecanismo de reacción: Labbé y Hubbard (123) postularon que la enzima podría activar a la Proto para fa-

cilitar la entrada del metal, pero si esto fuera así podría esperarse numerosas metaloporfirinas como producto; como esto no ocurre es más plausible que la Proto se una a un sitio de la enzima y el  $\text{Fe}^{++}$  (o  $\text{Co}^{++}$ , que actúa en forma semejante) se una a un 2º sitio. La alta especificidad exhibida por la enzima indica que el producto es un quelato antes que un complejo unido al metal.

Eriksen (161), estudiando la síntesis de Hb en reticulocitos, ha postulado 2 formas de Proto en eritrocitos: "Proto libre" y "Proto unida". La "Proto unida" es formada a partir de la "libre" y la la. sería el inmediato precursor del hemo, tratándose de un complejo de globina y Proto y el Fe sería incorporado a ese complejo directamente. En cambio Minakami (125) sugiere la existencia de otro proceso, el cual sigue a la incorporación de Fe, que es la transferencia del grupo hemo; ya que la fracción 50-75% saturación  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (obtenida durante el procedimiento de purificación de la enzima) incorpora  $^{59}\text{Fe}$  en hemo y causa formación del complejo hemo-proteína; pudiendo la apoproteína ser transferida desde aquí a las enzimas hémicas cit b, catalasas y otras hemoproteínas (salvo cit. c).

Nishida y Labbé (14) para determinar si la Proto pasaba a compuestos intermediarios antes de quelar al Fe, hicieron experiencias de preincubación, en los que la enzima con y sin porfirina fué incubada una hora antes de la adición de  $^{59}\text{Fe}$ , resultando con enzima y Proto una velocidad acelerada de incorporación de hierro durante los primeros 30 min, que siguieron a la adición del metal, después de lo cual la velocidad era paralela a la del ensayo en que se había preincubado la enzima sola. La diferencia da una idea de la existencia de un intermediario y una indicación de la cantidad que aparentemente se formó. Ambos sistemas presentaron un lag, lo cual podría indicar que el Fe no puede ser quelado directamente como ión ferroso sino que antes debe pasar a través de uno ó más procesos controlados enzimáticamente. Esta podría ser una secuencia lógica de eventos para prevenir la quelación no específica de otros iones metálicos por el anillo porfirina. Además, preincubaciones en ausencia de DPN, resultan en sólo 1/4 de tal acumulación de intermediario. Aunque los datos presentados no establecen el sitio de incorporación de hierro, sugieren que puede ocurrir después de la unión de Proto.

Labbé y Nielsen (162) citan que la enzima tiene un pico

a 411 nm que se corresponde con el que presenta la base de Schiff formada sintéticamente con PPy más glicina, esto sugeriría que dicho compuesto puede tener un rol funcional en la ferroquelatasa. La adición de PPy a la enzima aumenta la absorbancia a 411 nm, pero no tuvo efecto hasta una concentración  $10^{-5}$  M, por encima de la cual la ferroquelatasa fué inhibida. Informan también que varios compuestos reactivos aldehidos (isoniazida, semicarbazida, fenilhidrazina y borohidru-ro) disminuyen pero no eliminan el pico a 411 nm de la enzima, lo cual sugeriría que si el PPy es un grupo funcional, él está protegido por el medio ambiente del sitio activo.

Por otra parte los animales mantenidos con dietas deficientes en piridoxina no presentan cambios en la actividad ferroquelatasa ni en la concentración de Proto en el hígado pero los ratones en particular tuvieron actividad ferroquelatasa disminuída. Sobre la base de algunos hallazgos de laboratorio, uno podría concluir que la deficiencia en PPy causa una alteración en el transporte de Fe; sin embargo estos cambios podrían ser secundarios a la inhibición de su incorporación en hemo.

Ya que todas las funciones del PPy involucran la quela-

ción de metales bivalentes por la coenzima y el hierro al estado ferroso es útil para la ferroquelatasa, el PPy tienen las propiedades justas para operar en el sitio de unión del hierro.

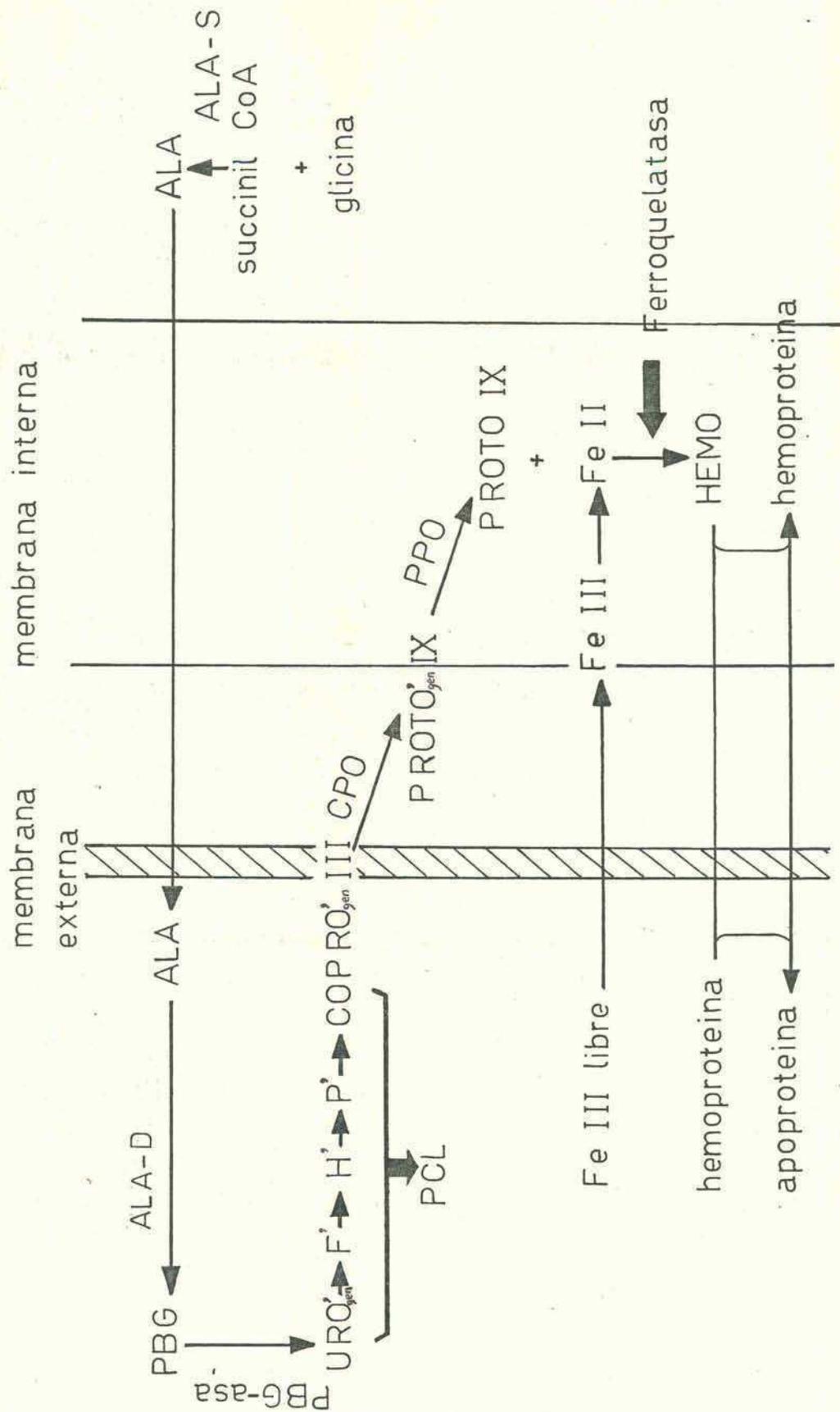
- Localización de las enzimas involucradas.

Considerando el proceso metabólico total, puede verse que se requiere oxígeno en dos puntos del mismo: por una parte en la formación de succinil - CoA y por otra en la decarboxilación oxidativa de Copro'gen a Prote. Estos procesos por consiguiente ocurren en la mitocondria, al igual que el pasaje a producto final HEMO, mientras que los restantes son citoplasmáticos. Aunque recientemente Saez de Cordova y col. (163) han encontrado en citosol todas las enzimas necesarias para la síntesis de hemo c desde  $\delta$ ALA y para su unión a un pequeño pool de apoproteína c sintetizado por polirribosomas libres.

Se han realizado numerosos estudios de localización subcelular (162, 86, 163-165) y submitocendrial (99, 114', 143, 166) de las distintas enzimas involucradas en este camino metabólico. En la fig. 15 puede verse el esquema propuesto por Romslo y col. (114'), basado en los hallazgos realizados hasta el momento.

114' Romslo Z, Busby P, Ulvik R y Koller M; "Dev. Bioenerg. Biomembrane (Elsevier North Holland) Funct. Mol. Aspects Biomembr. Transp. (1979) 441

Fig 15 Localización subcelular de las enzimas del camino metabólico del hemo

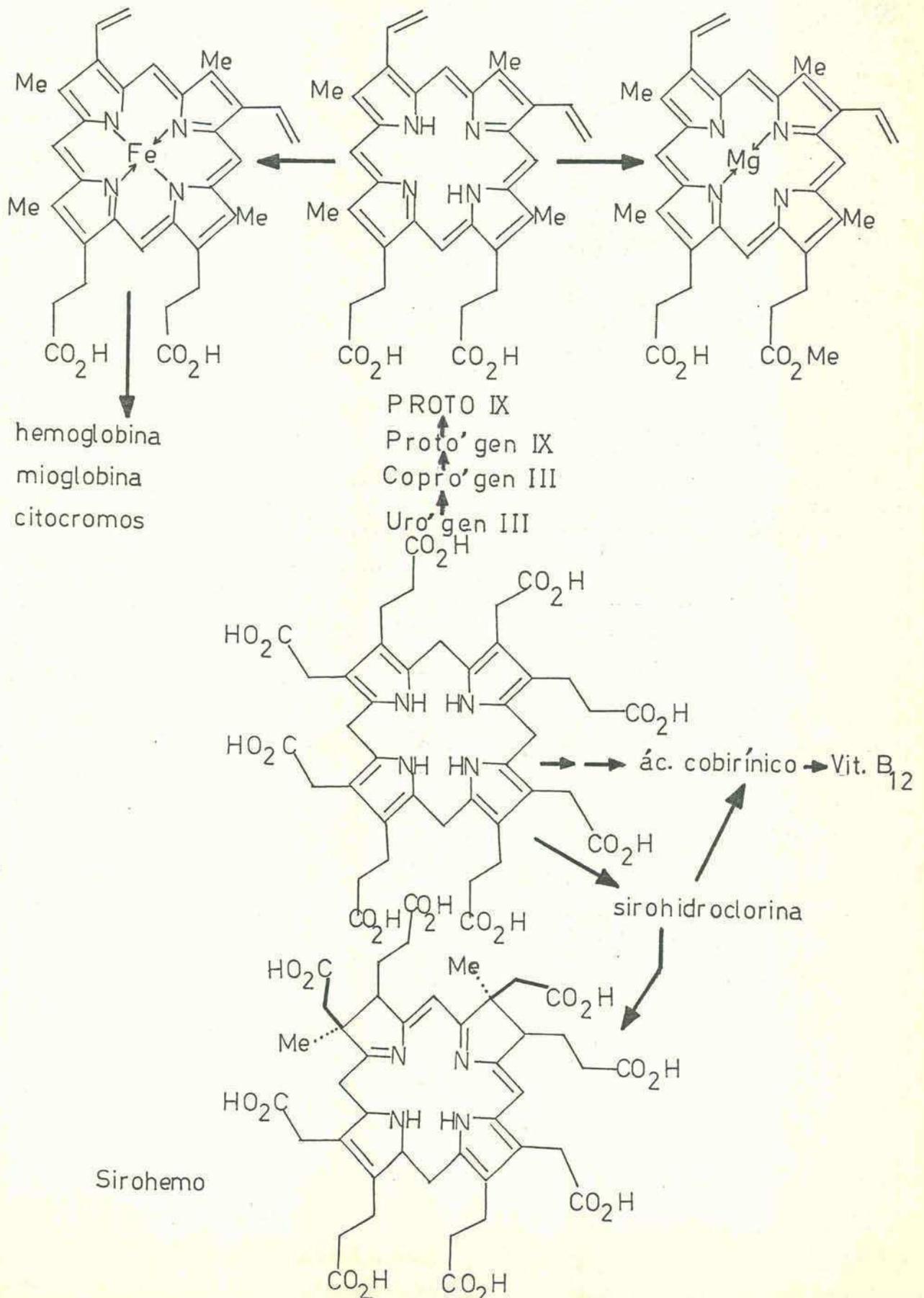


- Interrelación con otros caminos metabólicos.

Este camino principal está relacionado con otros laterales que llevan a la síntesis de compuestos muy importantes como puede verse en la fig. 16. Los desvíos hacia clorofilas y hemoglobinas se conocen desde muchos años atrás, en cambio recientemente ha sido descubierto un segundo camino, que opera en ciertas bacterias, levaduras y espinaca, a través del cual el Uro'gen III se convierte en sirohemo, el grupo prostético de varias sulfito y nitrito reductasas. El sirohemo a su vez parece derivar de la sirohidroclorina, que es precursora del ácido cobirínico y a través de él, de la vitamina B 12 (167-170).

Hasta aquí se ha descrito el camino normal de la biosíntesis del hemo, pero en casos patológicos, conocidos con el nombre de "porfiria", que puede presentarse tanto en el hombre como en animales y que tienen diversos orígenes y exteriorizaciones, se producen disturbios metabólicos que alteran este camino y llevan a una excreción y/o acumulación de algunos precursores o intermediarios del mismo, o también suele adquirir en ellos especial importancia la síntesis de los compuestos de la serie isomérica I, que en casos normales se

Fig 16 Interrelación del camino metabólico del hemo con otras vías metabólicas



considera un camino lateral y de menor importancia.

- Los porfirinógenos como verdaderos intermediarios.

Si bien hemos citado dos procesos netamente oxidativos en el camino biosintético del hemo, hay otros dos en los que es indispensable la existencia de sustratos al estado reducido, tal es el caso de los porfirinógenos, tanto aquellos sobre los que actúa la decarboxilasa como así también el Copro'gen, el sustrato de la coprogenasa.

En un principio se creyó que las porfirinas eran los sustratos de estas dos enzimas (90, 91, 171) pero numerosos hechos experimentales descartaron esta hipótesis, indicando que los porfirinógenos son los verdaderos intermediarios (7, 8, 11, 12, 69, 88, 90, 93, 97).

PORFIRIAS.

- Generalidades.

Como ya se mencionó anteriormente, las porfirias son enfermedades provocadas por alteraciones en el camino biosintético del hemo y que causan acumulación y/o excreción incremen-

tada de porfirinas o de sus precursores.

Años atrás se creía que el aumento en la actividad ALA-S constituía la alteración primaria, en los distintos tipos de porfiria; sin embargo, si éste fuera el único disturbio a nivel enzimático, no bastaría para justificar las distintas alteraciones observadas a nivel bioquímico. Actualmente se cree, por el contrario, que el aumento en la actividad ALA-S no es causa sino consecuencia de otras alteraciones e inclusive ya se han determinado los defectos enzimáticos que caracterizan a cada tipo de porfiria.

#### - Clasificación.

En cuanto a la clasificación de las porfirias, hay gran diversidad de opiniones al respecto. Nacht en 1963 recogió y analizó críticamente las distintas proposiciones que había hasta el momento (171). Pero desde entonces han seguido apareciendo numerosos trabajos, pudiendo mencionarse entre muchos otros los de Grinstein (172), Romeo (173), Saraceno (174), etc.

En la tabla II se da una clasificación general, indicando a su derecha alguna de las características principales de las distintas porfirias. Cabe aclarar aquí que la protoporfiria eri-

TABLA II		C A R A C T E R I S T I C A S		Q U I M I C A S	
TIPO DE PORFIRIA		GENERALES			
CONGENITA (CEP)	SINONIMIA				
ERITROPOYETINICA	Enfermedad de Gunther	Médula ósea. Recessiva. No ligada al sexo. Se inicia en el nacimiento.	Esplenomegalia, Dientes y huesos rojos. Anemia hemolítica. Fotosensibilidad, Mutilación. Alopecia cicatrizal. Hipertrofia.	Orina: Predominio de Uro I (80%) y Copro I. Heces: Predominio de Copro I y Uro I. Eritrocitos, Copro I y Proto.	
COPROPORFIRIA ERITROPOYETINICA (CE)	Coproporfirinemia,	Dominante. En menores de 10 años.	Fotosensibilidad: Eritema, Edema, prurito, ardor.	Eritrocitos: aumento de porfirinas con predominio de Copro III. Heces y orina: excreción normal.	
PROTOPORFIRIA (PP)	Eritrohepatia.	Dominante. En infancia.	Náuseas y cefaleas: Cirrosis, Anemia normocromica microcítica, Ardor, eritema, edema, cicatriz.	Heces: Proto. Orina: contenido normal de porfirinas. Eritrocitos y plasma Protoporfirinas.	
VARIEGATA (PV)	Mixta. Genética Sudafricana. Protocoproporfiria cutánea hereditaria.	Genética dominante. Factores pituitarios. Más frecuente en mujeres 30 años.	Ataques agudos abdominales, neurológicos, psicóticos y cardiovasculares. Desencadenados fundamentalmente por la ingestión de ciertos fármacos: barbitúricos, sulfamidas, estrógenos, etc.	Heces: Principalmente Proto y Copro. Orina: ALA y PBG (en ataque agudo) luego disminuye; Uro y Copro. En todos: dipéptidos porfirinas	
AGUDA INTERMITENTE (PAI)	Genética sueca. Piroloporfiria.	Genética dominante. Factores pituitarios. Ppalmente en sexo femenino.	Igual PV Parálisis	Orina: excreción de $\delta$ ALA y PBG y cantidades menores de porfirinas (ppalmente Uro y Copro). Heces: porfirinas de 7-, 6- y 5-COOHy Proto.	
COPROPORFIRIA HEREDITARIA (CH)	Coproporfirinuria idiopática.	Genética dominante. Factores pituitarios ocurren en cualquier edad en ambos sexos.	Ataques agudos abdominales y/o nerviosos desencadenados por barbitúricos, anticonvulsivantes y varios tranquilizantes. Fotosensibilidad en el 30% de los casos.	Orina: ALA, PBG, Uro y Copro. Heces: Ppalmente Copro, Proto. (X).	
CUTANEA TARDA (PCT)	Sintomática	Idiosincrática. Adquirida probablemente dicha. Hay predisposición genética. Predominio en hombre de $\approx$ 50 años.	Ampollas. Erosiones; Alopecia, Hipertrofia. Pigmentación, Hepatopatías de diverso grado. Fotosensibilización a medicamentos.	Orina: Uro (60-80% y serie III) Firia y trazos de 5- y 6- y 4-COOH. La mayor acumulación de Firia en orina, hígado y plasma es la característica ppal. Heces: serie isocopro.	

tropoyética a veces se incluye en las porfirias hepáticas, ya que el hígado también se ve afectado en estos casos. En la fig. 17 se ven los principales disturbios enzimáticos involucrados. (18, 175).

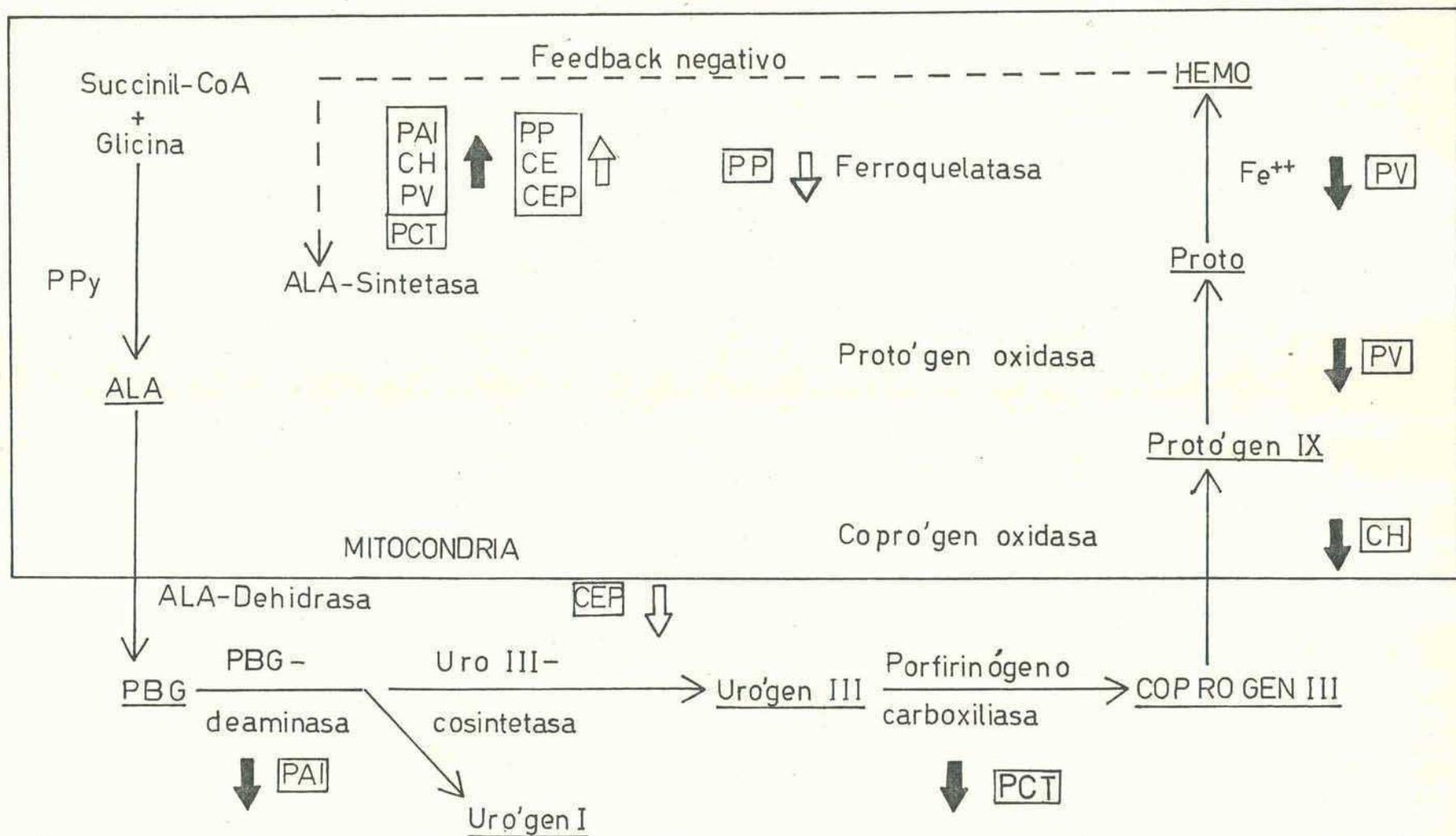
Dentro de las drogas inductoras de porfiria podemos citar: Sedormid (alil-isopropil acetilurea), barbitúricos, AIA (alil isopropilacetamida), colidinas, griseofulvina, por nombrar los más empleados en trabajos experimentales. Todas estas drogas producen un tipo de porfiria semejante a la PAH, existiendo una gran bibliografía al respecto (176-180).

#### - Porfiria por HCB.

##### a) Antecedentes.

Hasta 1956 no se conocía ninguna droga que produjese una porfiria semejante a la PCT humana, que se caracteriza por una excreción elevada de porfirinas de 4 a 8-COOH. En ese año aparecieron enfermos en el sudeste de Turquía, con los mismos rasgos clínicos y químicos de la PCT (181-183) y luego se demostró que se trataba de una porfiria adquirida a causa de la ingestión de productos fabricados con semillas de trigo tratadas con hexaclorobenceno (HCB).

Fig.17 Biosíntesis del hemo y sitios de parciales bloqueos en porfirias



Las flechas llenas indican incremento o decremento en la actividad enzimática en porfirias hepáticas.

Las flechas vacías indican incremento o decremento en la actividad en porfirias eritropoyéticas.

Ockner y Schmid (182, 184) fueron los primeros en administrar esta droga a ratas logrando producirles porfiria experimental, confirmando con ello los efectos tóxicos de la misma. Más tarde numerosos grupos la utilizaron como droga porfirinogénica, sobre distintos sistemas biológicos: ratas (5, 74-76, 185); cultivos de células hepáticas de embrión de pollo (41, 186); cobayos, conejos y ratones (187) y pájaros (188).

b) Principales características.

Esta droga produce en animales: síndrome cutáneo (187), elevada excreción de porfirinas de 4 a 8-COOH en orina, principalmente de la serie III, con predominio de Uro ( $\approx 50\%$ ) (187-189), acumulación de porfirinas en hígado (184, 187, 189-191), siendo exclusivamente Uro III y Firia III (75, 189) en forma semejante a lo que ocurre en PCT humana, en la que se observó acumulación hepática de porfirinas altamente carboxiladas (192), pero difiere de ésta en que los animales intoxicados por HCB presentan síntomas neurológicos (187, 190) ausentes en humanos con PCT.

También se ha comprobado un aumento de porfirinas en riñón, causado por intoxicación con HCB (75, 190); sólo un leve incremento fue observado en bazo (75) mientras que no

hubo alteraciones a nivel de eritrocitos (75).

c) Alteraciones a nivel enzimático y en la concentración de hemoproteínas microsomales.

Se han realizado estudios tendientes a visualizar el efecto del HCB sobre las enzimas del camino metabólico del hemo, como así también sobre la excreción de los intermediarios del mismo. Además teniendo en cuenta que en éste, como en los demás casos de porfiria, se encuentran elevados niveles de ALA-S y que el  $\delta$ -ALA es el precursor inicial de la mitad hémica de los citocromos microsomales, varios autores han estudiado los niveles de estos últimos con el objeto de relacionarlos con la actividad ALA-S. El citocromo P-450, en particular, es la oxidasa terminal del sistema oxigenasa de función mixta hepática, la cual está involucrada en la biotransformación de HCB y otros xenobióticos (193) por esa causa es una de las hemoproteínas microsomales más estudiadas en relación a la porfiria por HCB.

Wada y col. (194) estudiando, en hígado de ratón, el efecto del HCB, junto al de otros compuestos inductores de porfiria y de drogas que precipitan ataques agudos en porfiria hepática humana, encontraron que el HCB incrementa

aproximadamente 2.5 veces las actividades ALA-S y N-demetilasa (enzima relacionada al sistema detoxificante de drogas); el citocromo  $b_5$  sólo duplicó su nivel, en tanto que el citocromo P-450 llegó a triplicar el valor control. Los autores proponen que sus resultados indicarían que los compuestos inductores de porfiria pueden bloquear en algún punto, parcialmente o casi completamente, el camino que va desde la formación de hemo hasta la utilización del mismo en la síntesis de citocromos microsomales y un mecanismo de inducción de ALA-S por disminución del producto final, actuaría para proveer mas hemo. Mientras que la acumulación de porfirinas, que ellos también encontraron en hígado, resultaría de la diferencia entre la magnitud de formación de ALA y la de utilización de Proto, aunque no descartan la posibilidad de que el medio óxido-reductor del hígado pueda jugar un papel importante tanto en la excreción como en la acumulación de porfirinas, al menos en ciertos tipos de porfiria.

Por su parte Rajamanickam y col. (195) estudiaron los niveles de ALA-S, ALA-D y de los intermediarios de la biosíntesis de porfirinas (ALA, PBG, Uro y Copro). Ellos también encuentran un incremento de 2 veces en ALA-S pero piensan,

basándose en determinaciones de la velocidad de degradación de ALA-S, que el aumento podría deberse a una disminución en la velocidad de degradación antes que a un aumento en la velocidad de síntesis. Los restantes parámetros serán analizados en el tópico siguiente.

Más recientemente San Martín de Viale y col. (196) encontraron, trabajando también con hígado de ratas intoxicadas con HCB, que esta droga activa las enzimas del camino metabólico del hemo, en el siguiente orden: PBG-asa > ALA-D > > ALA-S, lo cual, según los autores, explicaría el bajo contenido en precursores y la gran acumulación y excreción de porfirinas en este tipo de porfiria. También trabajando con animales castrados al intoxicarlos con HCB encontraron activación de ALA-D y PBG-asa, aunque menor que la que había provocado la droga a los animales normales (en ambos casos respecto de la actividad de animales no tratados); por consiguiente sacaron como conclusión que las hormonas sexuales desempeñan un papel importante en la acción del HCB, hecho que ellos mismos confirmaron ya que al administrar hormonas a los animales castrados y someterlos al tratamiento con HCB, los niveles enzimáticos aumentaron considerablemente. Sobre

las bases de que el HCB podría actuar a través de esteroides libres, según el esquema de Kappas y Granick (197), midieron también la glucuroniltransferasa y encontraron incremento de la misma, ambos hechos serían compatibles suponiendo que la síntesis de esteroides está aumentada en mayor grado que su transferencia a glucurónido inactivo; esta hipótesis está apoyada por los hallazgos de Wada y col. (198) quienes encontraron, en porfiria por HCB, un aumento en la síntesis de colesterol, el precursor de los esteroides.

d) Desarrollo en función del tiempo de intoxicación.

Se observa una coproporfirinuria, en las primeras semanas, que aumenta progresivamente con el tiempo de intoxicación, con un concomitante incremento de Uro (187). También hay una acumulación progresiva de Uro en hígado, mientras que Copro y Proto lo hacen en menor grado (187, 191, 195), aunque Gajdos y Gajdos Török (199) informan en hígado y riñón mayor cantidad de Copro que de Uro. Elevados niveles de ALA se encuentran en orina desde la 1er. semana de tratamiento mientras que PBG recién se incrementa a la tercer semana. Similares resultados encontró De Matteis (187) con un gran incremento en la excreción final de PBG.

En cuanto al efecto sobre ALA-S y proteínas microsoma-  
les, Rajamanickan y col. (195) informaron lo siguiente:  
primero había un aumento en la cantidad y velocidad de sín-  
tesis del citocromo P-450 mientras la velocidad total de  
síntesis del hemo permanece constante, luego ésta aumenta  
pero sigue permaneciendo inalterada la actividad ALA-S;  
hasta que finalmente cuando la porfiria se pone de manifies-  
to, a raíz de la prolongada administración de HCB, se obser-  
va un incremento de 2 veces en la actividad ALA-S, que apa-  
rentemente se debería a un decremento en la velocidad de  
degradación de la enzima.

Por su parte Taljaard y col. (191) en base a la obser-  
vada progresiva acumulación de porfirinas de 8 y 7-COOH en  
el hígado de ratas intoxicadas por HCB, pensaron que podría  
existir un defecto a nivel de PCL y realizaron las determina-  
ciones de su actividad al tiempo en que presentaban el cuadro  
típico de aumento de porfirinas, sobre animales normales  
y con sobrecarga de Fe, encontrando que el HCB solo no afec-  
taba la actividad PCL "in vivo" de animales normales, en  
tanto que a aquellos que tenían sobrecarga de Fe la dismi-  
nuía hasta hacerla no detectable a los 55 días de tratamiento.

e) Comparación con PCT humana.

En cuanto a PCT humana (200, 201) es un síndrome que ocurre con asociación a una gran variedad de diferentes desórdenes; el síndrome consiste en la asociación de lesiones de piel debidas a fotosensibilización por porfirinas allí acumuladas, con sobreproducción de porfirinas, las cuales se excretan y acumulan excesivamente en el hígado. Dado que idénticas lesiones de piel pueden ocurrir en otras porfirias cutáneas, el síndrome se define por su sobreproducción de porfirinas y está caracterizada por: i) incrementada excreción y acumulación de porfirinas sustituidas con acetatos; ii) incrementada formación de Copro, que se excreta por heces al igual que las isocoproporfirinas, iii) hígado morfológicamente anormal y iv) marcada inducción de citocromo P-450 (200 - 202).

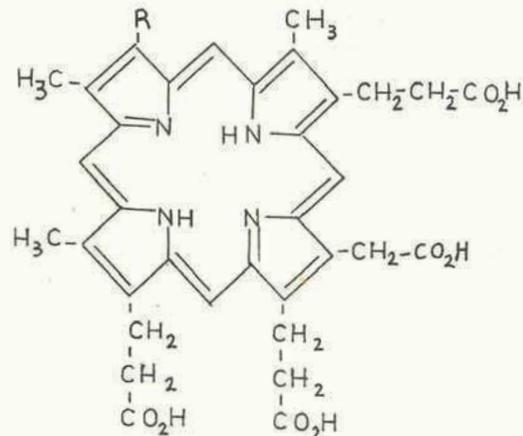
f) Existencia y caracterización de porfirinas tetracarboxiladas en heces.

Elder (5) se abocó al estudio de las porfirinas tetracarboxiladas encontradas en heces de pacientes con PCT y de ratas con porfiria con HCB, las cuales no estuvieron presentes en orina de ratas porfíricas ni en heces de ratas

control. En la fig. 18 puede verse la estructura de las mismas.

En la fig. 19 se ven las posibles transformaciones que puede sufrir el dehidroisocoproporfirinógeno (DHI 'gen) por lo que lo postula como el precursor de las restantes porfirinas de esta serie y afirma que aunque ésta no parece ser la principal ruta de excreción, en pacientes con PCT o en ratas con HCB, puede volverse importante cuando la **función biliar está dañada**. Propuso los caminos hipotéticos de **formación y degradación del DHI 'gen** y estudió el sitio de formación de la serie isocopro, llegando a determinar que se sintetiza en hígado (5), quizás por medio de un mecanismo de decarboxilación-dehidrogenación de la cadena lateral 2 propionato del Penta'gen, en una reacción posiblemente catalizada por la coproporfirinogenasa. La razón por la cual, en estos casos de porfiria, un sustrato normalmente producido y decarboxilado a Copro III en citosol podría ser atacado por una enzima intramitocondrial podría explicarse en base a una ruptura de la compartimentalización normal de la biosíntesis del hemo, secundaria al daño hepatocelular o alternativamente, por la acentuación de un camino secundario en

Fig.18 Estructura de porfirinas tetracarboxiladas, de heces de pacientes con PCT y ratas con porfiria por HCB



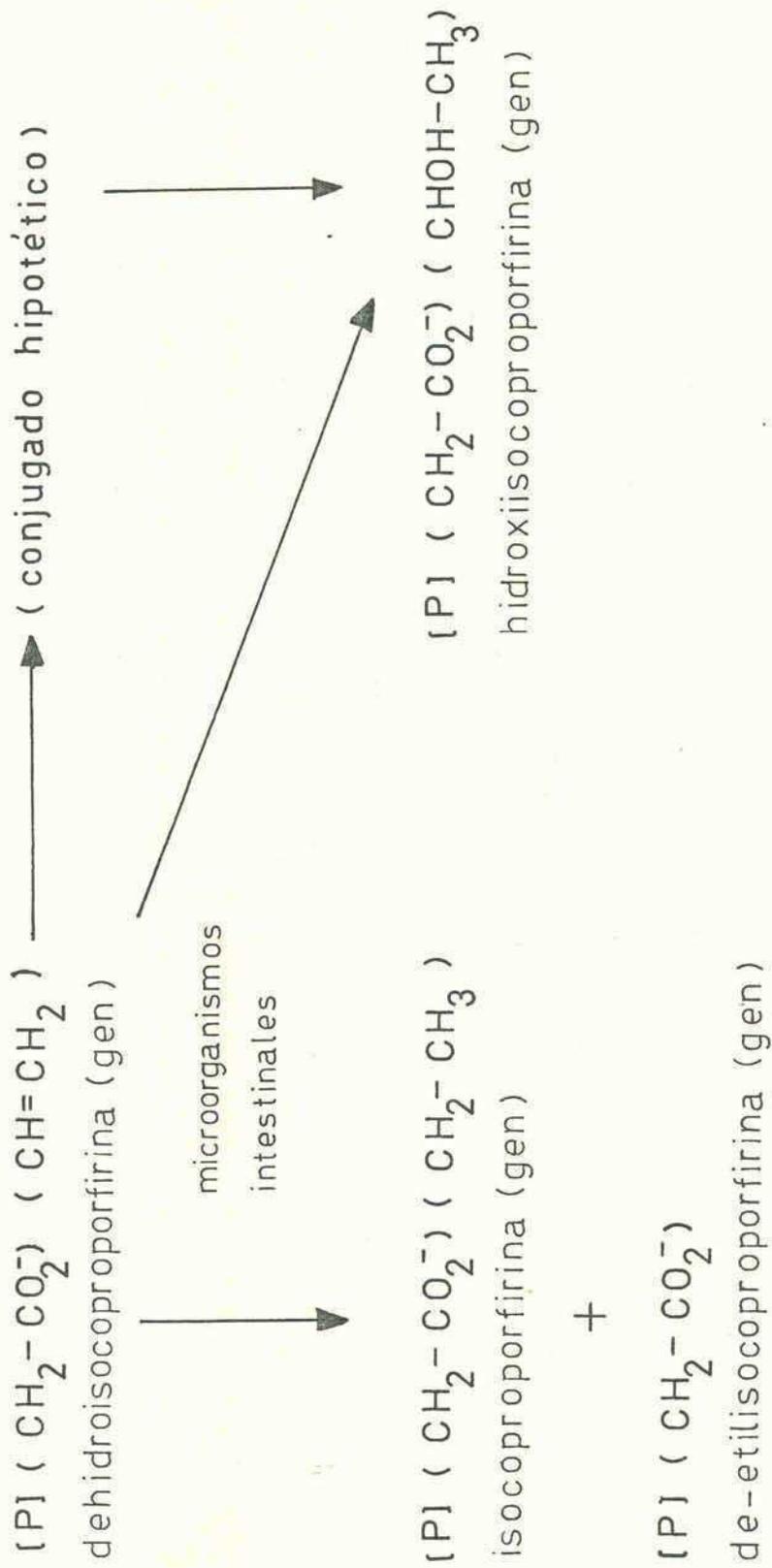
R= -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> ; tri - (2-carboxietil) - carboximetil etil trimetil porfina =  
= isocoprofina

R= -H ; de etilisocoprofina = T.C.C. trimetil porfina

R= -CHOH-CH<sub>3</sub>; hidroxisocoprofina = T.C.C. - mono - (1-hidroxietil) -  
- trimetil porfina

R= -CH=CH<sub>2</sub> ; dehidroisocoprofina = T.C.C. trimetil vinil porfina

Fig 19 Origen postulado de las porfirinas fecales tetracarboxiladas



el metabolismo normal de los porfirinógenos, que se incrementaría debido a la acumulación de Penta III intracelular.(203).

### HEXACLOROBENCENO.

#### - Generalidades.

El mecanismo por el cual el HCB ejerce su acción porfirinogénica se desconoce. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, se ha comprobado que, al igual que otros hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAP), provoca en animales de experimentación un tipo de porfiria semejante a la PCT humana. De todos los HAP que poseen propiedades porfirinogénicas, el HCB es el más estudiado y Debets y Strick (204), entre otros, consideran que el estudio del mecanismo de acción de esta droga puede servir como modelo de la acción hepatotóxica de otros HAP.

Los últimos trabajos realizados sobre el particular parecerían indicar: 1º) que la biotransformación de los HAP es un prerequisite para el desarrollo de porfiria, 2º) que inducen las enzimas microsomales metabolizantes de drogas (194, 195, 189, 205-207), 3º) que son metabolizados muy lentamente (185, 208), 4º) que se acumulan en animales y humanos en tejido adiposo(209, 210).

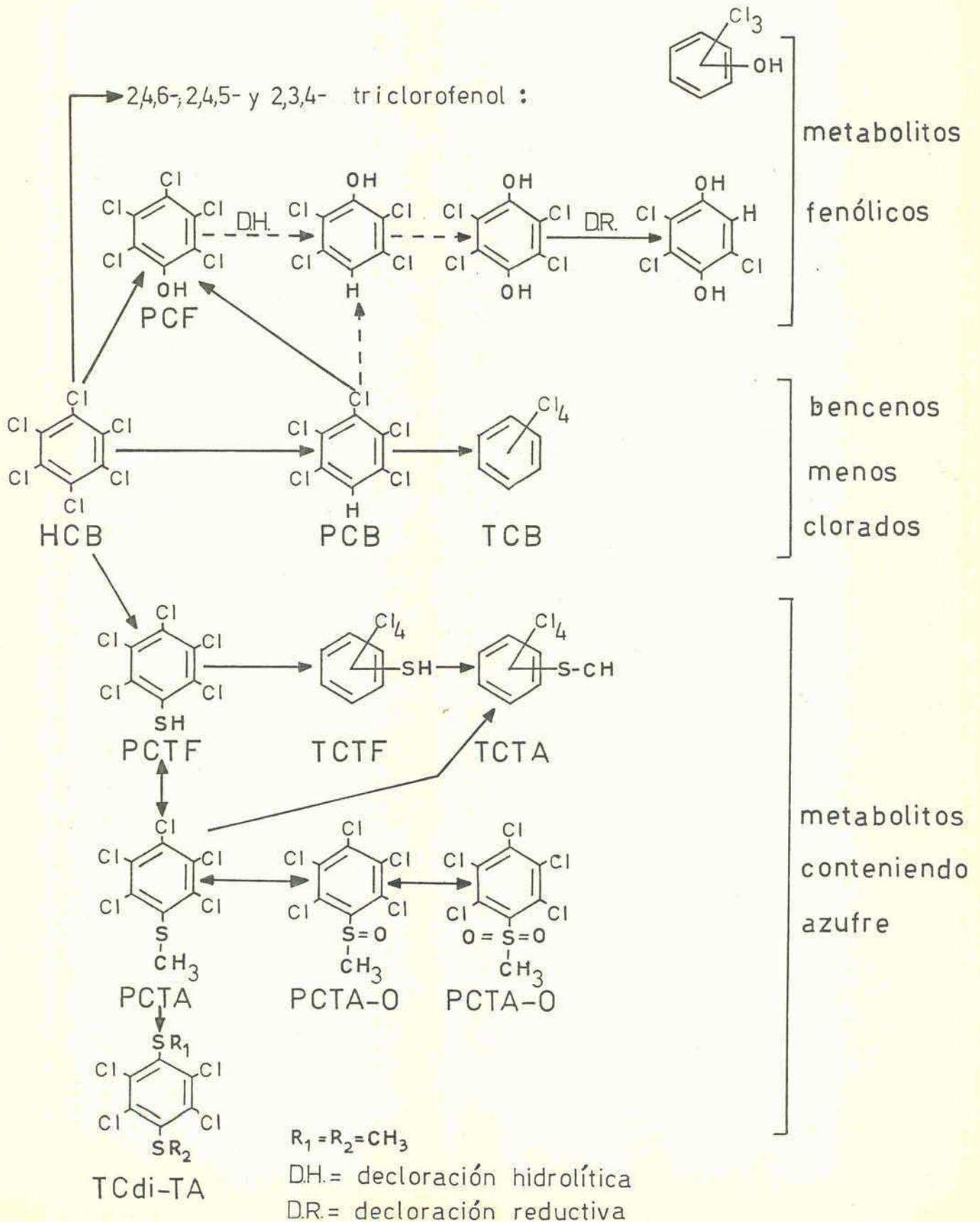
- Formación de metabolitos.

Parke y Willians (185) fueron los primeros en estudiar el destino metabólico del HCB en conejos. Ellos no encontraron metabolitos en heces ni en orina quizás por la pobre absorción del HCB desde el tracto gastrointestinal. Estudios más recientes (207, 208, 211) indican que el HCB es metabolizado a compuestos más polares. Iatropoulos y col. (212) demostraron que la mayor parte de una simple dosis oral de HCB es lentamente absorbida por el sistema linfático desde el tracto gastrointestinal y lo deposita en el tejido adiposo, salteando así el pasaje a través del hígado llevado por la vena porta y ésta podría ser la explicación tanto de la baja conversión metabólica del HCB como de la dificultad para detectar sus metabolitos en orina y heces de animales que han recibido una única dosis oral de la droga.

Koss y col. (208) han mostrado que durante la intoxicación crónica con HCB, aproximadamente 60% del mismo se excreta inalterado y un 40% como metabolitos, siendo principalmente metabolitos fenólicos y azufrados; en menor proporción se encuentran los bencenos menos clorados (fig. 20).

El pentaclorofenol (PCF) fué identificado como el principal metabolito del HCB en la mayoría de las especies animales

Fig. 20 Destino metabólico del hexaclorobenceno (HCB) en la rata



examinados hasta el momento y además el único detectado en tejido animal. Sin embargo se ha encontrado que el PCF no induce porfiria en ratas hembras (213, 214), por consiguiente se llegó a pensar que el PCF no juega un papel importante en el disturbio del metabolismo hepático de porfirinas provocado por administración prolongada de HCB. Pero por otra parte se ha encontrado que el PCF puro produce disturbios en el mecanismo de detoxificación hepática y acelera el establecimiento de porfiria inducida por HCB (215) o sea que si bien no es el metabolito causante de porfiria, contribuye indirectamente al disturbio de la síntesis hepática del hemo y a aumentar la acumulación de porfirinas. Otros metabolitos fenólicos excretados fueron: tetraclorohidroquinona, tetraclorocatecol y triclorofenol (202, 207, 208, 216).

Entre los metabolitos conteniendo azufre han sido identificados: pentaclorotiofenol, pentaclorotioanisol, tetraclorotiofenol, tetraclorotioanisol y tetracloroditioanisol, en heces de ratas intoxicadas con HCB (202, 215, 216) (fig. 20).

Estos metabolitos pueden derivar parcialmente de la conjugación con GSH, con metionina o por unión covalente de reactivos intermediarios a grupos sulfhidrilos funcionales de enzimas. Esta última posibilidad podría causar la disminución de la PCL, hepá-

tica, la cual contiene grupos sulfhidrilos esenciales (10, 83) y al ser inactivada por esta reacción con algún metabolito electrofílico del HCB, se produciría la observada acumulación de porfirinas altamente carboxiladas (217, 218).

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO.

- 1.- Determinar si los disturbios metabólicos ocasionados por el HCB están limitados al hígado o afectan otros órganos, principalmente el tejido eritropoyético.
  
- 2.- Localizar los puntos de acción de la droga a lo largo de la cadena metabólica del hemo, específicamente en las descarboxilaciones de los porfirinógenos y en la inserción de Fe a la porfirina determinando cuáles de las enzimas que llevan a cabo estas transformaciones se afecta en mayor grado y cuál responde antes al tratamiento. Establecer así si la porfirinógeno carboxiliasa está realmente afectada por la droga y en ese caso localizar la acción de la misma a nivel de los distintos pasos de descarboxilación tanto en la serie isomérica I como III.
  
- 3.- Aportar datos tendientes a elucidar el mecanismo por el cual el HCB afecta a estas dos enzimas del camino biosintético del hemo. Determinar si la droga ejerce su acción provocando alteraciones en las proteínas enzimáticas o modificando sólo sus actividades.

MATERIALES

SUSTRATOS Y TESTIGOS.

Uro III: Se aisló de turacina como se describe en (189).

Firia III: Se aisló de orina de ratas porfíricas por HCB por métodos previamente descriptos (189).

Penta III y Hexa III: Fueron aisladas de orinas de ratas intoxicadas por HCB como se describe en (97).

Copro III: Se aisló de orina de conejos intoxicados con plomo (219) siguiendo un procedimiento similar al descripto para orina de ratas intoxicadas con HCB.

Proto IX: Fué gentilmente cedida por el Dr. Grinstein o se preparó de sangre a partir del método de Grinstein (220).

Uro I: Se aisló de orina de porfiria congénita (221).

Porfirinógenos: Fueron preparados con amalgama de sodio como describen Mauzerall y Granick (10).

DROGAS Y MATERIALES AUXILIARES.

- Adsorbentes.

CO<sub>3</sub>Ca: Para cromatografía en columna, May and Baker o Merck.

MgO: Grado III para cromatografía en columna, se preparó de acuerdo a la técnica de Nicholas (222) a partir de droga Merck Co.

Seph. G-25 y G-200: Se obtuvieron de Pharmacia.

Gel de Fosfato de Ca: Se preparó por el método de Keilin y Hartree (223).

DEAE-celulosa: Se preparó según la técnica descripta en (224).

- Solventes.

$Cl_3CH$ : Se usó Merck, May & Baker, Sintorgan o Carlo Erba. En todos los casos antes de usarlo se probó con Proto IX (éster) para comprobar ausencia de fosgenos. En algunas oportunidades se utilizó  $Cl_3CH$  purificando en el laboratorio Ver Métodos.

Eter etílico: Eter anestésico Rhodia (F.A.).

Kerosene: Fracción  $190^{\circ}$ - $240^{\circ}$  preparada por el método de Falk y Benson a partir de kerosene comercial lavado varias veces con agua, secado 48 hs. sobre  $Cl_2Ca$  granulado y destilado en columna rectificadora. Se guarda en botellas oscuras hasta el momento de su uso.

Dioxano: Riedel de Haén-A.G. Seelze Hannover (Germany), Lowens Uve.

- Otras drogas.

Heparina: Fué gentilmente cedida por Laboratorios Inorp.

HCB grado técnico: Fué gentilmente cedida por Compañía Química

S.A. Para los ensayos "in vitro" se utilizó Fisher.

GSH: Sigma Chemical Co.

PCF: Se usó PCF de grado técnico (60%). Se realizaron 3 recris-

talizaciones de benceno caliente y se obtuvo un precipi-

tado en forma de agujas blancas de P.F. = 188 - 189°C.

El resto de las drogas usadas fueron de pureza p.a.

- Material auxiliar.

a) Sondas para drogado de ratas: "Franklin Nelaton" 11 Fr (made in England) o "Bresco" 10 Fr u 11 Fr.

b) Agujas: Para extracción de sangre de ratas: agujas de punta roma, calibre . - 12.

c) Aparatos: Para las mediciones espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Beckman D.U. ó D.B., con cubetas de vidrio o de cuarzo, de 1 cm de paso de luz. Mientras que para las mediciones fluorimétricas se utilizó un espectrofluorímetro Aminco Bowman (American Instrument Co.) equipado con una lámpara de Xenon 416-992,, un microfotómetro foto-

multiplicador y un tubo fotomultiplicador.

Se usaron cubetas cuadradas de cuarzo fundido de 1 cm x 4 cm.

#### ANIMALES.

Se usaron ratas cepa Wistar.

#### METODOS.

#### PORFIRINAS.

##### - Separación cromatográfica de Uro III: a partir de turacina.

La mezcla seca de los ésteres se mojó con  $\text{Cl}_3\text{CH}$  y se disolvió en benceno; la solución final se cromatografió sobre columna  $\text{CO}_3\text{Ca}$  según se detalla en página 99. La adsorción se llevó a cabo con benceno y el desarrollo con una mezcla de benceno:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (3:1 v/v).

La banda principal se recromatografió hasta banda única en el mismo sistema y luego sobre columnas de  $\text{O Mg}$  (222) o en papel Whatman N° 3 por el método de Falk y Benson (225).

Por estos procedimientos fue posible separar entre un 5 - 10% de Firia.

La Uro se purificó adicionalmente por cristalización de

MeOH:  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , cuyo punto de fusión fue 259-261°C.

- Inducción de porfiria en ratas: mediante administración de HCB.

Ratas hembras cepa Wistar de 200 - 250 grs. fueron mantenidas en jaulas metabólicas, suministrándoles dieta completa standard "Forramez Laboratorio" (de Molinos Río de la Plata) o Purina dieta 3 (de Cabeza S.C.A.) y agua "ad libitum".

El HCB fué suspendido en agua, previa maceración con Tween 20 (0,5% v/v) hasta una concentración final de 40 mg /ml.

La droga se administró diariamente a los animales por sonda gástrica en una dosis de 0,9-1 mg /gr. de peso del animal durante aproximadamente 45-50 días (hasta que empiezan a excretar porfirinas por orina), luego se los mantuvo drogándolos día por medio. El grado de intoxicación fué seguido por la observación espectroscópica de las bandas de absorción en el visible de las orinas.

- Esterificación de porfirinas provenientes de incubados de hígados de ratas.

Sobre la muestra de porfirinas libres en  $\text{ClH}$  5%, previamente secadas en desecador, se agregó 20 ml de una mezcla MeOH:  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (19: 1 v/v), se dejó 40 hs. en oscuridad a temperatura ambiente.

- Pasaje a cloroformo.

Sobre la solución de porfirinas anterior, se agregó 1/2 vol. (10 ml) de  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , luego se ajustó el pH a 4,5 con una solución de acetato de sodio saturado.

En una ampolla de decantación se colocó aproximadamente 1/2 vol. de agua destilada y sobre ella se volcó la solución. Se agitó suavemente, se decantó la fase clorofórmica y ésta se lavó una vez más con agua destilada. Se extrajo la fase acuosa con  $\text{Cl}_3\text{CH}$  hasta fluorescencia negativa; se reunieron los extractos clorofórmicos y se agitaron fuertemente en la ampolla, en presencia de igual volumen de  $\text{ClNa}$  al 7%, para romper la emulsión. El extracto clorofórmico final se filtró a través de papel de filtro plegado y embebido en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ .

Para la determinación del contenido en porfirinas se realizaron las lecturas espectrofotométricas correspondientes, pasando luego el extracto a un balón con cuello esmerilado, donde se procedió a concentrarlo en baño de agua al vacío.

- Purificación de porfirinas por cromatografía en columna.

a) Sobre  $\text{CO}_3\text{Ca}$ .

Se siguieron las técnicas descriptas en (98) y (171).

La mezcla de porfirinas esterificadas, previamente

embebidas en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , se disolvieron en benceno.

La adsorción se realizó en benceno, el desarrollo con una mezcla de benceno:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (4:1, v/v) y la desorción con  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , previa separación de las bandas.

Al recromatografiar dichas fracciones para su total purificación se varió la proporción de  $\text{Cl}_3\text{CH}$  en la mezcla de desarrollo; así para purificar Copro fue conveniente usar benceno puro, mientras que para Uro, Firia, Hexa y Penta se utilizaron las relaciones (7,5:2,5); (8:2); (8,5:1,5) y (9:1) respectivamente.

b) Sobre O Mg.

Se siguió el método de Nicholas (222), pero armando las columnas en forma semejante a las de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , utilizando O Mg grado III, previamente secado en estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante un día.

El solvente de adsorción fue  $\text{Cl}_3\text{CH}$  libre de MeOH (para ello se lavó con agua, se secó sobre  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , se filtró y se usó en el momento).

El desarrollo se realizó usando sucesivamente mezclas de MeOH:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  al 0,1 y 0,5% (v/v) o bien 0,5, 0,7 y 0,9% según los solventes utilizados.

Las bandas se eluyeron con MeOH:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  al 2% (v/v).

Al recromatografiar las distintas fracciones fue conveniente usar como solvente de desarrollo MeOH:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  0,5%, para Uro y Firia, 0,7% para Hexa y 1% para Penta y Copro.

- Aislamiento de porfirinas de distintos órganos.

a) Hígado, bazo y riñón.

Los órganos se cortaron en pequeños trozos (en el caso del riñón, éste se congeló previamente y se le sacó la membrana que lo envuelve) y se homogeneizaron en una relación 1:5 (p/v) con ClK 0,154 M. Luego se agregó ClH concentrado en c.s.p. llevarlo al 5% (68). Se dejó desproteínizar en hielo, durante una hora y se filtró, procediendo luego a lavar el precipitado con ClH 5%, hasta fluorescencia negativa.

b) Glándula de Harder.

Fue trabajada según la técnica de Tomio y Grinstein (94) modificada por Viale y col. (75).

El tejido se rompió en un mortero con arena libre de metales y se homogeneizó con MeOH:  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , 19:1, (v/v); el sobrenadante de centrifugación a 900 xg. fue

separado y el residuo de proteínas fué extraído repetidamente, con la misma mezcla, hasta fluorescencia negativa.

Los extractos se reunieron y guardaron en oscuridad durante 14hs., siendo luego pasados a  $Cl_3CH$  (226).

c) Hemolizado de sangre.

La sangre se centrifugó 15 min. a 900 xg, se descartó el plasma y los glóbulos rojos se lavaron tres veces, con solución fisiológica. Los hemolizados se obtuvieron agregando a los glóbulos rojos un volumen de agua fría y congelando y descongelando la preparación dos veces en baño de acetona y  $CO_2$  sólido. A un volumen de hemolizado total se agregó 5 volúmenes de AcOEt: AcOH (3:1, v/v) y se extrajeron las porfirinas con  $ClH$  5% hasta fluorescencia negativa.

- Identificación de porfirinas por cromatografía en papel.

Método de Falk y Benson (225). Se realizó en papel Whatman N° 1 y constó de dos corridas, ambas en sentido ascendente, usando como testigos Uro, Firia y Copro, y en casos particulares Proto y/o Uro I.

La primer corrida tuvo por objeto separar las impurezas,

que quedaron en la línea de siembra y se descartaron. El solvente de desarrollo fué kerosene:  $\text{Cl}_3\text{CH}$  etanólico (1:2, v/v) y la cuba estuvo saturada en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ .

La segunda corrida se realizó en otra cuba, saturada con dioxano, usando como solvente kerosene: dioxano (2,5:1, v/v).

El revelado se realizó por observación de la fluorescencia que exhiben las porfirinas bajo luz U.V. (227).

- Determinación cuantitativa de porfirinas.

a) Determinación de la concentración de porfirinas libres.

En los casos de porfirinas libres contenidas en  $\text{ClH}$  5%, los extractos ácidos fueron evaluados espectrofotométricamente leyendo la absorbancia correspondiente al pico máximo de la banda de Soret y realizando la corrección de Allen para porfirinas, según las fórmulas de Rimington y Sveinsson (228).

$$A_{\text{corr}} = \frac{2 A_{\text{máx}} - (A_{380} + A_{430})}{1,84}$$

Luego se aplicó la fórmula:

$$n \text{ moles} = A_{\text{corr}} \times \text{dil} \times \text{vol} \times f$$

donde  $f$  es el coeficiente de extinción, debiendo en estos

casos utilizar un coeficiente medio.

Para calcular el coeficiente medio, se realizó la cromatografía de la muestra en cuestión, en base a ella se sacaron los porcentajes de cada porfirina respecto al total y se calculó un coeficiente "pesado" teniendo en cuenta los coeficientes individuales de cada fracción (68, 229)

b) Determinación de porfirinas con distinto número de -COOH.

La determinación cuantitativa de las distintas porfirinas presentes en los desproteinizados provenientes de los ensayos de contenido o de los ensayos de incubación para la PCL, se realizó mediante la estimación de sus ésteres metílicos.

Para ello el extracto seco de las porfirinas libres totales se esterificó con mezcla MeOH:  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (19:1, v/v) dejándolos de 24 a 48 hs. en oscuridad. Luego se pasó a  $\text{Cl}_3\text{CH}$  y se llevó a sequedad, guardando el extracto seco en oscuridad hasta su uso, Las porfirinas se retomaron en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , se separaron por cromatografía en papel; las bandas correspondientes a las distintas fracciones se cortaron, eluyeron separadamente con  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , recogiendo los eluidos en tubos graduados, hasta la elución completa de las mismas que se

verificó a la luz U.V.

Luego se leyó la absorbancia, a la longitud de onda correspondiente a la banda de Soret de cada fracción y multiplicándola por los correspondientes volúmenes y factores en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , se calcularon los n moles parciales, se hizo la suma de los mismos y cada fracción se expresó como % de la cantidad total recuperada.

c) Determinación de cantidades muy pequeñas de porfirinas.

En el caso de la determinación de contenido de porfirinas en órganos de ratas normales, los valores fueron tan pequeños que el método espectrofotométrico no brindaban la sensibilidad requerida. Es por ello que para estos casos se emplearon métodos fluorimétricos, utilizando un espectrofluorímetro Aminco-Bowman, midiendo la fluorescencia a distintas longitudes de onda excitación, lo que permitió realizar una corrección gráfica por material interferente como se detalla en (230, 231).

- Método fluorimétrico.

a) Patrones: Se prepararon soluciones de las porfirinas libres en  $\text{ClH } 3\text{N}$ , que se guardaron como patrones de reserva, en heladera (hasta 3 meses) y se diluyeron en el momento del

- uso con ClH 5% a una concentración aproximada de 1  $\mu\text{mol/l}$ .
- b) Medición de las unidades de fluorescencia a partir del espectro de excitación de las porfirinas.

La fluorescencia de cada muestra se midió a 646 nm a partir del espectro de excitación, como se ve en la fig. 21 (izquierda). Allí se ven también (curva de la derecha) los espectros de emisión de la Uro, Copro y Proto en ClH 5%, los que presentan dos bandas, a 650 y 594, 646 y 592, 654 y 602, respectivamente.

Para determinar el espectro de excitación (curva de la izquierda), se "barrió" la  $\lambda$  de excitación desde 340 a 440 nm y se registró la fluorescencia medida a 646 nm en el caso de los patrones y a la  $\lambda$  del máximo de emisión para las distintas muestras.

La distancia "a" (fig. 22) representa las unidades de fluorescencia y es una medida de la concentración de porfirinas. La línea "b" sirve para realizar la corrección por material interferente.

El espectro de emisión (curva de la derecha) se determinó excitando a la  $\lambda$  del máximo y registrando la emisión producida al variar el monocromador de emisión desde 450 a

Fig. 21 Espectro de excitación (curva de la izquierda) y de emisión (curva de la derecha) de porfirinas en ClH 5%

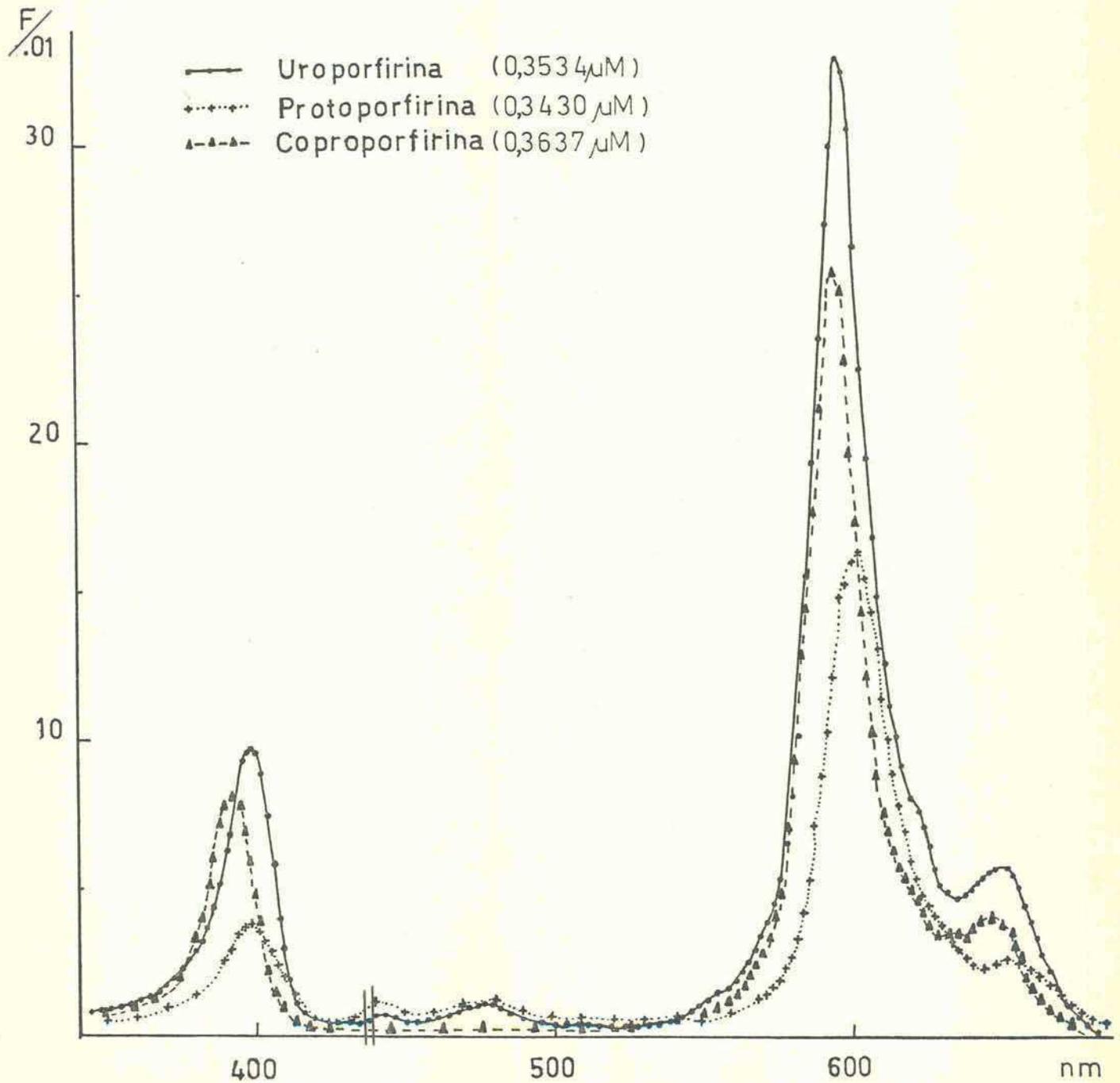
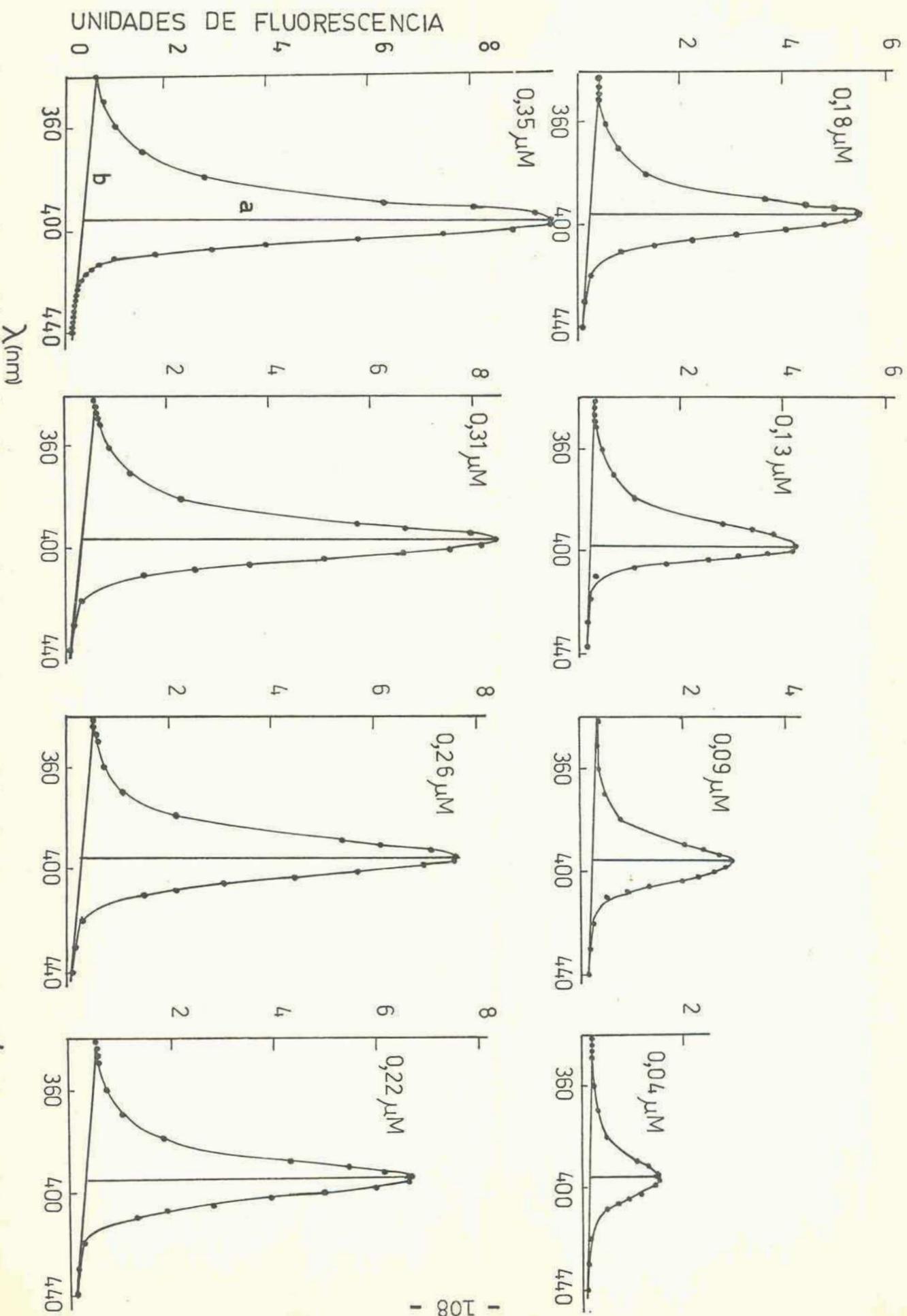


Fig 22 Espectros de excitación de Uroporfirina a distintas concentraciones en CIH 5%



(a) representa las unidades de fluorescencia y es una medida de la concentración de porfirinas  
 (b) en su intersección con 'a' marca la fluorescencia producida por el material interferente.

700 nm. Para las curvas de calibración se graficaron las unidades de fluorescencia (distancia "a") en función de la concentración de porfirina (fig. 23). Debido a que Uro y Copro fluorescen idénticamente, dentro del error experimental, se pudo usar indistintamente cualquiera de ellas como patrón.

#### PORFIRINOGENO CARBOXI-LIASA.

##### - Preparación de amalgama de sodio.

Aproximadamente 30 gr. de Hg se calentaron a 30-40°C en cápsula de porcelana y se introdujeron, en la masa fundida, trozos de sodio recientemente cortados (1 gr.). Se dejó enfriar, con lo cual endureció. La amalgama se guardó en frasco seco en desecador (232).

##### - Preparación de porfirinógenos.

Método de Fischer y Stern (233) y de Mauzerall y Granick (10). Se redujeron las porfirinas libres con amalgama de sodio recientemente pulverizada; lo que se verificó por la decoloración de la solución y pérdida de su fluorescencia a la luz U.V. La solución se filtró a través de placa filtrante, provista de

papel de filtro, al vacío. Se ajustó a pH 7,2 con  $\text{PO}_4\text{H}_3$  40%, bajo  $\text{N}_2$  y se mantuvo en frío, a intervalos, mientras se pipeteaba. Se usó inmediatamente.

Todas las operaciones se realizaron bajo luz roja.

#### - Preparación de los extractos enzimáticos.

En las experiencias con ratas se emplearon 2 a 3 animales de cada grupo, haciendo "pool" de los tejidos estudiados.

##### a) Sangre:

En humanos la sangre fue extraída en la forma habitual y recogida en frío sobre heparina; mientras que las ratas (tanto normales como intoxicadas con HCB) recibieron el siguiente tratamiento: en primer lugar fueron anestesiadas con éter en una cuba de vidrio con tapa esmerilada, luego se las abrió abdominalmente y con una aguja de punta roma se canalizó la aorta abdominal, en el lugar en que esta arteria se bifurca en las dos ilíacas (fig. 24), extrayendo entre 5-10 ml de sangre, que fue recogida sobre heparina en solución fisiológica (0,2 mg /ml) en frío.

A partir de aquí, la sangre proveniente de ambas fuentes, recibió el mismo tratamiento de hemólisis descrito en

Fig. 23 Curva de calibración para fluorimetría

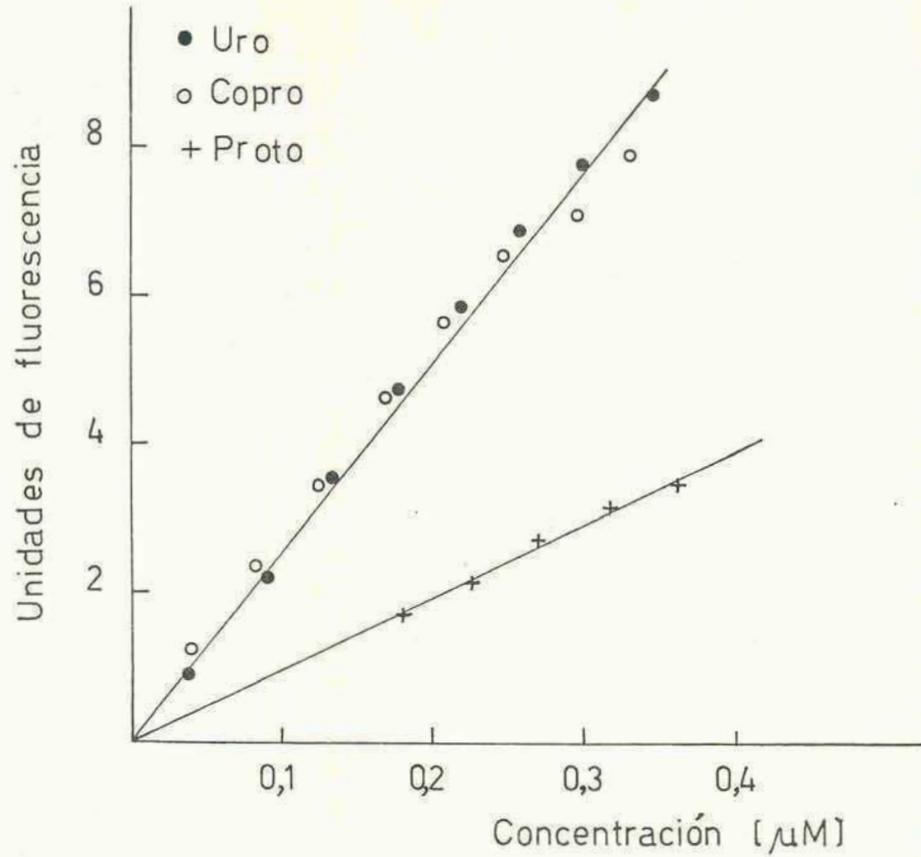
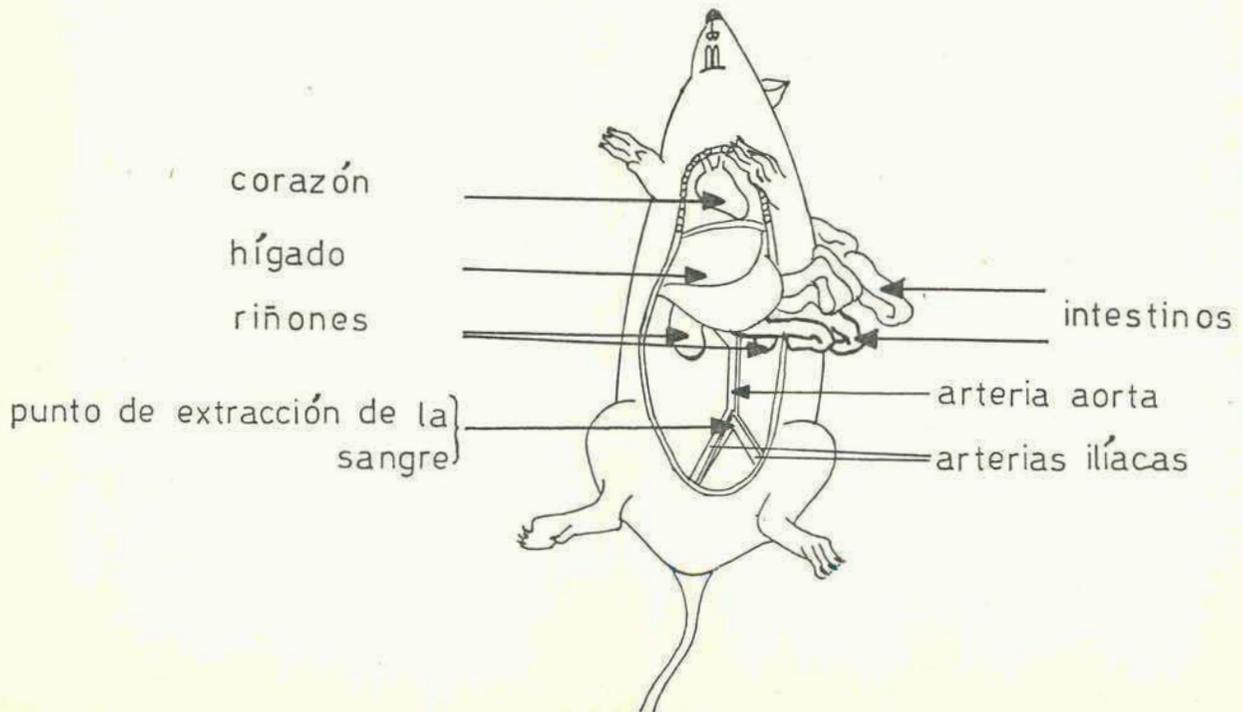


Fig 24 Localización del punto de bifurcación de la arteria aorta a los fines de extracción de la sangre



el método de aislamiento de porfirinas de hemolizado de sangre.

Luego se centrifugó el hemolizado total a 35.000 xg durante 60 min. a 0-2°C y el sobrenadante se usó como preparación enzimática.

b) Hígado, riñón y bazo.

Una vez sangradas las ratas, les fueron extraídos el hígado, los riñones y el bazo, enfriados y lavados inmediatamente en solución fisiológica sobre hielo, reunidos, pesados y homogeneizados en CLK 0,154 M (1:5, p/v). Los homogenatos se centrifugaron a 11.000 xg durante 20 min. El sobrenadante se usó como preparación enzimática en el caso de los órganos provenientes de animales normales.

En el caso de animales porfíricos, el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephadex G-25, equilibrada con buffer fosfato 0,134 M, pH 7,0, eluyéndola con el mismo buffer. Los eluidos que no presentaron fluorescencia, o que presentaron muy poca, se reunieron y fueron usados como preparación enzimática (234).

Todas las operaciones se realizaron entre 0 - 4°C.

c) Glándula de Harder.

Las glándulas de Harder congeladas fueron disgregadas en un mortero con arena libre de metales (70) y homogeneizadas en 10 vol. (p/v) de buffer fosfato de potasio 0,134 M, pH 7,0. Los homogenatos fueron centrifugados a 11.000 xg, a 0-2°C, por 20 min. y el sobrenadante se usó como preparación enzimática.

- Incubaciones.

a) Materiales y aparatos.

Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de Thumberg, en oscuridad y en baño termostatzado, con agitación mecánica.

b) Sistemas de incubación.

La actividad porfirinógeno carboxiliasa (PCL) fue determinada como describieron Tomio y col. (68).

La mezcla de incubación contuvo: en su volumen final de 3 ml, buffer fosfato de potasio 0,067 M, pH 7,0, GSH 1mM, EDTA 0,1 mM, porfirinógeno 2  $\mu$ M y preparación enzimática (8-10 mg prot.)

- Aislamiento e identificación de las porfirinas libres de los sistemas de incubación.

a) Para incubaciones con sangre como fuente enzimática.

Se paró la reacción con el agregado de 5 vol. de una mezcla de AcOEt:AcOH (3:1, v/v), dejando toda la noche en heladera.

Luego se filtró el desproteínizado, se lavó el precipitado 3 veces con la misma mezcla, disgregando bien el precipitado con varilla, hasta extracto incoloro, luego de lo cual se descartó. Los filtrados combinados fueron lavados 2-3 veces con agua para eliminar el AcOH; los lavados extraídos con AcOEt y las porfirinas libres extraídas completamente de la solución de AcOEt con ClH 10%. Luego se secaron en desecador.

b) Para incubaciones con distintos órganos de rata.

Después de la incubación la reacción se detuvo con ClH (c.s.p. 5%). Se dejó 1 h. en frío, bajo luz blanca, se filtró y lavó el precipitado hasta fluorescencia negativa. Los extractos clorhídricos se secaron en desecadores, manteniéndolos en oscuridad hasta su determinación cuali y cuantitativa.

- Determinación de actividad.

La actividad enzimática se determinó evaluando las cantidades relativas de las porfirinas con diferente número de carboxilos presente luego de detener la reacción.

Para ello se esterificaron, separaron los ésteres metílicos por cromatografía en papel y evaluaron como se detalló en "Determinación cuantitativa de porfirinas".

- Resultados.

a) Expresión de los resultados.

Las unidades se expresaron como: 1) la suma de los nmoles de porfirinas de 7-, 6-, 5- y 4-COOH formadas en 30 min; lo que representó la descarboxilación del Uro'gen, es decir la desaparición del sustrato; 2) los n moles de porfirina de 4-COOH formados en 30 min, es decir, aparición del producto final Copro'gen. En algunos casos los resultados se expresaron también como la formación de cada uno de los productos de descarboxilación.

b) Correcciones.

En los casos en que no fue posible separar las porfirinas endógenas de las preparaciones enzimáticas provenientes

de los animales porfíricos, se realizaron las correcciones pertinentes, restando a las porfirinas provenientes de la reacción enzimáticas, las endógenas provenientes de la preparación enzimática. Para ello, al valor de cada porfirina, calculado de los porcentajes de las cromatografías de los productos de descarboxilación, se le restó el valor correspondiente en la cromatografía del ensayo realizado sin Uro' gen a tiempo cero, pues ensayos previos habían demostrado que la incubación no altera la cantidad ni calidad de las porfirinas endógenas o sea que éstas no sufren transformación durante la reacción.

c) Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  E.S. y las medias se compararon por el test t de Student.

Para obtener el valor de P se usó un grado de libertad  $\frac{n_1}{1} + \frac{n_2}{2} - 2$

- Purificación.

Una vez obtenidos los homogenato de hígado de rata como se describió anteriormente, se sometieron a centrifugación diferencial: centrifugando primero a 900 xg durante 10 min, y luego a 11.000 xg durante 20 min. y realizando los lavados de los pe-

llets correspondientes, por centrifugación, con ClK 0,154M.

Luego se realizó una precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en los rangos 0-35%, 35-70% y 70-90%.

El precipitado se resuspendió en buffer fosfato de potasio 5 mM pH 6,8 y se pasó a través de una columna de Sephadex G-25, equilibrada con el mismo buffer.

Se reunieron los tubos que contenían proteína pero daban sulfatos negativos con  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  y se trataron en batch con gel de fosfato de calcio en una relación proteína: gel (1:2); se agitó mecánicamente, en frío, durante 20 min. y se centrifugó 5 min. a 11.000 xg.

La elución se realizó con buffer fosfato de potasio 0,067 M, los eluidos se juntaron y concentraron por precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  75% de saturación.

El precipitado se resuspendió en buffer fosfato de potasio 5 mM pH 6,8, se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 y el pico proteico se sembró sobre una columna de DEAE-celulosa, equilibrada con el mismo buffer. Se desarrolló con gradiente continuo de ClK 0-0,5 M en buffer fosfato de potasio 5 mM, conteniendo GSH  $10^{-3}$ M. Los eluidos correspondientes al pico se concentraron con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  75%, se desalaron a través

de G-25 o se sembraron sobre una columna de Sephadex G-200 o G-100 equilibrada con buffer fosfato de potasio 0,134 M y se eluyó con el mismo buffer.

- Fotooxidación.

Las experiencias de fotooxidación se realizaron sobre alícuotas de 0,9 ml de preparación enzimática a nivel de gel de fosfato. Para ello se pipeteó la enzima más 0,6 ml de buffer fosfato  $K/K_2$  0,134 M pH 6,8 y la solución acuosa del colorante (recientemente preparada) para lograr la concentración deseada. Luego se iluminaron los tubos con una lámpara de tungsteno de 100 vatios, colocada a una distancia de 20 cm, durante 6 min., con agitación, en frío (235-237).

Luego de realizar los ensayos de actividad PCL, se separó el exceso de colorante de los precipitados proteicos mediante filtración a través de dos capas de papel de filtro. Para asegurar la eliminación del colorante, después de los pasajes a cloroformo, se volvió a filtrar a través de papel de filtro doble.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida 7%, se reali-

zaron según las técnicas de Ornstein (238) y Davis (239).

Las muestras (aproximadamente 40  $\times$ ) se sembraron, con sacarosa, sobre cilindros de gel de 0,8 x 10 cm y se corrieron durante 4 hs. con buffer Tris - ClH, 50 mM, aplicando una corriente de 5 mA, por tubo, a pH 8,2.

Finalizada la corrida, se extrudaron los geles y se tiñeron por inmersión en Amido-Schwartz 1% (p/v) en ácido acético 7%, durante 5 min. y se lavaron con acético al 7% para eliminar el exceso de colorante.

#### FERROQUELATASA.

##### - Preparación y purificación de Proto.

La Proto fué preparada por el método de Grinstein (220) para los ensayos generales y purificada por el método de Labbé y Hubbard (119) o de Goudy y col (116) cuando se ponía a punto la determinación de la actividad ferroquelatasa.

##### - Preparación de la solución patrón de Proto para el sistema de incubación.

Se preparó una solución acuosa en Tween 80 al 2% (v/v), de una concentración 1 mM en Proto y se guardó a -20°C hasta su uso.

- Curva de calibración para las determinaciones de hemo.

La solución patrón de hemina se obtuvo disolviendo 1 mg de hemina, previamente humedecida con OHK 1N, en 4 ml de agua destilada conteniendo Tween 80 al 1%; esta solución se diluyó a 25 ml con CLK 0,154 M y se mantuvo a 0-4°C hasta su uso.

Luego, aplicando el método descrito por Falk (226) sobre una solución de hemina 20 mM, se determinó el espectro de referencia, obteniéndose los resultados que aparecen en la fig. 25, en la cual se ven los picos  $\alpha$  y  $\beta$  característicos del espectro diferencial del piridín-hemocromógeno, con el correspondiente mínimo entre ambos; de aquí que las longitudes de onda a las cuales debieron realizarse las mediciones de la absorbancia de la forma oxidada contra la reducida fueron 556 y 538, que corresponden al pico  $\alpha$  y al mínimo entre el  $\alpha$  y el  $\beta$ , respectivamente.

Como se sabe, las absorbancias a estas longitudes de onda guardan una relación lineal con la concentración de hemo en el medio. Teniendo en cuenta esto último, se realizó la correspondiente curva de calibración; para ello se usó una solución de hemina preparada como se describió al principio de este tópico, se aplicó el método del piridín-hemocromógeno sobre una serie de distintas diluciones de dicha solución; para cada concentra-

ción se leyó la forma oxidada contra la reducida y en base a los valores obtenidos se construyó la curva de  $\Delta E$  vs n moles de hemo, obteniendo un valor de  $1/tg = 358$  n moles (fig. 26) valor que coincidió con el calculado para la constante K de la fórmula (109):

$$\text{Hemo ( n moles )} = \frac{10^3 v}{\Delta \epsilon \text{ mM}} \cdot \Delta E = K \cdot \Delta E$$

donde: v = vol (ml) de la solución alcalina de piridina.

$$\Delta \epsilon \text{ (mM)} = \epsilon_{\text{ox}} - \epsilon_{\text{mín}} = \epsilon_{556} - \epsilon_{538}$$

$\Delta E$  = diferencia de absorbancias entre el máximo de la banda  $\alpha$  y el mínimo que aparece entre las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  .

#### - Extractos enzimáticos.

Los animales fueron muertos por decapitación y luego de desangrarlos se les extrajo el hígado, que se colocó inmediatamente en solución fisiológica, enfriada sobre hielo.

En general se trabajó con los hígados provenientes de 2 ó 3 ratas, que se reunieron, homogeneizaron en ClK 0,154 M en una relación 1:5 (p/v), se centrifugaron a 800 xg durante 10 min y el sobrenadante se recentrifugó a 11.000 xg durante 20 min. El precipitado mitocondrial se guardó en congeladora, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 24hs. o hasta su uso, no conservándolos más de una semana.

Fig. 25 Espectro diferencial del piridín-hemocromógeno

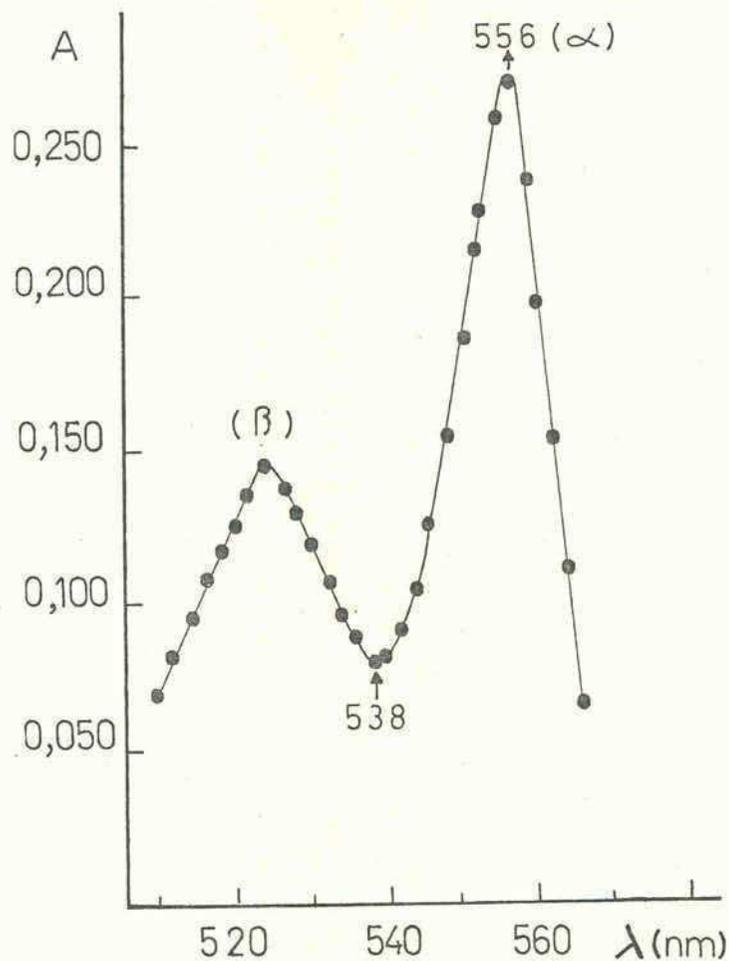
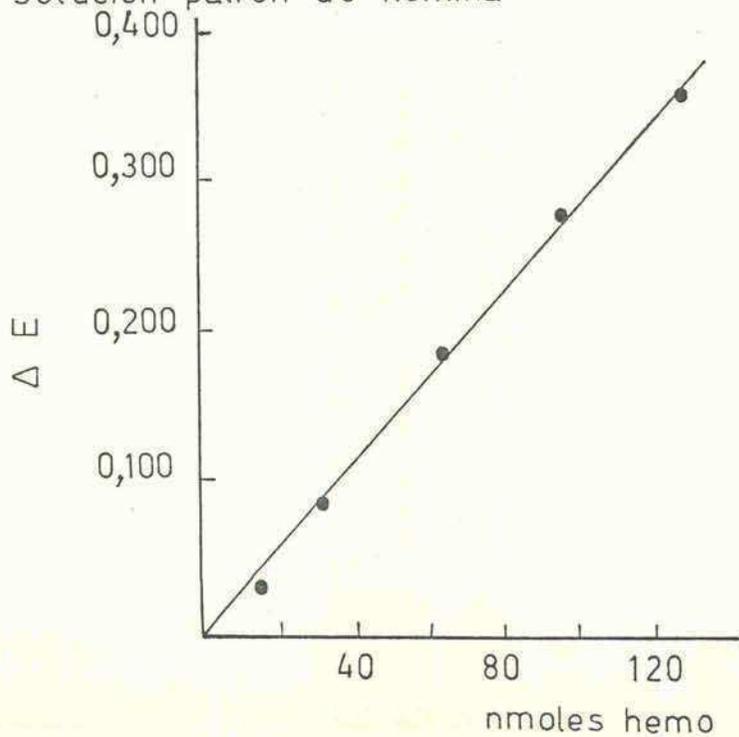


Fig. 26 Curva de calibración para el método del piridín-hemocromógeno usando solución patrón de hemina



- Métodos de solubilización de mitocondrias.

a) Congelamiento y descongelamiento.

Una vez obtenido el "pellet" mitocondrial, se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 24-48hs., y en el momento de usarlo se disgregó con una varilla de vidrio y se suspendió en el buffer de incubación, en una relación tal que las mitocondrias provenientes de lgr. de hígado quedaron contenidas en 1,4 ml de suspensión.

b) Sonicación.

El "pellet" mitocondrial se suspendió inmediatamente en buffer Tris 50 mM, pH 8,2 y se sonicó durante 2 min. con pulsos de 15 seg. por vez, mediante un sonicador MSE a 60 vatios (143).

c) Tratamiento con detergente (119).

Las mitocondrias se suspendieron inmediatamente en las mismas condiciones que en los casos anteriores y se les adicionó Tween 20, hasta lograr en una concentración de 10 mgs/ml. La mezcla se colocó en un baño de hielo por 30 min., con agitación ocasional.

En la experiencia de estabilidad esta operación se realizó sobre las mitocondrias que habían sido congeladas, man-

tenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 ó 48 hs, según el caso y resuspendidas en buffer Tris inmediatamente antes del tratamiento con detergente.

- Sistema de incubación.

Salvo en casos especiales, aplicados en la puesta a punto del método de determinación de actividad ferroquelatasa, se utilizó el siguiente sistema de incubación, en un volumen total de 3,2 ml: 100 n moles de Proto IX; 200 n moles de  $\text{SO}_4\text{Fe}$ ; Succinato 10 mM; 0,8 ml de preparación enzimática y buffer Tris-ClH 50 mM, pH 8,2.

Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de ensayo, en baño termostatzado a  $37^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad y sin agitación.

Salvo en el método de Labbé y Hubbard (119) en el que las incubaciones se realizaron en erlenmeyers de 25 ml, montados en un Agitador Metabólico Dubnoff, bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , a  $37^{\circ}\text{C}$  y oscuridad.

- Determinación del producto formado.

La reacción fué parada retirando los tubos del baño y colocándolos inmediatamente en hielo. Luego se volcó su contenido sobre 1,5 ml de una solución de piridina alcalina (piridina:

OHNa 1N; 1:0,5 v/v), se dejó nuevamente en hielo por 20 min y se agregó 1 ml de agua destilada. La mezcla fué dividida en partes iguales entre dos cubetas y aproximadamente 2 mg de hidrosulfito de sodio sólido se adicionaron a una cubeta y 0,05ml de  $(CN)_6FeK_3$  3mM a la otra. Se leyeron las absorbancias a 556 y 538 nm y se calcularon los n moles de hemo formados, según se describió en la determinación de la curva de calibración.

- Expresión de los resultados.

La actividad enzimática se expresó como los n moles de hemo formados por mg de proteína en 30 min.

- Localización submitocondrial de Ferroquelatasa.

Las mitocondrias se prepararon sacarosa 0,25 M conteniendo ácido etilenglicol di(aminoetil) tetracético (EGTA) 1mM y Tris - ClH 4 mM, pH 7,2. Se lavaron dos veces con sacarosa-Tris, sin EGTA.

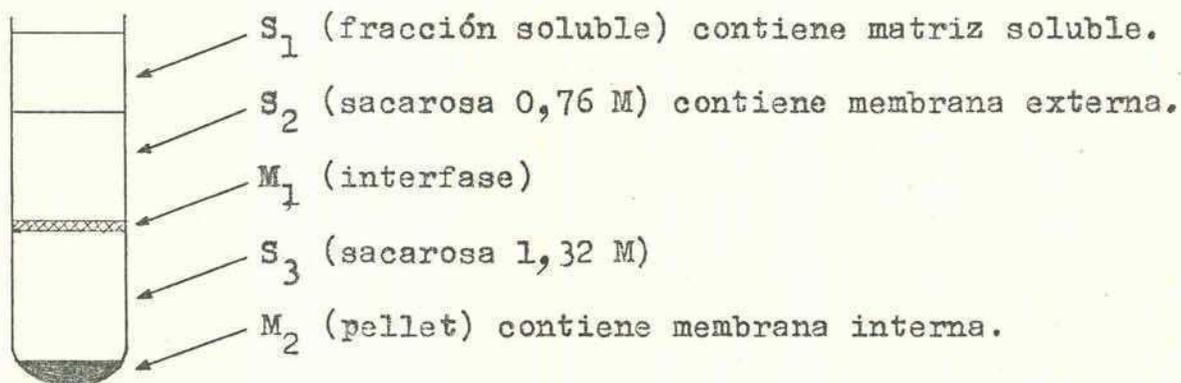
Para preparar las fracciones de membrana se utilizó una modificación de Jones y Jones (240) del método de Sottocasa y col (241), como se detalla a continuación.

- Preparación de las fracciones de membrana.

Las mitocondrias (200 mg proteínas) se dejaron hinchar a

0°C durante 7 min. en 30 ml de buffer Tris-fosfato 10 mM, pH 7,5. Se agregaron 10 ml de una solución conteniendo ClK 0,48 M, ATP 2mM y  $SO_4 Mg$  2 mM, ajustando el pH a 7,4 con Tris. Después de 5 min., la suspensión fue sonicada en alícuotas de 5 ml (10 seg, 1,5 amperios) para liberar la membrana externa de la interna, que se encuentra contraída.

Finalmente alícuotas de 20 ml fueron colocadas sobre un gradiente discontinuo compuesto por sacarosa 1,32 M (25 ml) y sacarosa 0,76 M (12 ml). Se centrifugó 3 1/2 hs. a 24.000 rpm en un rotor SW 25 de una centrífuga preparativa Beckman-Spinco. La distribución de las fracciones resultantes de este procedimiento se muestra en la siguiente figura:



en la cual se han indicado las fracciones submitocondriales que contendría cada capa, en función de las enzimas marcadoras: malato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y monoaminoxidasa.

- Malato deshidrogenasa.

Esta enzima, marcadora para matriz mitocondrial, se determinó por el método de Ochoa (242).

La mezcla de reacción contenía: buffer glicil-glicina  $2,5 \times 10^{-2} M$  pH 7,4; NADH  $5 \times 10^{-5} M$ ; oxalacetato  $2,5 \times 10^{-3} M$  pH 7,4 (solución fresca), enzima (0,2-1ml) y agua destilada (c.s.p. 3,0 ml).

La reacción se hace en una cubeta de espectrofotómetro Beckman D.B. a temperatura ambiente (22-23°C).

La reacción se inicia por adición de enzima u oxalacetato. Se hacen blancos colocando todos los componentes menos NADH y las lecturas se realizan contra el blanco, leyendo la absorbancia a 340 nm, a intervalos de 15 seg. durante 1 a 2 min.

La cantidad de enzima usada en cada ensayo se ajusta para que la velocidad de decrecimiento de la absorbancia por el período entre 30 y 45 seg. no exceda -0,025.

Una unidad enzimática: es la cantidad de enzima que provoca un decrecimiento en la absorbancia de 0,01/min. bajo las condiciones de ensayo.

- Citocromo c-oxidasa.

Esta enzima está localizada en la membrana interna; se determinó por el método de Cooperstein y Lazarow (243).

Para determinar su actividad se midió la velocidad de oxidación enzimática del citocromo reducido.

En primer lugar fue necesario reducir el citocromo. Para ello 30 ml de una solución de citocromo c ( $1,5 \times 10^{-5} M$ ) en buffer fosfato 0,03M, pH 7,4, fueron reducidos por adición de 100 ml de solución fresca de hidrosulfito de sodio (1,2 M). La solución se agitó 2 min. para eliminar el exceso de hidrosulfito.

Para determinar la actividad enzimática se pipetearon 3ml de la solución de citocromo c recientemente reducido en una cubeta del espectrofotómetro y se agregaron 0,02 a 0,04 ml de preparación enzimática. Los reactantes se mezclaron invirtiendo la cubeta y se leyó la absorbancia del citocromo reducido a 550 nm cada 30 seg, durante 3 min. Finalmente se agregaron unos pocos granos de ferricianuro de potasio (para completar la oxidación del citocromo c) y se leyó nuevamente la absorbancia.

Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente (25°C). Cálculos: A cada lectura de absorbancia, así obtenidas, se les restó la correspondiente a la muestra de citocromo comple-

tamente oxidado y el logaritmo de esa diferencia (A) se graficó en función del tiempo. La actividad enzimática es proporcional a la tangente de dicha línea y se calcula como el decrecimiento en el log. A/min.

Una unidad enzimática: es la cantidad de enzima que cataliza un decremento de 1,0 en el log A por minuto

- Monoamino-oxidasa.

Esta enzima está localizada en membrana externa; se determinó por el método de Tabor y col. (244).

Para ello se incubaron: 10  $\mu$ moles de benzilamina con aproximadamente 1 mg de proteína enzimática en buffer fosfato 0,2 M pH 7,2, en un volumen total de 3 ml.

La reacción se lleva a cabo en la cubeta del espectrofotómetro, a temperatura ambiente, siguiendo la formación de benzaldehído por lectura de la absorbancia a 250 nm.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza un incremento de 0,001 en la absorbancia por minuto, leyendo a 250 nm.

- Actividad Ferroquelatasa.

En este caso se determinó por el método de Jones y Jones

(240) que aplica el método del piridín hemocromógeno, pero en lugar de  $\text{Fe}^{++}$  y Proto usan  $\text{Co}^{++}$  y Meso, como sustratos.

La formación de Co-Meso se midió leyendo las absorbancias a 525 y 547 nm y usando un  $\epsilon_{\text{mM}} = 7,96$ , resultando el factor (1/tg) de la curva de calibración 402nmoles.

RESULTADOS.

CONTENIDO DE PORFIRINAS TOTALES EN DISTINTOS TEJIDOS DE RATAS  
NORMALES E INTOXICADAS CON HCB.

Se estudió el efecto del HCB sobre el contenido de porfirinas totales en homogenatos de distintos tejidos de ambos lotes de animales (normales y con severa porfiria por HCB-aproximadamente 3 meses de tratamiento-) midiendo las mismas en el extracto clorhídrico por métodos espectrofotométricos y fluorimétricos como se describe en METODOS. Para determinar los contenidos en porfirinas de los homogenatos de los tejidos de animales normales se recurrió a los métodos espectrofotofluorimétricos y en la fig. 27 pueden verse las curvas típicas obtenidas en dichos casos, para los espectros de emisión, comparadas con las correspondientes a los tejidos de animales porfíricos.

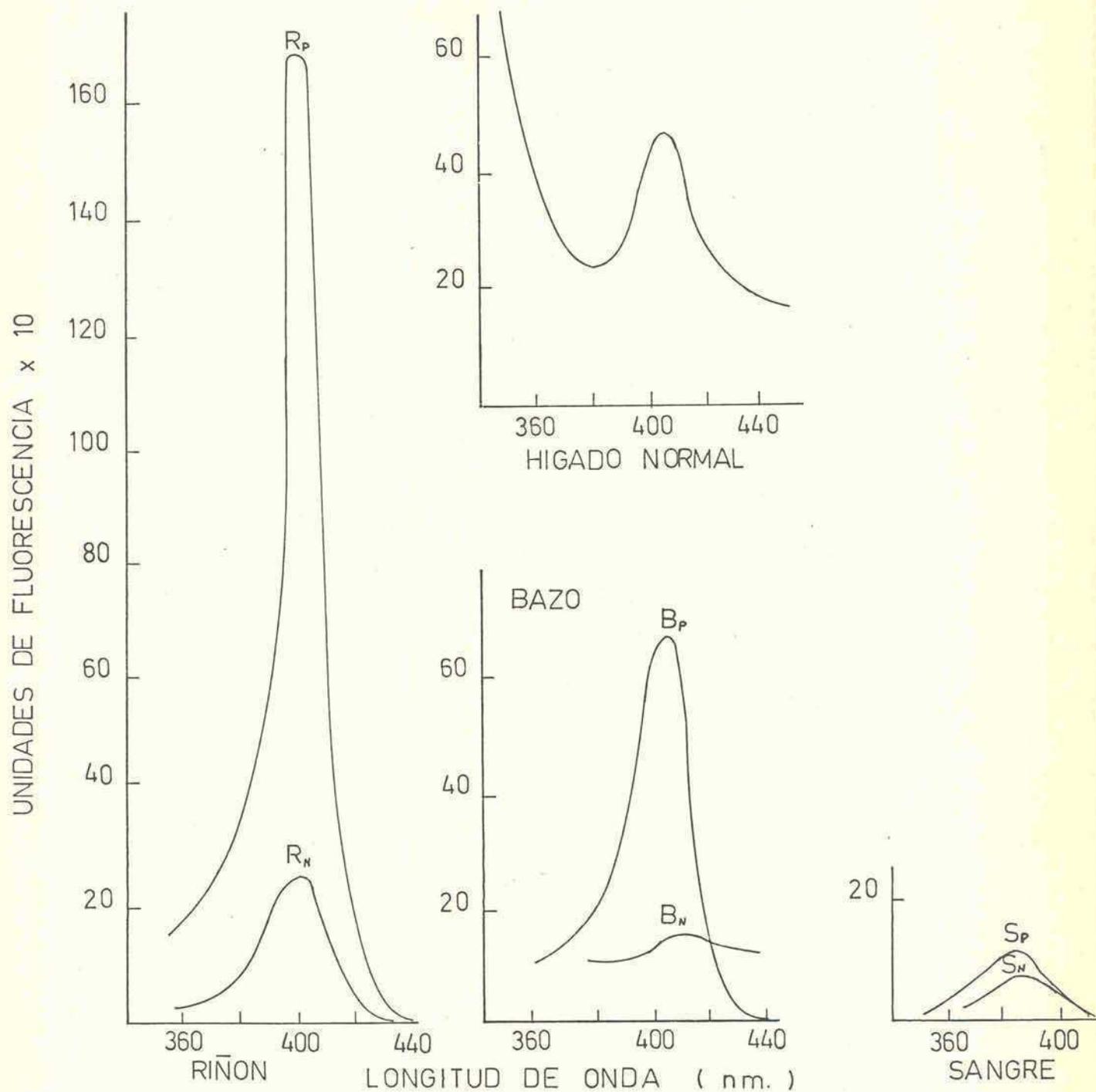
Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla III. En ella se observa que el HCB provoca un gran incremento en el contenido de porfirinas en homogenato total de hígado (cerca a 4.000 veces), siendo éste el órgano más afectado. También hubo incremento en el contenido de porfirinas en riñón y bazo, siendo los valores correspondientes a los animales porfíricos 300 y 120

TABLA III Efecto del HCB sobre la acumulación total de porfirinas en tejidos de ratas

TEJIDO	nmoles de porfirinas totales de homogenato ó hemolizado de eritrocitos /gr. de tejido o /100 ml. de eritrocitos.	Cantidades relativas de porfirinas ( % )					
		8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	2-COOH
HIGADO	N	0,30 ± 0,02	—	—	—	trazas	trazas
	HCB	1177 ± 47 *	72 ±	28 ± 1	—	—	—
BAZO	N	0,094 ± 0,011	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas
	HCB	11,1 ± 0,5 *	74 ± 4	26 ± 4	—	—	—
RIÑÓN	N	0,36 ± 0,07	trazas	trazas	—	trazas	trazas
	HCB	109 ± 19 *	86 ± 2	14 ± 2	—	—	—
GLANDULA DE HARDER	N	612 ± 92	5 ± 1	3 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	80 ± 3
	HCB	425 ± 89 **	10 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	74 ± 2
ERITROCITOS	N	26 ± 4	—	—	—	trazas	trazas
	HCB	29 ± 4	—	—	—	trazas	trazas

El contenido de porfirinas totales en hígado (40 y 4 ml, para N y HCB respectivamente), bazo (5 ml y 2,5 ml), riñón (5 ml y 2,5 ml) y eritrocitos (4 ml y 4 ml) de ratas normales (N) y porfíricas por HCB (HCB) se determinó en CIH 5 % utilizando homogenatos o hemolizados respectivamente, aplicando métodos espectrofotométricos y fluorimétricos como se detalla en Métodos. El contenido en glándula de Harder (1 ml y 1 ml) se determinó en CI<sub>3</sub>CH. Las cantidades relativas de cada porfirina se determinaron por métodos cromatográficos y espectrofotométricos. Los resultados se expresan como la media ± E.S., de los valores obtenidos en 4-8 experimentos. Las probabilidades de diferencia con los controles correspondientes se indican: \*, P < 0,001; \*\*, P < 0,2.

Fig 27 Espectros de excitación correspondientes a homogenato de tejidos de ratas normales y porfíricas



Las determinaciones se realizaron sobre los desproteinizados de los homogenatos totales de los distintos tejidos, que fueron extraídos hasta fluorescencia negativa con ClH 5%. El extracto clorhídrico se midió a 646 nm a partir del espectro de excitación, determinando las unidades de fluorescencia y refiriéndolas a la curva de calibración de Copro. Las cantidades empleadas de cada preparación se especifican en la Tabla III.

veces mayores que los normales, respectivamente.

El HCB no afectó el contenido de porfirinas eritrocitario en tanto que disminuyó en un 30% el alto contenido normalmente presente en la glándula de Harder.

Se estudió además el efecto del HCB sobre la naturaleza y proporción de las porfirinas presentes en los distintos tejidos, mediante cromatografía de sus ésteres metílicos, según se detalla en METODOS. Los resultados están presentes en el lado derecho de la misma tabla. Allí vemos que Copro y Proto son porfirinas que se encuentran en todos los tejidos normales y, en muy pequeña cantidad, salvo en glándula de Harder, donde aparecen en cantidades mucho mayores y además acompañadas de porfirinas con 8 a 5-COOH; en bazo pudieron determinarse también trazas de porfirinas más carboxiladas (8-, 7-, 6- y 5-COOH) mientras que en riñón hubo trazas sólo de Uro y Firia.

Por otra parte, en todos los tejidos en los que el HCB provoca acumulación de porfirinas (hígado, bazo y riñón), vemos que las mismas están constituidas por porfirinas altamente carboxiladas: Uro (8-COOH) y Firia (7-COOH), con notable predominio de la primera; no habiendo detectado Copro ni Proto.

La relación molar Uro:Firia para las porfirinas acumuladas

fué 72:28 para el hígado; 74:26 para el bazo y 86:14 para riñón.

En cuanto a los eritrocitos, que es el tejido que no ve afectado su contenido porfirínico a causa del HCB, vemos que el tratamiento tampoco afectó el tipo de porfirinas normalmente presente en los mismos, ya que sólo trazas de Copro y Proto pudieron detectarse en los eritrocitos normales como en los porfíricos.

Finalmente, en glándula de Harder se encontraron todas las porfirinas desde Uro a Proto y en proporciones semejantes en normal y porfírica, con sólo un incremento en Uro a expensas de un ligero decremento en Copro en las preparaciones provenientes de los animales intoxicados.

#### CONTENIDOS DE PORFIRINAS EN SOBRENADANTES DE 11.000 xg.

También se realizaron estudios en sobrenadante de homogenato de 11.000 xg, (tabla IV), dado que esa es la preparación enzimática utilizada en los incubados para la determinación de actividad PCL, por consiguiente era de interés conocer el contenido y naturaleza de las porfirinas endógenas presentes en cada tubo, en especial el de aquellos órganos que acumulan porfirinas, para poder realizar las correcciones adecuadas en la determinación de dicha actividad.

TABLA IV Contenido de porfirinas en sobrenadante de hemolizado y de homogenato de distintos tejidos de rata

TEJIDO	nmoles de porfirinas totales/gr. de tejido ó 100ml. de eritrocitos		nmoles de porfirinas totales/mg. de prot.		nmoles totales que se incluirían en el medio de incubación	Cantidades relativas ( % )					
	CONTENIDOS					8COOH	7COOH	6COOH	5COOH	4COOH	2COOH
HIGADO	N	0,32		0,003	0,03	t	r	a	z	a	s
	HCB	580		5,33	53,3	73	25	2			
BAZO	N	0,08		0,002	0,03	t	r	a	z	a	s
	HCB	8,72		0,085	1,28	73	27				
RIÑÓN	N	0,35		0,013	0,33	t	r	a	z	a	s
	HCB	22,65		0,323	8,08	80	20				
GLANDULA DE HARDER	N	354		0,75	0,97	t	r	a	z	a	s
	HCB	294		0,75	0,97	t	r	a	z	a	s
ERITROCITOS	N	26		0,012	0,12	—	—	—	—	—	trazas
	HCB	28		0,010	0,10	—	—	—	—	—	trazas

Se trabajó en idéntica forma que para la obtención de los resultados presentes en la tabla III, salvo que la extracción se realizó a partir de homogenatos ó de hemolizados centrifugados a 11.000 xg por 20 min. Los volúmenes de sobrenadante, empleados en cada caso, fueron: hígado (17 ml y 1,7 ml, para normal y porfírico respectivamente), bazo (4 ml y 2 ml), riñón (4,4 ml y 2,2 ml), glándula de Harder (1 ml y 1 ml), eritrocitos (4,5 ml y 4,5 ml).

Los datos presentes en la tabla IV representan los valores obtenidos en 2 o 3 experiencias sobre 2 animales de cada lote, ya que al comprobar que los datos provenientes de los animales normales (salvo glándula de Harder) eran despreciables, no se volvieron a determinar, mientras que los valores correspondientes a animales porfíricos y a glándula de Harder normal, variaban bastante de animal a animal, por consiguiente, se repitieron las determinaciones en cada experiencia, para realizar las correcciones adecuadas.

En la tabla IV comprobamos que hay también un incremento en porfirinas en los sobrenadantes de los órganos que sufren acumulación a causa del tratamiento con HCB. Comparando los datos de contenido en porfirinas totales de sobrenadante de homogenato por gr. de tejido (tabla IV) respecto de homogenato total (tabla III) se observa, que el primer valor es menor; quizás esta diferencia se deba en parte a que algunas porfirinas queden unidas a mitocondrias (principalmente en el caso del hígado, en el que la diferencia es mayor) y en parte a porfirinas que queden retenidas impregnando el precipitado.

En cuanto a la cantidad relativa de porfirinas presentes, con distinto número de carboxilos, nuevamente se comprueba que

en los tejidos normales sólo es posible determinar trazas en tanto que en los órganos que acumulan porfirinas la naturaleza de las mismas corresponde a Uro y Firia predominantemente.

Teniendo en cuenta los mg. promedio de proteínas que se incuban en cada caso, vemos que con las preparaciones provenientes de hígado, bazo y riñón porfírico, incluiríamos en el medio de incubación 53,3; 1,28 y 8,1 nmoles de porfirinas por tubo respectivamente, valor que es del orden o superior a los nmoles de Uro'gen incubados, lo que podría traer dificultades metodológicas para la determinación de la actividad PCL, restando muchísima sensibilidad al método de estimación de las porfirinas presentes al final de la incubación. Por esta razón se intentó separar las porfirinas endógenas de estas preparaciones, mediante el uso de columnas de Sephadex G-25.

Para hígado y riñón los resultados fueron ampliamente satisfactorios y se presentan en la tabla V. En ella vemos que se logra eliminar casi un 99 y 85% respectivamente, de las porfirinas endógenas. El número de primeros tubos de elución de la columna que contenían proteína sin fluorescencia fué mayor para hígado que para riñón. Los tubos siguientes contenían algo de fluorescencia acompañando a una alta concentración de proteínas

TABLA V Separación de las porfirinas endógenas de hígado y riñón de ratas intoxicadas con HCB, por pasaje a través de columna de Sephadex G-25

Sobrenadante de homogenato Preparación enzimática	Contenido de porfirinas nmoles de porfirinas totales / mg. de prot.	Porfirinas eliminadas ( % )	Naturaleza de las porfirinas remanentes (%)				
			8 COOH	7 COOH	6 COOH	5 COOH	4 COOH
HIGADO HCB	4,72 ± 0,27		73 ± 1	27 ± 1	—	—	—
HCB / G-25	0,066 ± 0,011 *	98,6	64 ± 1	36 ± 1	—	—	—
RIÑÓN HCB	0,459 ± 0,006		83 ± 2	17 ± 2	—	—	—
HCB / G-25	0,070 ± 0,002 *	84,8	63 ± 3	37 ± 3	—	—	—

Los métodos de ensayo se indicaron en la tabla III. HCB/G-25: sobrenadante de homogenato de ratas porfíricas pasado a través de columnas de Sephadex G-25 (2,4 x 30 cm) previamente equilibrada y desarrollada con buffer fosfatos de potasio 0,134 M pH 7. Los tejidos de dos animales fueron reunidos en cada experimento.

\* P < 0,001.

y en general se incluyeron con los anteriores, para ser usados como fuente enzimática; de aquí que dicha preparación contenía una pequeña cantidad remanente de porfirinas; (el valor correspondiente aparece en la tabla V como HCB/G-25).

Esta cantidad es muy pequeña comparada con la de los porfirinógenos usados como sustrato en la determinación PCL.

Los estudios sobre la naturaleza de las porfirinas antes y después de la filtración por gel mostraron que la Uro es retenida por el dextrano en mayor grado que la Firia, ya que, como se ve en la tabla V, el porcentaje de Firia fué mayor en los e-luídos de la columna.

Como en algunas oportunidades los bazos provenientes de animales porfíricos tenían bastante fluorescencia, se intentó separar las porfirinas también por este método; para ello se emplearon dos procedimientos: a) homogeneizar los bazos en buffer Tris-ClH 0,1M, pH 7; b) homogeneizar con CLK 0,154 M; en ambos casos se sembraron 2 ml. de homogenato sobre sendas columnas de Sephadex G-25, equilibradas con buffer fosfatos de potasio 0,134 M pH 7.

Con ninguno de los dos sistemas se obtuvo buena separación, aunque fué algo mejor la correspondiente al homogenato en buffer

Tris-ClH, por lo que se pensó que convenía aumentar la fuerza iónica; se preparó otra columna, se llevó la concentración de CLK a 2M, se corrió la muestra y nuevamente dió una mala separación, razón por la cual no se insistió en aplicar el método, fundamentalmente al comprobar que los nmoles de porfirinas que se incluirían en el medio de incubación eran despreciables frente a los de Uro'gen y bastaba hacer las correcciones correspondientes para poder determinar la actividad; lo que fué corroborado por los datos obtenidos para riñón (tabla VI) donde vemos que aún con una cantidad mucho mayor de porfirinas endógenas se lograban resultados concordantes determinándola sobre los eluidos del Sephadex G-25 o sobre el sobrenadante inicial, mediante las correcciones apropiadas, obtenidas a partir de los blancos.

Los intentos de separar las porfirinas presentes en glándula de Harder, tanto normal como porfírica, también resultaron inútiles; pero por la naturaleza de las mismas (fundamentalmente Proto) no se vió afectada la determinación PCL, ya que dicha porfirina se separa cromatográficamente, no incide en el cálculo numérico de los productos de decarboxilación y está presente en concentraciones semejantes en ambas preparaciones enzimáticas.

TABLA VI Efecto del pasaje a través de columnas de Sephadex G-25 sobre la actividad PCL

TEJIDO	Preparación enzimática	Porfirinas ( % )				ACT. ENZIMÁTICA		
		sustr. rem.	productos formados			Desaparición de Uro'gen	Formación de Copro'gen	
			7COOH	6COOH	5COOH			4COOH
HIGADO	Sobrenadante de homogenato de hígado normal (SHHN) SHHN pasado a través de columna de Sephadex G-25	37	30	4,5	4,5	24	0,52	0,20
		36	29	4,0	4,0	27	0,51	0,21
RINON	Sobrenadante de homogenato de riñón porfírico (SHRP) SHRP pasado a través de columna de Sephadex G-25	39	27	7,0	5,0	21	0,23	0,08
		46	25	6,0	4,0	19	0,22	0,07

La mezcla de incubación contenía: buffer fosfato de potasio 0,067 M, pH 7,0, GSH 1 mM, EDTA 0,1 mM, Uro'gen III 2  $\mu$ M y sobrenadante de homogenato (11.000 x g) de hígado normal ( 9 mg. de prot.) o riñón de ratas porfíricas por HCB. (21mg de prot.) o los correspondientes eluidos de las columnas de Sephadex G-25 conteniendo aprox. la misma cantidad de mg de proteína. Los ensayos se incubaron por 30 min en oscuridad, anaerobiosis y con agitación, a 37C. Las porfirinas con distinto número de -COOH fueron extraídas, cromatografiadas y cuantificadas espectrofotométricamente como se detalla en Métodos.

EFFECTO DEL TAMIZAJE MOLECULAR SOBRE LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD PCL.

Para investigar si el pasaje a través de Sephadex G-25 afectaba la determinación de la actividad PCL, la misma fué medida antes y después de dicho tratamiento. Los resultados (tabla VI) mostraron que la filtración por gel no altera ninguna de las actividades enzimáticas de los distintos pasos de decarboxilación, tanto en el hígado normal como en el riñón porfírico (que fueron los sistemas probados) ya que tanto la actividad enzimática por mg. de proteínas, como la actividad total fué la misma antes y después del procedimiento.

De acuerdo a los resultados y consideraciones arriba mencionadas, las preparaciones enzimáticas usadas para la determinación de PCL, en los diferentes tejidos estudiados, se indica en la leyenda de las tablas correspondientes (las preparaciones de hígado y riñón porfíricos fueron las únicas que se pasaron a través de Sephadex G-25).

ACTIVIDAD PCL EN DISTINTOS TEJIDOS DE RATAS NORMALES Y PORFIRICAS POR HCB.

Dado que la acumulación arriba mencionada sugiere una probable deficiencia en la PCL, se determinó la actividad de la

misma en ambos grupos de animales. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla VII.

Además se realizaron los blancos correspondientes que consistieron en la incubación del sistema total menos el Uro'gen, obteniendo en todos los casos ensayados actividad nula; además sirvieron para verificar, en el caso de los tejidos que acumulan porfirinas, que la composición (en porcentaje y naturaleza) de las porfirinas de un blanco incubado coincidía con la de los blancos a tiempo cero, lo cual nos está indicando que dichas porfirinas (Uro y Firia) están presentes como porfirinas y no como porfirinógenos, ya que no son utilizadas por la enzima. En la tabla VII se encuentran los porcentajes de los sustratos remanentes y producto formado y las actividades enzimáticas expresadas como: a) decarboxilación de Uro'gen y que mide la velocidad de eliminación del primer grupo carboxilo desde Uro'gen (1er. etapa: Uro  $\rightarrow$  Firia); b) formación de Copro'gen, que mide la eliminación de los 3 grupos carboxilos desde el Firia'gen biosintetizado (2da. etapa: Firia  $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$  Copro) (71). Allí vemos que la intoxicación por HCB produce una notable disminución de la actividad de la PCL hepática, afectando ambas etapas de la decarboxilación. Aparentemente la 1a. etapa, que lleva de Uro a Firia, se ve afec-

TABLA VII Actividad PCL en distintos tejidos de ratas normales e intoxicadas con HCB

TEJIDO	PORFIRINOGENOS (%)					ACTIVIDAD ENZIMATICA $\frac{\text{nmoles de porfirinas}}{\text{mg. de prot. x30 min.}}$				
	sustr. rem.	productos formados				Desaparición de Uro'gen	AR (%)	FORMACION de Copro'gen	AR (%)	
	8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH					
HIGADO	N	38 ± 2	27 ± 3	4 ± 0,3	4 ± 0,3	27 ± 2	0,56 ± 0,02	100	0,26 ± 0,02	100
	HCB <sup>a)</sup>	85 ± 1	10 ± 1	5 ± 0,5	0	0	0,15 ± 0,01 *	27	0	0
	HCB <sup>b)</sup>	75 ± 2	17 ± 1	4 ± 0,5	2 ± 0,5	2 ± 0,5	0,14 ± 0,01 *	25	0,015 ± 0,002 *	6
BAZO	N	44 ± 9	29 ± 5	5 ± 1,5	4 ± 1,5	18 ± 5	0,36 ± 0,02	100	0,10 ± 0,01	100
	HCB	42 ± 8	31 ± 6	5 ± 1,5	5 ± 1,5	17 ± 6	0,39 ± 0,03	108	0,12 ± 0,04	120
RIÑON	N	24 ± 1	23 ± 1	4 ± 0,5	4 ± 0,5	45 ± 1	0,26 ± 0,01	100	0,15 ± 0,01	100
	HCB	49 ± 2	25 ± 1	6 ± 0,5	4 ± 0,5	16 ± 2	0,23 ± 0,01 †	89	0,072 ± 0,006 *	48
GLANDULA DE HARDER	N	38 ± 5	27 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	25 ± 4	4,42 ± 0,25	100	2,39 ± 0,25	100
	HCB	38 ± 4	32 ± 2	5 ± 1	4 ± 1	21 ± 4	4,31 ± 0,01	97	1,94 ± 0,25	81
ERITROCITOS	N	40 ± 10	24 ± 2	4 ± 1,5	4 ± 1,5	28 ± 8	0,48 ± 0,03	100	0,22 ± 0,01	100
	HCB	42 ± 8	23 ± 3	5 ± 0,5	5 ± 0,5	25 ± 6	0,49 ± 0,03	100	0,22 ± 0,02	100

tada en menor grado que la 2a., que lleva de Firia a producto final Copro.

Como las experiencias se realizaron con ratas con severa porfiria, en algunos casos (Hígado/HCB/a) se encontró un 100% de inhibición para la formación de producto final, lo cual indicaría una inhibición total de esta etapa o de lo contrario podría ser que la cantidad de Copro formada fuese tan pequeña que no se detectaba. Para ver cual de las dos posibilidades era la verdadera, se realizaron ensayos variando la cantidad de proteína empleada para la preparación enzimática de hígado porfírico, utilizando un valor semejante al empleado para el ensayo con hígado normal y el doble del mismo.

Los resultados se ven en la primer fila de la tabla VII, en donde comprobamos que cuando la cantidad empleada de las preparaciones de los animales tratados es igual a la de los normales no hay formación de Copro, en cambio, cuando se duplica la proteína empleada, se forma una pequeña cantidad de la misma (2%) como así también de los intermediarios de 5- y 6-COOH (6% en total). En estos casos puede cuantificarse el decremento de la actividad enzimática producida por la intoxicación por HCB que es de un 94% para la 2da. etapa y de un 75% para la 1a. como se observa en dicha tabla.

En la 2a. fila de la tabla VII vemos la actividad PCL de los sobrenadante de homogenato de bazos normales y de animales intoxicados y comprobamos que, contrariamente a lo que era de esperar por la notable acumulación de porfirinas altamente carboxiladas, la actividad PCL no está disminuída sino, por el contrario, ligeramente aumentada, lo cual se ve en ambas etapas de la descarboxilación del Uro'gen.

Si bien la actividad de los bazos normales fué menor que la de los hígados normales, el nivel de actividad fué bueno y perfectamente detectable.

En el riñón, que era el 3er. tejido que acumulaba porfirinas de 8- y 7-COOH por acción del HCB, la actividad PCL estuvo significativamente disminuída, sobre todo la formación de Copro para la cual  $p < 0,001$ , siendo los porcentajes de inhibición de 11 y 52% para la 1er. y 2da. etapa respectivamente (tabla VII) y pudiendo esto justificar la acumulación observada.

En cuanto a los dos últimos tejidos, glándula de Harder y glóbulos rojos, que no presentaban un contenido porfirínico distinto para las ratas intoxicadas frente a las normales, tampoco presentaron diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$  en cuanto a la actividad PCL (dos últimas filas de la tabla VII).

Observando los intermediarios de la reacción vemos que tanto con la enzima de ratas normales como porfíricas el intermediario que más se acumula es el Firia'gen; en tanto que la proporción relativa de Hexa'gen respecto de Penta, fué igual en ratas normales y mayor en porfíricas; indicando quizás que el paso de Hexa a Penta se ve también afectado por el tratamiento con HCB. La comparación de los porcentajes de Copro en los dos sistemas sugieren que el paso de Penta a Copro también está afectado, ya que con la enzima proveniente de ratas intoxicadas con HCB se llega a un porcentaje mucho menor de Copro.

- Actividad PCL hepática frente a los porfirinógenos de la serie isomérica I y III comparativamente.

Al comprobar que el hígado era el órgano más afectado por la intoxicación con HCB, se decidió estudiar el efecto de esta droga sobre los distintos pasos de decarboxilación de los porfirinógenos de la serie isomérica I, como así también el efecto de la droga en función del tiempo de intoxicación, sobre varias enzimas del camino metabólico del hemo, a nivel hepático. La medición de la actividad PCL sobre el Uro'gen I permitiría determinar si la decarboxilación de los porfirinógenos de la se-

rie isomérica I también se ve afectada por el tratamiento con HCB y, en caso afirmativo, localizar el bloqueo a lo largo del proceso total. Estos resultados ayudarían a explicar el cuadro químico observado en porfiria cutanea tarda (PCT) humana, pues como se puntualizó en la Introducción y se corrobora en varios tópicos del presente trabajo, la porfiria experimental por HCB es un buen modelo para su estudio.

En la tabla VIII se ve que el tratamiento con HCB provoca un decremento de la actividad PCL respecto de la normal de aproximadamente un 80% y 94% para la 1er. y 2da. etapa respectivamente, tanto al usar Uro I como al usar Uro III como sustrato.

A nivel de actividades enzimáticas también se comprueba que la velocidad de decarboxilación, en las condiciones de ensayo, es mucho menor para el Uro'gen I que para el Uro'gen III.

Observando el % de porfirinógenos que quedan formados al final de la incubación se ve: i) que en la serie isomérica I, tanto con la enzima normal como con la porfírica, queda una gran cantidad de sustrato remanente, aproximadamente del mismo orden de la Uro III remanente, usando enzima de ratas porfíricas; ii) que en la serie III hay acumulación de Firia, y que dicha acumulación respecto de Hexa es aproximadamente igual para la enzima

TABLA VIII Efecto de la intoxicación con HCB sobre la descarboxilación de los isómeros I y III del Uro'gen

Sustrato	P Reparación enzimática	Porfirinas ( % )						ACTIVIDAD ENZIMATICA $\frac{\text{nmoles de porfirinas}}{\text{mg. de prot. x 30 min.}}$			
		sust. rem.	productos formados						Desaparición de Uro'gen (%)	D Formación de Copro'gen (%)	D
			8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	4-COOH			
Uro'gen I	N	89	0,8	0,3	4,4	5,5		0,085	0,044		
	P	97	0,6	0,6	1,1	0,5		0,014	84	0,003	93
Uro'gen III	N	28	25	4,5	4,5	3,8		0,604		0,321	
	P	84	11	2,3	1,2	1,5		0,151	75	0,015	95

Las determinaciones se realizaron como se indica en la tabla VII, con sobrenadantes de 11.000 xg de homogenato de hígado de ratas normales (N) o porfíricas (P) usando Uro'gen I (8,7 nmoles) o Uro'gen III (8,1 nmoles) como sustrato. Los valores son el promedio de los resultados obtenidos en dos experiencias, en las cuales se trabajaron individualmente los datos correspondientes a 2 ratas de cada lote. Los detalles de las determinaciones están en la tabla VII

normal que para la porfírica; en tanto que para la serie isomérica I, esta acumulación relativa respecto de Hexa, es algo menor para la enzima normal y no existe para la porfírica; iii) en cuanto a Penta' y Hexa'gen, siempre aparecen en pequeño porcentaje y la diferencia más significativa es que con la serie isomérica III y enzima normal los dos aparecen en igual porcentaje, mientras que con la porfírica hay mayor cantidad de Hexa'gen y respecto de la serie I, con ambas preparaciones enzimáticas, hay una gran acumulación de Penta'gen, siendo más notoria a nivel normal; iv) por último, en cuanto a formación de producto final, se corrobora lo dicho a nivel de actividad enzimática o sea que con la preparación proveniente de animales intoxicados se produce una cantidad mucho menor de Copro, en ambas series isoméricas.

De lo expresado anteriormente podemos concluir que la decarboxilación de los dos isómeros en ratas normales difiere no sólo en cuanto a la velocidad de reacción sino también en cuanto al modo de acumulación de los intermediarios de reacción, que como dijimos es distinto con los distintos isómeros, y el efecto del HCB a nivel de actividades enzimáticas sería aproximadamente el mismo en ambas series isoméricas, mientras que a nivel

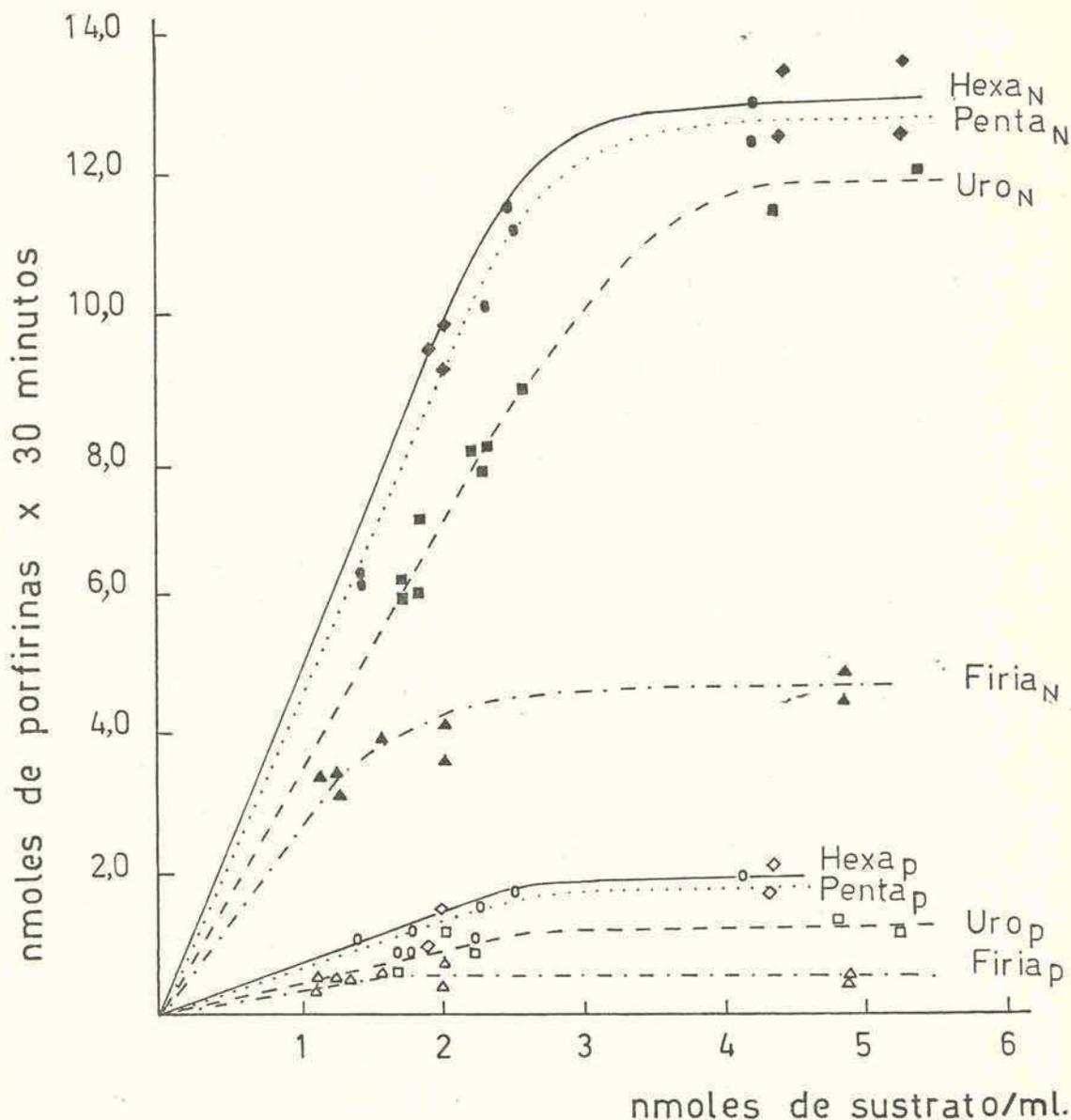
de intermediarios parecería que el HCB provoca un bloqueo a nivel de Hexa  $\rightarrow$  Penta, en ambas series isoméricas, provocando así mayores acumulaciones del intermediario de 6-COOH frente al de 5-COOH, no modificando las características acumulaciones de Firia para la serie III y Penta para la serie I.

EFEECTO DEL HCB SOBRE LA DESCARBOXILACION DE LOS DISTINTOS PORFIRINOGENOS DE LA SERIE III, AÑADIDOS A SATURACION EN EL MEDIO.

A los fines de ver si había diferencia en la respuesta de la actividad PCL para los 4 pasos de la decarboxilación total del Uro'gen III, se realizaron ensayos usando los distintos porfirinógenos involucrados en cada paso, y se variaron las cantidades empleadas para poder comparar aquellos valores que se consideró estaban a saturación. Los resultados se ven en la fig. 28 y en la tabla IX.

En la fig. 28 vemos que entre 12-16 nmoles de porfirinógeno se logra la saturación para Uro, Hexa y Penta'gen, mientras que con Firia'gen quizás se sature antes (8-10 nmoles). Los datos correspondientes a animales porfíricos son más imprecisos, dado la baja actividad que presentan y la gran fluctuación de los resultados cuando se emplean altas concentraciones de porfiri-

Fig 28 Efecto de distintas concentraciones, en el medio de incubación, de los sustratos involucrados en el pasaje de Uro'gen a Copro'gen, sobre la PCL hepática de ratas



Los detalles experimentales referentes al sistema y modo de incubación están en la Tabla VII. La actividad se expresa como nmol consumidos del porfirinógeno usado como sustrato. Las cuatro curvas superiores (figuras llenas) corresponden a los animales normales y las 4 inferiores (figuras vacías) a los animales porfíricos.

TABLA IX Efecto 'in vivo' del HCB sobre la actividad PCL a nivel de los distintos pasos de la descarboxilación total del Uro'gen III

SUSTRATO	Prep. Fzn.	PORFIRINAS (%)					ACTIVIDAD ENZIMATICA					nmoles de sustrato consumidos mg. de prot. x 30min.	
		8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	U→F (%)	F→H (%)	H→P (%)	I (%)	P→C (%)	I (%)	I (%)
Uro	NORMAL	68	25	2	2	3	1,15	0	0,07	0	0,07	0	0
Firia		76	6	6	6	12	0,43	0	0,21	0	0,21	0	0
Hexa		51	51	19	30	1,33	0	0,81	0	0,81	0	0	0
Penta		47	47	53	1,26	0	1,26	0	0	0	0	0	0
Uro	HCB	82	13,5	3	1	0,5	0,16	86	0,007	90	0,007	90	90
Firia		87	6	3	4	0,06	85	0,02	90	0,02	90	90	90
Hexa		84	84	8	8	0,18	86	0,09	89	0,09	89	89	89
Penta		85	85	15	0,14	89	0,14	89	89	0,14	89	89	89

Las mezclas de incubación contuvieron buffer fosfato de potasio pH 7,0, GSH  $10^{-3}$  M, EDTA  $10^{-4}$  M, Uro'gen III (5,1  $\mu$ M), Firia'gen III (2,5  $\mu$ M), Hexa'gen III (4,6  $\mu$ M) o Penta'gen III (4  $\mu$ M). Como preparación enzimática se usó: sobrenadante de homogenato para hígado normal (6,9 mg prot) y dicho sobrenadante pasado por columna de Sephadex G-25 para hígado porfírico (15,6 mg prot) en un volumen total de 4 ml. Las incubaciones y determinaciones de los productos formados se detallaron en la Tabla VII.

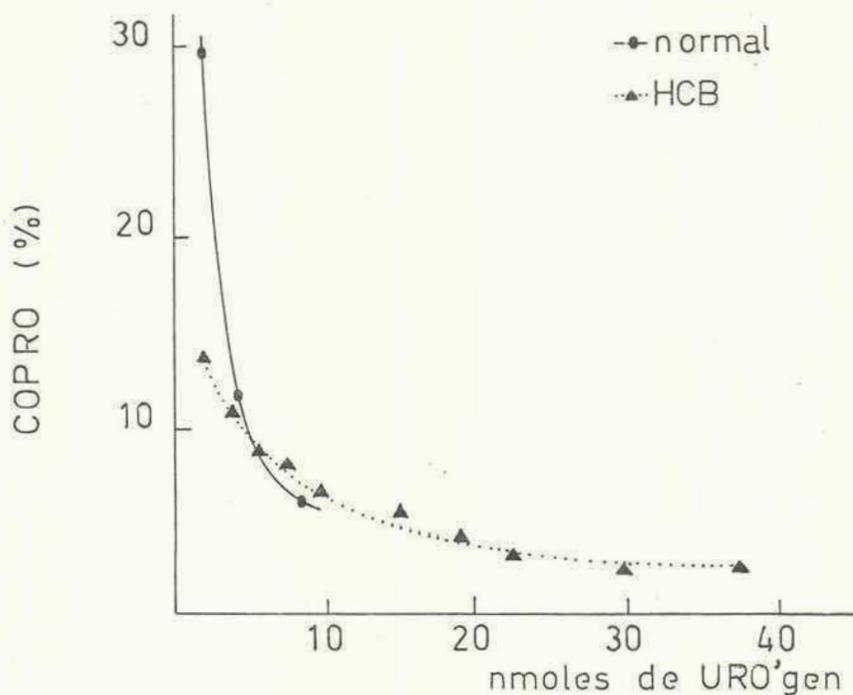
nógeno; a pesar de ello los gráficos aparentemente indicarían que los nmoles necesarios de Firia'gen para saturar a la enzima son menores que los nmoles necesarios de los restantes porfirinógenos. Por otra parte, tanto con ratas normales como con porfíricas se observa una menor velocidad de decarboxilación del Firia'gen, respecto de Uro, Penta y Hexa'gen, siendo quizás la velocidad de decarboxilación de este último la mayor de todas.

En la tabla IX vemos los valores de actividad PCL para los porfirinógenos con distinto número de  $-COOH$ , correspondientes a la serie III y los porcentajes de inhibición para cada paso de la decarboxilación de Uro'gen hasta Copro'gen de la enzima porfírica, calculados tomando como referencia los valores correspondientes a la enzima normal. Vemos que, en todos los pasos, la inhibición es de 83-86% para la primer decarboxilación que sufre el porfirinógeno correspondiente y 89-90% para la aparición del producto final (Copro) en todos los casos.

En cuanto al % de intermediarios al final de la incubación, nuevamente esta tabla, pone de manifiesto que en la serie isomérica III, cuando se usa Uro'gen como sustrato hay acumulación de Firia, en tanto que los porcentajes de Hexa y Penta son pequeños e iguales; esto último también se visualiza cuando el

sustrato es Firia'gen. Con la preparación porfírica, se produce un desbalance entre Hexa y Penta, que favorece a la primera, tanto al usar Uro'gen o Firia'gen como sustratos. Por otra parte, cuando se usaron cantidades saturantes de Hexa'gen o Penta'gen como sustrato, el % de inhibición de la actividad PCL de la enzima porfírica frente a la normal, producido por HCB, del pasaje de Hexa a Penta, fué ligeramente mayor que el de Penta a Copro; esto justificaría la mayor acumulación relativa de Hexa frente a Penta, en los casos porfíricos.

Cuando el sustrato fué Uro'gen, se ve que el % relativo de Copro y por ende su velocidad de formación, tanto para la enzima normal como para la porfírica, fué muy bajo. Esto podría estar indicando una inhibición por sustrato, a las altas concentraciones usadas, necesarias para alcanzar la saturación de la 1er. etapa. Esto fué confirmado por los datos presentes en la siguiente figura, que fué construída en base a los valores de los % relativos de Copro'gen formados al utilizar distintas concentraciones de Uro'gen. Aquí observamos que la Copro formada decrece a medida que aumenta la concentración del sustrato.

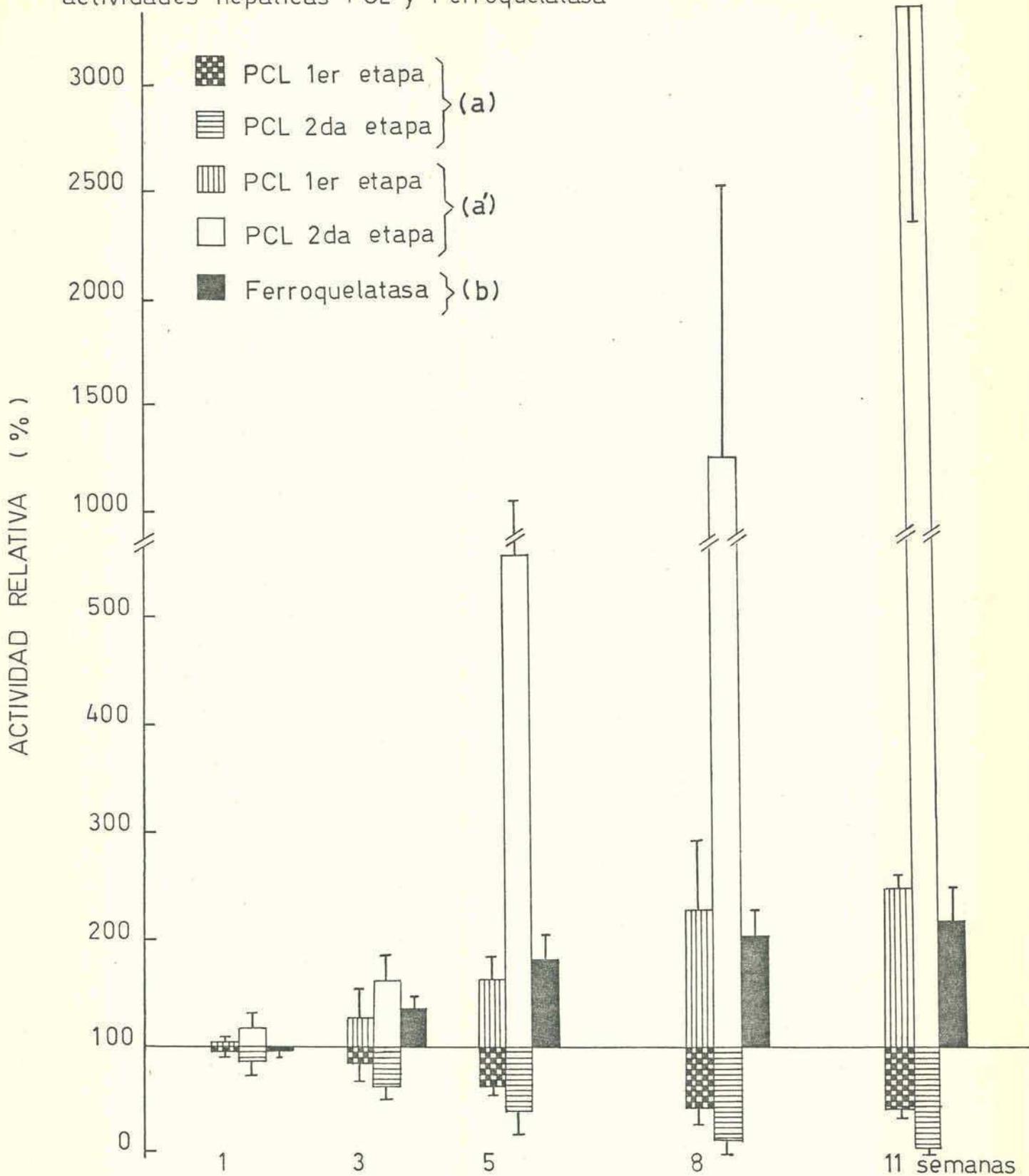


EFFECTO DEL HCB SOBRE EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO.

El efecto del HCB sobre las distintas enzimas del camino metabólico del hemo a nivel hepático se realizó en conjunto con otros integrantes del equipo de la Dra. San Martín de Viale y si bien aquí veremos los resultados obtenidos a nivel de PCL y ferroquelatasa, que son parte de este trabajo de tesis, mencionaremos los resultados obtenidos por los restantes compañeros de grupo, para tener una idea global de la situación, a nivel enzimático.

Se estudió el efecto del HCB en función del tiempo de intoxicación encontrando, como puede verse en la fig. 29 que la PCL decrece su actividad progresivamente en función de las se-

Fig 29 Efecto del HCB en función del tiempo de intoxicación sobre las actividades hepáticas PCL y Ferroquelatasa



Los detalles experimentales para medición de PCL se dieron en la Tabla VII en cuanto a la medición ferroquelatasa se realizó en el siguiente sistema de incubación: 100 nmoles de Proto, 200 nmoles de  $SO_4Fe$ , 200 nmoles de succinato, 0,8 ml de suspensión mitocondrial (10 mg) en un volumen final de 3,2 ml, con buffer Tris-ClH 500 mM, pH 8,2. El hemo formado fué determinado por el método del piridín-hemocromógeno empleando  $Fe^{++}$  y Proto como sustratos. En todos los casos las barras representan los valores medios y las semirrectas el E.S.

manas de intoxicación, tanto para la 1a. como para la 2a. etapa. Es de destacar que ya a la primer semana de tratamiento se observa un decremento de la actividad, siendo la 2a. etapa la que se ve más afectada en todo momento alcanzando el valor máximo de disminución a las 8 semanas de tratamiento.

La fig. 29 a' es la imagen especular de la 29 a y se realizó para poder visualizar mejor hasta qué nivel puede llegar el decremento de actividad en el hígado de un animal intoxicado, pues en caso de tomar al normal como 100%, el decremento sólo podría llegar a ser igual a 100%, en cambio tomando al valor de las ratas intoxicadas como 100% y ver respecto de ese, cual es el valor porcentual de las ratas control, las posibilidades no tienen límite y así comprobamos que en casos graves de porfiria, el valor PCL de un hígado normal puede llegar a ser un 250% del valor proveniente de una rata intoxicada. Aquí también incluimos lo que sucede a nivel de aparición de producto final, o sea formación de Copro, y nuevamente comprobamos que el efecto es mucho mayor, del orden del 3.500 %, ya que a ese nivel el problema de no saturación es mayor.

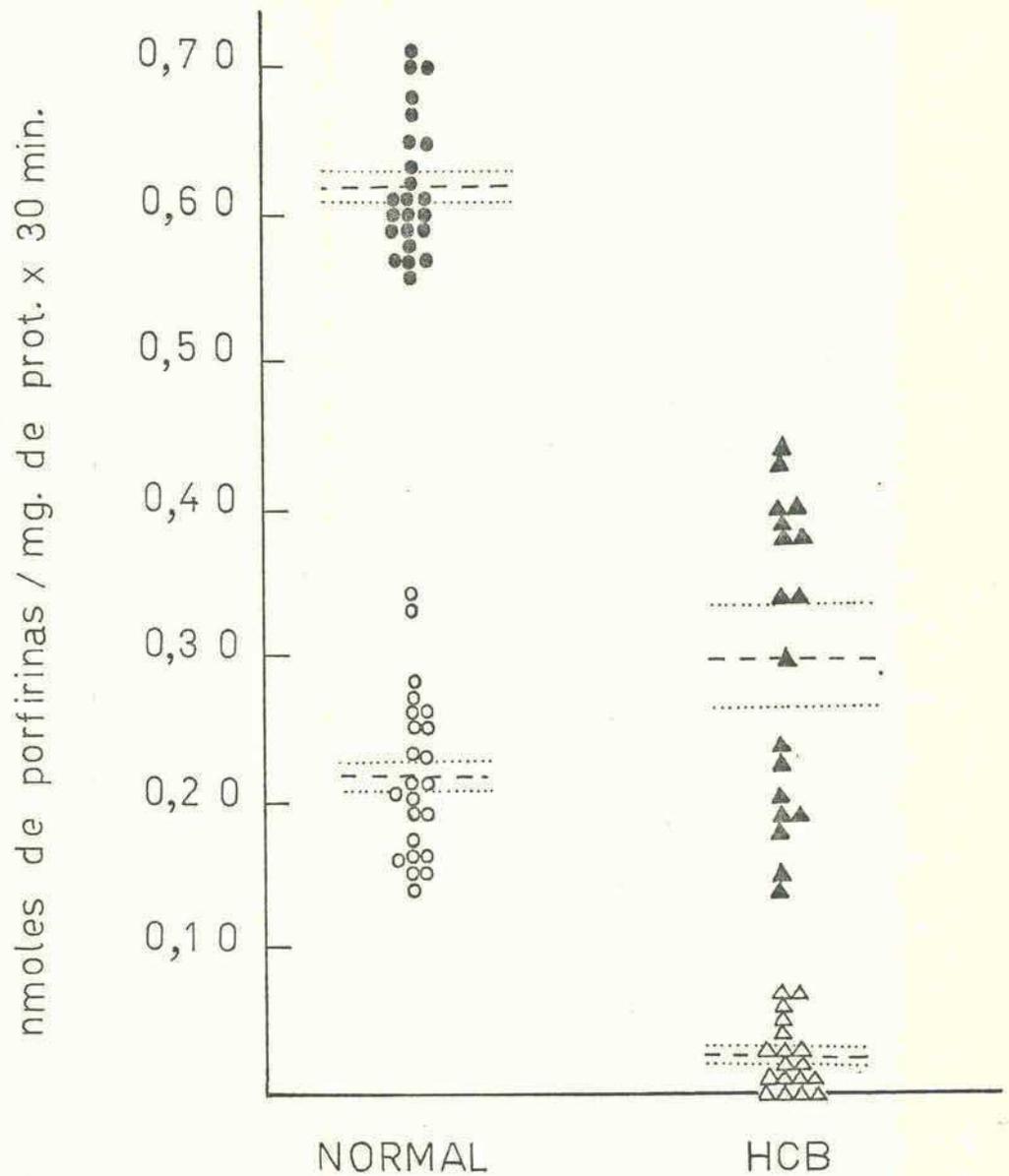
En la misma figura (fig. 29) se grafican los resultados para actividad ferroquelatasa en función del tiempo de tratami-

ento con HCB. Así se comprueba que, a diferencia de la PCL, la ferroquelatasa aumenta su actividad por la droga y que dicho incremento es progresivo con el tiempo a lo largo del período estudiado (11 semanas) encontrándose un valor del 200% al final del mismo, momento en que los animales presentaban un cuadro de severa porfiria. Comparando los resultados aquí mencionados con los de las restantes enzimas estudiadas del camino metabólico del hemo: ALA-S, ALA-D y PBG-asa se comprobó que frente a ellas la PCL es la que ve afectada primero su actividad en función del tiempo de intoxicación y además que es la única que sufre un decremento con el tratamiento puesto que, al igual que ferroquelatasa, ALA-S, ALA-D y PBG-asa aumentan su actividad.

En la fig. 30 pueden verse la recopilación de datos obtenidos para las actividades PCL hepáticas normales y de animales intoxicados, a nivel de sobrenadante de homogenato. Allí también se corrobora que los valores normales de actividades de la 1er. y 2da. etapa respectivamente, son del orden del 200 y 800%, en promedio, respecto de la de un animal porfírico.

En la misma figura se ve que si bien los valores de actividad PCL caen dentro de un rango estrecho para los animales normales, para los porfíricos no ocurre lo mismo, indicando que

Fig 30 Actividad PCL de sobrenadante de homogenato de hígado de ratas normales y porfíricas por hexaclorobenceno (HCB)



Los detalles de medición PCL fueron presentados en la tabla VII. Los círculos y triángulos representan valores individuales y las líneas discontinuas los valores medios y las líneas punteadas el E.S.

N: valores correspondientes a ratas normales. HCB valores correspondientes a ratas con un severo cuadro de porfiria (tiempo de tratamiento: 11 o más semanas).

● { 1a etapa      ○ { 2a etapa  
▲ {                      △ {

existe distinta sensibilidad en la respuesta enzimática de los animales individuales a la droga puesto que estos datos fueron obtenidos de ratas muy porfíricas, que tenían 11 o más semanas de tratamiento.

INVESTIGACIONES SOBRE LA EXISTENCIA DE UN POSIBLE INHIBIDOR DE LA PCL EN HIGADO DE RATAS PORFIRICAS POR HCB.

Deseando investigar si el decremento de la PCL hepática era debido a la acción de un inhibidor enzimático presente en los hígados de las ratas porfíricas por HCB y en caso de serlo, si se trataba del HCB mismo o un metabolito tal como el PCF u otros compuestos relacionados, se planearon una serie de experimentos.

- Ensayos cruzados y de calentamiento.

En primer lugar se llevaron a cabo estudios de calentamiento y ensayos cruzados. Para ello se probó el efecto de una preparación enzimática proveniente del hígado de un animal porfírico, desproteinizado por calentamiento durante 5 min. a 100°C, sobre la actividad PCL de un hígado normal y los resultados obtenidos se compararon tanto con la actividad del mismo hígado normal, como con la actividad del hígado normal en presencia de

un desproteínizado proveniente del hígado normal. Además se realizaron los controles correspondientes midiendo la actividad enzimática de los desproteínizados por calentamiento ( $\Theta N$  y  $\Theta P$ ) para asegurar que la desnaturalización había sido efectiva. Los resultados obtenidos con el desproteínizado total o un sobrenadante del mismo se ven en la tabla X. Allí vemos que decrementos del 23 y 52% fueron obtenidos para el primer y segundo paso de la decarboxilación respectivamente, cuando preparaciones calentadas totales provenientes de hígados porfíricos fueron adicionadas como tales a una normal. Aproximadamente el mismo efecto fué observado cuando el sobrenadante de centrifugación por 5 min. a 900 xg después de desproteínizar (o sea la fracción soluble), fué utilizado como preparación calentada. Puede verse también que los controles  $\Theta N$  y  $\Theta P$  no exhibieron actividad PCL, es decir que la desnaturalización por calentamiento fué efectiva provocando un 100% de inhibición. Los decrementos mencionados (efecto "in vitro" del HCB) son menores que los calculados cuando la actividad de animales porfíricos se compara directamente con la del normal (efecto "in vivo"), pues como vemos en la segunda fila tales decrementos son del 40 y 96 %, para el primer y segundo paso, respectivamente.

TABLA X Efecto de preparaciones de hígado desproteinizadas por calentamiento sobre la actividad PCL de hígado de ratas normales

PREPARACION ENZIMATICA	PREPARACION DE HIGADO DESPROTEINIZADA POR CALENTAMIENTO		ACTIVIDADES ENZIMATICAS			
			Desaparición de Uro'gen		Formación de Copro'gen	
			nmoles de porfirinas/ mg. de prot. x 30 min.	Inhibición ( % )	nmoles de porfirinas/ mg. de prot. x 30 min.	Inhibición ( % )
NORMAL	—		0,62		0,27	
PORFIRICO	—		0,25	40	0,01	96
NORMAL	SOBRENADANTE	$\ominus N_s$	0,59	5	0,24	11
		$\ominus P_s$	0,52	16	0,15	44
	TOTAL	$\ominus N$	0,61	2	0,25	7
		$\ominus P$	0,48	23	0,13	52
BLANCOS	$\ominus N$		0	100	0	100
	$\ominus P$		0	100	0	100

El medio de incubación para PCL fué detallado en la Tabla VII N y P: sobrenadante de 11,000 xg por 20 min., de homogenato de hígados de ratas normales y porfíricas, respectivamente  $\ominus N$  y  $\ominus P$ : sobrenadante de homogenato de hígado normal(N) y porfírico(P) filtrado a través de Sephadex G-25, calentado a 100°C por 5 min.  $\ominus N_s$  y  $\ominus P_s$  la misma preparación centrifugada a 900 xg por 5 min. (descartando el precipitado). Los valores son el promedio de los resultados obtenidos en dos experimentos, en los que se usaron dos ratas de cada lote

Los resultados, obtenidos hasta aquí, indicarían la presencia, en el hígado de animales intoxicados con HCB, de una sustancia termoestable capaz de disminuir la actividad PCL hepática de animales normales, pero no en el mismo grado en que lo hace el HCB cuando se administra "in vivo", por lo tanto otras causas deben modificarla, por ejemplo una alteración en la estructura proteica o en el mecanismo de síntesis de la proteína enzimática. Aunque tampoco podía descartarse la posibilidad de que el tratamiento térmico hubiese restado efectividad a la sustancia en cuestión. Por ello se realizaron también los correspondientes ensayos cruzados incubando juntas la preparación proveniente de animales normales con la de animales intoxicados, ambas pasadas previamente a través de Sephadex G-25.

Una vez obtenidos los resultados individuales se compararon con los cruzados de la siguiente manera: Se sumaron la mitad de los nmoles obtenidos con 2 ml de la preparación normal más la mitad de los nmoles obtenidos con la preparación porfirica y el valor resultante se dividió por la semisuma de los mg. de proteínas empleados en cada determinación; esto es lo que se llamó "valor teórico". Mientras que el valor experimental se logró incubando 1 ml de cada preparación y realizando los cál-

culos en la forma habitual.

En caso de que la preparación porfírica tuviese un inhibidor de la actividad de la normal, cabría esperar que el valor experimental fuese menor que el teórico, a no ser que el probable decremento provocado por la preparación porfírica sobre la normal se viese compensado por un concomitante incremento de la actividad de la preparación porfírica, al ser separada en parte del inhibidor.

Como vemos en la tabla XI los resultados teóricos no difirieron mayormente de los experimentales o sea que la preparación de la enzima porfírica no afecta significativamente la actividad normal pudiendo no obstante tener vigencia la última hipótesis planteada.

Se podría pensar también que el pasaje a través de Sephadex G-25, que se aplicó a ambas preparaciones afectó la actividad de las mismas, por ejemplo separando un inhibidor de la porfírica o un activador de la normal, impidiendo por esta causa encontrar los resultados esperados. Pero cabe recordar aquí que este tratamiento no afecta la actividad de una preparación normal, como lo demuestran los resultados presentes en la tabla VI y en cuanto a la preparación porfírica, evidentemente no se vió

TABLA XI Efecto del agregado de una preparación enzimática proveniente del hígado de ratas porfíricas sobre la actividad PCL hepática de ratas normales.

PREPARACION ENZIMATICA (ml)		ACTIVIDADES ENZIMATICAS					
		Desaparición de Uro'gen			Formación de Copro'gen		
NORMAL	PORFIRICO	nmoles	nmoles de porfirinas/ mg. prot. x 30 min.	valor relativo (%)	nmoles	nmoles de porfirinas/ mg. prot. x 30 min.	valor relativo (%)
2	—	5,8	0,59		3,8	0,39	
—	2	1,7	0,22		0,14	0,018	
1	1	5,2	0,60	136	22	0,25	109
VALOR TEORICO		3,8	0,44		2,0	0,23	

N y P: sobrenadante de 11.000 xg por 20 min.\*, de homogenato de hígado de ratas normales y porfíricas respectivamente. Los detalles experimentales de medición de PCL se dan en la Tabla VII. Los valores son el promedio de los resultados obtenidos en dos experiencias, en las cuales se usaron 2 ratas de cada lote.

\* pasado a través de Sephadex G-25

separada de ningún inhibidor por el pasaje a través de Sephadex G-25, ya que de haber sido así tendría que haberse encontrado un notable incremento en su actividad y como se ve en la 2a. fila de la tabla XI (P/2 ml) la inhibición final es de casi el 100% (valor relativo de la preparación porfírica respecto de la normal 0,05).

Estos resultados se cumplen en todos los pasos de la decarboxilación del Uro'gen a Copro'gen, ya que los valores relativos para los tres pasos intermedios no difieren mayormente de 100.

- Efecto "in vitro" del HCB y varios compuestos relacionados.

En segundo lugar se quiso investigar si el inhibidor en cuestión era el HCB o algún metabolito suyo. Para ello se realizaron los correspondientes ensayos "in vitro", con HCB, PCF y otros compuestos relacionados; tendientes además a ver si existía una relación entre la estructura de las sustancias probadas y su efecto inhibitorio. Los resultados se ven en la tabla XII. Las drogas fueron ensayadas a una concentración  $10^{-3}M$ , en la mezcla de incubación y en varios casos también a  $10^{-2}M$ , para tratar de encontrar mayores diferencias entre las respuestas de los isómeros de un mismo compuesto. Las drogas fueron ordena-

TABLA XII Efecto "in vitro" del HCB y varios compuestos relacionados sobre la actividad PCL hepática de ratas normales

DROGAS	PORFIRINAS ( % )				ACTIVIDAD ENZIMÁTICA $\frac{\text{nmoles porfirinas}}{\text{mg. prot. x 30 min.}}$				
	sust. rem. ——— productos formados				Desaparición de Uro'gen	Inh. (%)	Formación de Copro'gen	Inh. (%)	
	8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH					4-COOH
—	31	29	5	5	30	0,62	—	0,27	—
hexaclorobenceno $10^{-3}$	32	28	5	5	30	0,61	2	0,27	0
$10^{-2}$	31	29	5	5	30	0,62	0	0,27	0
benceno	31	29	5	5	30	0,62	0	0,27	0
m-diclorobenceno $10^{-3}$	31	29	6	6	28	0,62	0	0,25	7
$10^{-2}$	31	28	6	6	29	0,62	0	0,26	3
p-nitrofenol $10^{-3}$	32	31	5	5	27	0,61	2	0,24	11
ácido p-clorobenzoico $10^{-3}$	32	31	5	5	27	0,61	2	0,24	9
ácido benzoico $10^{-3}$	33	29	6	6	26	0,60	3	0,23	15
$10^{-2}$	38	35	4	4	19	0,56	10	0,17	37
fenol $10^{-3}$	43	26	5	5	21	0,51	18	0,19	30
$10^{-2}$	52	28	3	3	14	0,43	31	0,13	52

cont. TABLA XII

DROGAS		8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	Desaparición de Uro'gen	Inh. (%)	Formación de Copro'gen	Inh. (%)
2,4-diclorofenol	$10^{-3}$	41	32	5	5	17	0,53	15	0,15	44
2,5-diclorofenol	$10^{-3}$	43	30	5	5	17	0,51	18	0,15	44
	$10^{-2}$	62	28	3	2	5	0,34	45	0,05	81
2,6-diclorofenol	$10^{-3}$	42	32	5	4	17	0,52	16	0,15	44
	$10^{-2}$	52	31	4	4	9	0,43	31	0,081	70
p-monoclorofenol	$10^{-3}$	40	34	5	5	16	0,54	13	0,14	48
o-monoclorofenol	$10^{-3}$	47	33	4	3	13	0,48	23	0,12	56
m-monoclorofenol	$10^{-3}$	47	33	4	4	12	0,48	23	0,11	59
2,4,5-triclorofenol	$10^{-3}$	51	27	6	4	12	0,46	26	0,11	59
	$10^{-2}$	54	34	4	2	6	0,41	34	0,054	80
2,4,6-triclorofenol	$10^{-3}$	59	24	5	3	9	0,37	40	0,081	70
	$10^{-2}$	74	22	2	1	1	0,23	63	0,009	97
2,3,4,6-tetraclorofenol	$10^{-3}$	67	22	4	2	5	0,30	52	0,046	83
	$10^{-2}$	91	4	2	1	2	0,08	87	0,018	93
2,4-dinitrofenol	$10^{-3}$	62	27	4	2	5	0,34	45	0,042	84
pentaclorofenol	$10^{-3}$	69	23	3	2	3	0,28	55	0,027	90
	$10^{-2}$	91	4	2	1	2	0,08	87	0,018	93

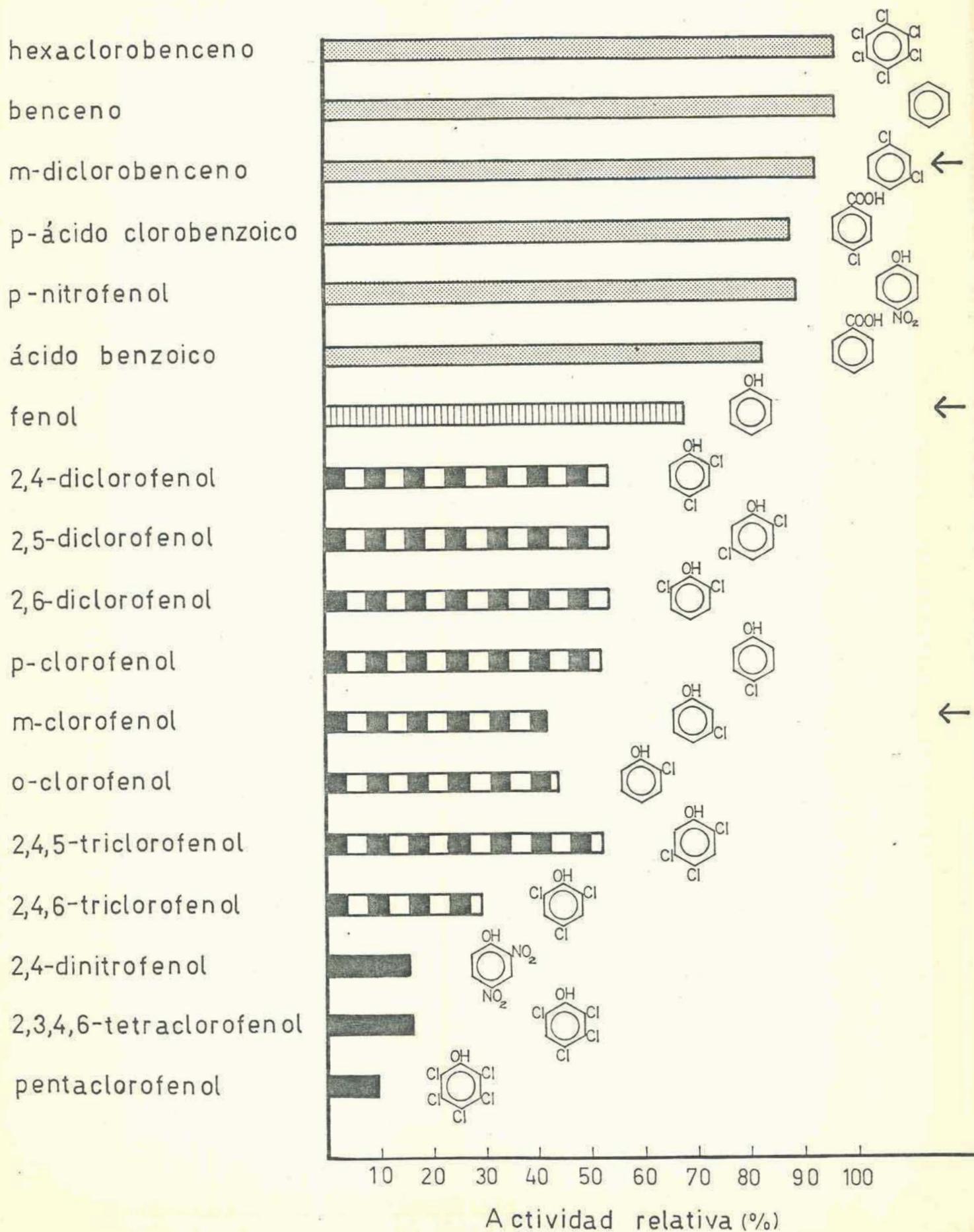
Las drogas fueron incorporadas en 0,04-0,4 ml de benceno, que fué evaporado antes de la adición de los componentes de la mezcla de incubación detallados en la Tabla VII, Los valores son el promedio de los resultados obtenidos en 2 a 3 experimentos, en los cuales se utilizaron 2 ratas.

das en orden creciente de efectividad para decrecer la actividad PCL. Así las 6 primeras a  $10^{-3}M$ , no tuvieron efecto o sólo afectaron ligeramente dicha actividad mientras que a partir del fenol, el efecto fué cada vez más acentuado. Los resultados obtenidos a  $10^{-2}M$  fueron en todos los casos mayores que a  $10^{-3}M$ , pero en el caso de distintos isómeros de un mismo compuesto, las diferencias en las respuestas se mantuvieron.

Otra observación importante que podemos hacer en esta tabla es que aquellas drogas que muestran un notable o gran efecto inhibitorio sobre la PCL, modifican la relación del porfirinógeno de 6-COOH al de 5-COOH, que es 1:1 para el caso control y pasa a 2:1 en estos ensayos, al igual que lo que sucede cuando se realiza el ensayo de actividad con una enzima proveniente de animales intoxicados. En estos ensayos también se observa un gran decremento en el porcentaje del porfirinógeno de 4-COOH.

En la fig. 31 podemos analizar la relación entre la estructura de los compuestos ensayados y su efecto inhibitorio, ya que las barras representan las actividades relativas por ciento del control para los compuestos cuya estructura se encuentra a la derecha de las mismas. Allí vemos que i) El HCB no tuvo efecto sobre la actividad PCL mientras que el PCF, fué la más efectiva

Fig 31 Relación estructura efecto inhibitorio de varios compuestos aromáticos sobre la actividad PCL de ratas normales



de las drogas ensayadas; ii) Las drogas que exhibieron efecto inhibitorio fueron fenoles, mientras que las no fenólicas no afectaron la actividad PCL, excepto el p-nitrofenol, pero podría deberse al efecto de la posición opuesta de los sustituyentes; iii) Los grupos Cl parecen incrementar el efecto inhibitorio del fenol no existiendo una correlación estricta entre el número de cloros y el poder inhibitorio, aunque los compuestos con mayor número de cloros, tales como el PCF y tetraclorofenol fueron los inhibidores más poderosos.

Tampoco se encontró una relación entre la acidez y el poder inhibitorio de estas drogas, ya que por ejemplo el dinitrofenol y el ácido benzoico tienen un  $pK_a \approx 4,0$  y sus efectos son muy diferentes. Sin embargo con los clorofenoles parece existir una relación inversa entre  $pK_a$  y el poder inhibitorio, ya que cuando el número de cloros sobre el anillo bencénico se incrementa, el  $pK_a$  decrece y el efecto inhibitorio aumenta. O sea que, el grupo fenólico tiene poder inhibitorio, que es incrementado por la presencia de grupos electrofílicos que hacen al OH más disociable y cargado negativamente al pH de la incubación enzimática.

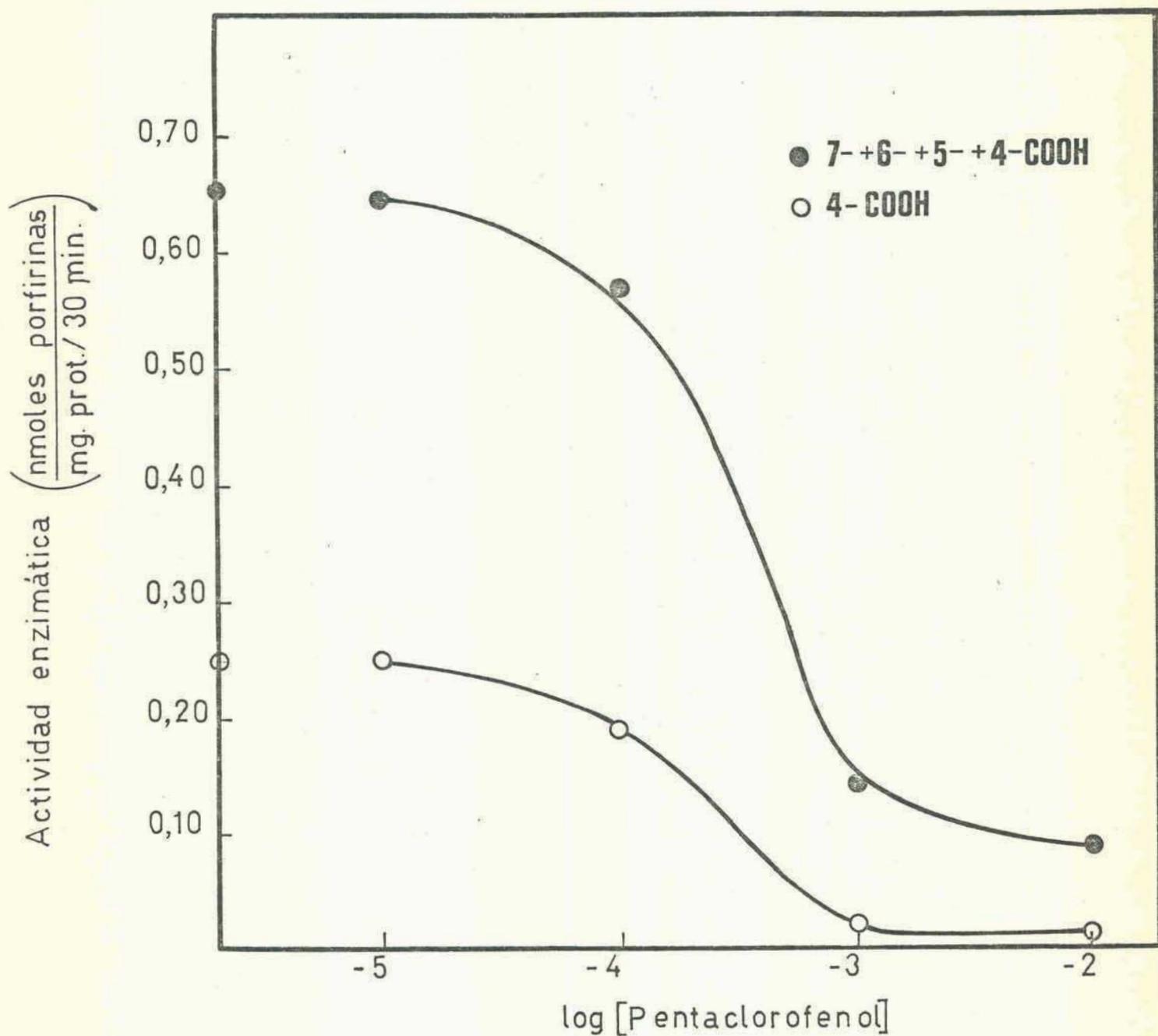
- El PCF como probable inhibidor.

Dado que el PCF, un compuesto que está entre los primeros metabolitos en el camino de la degradación del HCB, fué el más potente inhibidor de la enzima, resultó interesante encontrar la dosis límite por debajo de la cual el PCF no fuera efectivo y poder analizar así su posible implicancia en el desarrollo de la porfiria por HCB. Los resultados se ven en la fig.32, en la cual la línea superior representa la actividad para la primer etapa y la inferior la actividad para la 2da., los valores sobre la ordenada son los correspondientes a la enzima normal sin adición. Como puede verse a concentraciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  M el PCF posee un fuerte poder inhibitorio de la actividad PCL, siendo más leve aunque aún significativa la disminución que provoca a  $10^{-4}$  M, mientras que a  $10^{-5}$  M no presentó efecto inhibitorio, o sea que si el PCF fuese directamente responsable del decremento de PCL en porfiria por HCB, la concentración de PCF originada por metabolización del HCB y presente en el hígado debería ser mayor que  $10^{-5}$  M.

LOCALIZACION SUBCELULAR.

Dado que los resultados expuestos hasta el momento indicaban que, además de la existencia en el hígado de animales in-

Fig 32 Efecto de diferentes concentraciones de PCF sobre la PCL de hígado de ratas normales



toxicados con HCB de un inhibidor de la PCL, debía existir otro factor que disminuyera su actividad, se decidió purificar la enzima, para luego realizar estudios comparativos de algunas propiedades de la enzima proveniente de animales intoxicados respecto de las de normales.

En primer lugar se procedió a determinar la localización subcelular de la PCL en hígados normales y de animales porfíricos, ya que si bien se conocía su ubicación en los normales, podría existir alguna diferencia significativa en los porfíricos. Los resultados están presentes en la tabla XIII en la cual se comprueba que, para ambos sistemas, la actividad PCL hepática está concentrada principalmente en la fracción citoplasmática, no existiendo mayores diferencias entre las actividades de los sobrenadantes a 11.000 xg y 105.000 xg; lo cual está de acuerdo con el hecho de que los microsomas poseen muy poca actividad como así también las mitocondrias tampoco presentaron una apreciable actividad y tanto en unas como en otras las unidades totales solo representaron, en promedio, un 5% de la actividad total de los respectivos sobrenadantes, por lo que se pensó que la actividad detectada probablemente se debía a contaminación con dichos sobrenadantes (tabla XIII).

TABLA XIII Localización subcelular de la PCL hepática de rata

FRACCION		VOL. (ml)	ACT. ENZIMATICA <u>nmoles de porf.</u> mg. de prot. x 30min.
HOMOGENATO	N	0,75	0,401
	HCB	0,75	0,252
SOBRENADANTE 900 x g	N	1,0	0,548
	HCB	1,0	0,254
SOBRENADANTE 11.000 x g	N	1,0	0,632
	HCB	1,0	0,257
SOBRENADANTE 105.000 x g	N	1,0	0,655
	HCB	1,0	0,272
MITOCONDRIAS	N	1,5	0,122 (4)
	HCB	1,5	0,085 (6)
MICROSOMAS	N	1,5	0,200 (2)
	HCB	1,5	0,138 (8)

La actividad PCL se determinó según se detalla en la Tabla VII. Las siguientes preparaciones (tanto normales como porfíricas) fueron pasadas a través de columnas de Sephadex G-25, previamente equilibradas con el buffer de incubación: homogenato, sobrenadante de 900 xg, 11.000 xg y 105.000 xg, mitocondrias y microsomas. Los eluidos respectivos se reunieron separadamente y fueron utilizados como preparación enzimática, utilizando de cada uno de ellos los ml. indicados en la tabla. La actividad enzimática representa la 1er. etapa de la decarboxilación del Uro'gen (7-+6-+5-+4-COOH). Los números entre paréntesis que figuran para mitocondrias y microsomas indican que % representa su actividad total respecto de la correspondiente al sobrenadante de las centrifugaciones respectivas (11.000 xg y 105.000 xg).

PURIFICACION HASTA GEL DE FOSFATO.

- Fraccionamiento salino.

Luego se empleó el método de purificación mediante fraccionamiento salino, para ello se probaron distintos rangos de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , encontrándose que el óptimo estaba entre 35 y 70% de saturación para los sobrenadantes provenientes de ambos lotes de animales si bien en el precipitado 0-35% se pierde más enzima porfírica que normal, pero se conservó el rango para hacer los dos sistemas más comparables. Los resultados están en la tabla XIV.

- Adsorción sobre gel de fosfato en batch.

En la misma tabla (tabla XIV) pueden visualizarse los resultados del siguiente paso de purificación, que consistió en un tratamiento con gel de fosfato. Para ello se disolvieron los precipitados en buffer fosfato de potasio 0,005 M y se trataron con gel de fosfato en batch (relación proteína: gel, 1:2, p/p) habiéndolos desalado previamente por pasaje a través de columnas de Sephadex G-25, equilibradas con el mismo buffer. La desorción se realizó con pequeñas alícuotas. Sabiendo los mg. de proteínas que contenía la preparación, ya que habían sido

TABLA XIV Fraccionamiento salino y absorción sobre gel de fosfato de calcio

PASOS DE PURIFICACION	Tratam. ratas	PROTEINAS TOTALES (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (unidades)	ACTIVIDAD ESPECIFICA ( $\frac{\text{unidades}}{\text{mg. prot.} \times 30 \text{min.}}$ )	Rto. (%)
SOBRENADANTE 11.000xg	N	945	596	0,63	100
	HCB	1150	340	0,30	100
PRECIPITADO $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0-35% de saturación	N	50	14	0,28	2,3
	HCB	321	60	0,19	17,5
PRECIPITADO $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 35-70% de saturación	N	265	248	0,94	42
	HCB	289	116	0,40	34
PRECIPITADO $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 70-90% de saturación	N	112	17	0,15	2,9
	HCB	67	10	0,15	3,0
GEL DE FOSFATO	N	77	197	2,56	33
	HCB	30	34	1,13	10

Los eluidos de gel de fosfato, DEAE-celulosa y Sephadex G-100 fueron utilizados en el día o precipitados como  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , guardados a  $-20^\circ\text{C}$  y desalados por Sephadex G-25 antes de su uso, Las restantes preparaciones también fueron pasadas a través de Sephadex G-25. Los detalles de las determinaciones están presentes en la Tabla VII. La unidad enzimática: es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 nmol de Uro'gen/mg de protx 30min.

determinados por medio de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm para calcular los mg. de gel a utilizar, en general se usó una relación mg. proteína: ml totales de elución igual a 20, dicho volumen se distribuía en 5 alícuotas de volumen decreciente para los sucesivos pasos de elución de buffer fosfato 0,067 M, mediante tratamiento en batch y posterior centrifugación. El pool de todos los extractos obtenidos se utilizó como fuente enzimática o en algunas oportunidades se concentró por precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  al 75% de saturación y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso (generalmente por 24hs.).

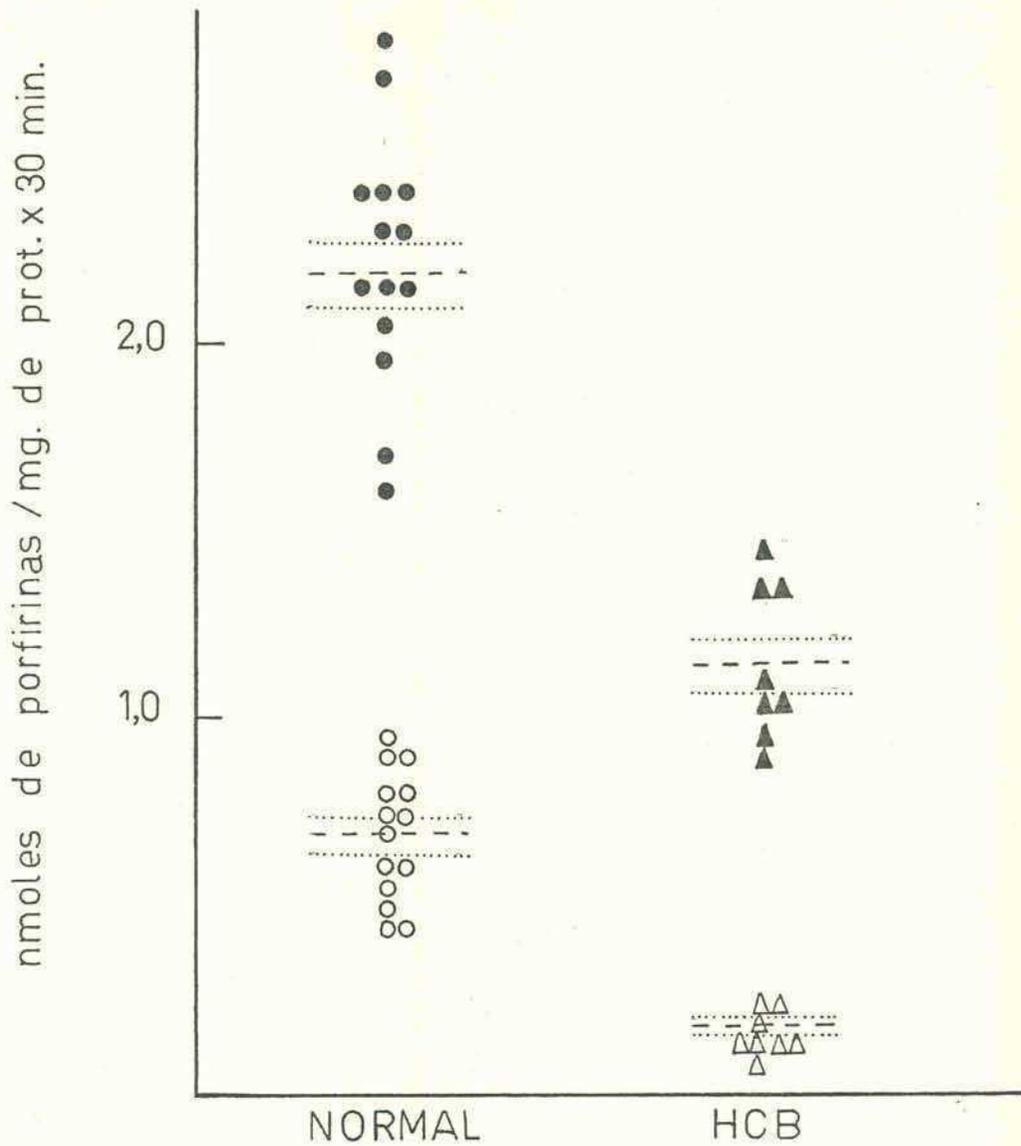
De los resultados obtenidos vemos que el tratamiento es efectivo con ambas preparaciones enzimáticas (normal y porfírica) ya que si comparamos las actividades específicas de las enzimas en esta etapa de la purificación respecto de las actividades que presentaron los sobrenadantes correspondientes, vemos que se purifican 4,1 y 3,8 veces respectivamente, mientras que si las comparamos con las actividades de las preparaciones del paso inmediatamente anterior (precipitados  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  35-70% sat.) se purifican 2,7 y 2,8 veces respectivamente. Desde el punto de vista del rendimiento el procedimiento es mucho más satisfactorio para la preparación normal, ya que nuevamente comparán-

dolo con el paso inmediato anterior la preparación normal retiene un 79% de actividad, en tanto que la porfírica sólo un 30%.

La fig. 33 representa los valores obtenidos para la determinación de la actividad PCL proveniente de hígados normales (datos de la izquierda) e hígados porfíricos (datos de la derecha) a nivel de gel de fosfato. Los signos superiores corresponden a la decarboxilación del Uro'gen y los inferiores a la formación de Copro'gen. Las líneas de puntos representan los valores promedio para cada actividad enzimática en cuestión.

Como vemos a pesar de haber aplicado varios pasos de purificación hasta este momento, se siguen manteniendo las diferencias de actividad entre las preparaciones normales y las porfíricas, inclusive con el mismo porcentaje de inhibición para la 1er. etapa (comparando con la actividad en sobrenadante de homogenato) que con ambas preparaciones es aproximadamente un 50% y con sólo una ligera diferencia en la 2da. etapa (88% para sobrenadante contra 74% para gel de fosfato) que dada las fluctuaciones de los datos correspondientes a los animales porfíricos, no sería significativa.

Fig 33 Actividad PCL de hígado de ratas normales e intoxicadas con HCB



Los signos representan valores individuales y las líneas punteadas los valores medios N: valores correspondientes a ratas normales, HCB: corresponden a ratas con severa porfiria. Los detalles experimentales están en la tabla VII. La preparación enzimática utilizada fue el "pool" de los eluidos del gel de fosfato (volumen total aprox. 10 ml).

Normal { ● 1a. etapa.  
          ○ 2a. etapa.

HCB { ▲ 1a. etapa.  
      △ 2a. etapa.

CONDICIONES DE INCUBACION.

- Condiciones generales.

Llegado este punto de la purificación se decidió ajustar las condiciones de incubación, especialmente para ver si existían requerimientos distintos para ambos sistemas (normal y porfírico). Cabe aquí recordar que el medio de incubación empleado hasta el momento contenía EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM y la reacción se llevaba a cabo en medio anaeróbico (ensayo control). Aquí se probó el efecto de la exclusión de EDTA, la exclusión de GSH, la inclusión de GSH a una concentración 4 veces mayor que la empleada en el ensayo control y la inclusión de oxígeno en el medio (aerobiosis). Los resultados presentes en la tabla XV nos muestran que la ausencia de EDTA no modifica la actividad de ninguna de las dos preparaciones enzimáticas mientras que la aerobiosis las disminuye a ambas.

En cuanto al GSH provocó respuestas diversas: así la exclusión de GSH del medio provocó disminución de la actividad de la enzima normal y aumento de la proveniente de animales porfíricos. También en el caso de incluir en el medio una concentración 4 veces mayor que la del control la respuesta es seme-

TABLA XV Influencia de los distintos componentes de la mezcla de incubación en la determinación de la actividad PCL

ENSAYO	ACTIVIDAD ENZIMATICA				
	DESAPARICION DE URO'GEN		APARICION DE COPRO'GEN		
	<u>nmoles de porfirinas</u> mg. de prot. x 30 min.	AR (%)	<u>nmoles de porfirinas</u> mg. de prot. x 30 min.	AR (%)	
CONTROL	N	2,40	100	0,68	100
	HCB	1,00	100	0,13	100
Sin EDTA	N	2,45	102	0,70	103
	HCB	1,00	100	0,13	100
Sin GSH	N	2,00	83	0,50	74
	HCB	1,31	131	0,21	162
GSH 4mM	N	2,20	92	0,70	103
	HCB	1,23	123	0,17	131
AEROBIOSIS	N	1,30	54	0,48	71
	HCB	0,71	71	0,10	77

El ensayo control se realizó según las condiciones "standard" en un medio que contenía buffer fosfato de potasio 0,067M pH 7, GSH 1mM, EDTA 0,1mM, Uro'gen III 2,2  $\mu$ M, en un volumen total de 4 ml. la incubación se realizó anaeróbicamente en oscuridad, con agitación mecánica a 37°C. Los productos de reacción se determinaron según se detalla en la Tabla VII. En los restantes ensayos, se trabajó en idéntica forma, salvo las modificaciones expresadas en cada caso.

jante, es decir la normal disminuye y la "porfírica" aumenta, como si a la dosis control existieran un máximo y un mínimo para la actividad normal y porfírica respectivamente.

- Efecto del GSH.

Para verificar esta probabilidad se programó una experiencia a distintas concentraciones de GSH; los resultados pueden verse en la fig. 34, en la que comprobamos que en realidad ambas enzimas presentan un mínimo, aunque no demasiado significativo, por lo que se decidió seguir trabajando a 1 mM, para mejor comparación con los resultados previos.

- Efecto del pH.

También se estudió el pH óptimo, a este nivel de purificación, encontrando, como se ve en la fig. 35 que su valor es aproximadamente 6,8, tanto para la enzima normal como para la porfírica con un ligero corrimiento del pico para la etapa de la enzima normal hacia valores más altos.

- Efecto de la temperatura de incubación.

La fig. 36 presenta los resultados de los nmoles formados en función de la temperatura de incubación. Allí se ve

Fig34 Efecto del GSH

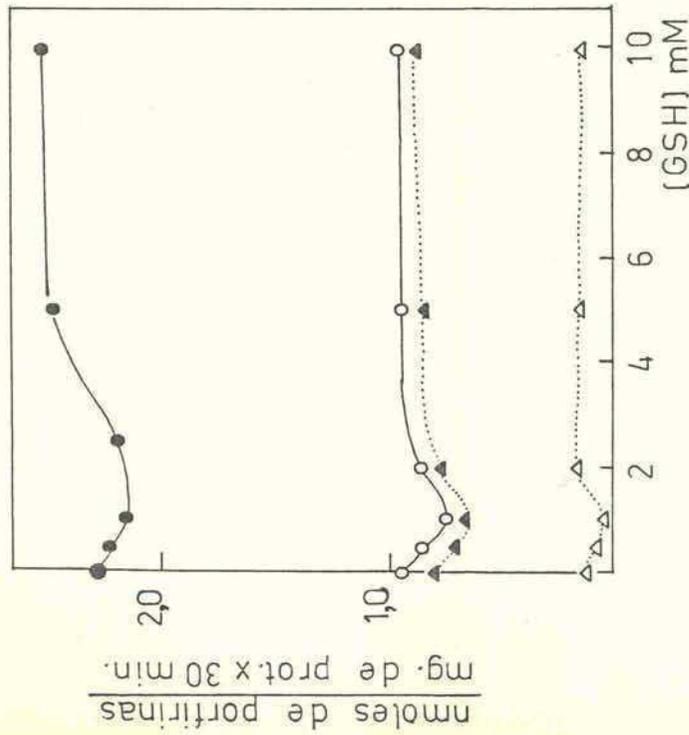


Fig35 Curva de pH

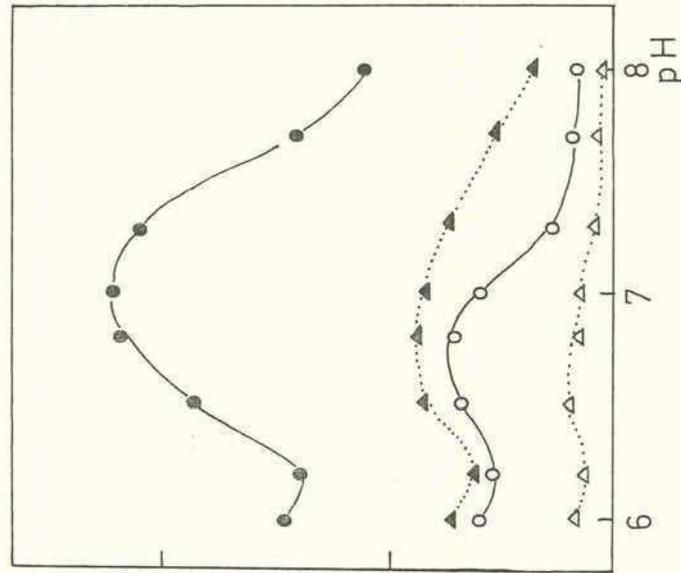
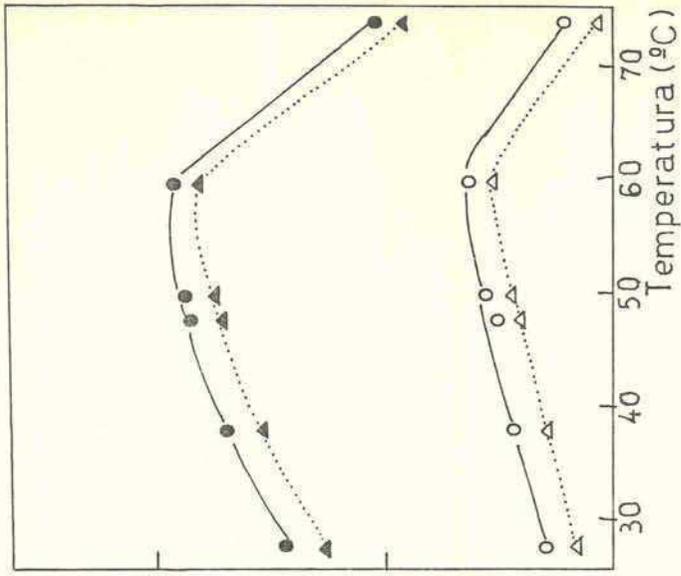


Fig36 T°C de incubación



Las determinaciones de actividad PCL se realizaron en buffer fosfato de potasio 0.067 M, por el método presentado en la fig. 33, variando según los casos indicados en cada figura: 1a [GSH] de 0 a 10 mM; el pH de 6 a 8 o 1a temperatura de incubación de 28 a 74°C. Los resultados son el promedio de dos experiencias:

● 1a. etapa  
 ○ 2a. etapa  
 { Norma1  
 { HCB  
 ▲ 1a. etapa  
 △ 2a. etapa

que la actividad, tanto de la enzima normal como la proveniente de animales porfíricos, aumenta casi linealmente con la temperatura de incubación, en el rango de 28 a 50°C; de 50 a 60°C decae la pendiente y luego de 60 a 74°C se hace negativa al decaer abruptamente la actividad. Estos hechos se presentan tanto en la 1a. etapa (desaparición de Uro) representada por las dos curvas superiores, como para el paso final de la 2a. etapa (aparición de Copro) representada por las dos curvas inferiores.

#### PROPIEDADES.

Una vez fijadas las condiciones de incubación, se procedió a estudiar algunas propiedades en forma comparativa.

#### - Efecto de sales, agentes quelantes y otro protector de grupos sulfhidrílos.

En la tabla XVI están presentes los resultados obtenidos al probar "in vitro" el efecto que producían sobre la actividad PCL: i) distintas concentraciones de ClNa, ii) dos agentes quelantes: el dietilditiocarbamato de sodio (DTC) y el pirofosfato de sodio (PPNa), iii) el reemplazo del GSH por otro agente protector de grupos sulfhidrílos: el ditiotreitól (DTT)

TABLA XVI Respuesta de la PCL hepática de ratas ante distintos agregados al medio de incubación

AGREGADO (mM)		ACTIVIDAD ENZIMATICA				
		DESAPARICION DE URO'GEN		APARICION DE COPRO'GEN		
		<u>nmoles porfirinas</u> mg prot x 30 min	AR (%)	<u>nmoles porfirinas</u> mg prot x 30 min	AR (%)	
CONTROL	—	N	2,14	100	0,55	100
		HCb	0,99	100	0,12	100
Cl Na	100	N	2,30	107	0,51	93
		HCb	1,01	102	0,11	92
Cl Na	200	N	2,25	105	0,46	84
		HCb	1,01	102	0,10	83
DTT	1	N	2,07	97	0,53	96
		HCb	0,85	86	0,10	83
DTC	1	N	1,52	71	0,33	60
		HCb	0,71	72	0,08	67
PPNa	1	N	2,05	96	0,51	93
		HCb	0,85	86	0,10	83

Las actividades enzimáticas se determinaron según se detalla en la Tabla VII. Las drogas fueron disueltas en agua, antes de agregarlas al medio de incubación. Los resultados son el promedio de dos experiencias, en las que se trabajaron 2 animales de cada lote.

Como puede verse allí: i) la sal sódica 100 mM no afecta mayormente la reacción en tanto que a 200 mM si bien no afecta la 1er. etapa, produce un decremento de 17 y 14% respectivamente para la enzima normal y porfírica de la velocidad de formación de Copro, con ambas preparaciones enzimáticas; ii) el protector de grupos sulfhidrilos afecta ligeramente las dos etapas en ambos casos; iii) uno de los agentes quelantes el PPNa disminuye también ligeramente ambas etapas en tanto que el DTC, a la misma concentración que el PPNa, presentó mayor efecto y además, en presencia de la enzima normal, afectó algo más a la 2a. etapa que a la 1a; no siendo significativa la diferencia encontrada en la respuesta de la preparación porfírica frente a la normal en los tres casos anteriores.

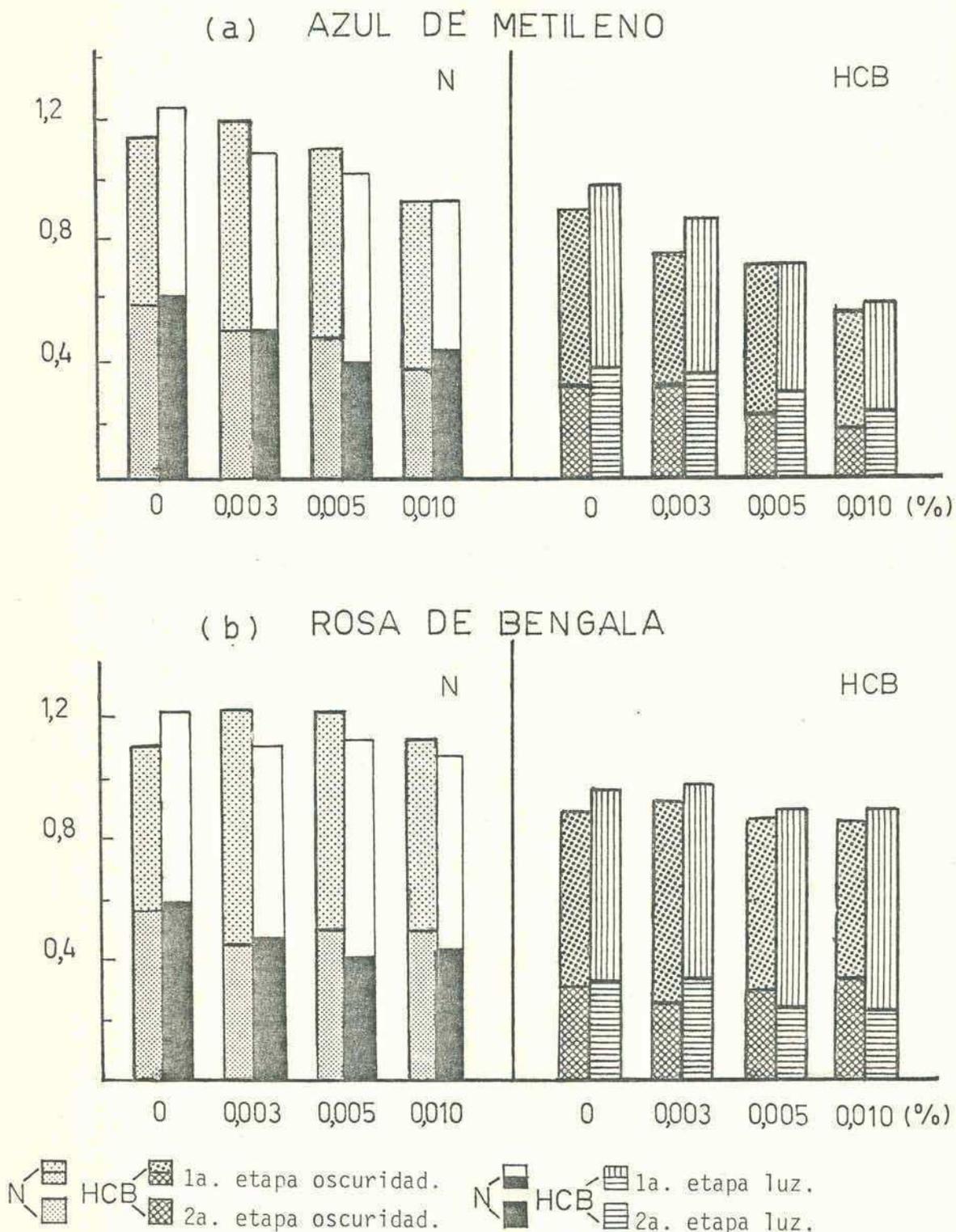
- Detección de grupos fotooxidables en el centro activo.

Se estudió también el efecto de la fotooxidación sobre la actividad PCL a los fines de investigar si histidina, tirosina o triptofano, jugaban un papel importante en la catálisis enzimática de esta reacción y si había diferencias estructurales entre las enzimas provenientes de animales normales y porfíricos por HCB. Para ello se ensayó "in vitro" el efecto de la

luz (100 vatios) sobre la preparación enzimática en presencia de alguno de los siguientes colorantes, azul de metileno o Rosa de Bengala y luego se midió la actividad enzimática agregando los restantes componentes del medio de incubación. Los controles fueron preparados de igual manera, pero mantenidos constantemente en oscuridad. Los resultados pueden verse en la fig. 37. La fig. 37 (a) representa los valores obtenidos en la experiencia con Azul de Metileno y la 37 (b) los correspondientes a Rosa de Bengala. En cada una de ellas las 8 primeras barras pertenecen a los ensayos realizados con enzima normal y las 8 segundas a la preparación porfírica. Dentro de ellas, como se ve en abscisas, están representadas las distintas concentraciones de colorante probadas, 0 para las dos primeras, 0,003 para las dos segundas, 0,005 para las dos terceras y 0,01 las últimas, y dentro de cada par citado la barra de la izquierda representa el control, es decir la experiencia realizada totalmente en oscuridad, mientras que la de la derecha representa aquellos ensayos en los que se iluminó la enzima en presencia del colorante y luego se realizó la incubación.

Comparando los ensayos en presencia de Azul de Metileno puede verse que la respuesta de la preparación normal es seme-

Fig 37 Efecto de la fotooxidación sobre la actividad PCL



Las condiciones de incubación se detallan en la fig. 33.

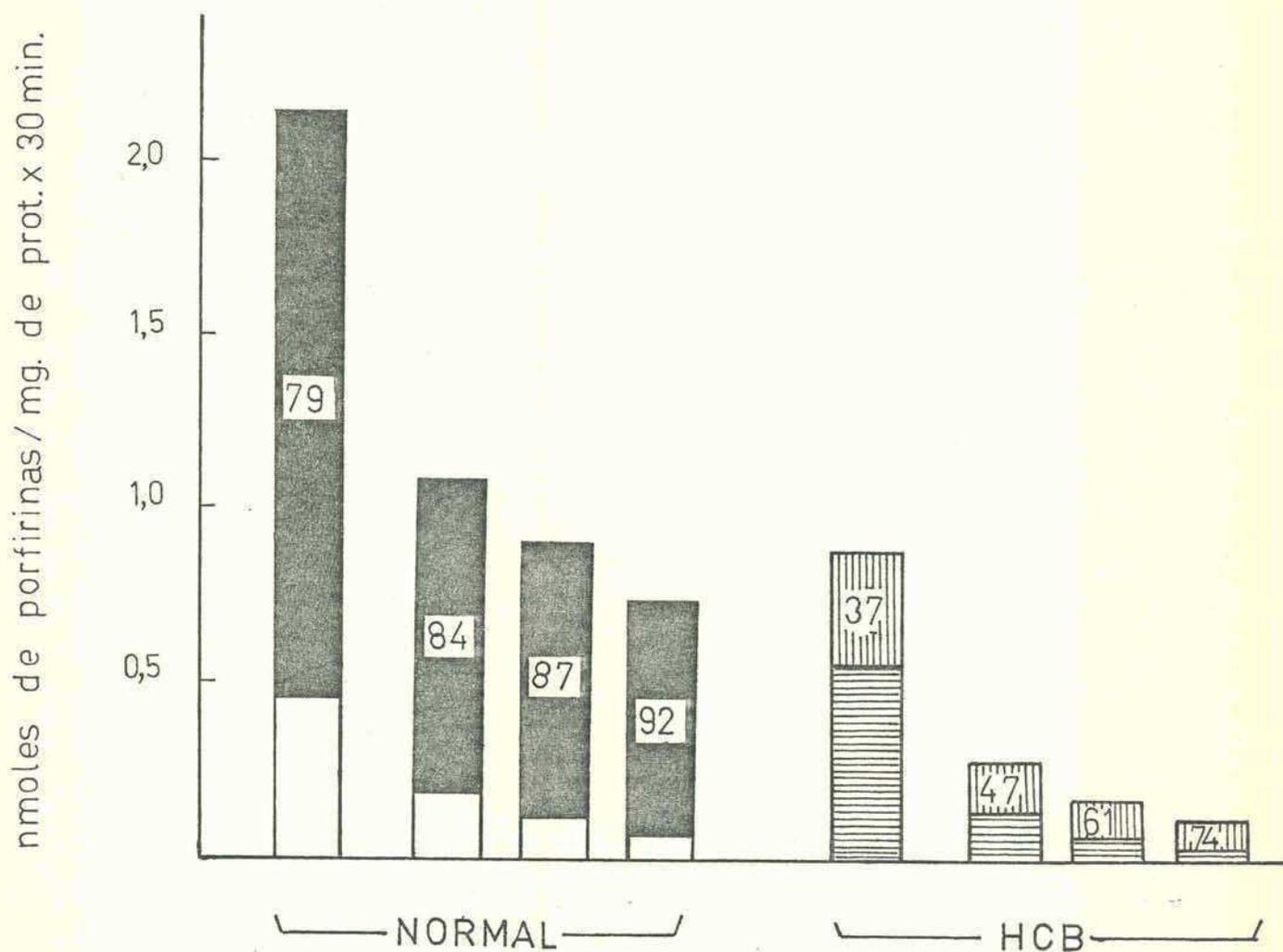
jante a la porfírica, ya que en ambos casos no se encontró diferencia significativa en la actividad PCL exhibida por los ensayos realizados en oscuridad frente a los luminosos, a ninguna de las dosis probadas pero, también en ambos casos, se ve un ligero decremento de la actividad, tanto de los ensayos con luz o en oscuridad, a medida que aumenta la dosis del colorante, como si el colorante en sí tuviese efecto inhibitorio.

En cuanto a los ensayos con Rosa de Bengala tampoco arrojaron diferencias significativas en cuanto al comportamiento de ambas enzimas en luz u oscuridad. En este caso no se observó tampoco efecto dependiente de la dosis del colorante empleado, ya que la actividad permaneció aproximadamente constante a todas las dosis empleadas, a diferencia de lo que ocurrió con azul de metileno.

- Estabilidad térmica.

Finalmente se realizaron ensayos de precalentamiento de la enzima, a 60°C por 3 min. y los resultados están graficados en la fig. 38. Las cuatro primeras barras corresponden a la preparación normal y representan el valor de actividad correspondiente a la 1er. etapa (U→F) y a los 3 pasos de la 2a. eta-

Fig 38 Efecto del precalentamiento a 60°C por 5 min



Los números entre paréntesis representan el decremento % producido por el precalentamiento, sobre la actividad de cada paso de la decarboxilación del Uro'gen, con enzima normal (izquierda) o porfírica (derecha). Las barras representan la actividad PCL, promedio de 2 experiencias, medidas según se indicó en la fig. 33.

N { ■ decremento  
 { □ actividad remanente.  
 HCB { ▨ decremento  
 { ▩ actividad remanente.

pa (F→H, H→P, P→C), consecutivamente. Igual significado tienen las cuatro barras siguientes, que corresponden a la preparación proveniente de un hígado porfírico. En cada barra la superficie total representa la actividad correspondiente a la preparación sin precalentar, mientras que la fracción superior representa el decremento producido por el precalentamiento de la enzima y la fracción inferior la actividad remanente. El número que aparece en la fracción superior cuantifica el % de inhibición y muestra claramente que el efecto es mucho mayor para la enzima normal que para la porfírica y que en ambos casos todos los pasos se ven afectados.

- Estabilidad al almacenamiento.

En la tabla XVII se puede comparar la estabilidad al almacenamiento que exhibieron las preparaciones normales y "porfíricas" en distintas etapas de su purificación.

Los sobrenadantes y precipitados fueron guardados como tales, en tanto que los eluidos del gel de fosfato fueron precipitados en el rango 0-75% de saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , se decantó el sobrenadante y se guardó el precipitado hasta su uso.

TABLA XVII Estabilidad al almacenamiento

PREPARACION ENZIMATICA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO ( semanas )	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		$\frac{\text{nmoles Uro'gen}}{\text{mg. prot. x 30min.}}$	AR (%)
SOBRENADANTE 11000xg N  HCB	—	0,57	100
	1	0,50	88
	6	0,41	72
	—	0,38	100
	1	0,30	79
	6	0,25	66
PRECIPITADO $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ N 35-70% de saturación  HCB	—	1,16	100
	1	1,16	100
	6	1,15	99
	24	1,20	103
	—	0,60	100
	1	0,60	100
	6	0,59	98
	24	0,61	102
GEL DE FOSFATO N  HCB	—	3,17	100
	1	2,58	81
	6	2,50	79
	—	1,48	100
	1	1,15	78
	6	1,09	74

El sistema de incubación se detalla en la Tabla VII. Todas las preparaciones enzimáticas fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

Todas las fracciones fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las fracciones provenientes de animales intoxicados presentaron un comportamiento semejante a la de los animales porfíricos.

Los sobrenadantes perdieron entre un 12 y 21% de actividad en la primer semana y otro tanto en las cuatro siguientes, o sea que la actividad sigue decreciendo aunque más lentamente.

Los precipitados fueron sumamente estables, ya que a los 6 meses aún exhibieron un 100% de la actividad inicial.

Mientras que los precipitados correspondientes a los eluidos del gel de fosfato pierden aproximadamente un 20% de actividad en la primer semana y luego parecen estabilizarse en ese valor, ya que solo hubo una disminución despreciable en las cuatro semanas siguientes.

#### PASOS FINALES DE LA PURIFICACION.

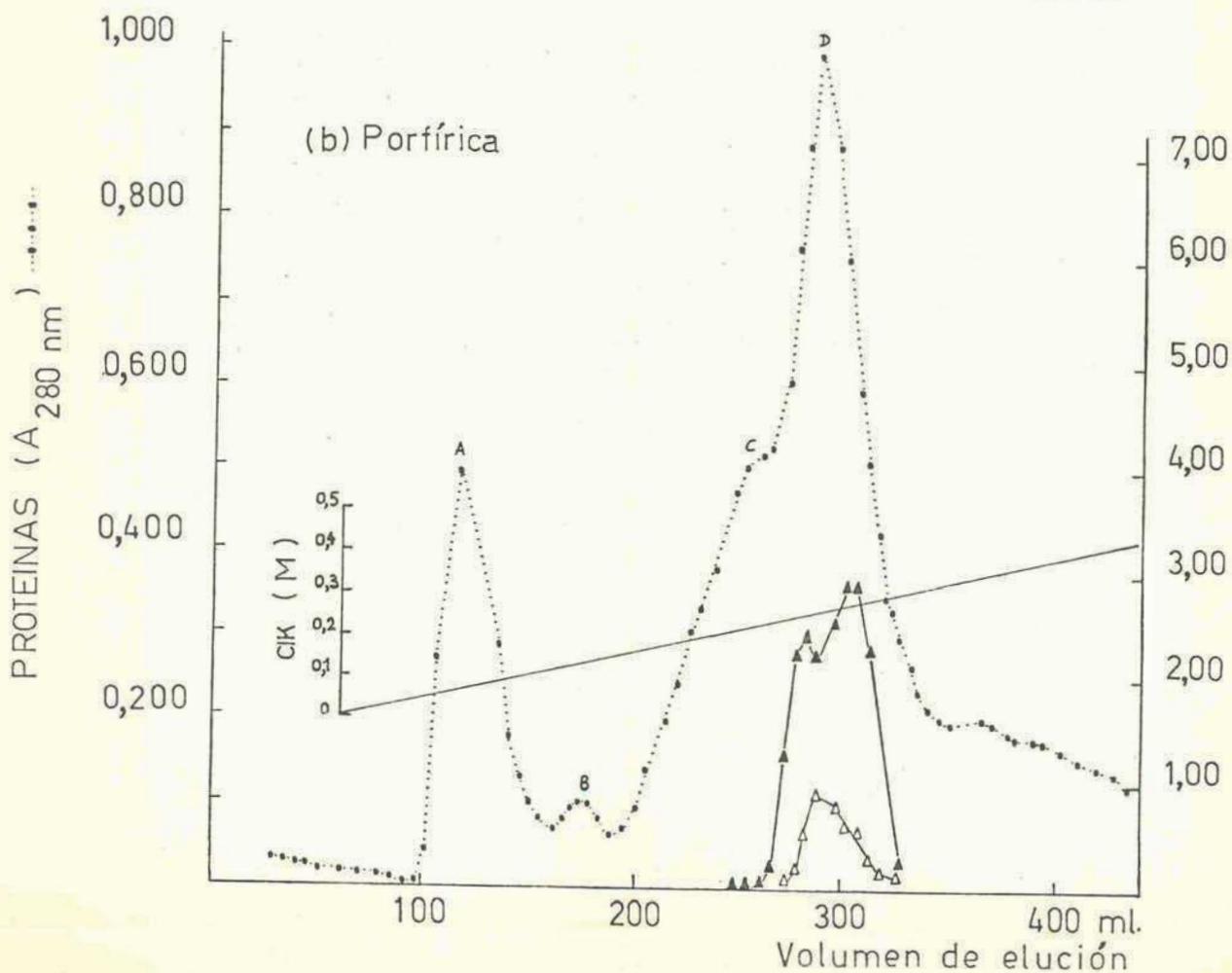
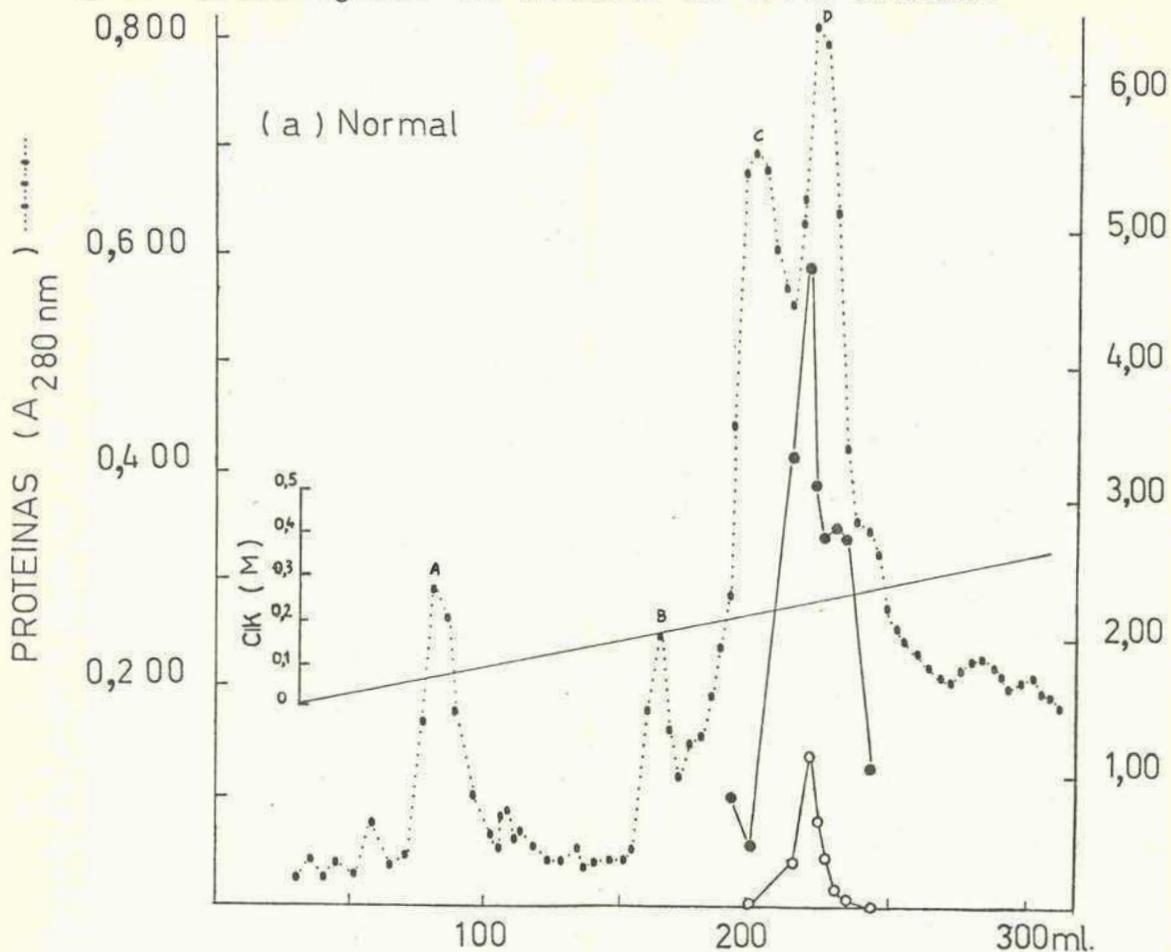
##### - DEAE-celulosa.

Para continuar con la purificación se pasó el extracto enzimático obtenido, después del tratamiento con gel de fosfato, a través de una columna de DEAE celulosa (30 cm de alto x 2,2cm de diámetro, previamente equilibrada con buffer fosfato de po-

tasio  $5 \times 10^{-3}$  M, conteniendo GSH  $1 \times 10^{-3}$  M, como se describe en Métodos. Se sembró la totalidad del extracto obtenido a partir de un hígado, o la cantidad equivalente a ello cuando se había partido de más de un animal. La velocidad de flujo al iniciar la elución era de  $\cong 1,5$  ml/min. y se recogieron alícuotas de  $\cong 4$  ml por tubo. Los perfiles de elución están graficados en la fig. 39, en la cual la línea llena representa los datos correspondientes a la actividad enzimática, cuyos valores numéricos aparecen en la ordenada de la derecha. En dicha figura la línea punteada representa el perfil de elución para proteínas, que fué graficado en base a los valores de absorbancia a 280nm, representados sobre la ordenada de la margen izquierda. La línea clara transversal representa el gradiente de ClK, que fué continuo entre 0-0,5 M. La parte (a) corresponde a la preparación normal y (b) a la porfírica.

Comparando ambos gráficos, se ve que: i) a nivel de proteínas pueden distinguirse 4 picos principales (A, B, C y D); si bien tanto la resolución como la proporción entre los mismos varía de uno a otro gráfico, diferencias semejantes fueron observadas entre distintas preparaciones de enzima normal o porfírica, entre sí. En general el pico A es el que fluctuó más, en cuanto

Fig 39 Cromatografía en columna de DEAE-celulosa



a su altura, el B fué el más constante, mientras que C y D fluctuaron tanto en su resolución como 2 picos netos, como en su altura relativa; ii) a nivel de actividad enzimática, la misma aparece asociada al pico D y desdoblada como 2 picos al medir el pasaje de Uro  $\rightarrow$  Firia o un pico único, para el pasaje a Copro.

La mayor diferencia, de la preparación porfírica frente a la normal, sería la diferente proporción de los picos comprometidos en la curva de actividad para la 1er. etapa, ya que con la preparación porfírica aumenta la proporción del pico que eluye a mayor fuerza iónica.

- Sephadex G-200.

Luego se probó usar una columna de Sephadex G-200 como siguiente paso de purificación. Para ello se armaron columnas de 2,4 x 50 cm, como se describe en Métodos, se equilibraron con buffer fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8. Luego se midió el  $V_0$  mediante el uso de Blue dextrano y se calibraron con catalasa (240.000), seroalbúmina (65.000), fosfatasa alcalina (80.000) y citocromo c (12.400), para determinar simultáneamente el PM de la PCL. Los trabajos se iniciaron con una velocidad de flujo de aprox. 50 ml/hora, durante el proceso de equilibra-

ción con buffer; al sembrar las distintas muestras bajó el flujo aproximadamente a la mitad y al sembrar las preparaciones enzimáticas se comprobó que el pico proteico tardaría más de 24hs en salir, y atendiendo a la inestabilidad de la enzima en este estado de purificación se decidió cambiar de sistema, no sin antes repetir la experiencia con la preparación proveniente de hígados porfíricos encontrando las mismas dificultades, por lo que si bien se completó la elución no se realizaron las incubaciones correspondientes.

Los perfiles de elución para las proteínas están representados en la fig. 40, en la cual la línea llena corresponde a la preparación normal y la punteada a la porfírica. Si bien los gráficos son semejantes, presentan diferencias tanto en la proporción de los picos como en los volúmenes de elución de los mismos.

- Sephadex G-100.

Finalmente se decidió hacer uso del Sephadex G-100; la columna se calibró con citocromo c (12.400), seroalbúmina(65.000) y peroxidasa (40.000). La curva de calibración se muestra en la fig. 41. Para realizar la cromatografía de las preparaciones de

Fig 40 Cromatografía en Sephadex G-200. Perfil de elución de proteínas

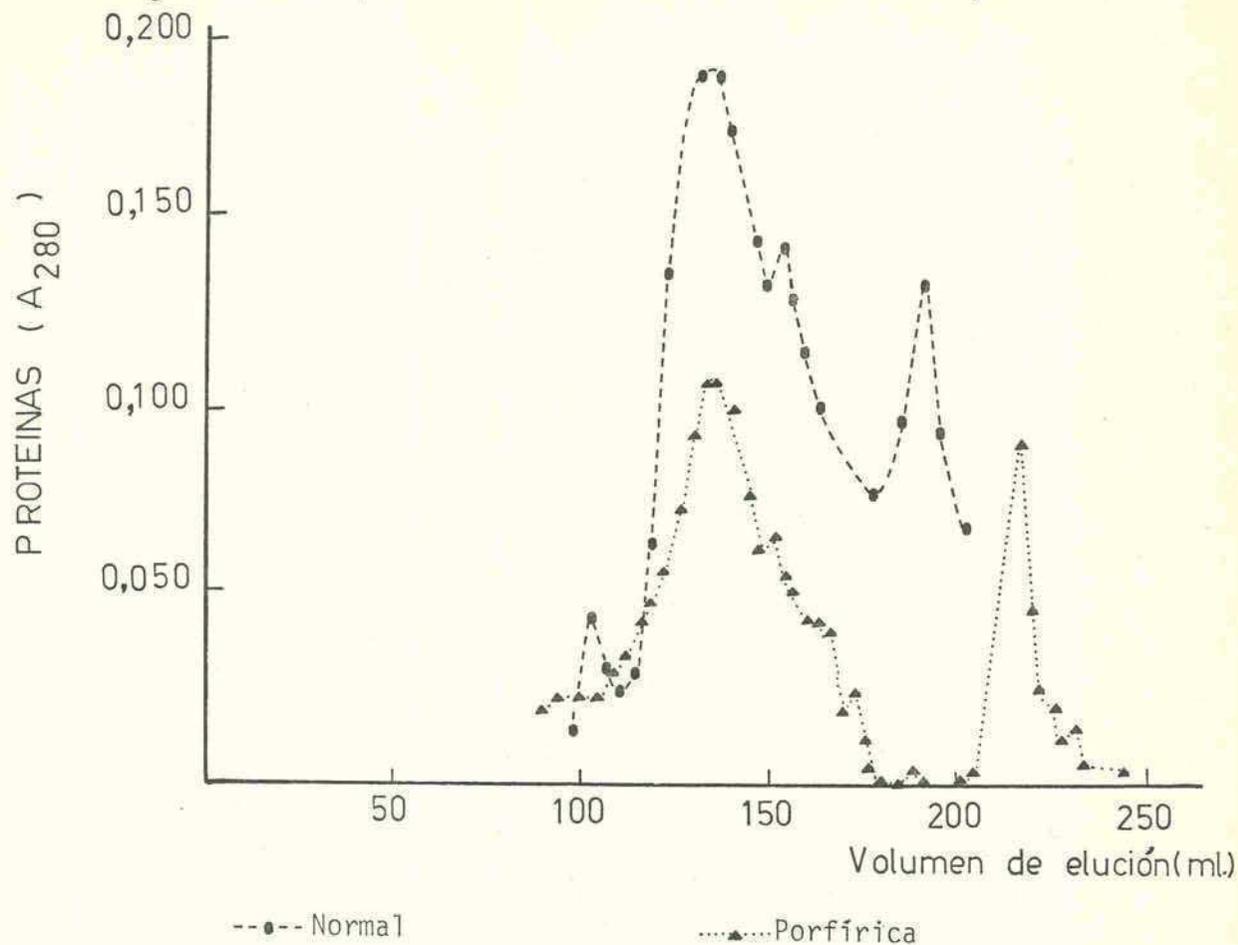
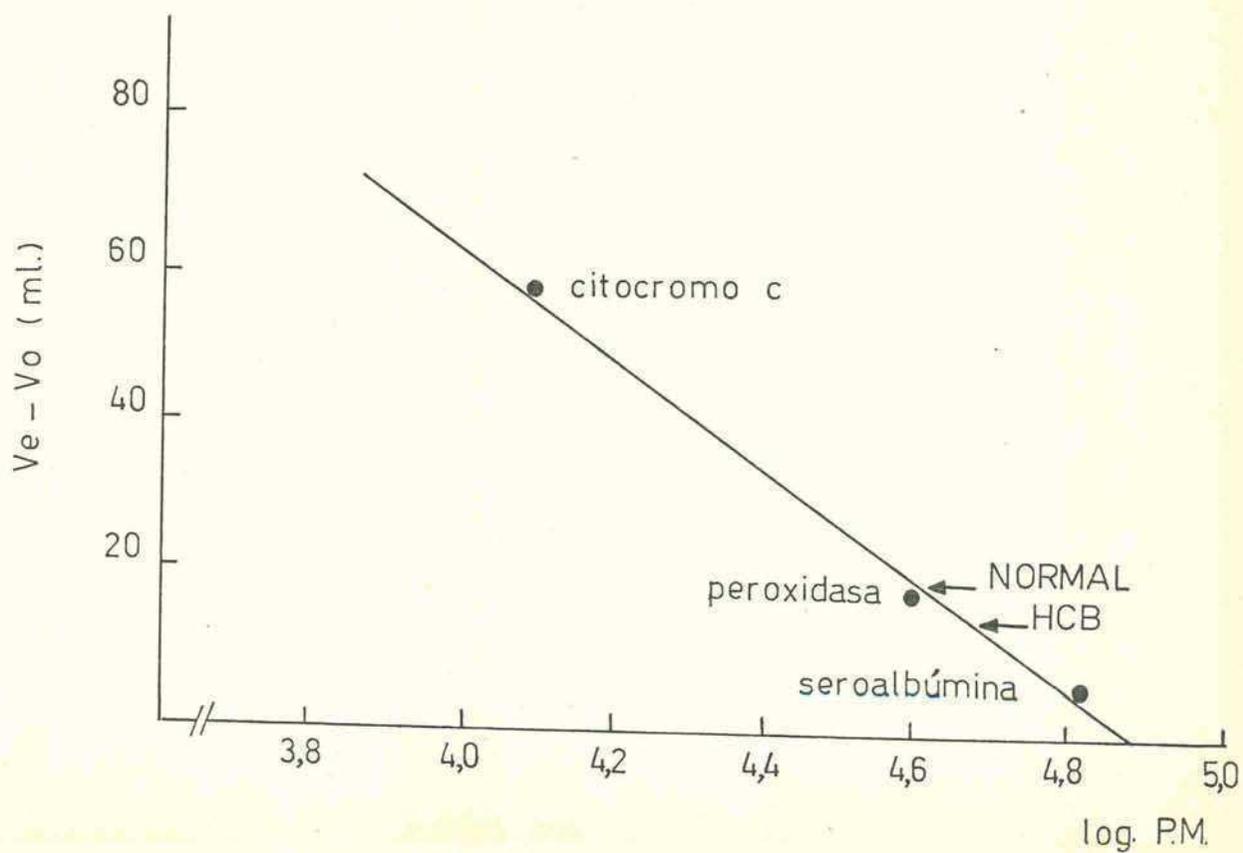


Fig 41 Curva de calibración de la columna de Sephadex G-100



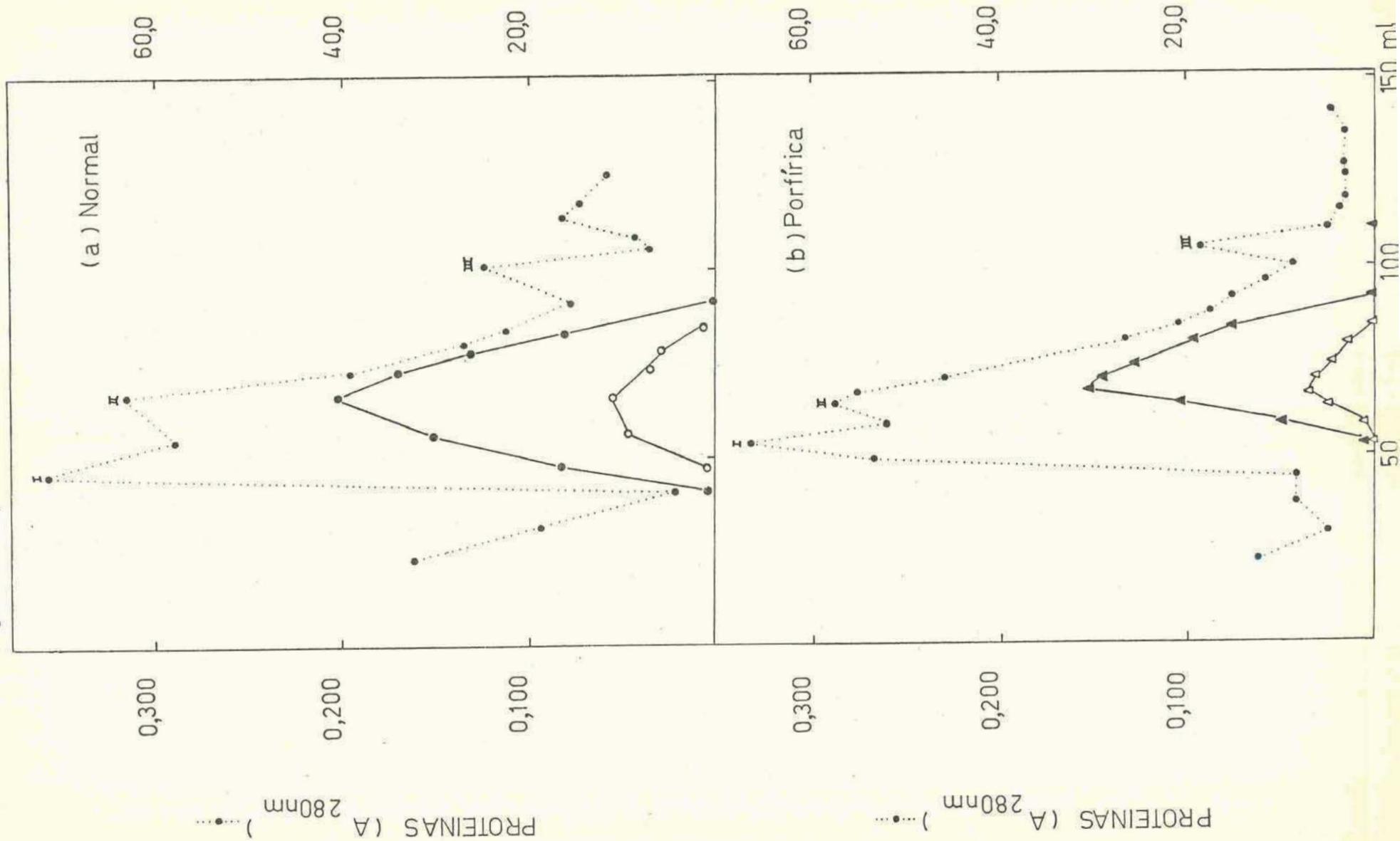
PCL los precipitados de los tubos eluidos de la columna de DEAE celulosa que componen el pico al cual se considera que está asociada la actividad, que contenían aprox. 10 mg. de proteína, se disolvieron en buffer fosfato de potasio 0,134 M, pH 6,8. Inmediatamente se sembraron en la columna de Sephadex G-100 calibrada previamente. Se obtuvieron los perfiles que aparecen graficados en líneas de puntos en la fig. 42 (a) y 42 (b) que corresponden a la enzima normal y porfírica respectivamente. La determinación de las actividades enzimáticas correspondientes dieron por resultado los gráficos que aparecen en línea llena en las citadas figuras.

Aquí, si bien aparece en ambos casos un solo pico de actividad, al realizar la corrida electroforética sobre gel de poli-acrilamida se encontraron tres bandas proteicas, tanto para la enzima normal como para la porfírica. Comparando los gráficos obtenidos, se ve: i) a nivel de proteínas se obtuvieron 3 picos principales (I-III); (I) y (II) resueltos sólo parcialmente; ii) a nivel de actividad se obtuvo sólo un pico asociada al II de proteínas; en el caso de la preparación normal su máximo coincidía con el del pico II, en tanto que con la porfírica hubo un corrimiento hacia la derecha del mismo, o sea que la actividad

ACTIVIDAD PCL (—●—1a etapa ; -○-2a etapa )  
 nmoles de porfirinas / mg. de prot. x 30 min.

ACTIVIDAD PCL (—▲—1a etapa ; -△-2 etapa )  
 nmoles de porfirinas / mg. de prot. x 30 min.

Fig 42 Sephadex G-100



enzimática salía con mayor  $V_e$  que el pico II.

En este caso no hubo diferencias en el comportamiento de la actividad correspondiente a la 1er. y 2da. etapa (como se había presentado en el caso de la columna de DEAE), ya que como puede verse en la figura, ambas curvas presentan un sólo pico cuyos máximos son coincidentes.

Teniendo en cuenta el  $V_e$  del máximo de la curva de actividad enzimática y restándole el  $V_o$  de la columna correspondiente, se determinó, mediante la curva de calibración, el PM de la enzima normal y de la porfírica, siendo 41.000 y 46.000 respectivamente. La diferencia entre los PM podría indicar una estructura distinta para dichas proteínas enzimáticas.

- Cuadro final.

El cuadro de purificación final, obtenido hasta el momento aparece en la tabla XVII.

En ella se ve que con los distintos métodos empleados se logra purificar la enzima proveniente de ratas normales aproximadamente en el mismo grado que la de animales porfíricos; 115 y 114 veces respectivamente para las últimas preparaciones. En tanto que en los pasos intermedios siempre los resultados fueron también paralelos, presentándose sólo ligeras diferencias.

TABLA XVII' Tabla de purificación

PREPARACION ENZIMATICA		PROTEINAS TOTALES (mg.)	ACTIVIDAD TOTAL (unidades)	ACTIVIDAD ENZIMATICA ( $\frac{\text{nmoles de Uro'gen}}{\text{mg. de prot. x 30min}}$ )
HOMOGENATO	N	1991	663	0,33
	HCB	1960	388	0,20
SOBRENADANTE 11.000 x g	N	855	530	0,62
	HCB	1047	314	0,30
PRECIPITADO $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 35-70% de saturación	N	265	329	1,24
	HCB	289	162	0,56
GEL DE FOSFATO	N	71	240	3,36
	HCB	56	113	2,03
DEAE celulosa	N	14	75	5,37
	HCB	13	41	3,24
SEPHADEX G-100	N	0,9	35	38,88
	HCB	0,8	18	22,50

Las condiciones de ensayo se detallan en Tabla VII. La actividad se expresa como nmoles de Uro'gen consumidos (o sea 7-+6-+5-+4-COOH, formados) en 30 min. En los eluidos del gel de fosfato, se reunieron sólo los primeros tubos (volumen total aprox. 10 ml) que presentaron mayor actividad y contenido proteico. Los resultados son el promedio de 3 a 4 experiencias, en las que se trabajaron 2 o 3 animales de cada lote.

FERROQUELATASA.

PUESTA A PUNTO DEL METODO DE DETERMINACION.

Para la determinación de la actividad ferroquelatasa se intentó utilizar el método de Labbé y col. (119) o el de Goudy y col. (116). Para ello se realizaron una serie de experiencias simultaneamente con los dos métodos, intentando encontrar las condiciones óptimas de incubación para el sistema enzimático proveniente de sobrenadante de homogenato de hígado de ratas normales y porfíricas por HCB.

En el método de Labbé y col. (119) se usó como sustrato Proto preparada por el método de Grinstein y purificada como se indicó en Métodos. La actividad ferroquelatasa se ensayó espectrofotométricamente, luego de la incubación a 38°C, por 2 hs., bajo N<sub>2</sub>, en un medio que contenía 0,4 ml de preparación enzimática (6-8 mg/ml), 0,02 μmoles Proto, 0,02 μmoles SO<sub>4</sub>Fe, 100 μmoles Tris, 40 μmoles ácido ascórbico, en un volumen final de 1 ml. Finalizada la incubación se agregó 9 vol. de ClH 1,5 N, se descartó el precipitado proteico por centrifugación y se leyó la absorbancia a 407 nm, característica de la Proto, que decrece al transcurrir la reacción. Una muestra sin enzima

se incluyó en cada ensayo.

El método de Goudy y col. (116) utiliza una solución patrón de Proto preparada por disolución de la Proto en ClH 5 N, se deja 18 hs. a 4°C, se elimina el exceso de ClH a 80°C y vacío, se ajusta a pH 1 con NH<sub>3</sub> conc. y se diluye con agua destilada para llevar a un volumen tal que 25 ml. contengan 30 mg de Proto, se guarda en heladera hasta su uso.

La actividad ferroquelatasa se midió en un medio conteniendo 0,48 ml de buffer Tris 0,5 M, pH 8, 0,05 ml de ascorbato 0,4 M, 0,12 ml de Proto 0,1 mM, 0,2 ml de homogenato o suspensión mitocondrial y agua destilada en c.s.p. 1,8 ml. La reacción transcurrió en un tubo de Thumberg y el aire se extrajo por la adición de un pequeño trozo de CO<sub>2</sub> sólido. Los tubos se preincubaron a 37°C por 5 min. y la reacción se inició con el agregado de 0,2 ml de SO<sub>4</sub>Fe 5 mM, desde la rama lateral del tubo de Thumberg. Las muestras fueron retiradas inmediatamente después de la adición del Fe<sup>++</sup> y a intervalos de 10 min. durante un período de 30 min. Cada muestra fué adicionada a 4 ml de ácido sulfosalicílico 5% en ClH 5 N y el precipitado separado por centrifugación. La concentración de Proto en el sobrenadante se determinó leyendo la absorbancia del mismo, debida a la

Proto remanente, a 407 nm. Cuando el sobrenadante resultó ligeramente turbio, se hizo una corrección sustrayendo la absorbancia a 450 nm, longitud de onda a la que la absorbancia de las porfirinas es virtualmente cero. Antes de la sustracción, la lectura a 450 nm se multiplicó por 1,25, un factor que se determina comparando la absorbancia de homogenatos de tejido diluidos, que no tienen adicionada Proto, a 407 y 450 nm.

Los blancos, usando homogenato de tejido hervidos, se realizaron para medir la velocidad no enzimática de quelación de hierro. Esta velocidad en general fué muy pequeña y se restó a los valores obtenidos para la quelación enzimática. Se calcularon las velocidades iniciales para todos los experimentos, a partir de los correspondientes gráficos de velocidad y se expresaron como  $\mu$ moles de Proto utilizados por minuto.

En el método de Goudy en varias oportunidades se presentaron problemas de turbidez que fueron insalvables por medio de filtración y/o centrifugación, no logrando además reproducibilidad en los resultados; mientras que en el método de Labbé, se presentaron serios inconvenientes en la determinación de los blancos, llegando en varias oportunidades a ser sus valores superiores a los de las determinaciones correspondientes. Por

estos motivos se decidió descartar ambos métodos e intentar adaptar el tradicional método del piridín-hemocromógeno a este sistema.

En las primeras experiencias se empleó dicho método con las modificaciones de Porra y Jones (109) que no presentaron mayores dificultades metodológicas y por el contrario permitieron obtener resultados reproducibles. Por otra parte, dado que sobre las mismas ratas se deseaba determinar también la actividad PCL, se realizó una experiencia comparativa entre el método de obtención de las mitocondrias empleado por Jones y Jones (143) y el utilizado en este laboratorio para la obtención del sobrenadante correspondiente, que se aplica como fuente enzimática de la PCL hepática.

Según el método de Jones y Jones para obtención de mitocondrias, los hígados se homogenizaron en 8 volúmenes de medio conteniendo una concentración final de sacarosa 0,25 M, buffer Tris-ClH 4 mM, pH 7,2 y EDTA 1 mM. Después se centrifugó a 800 xg por 10 min y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 17.000 xg por 4 min. El pellet mitocondrial se lavó 2 veces con el mismo buffer. Finalmente las mitocondrias fueron sonicadas, en alícuotas de 5 ml, durante 3 min, recibiendo pul-

ses de 15 seg. por vez.

Mientras que el método de obtención de la preparación enzimática para PCL, cabe aquí recordar que consiste en: homogeneizar los hígados en 5 vol. de CLK 0,154 M, centrifugar a 900 xg durante 10 min. y recentrifugar el sobrenadante a 11.000 xg durante 20 min. El precipitado mitocondrial se congela durante 24 hs. (o hasta su uso) y se descongela y resuspende en el buffer de incubación en el momento de su uso. Los resultados fueron similares, por consiguiente en lo sucesivo se utilizó esta segunda técnica.

Teniendo en cuenta esta modificación del método, se deseó constatar las condiciones óptimas de incubación, como así también probar distintos métodos de solubilización de mitocondrias.

#### SOLUBILIZACION DE MITOCONDRIAS. Su estabilidad al almacenamiento.

En la tabla XVIII aparecen las actividades enzimáticas correspondiente a distintas preparaciones mitocondriales, que se obtuvieron según se describe en Métodos. Según puede verse, los distintos métodos probados no arrojaron resultados muy satisfactorios, ya que tanto la sonicación como el tratamiento con detergente disminuían considerablemente la actividad ferroquelatasa

TABLA XVIII Actividad Ferroquelatasa de mitocondrias solubilizadas por distintos métodos y su estabilidad al almacenamiento

TRATAMIENTO DE LA SUSPENSION MITOCONDRIAL	Tiempo de almacena- miento (hs.)	NORMAL		HCB	
		$\frac{\text{nmoles hemo}}{\text{mg. prot.} \times 30\text{min.}}$	A.R. (%)	$\frac{\text{nmoles hemo}}{\text{mg. prot.} \times 30\text{min.}}$	A.R. (%)
MITOCONDRIAS CRUDAS	—	1,11	100	2,90	100
SONICADAS	—	0,40	36	1,55	53
TWEEN	—	0,78	70	1,70	59
	24	0,48	43	1,51	52
	48	0,55	50	1,31	45
CONGELADAS Y	2	0,81	73	2,39	82
DESCONGELADAS	24	1,12	101	2,90	100
	48	1,09	98	2,79	96

La mezcla de incubación contenía, en un volumen total de 3,2 ml 100 nmoles de Proto IX, 200 nmoles de  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , succinato 10 mM, 0,8 ml de preparación enzimática y buffer Tris-ClH 50 mM pH 8,2. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C, en oscuridad, sin agitación, durante 30 min. Las actividades relativas se calcularon con respecto a "mitocondrias crudas". Los resultados son el promedio de 2 experiencias en las que se reunieron las mitocondrias hepáticas provenientes de 2 o 3 ratas. Las mitocondrias crudas se obtuvieron por centrifugación diferencial a 900 xg y 11.000 xg. Las sonicadas por sonicación de la suspensión mitocondrial durante 2 min. Las tratadas con Tween se suspendieron en Tween 20, (10 mg/ml) colocándolas en baño de hielo por 30 min. con agitación ocasional. En las congeladas y descongeladas, el tiempo de congelamiento fué 24 o 48 hs y se resuspendieron en el momento de usarlas.

tanto de las preparaciones enzimáticas normales como la de animales intoxicados con HCB. En cuanto al congelamiento y descongelamiento la mantiene pero no la mejora. Sin embargo en la mayor parte de este trabajo se empleó este último método, ya que se comprobó que inclusive a las 72 hs. la actividad permanecía aproximadamente constante. Esto era conveniente pues permitía defasar la determinación de esta enzima respecto de las PCL, en los casos en que era necesario realizar el estudio comparativo de ambas.

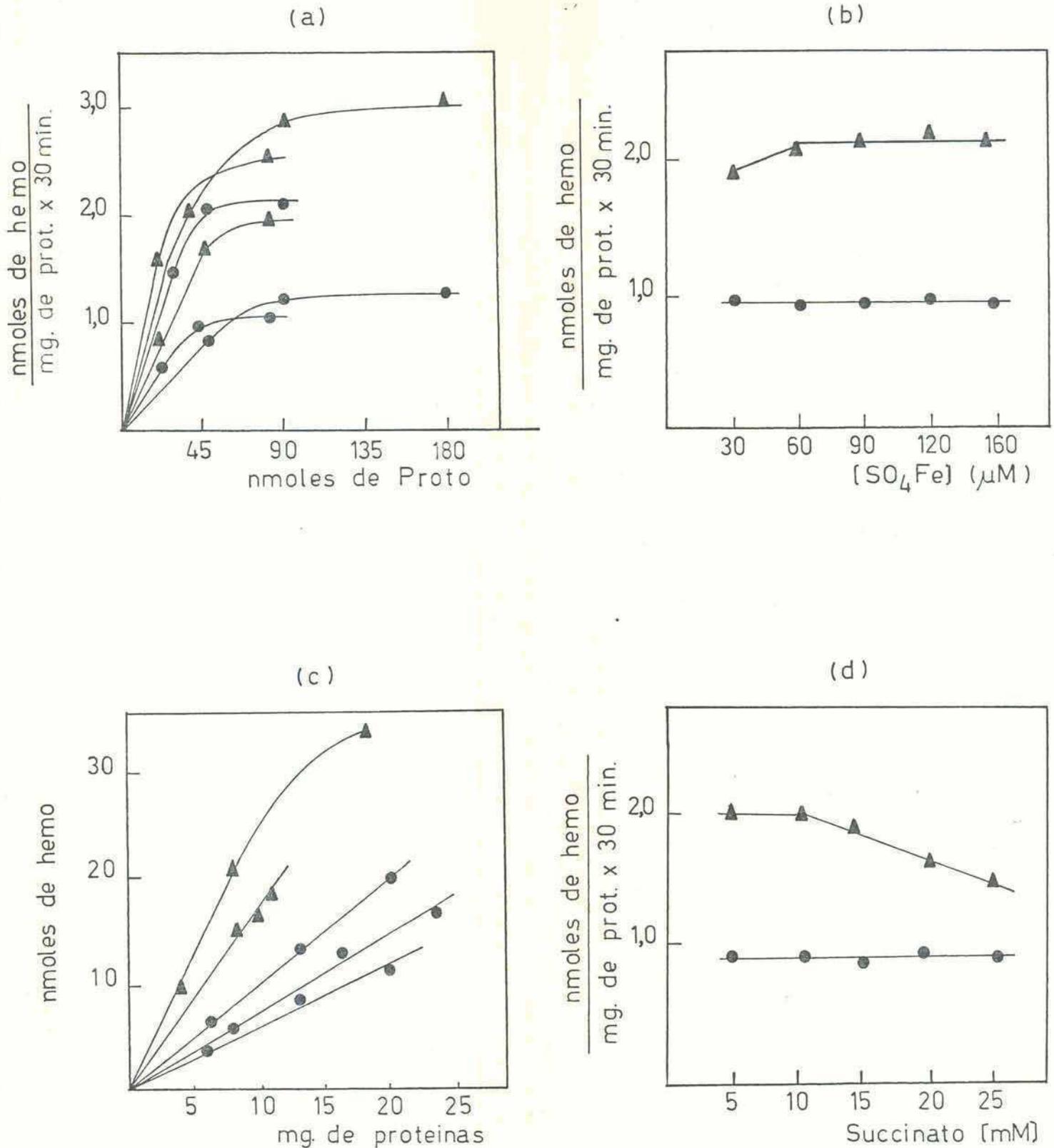
#### CONDICIONES DE ENSAYO.

##### - Condiciones generales.

En estos ensayos se utilizaron las mitocondrias obtenidas como se describe en el tópicó anterior, que se guardaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 ó 48 hs. y que fueron descongeladas y resuspendidas en buffer Tris 50mM, pH 8,2, en el momento de usarlas.

En las fig. 43 (a) y (b) se presentan los resultados obtenidos para la actividad de la enzima normal (círculos) y para la de animales porfíricos (triángulos), expresada como nmoles hemo/mg de proteína x 30 min., en función de la concentración

Fig 43 Efecto de distintas concentraciones de los componentes del sistema de incubación sobre la actividad Ferroquelatasa



Las condiciones de ensayo, salvo para el componente que se analiza en cada figura, fueron similares a las mencionadas en la Tabla XVIII. Las curvas presentes en (a) y (c) representan valores individuales, en tanto que (b) y (d) son el promedio de dos experiencias .

● valores normales

▲ valores porfíricos.

de cada uno de los sustratos que intervienen en la reacción por ellas catalizada, es decir Proto y  $\text{Fe}^{++}$ . De ellas se comprueba que ambas enzimas llegan a actividad constante con aproximadamente 100 nmoles de Proto y a una concentración 60-90  $\mu\text{M}$  de  $\text{SO}_4\text{Fe}$ .

En cuanto a los mg de proteínas a emplear se decidió que fueran entre 8 y 10 mg. para tener una buena sensibilidad y no más de 10 pues, en algunos casos de preparaciones porfíricas, por encima de esa cantidad la recta comenzaba a curvarse (fig. 43 (c)).

En la fig. 43 (d) se ve el efecto de distintas concentraciones de Succinato (agente reductor empleado en la incubación para prevenir la oxidación del ión ferroso), en el medio de incubación y aparentemente concentraciones superiores a 10 mM producirían una disminución de la actividad de la preparación porfírica, mientras que a menores concentraciones mantiene el mismo valor, por lo que se decidió utilizar una concentración 5 mM.

- Actividad en función del tiempo de incubación.

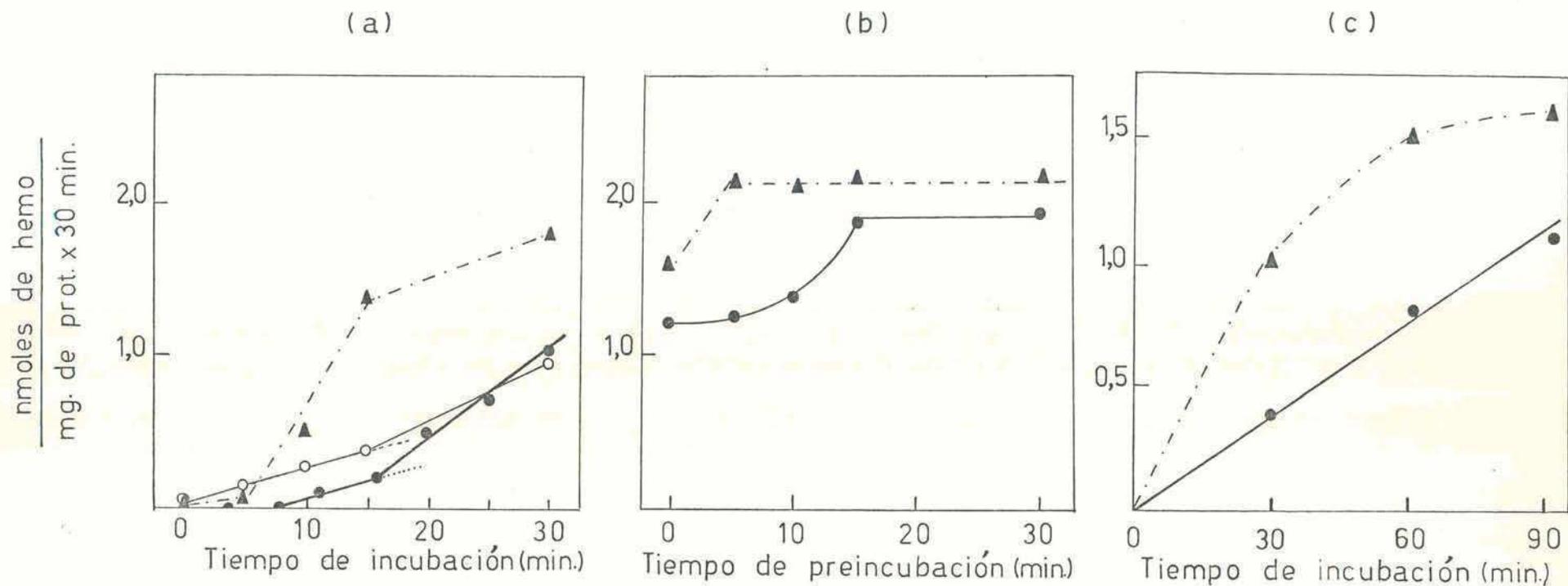
Se estudió el curso de reacción para la ferroquelatasa hepática obtenida de ratas normales e intoxicadas con HCB. El

construir las curvas de actividad en función del tiempo de incubación dió por resultado la fig. 44 (a) en la cual aparece un lag de 15 y 5 min., para normal y porfírica respectivamente, lo que podría estar indicando la formación de un posible intermedio, por ello se decidió preincubar la enzima en presencia de uno de sus sustratos (la Proto).

Los resultados aparecen en la fig. 44 (b), en la cual se comprueba que la preincubación favorece la formación de hemo, variando la respuesta en función del tiempo de preincubación, en el lapso de 0 a 20 min, siendo distinta para el preparado normal que para el porfírico . Así para el normal inicialmente el crecimiento es más lento que para el porfírico y entre los 10 y los 15 min de preincubación la activación crece bruscamente, mientras que para el porfírico la actividad ya es máxima a los 5 min. de preincubación, permaneciendo luego constante. En ambos casos, a partir de los 15 min la actividad permaneció constante.

En base a estos resultados se decidió repetir la curva de actividad en función del tiempo de incubación, pero preincubando por 15 min a 37°C y como puede verse en la fig. 44 (c) las rectas no presentaron el lag observado anteriormente. De aquí en más se incorporó la preincubación con Proto por 15 min, a las

Fig. 44 Actividad Ferroquelatasa en función del tiempo de incubación y/o preincubación



Las condiciones de incubación son las de la TABLA XVIII. La fig.(a) representa experiencia realizada sin preincubación, la curva superior (correspondiente a ratas porfíricas) es el promedio de dos experiencias, en tanto que las dos inferiores corresponden a experiencias individuales, con ratas normales. Las curvas (b) y (c) son el promedio de dos experiencias.

● y ○ Normal

▲ Porfírica.

condiciones generales de ensayo. En esta figura (44 c) también se observa que los datos normales caen sobre una recta, durante todo el tiempo ensayado; en tanto que los correspondientes a los porfíricos se curvan entre los 30-60 min; la causa podría ser la alta actividad específica de estas preparaciones, lo cual provocaría un gran decremento de la concentración de sustrato, que a los tiempos indicados dejaría de ser saturante.

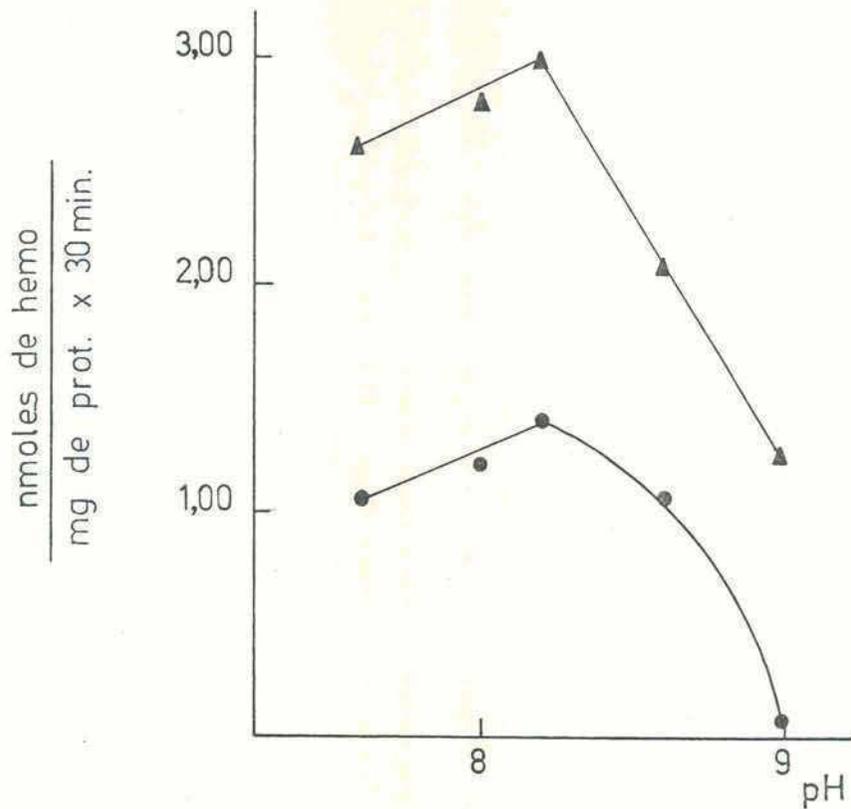
- pH óptimo.

Finalmente se determinó el pH óptimo para ambos sistemas enzimáticos. En la fig. 45 se comprueba que en ambos casos su valor aproximado es 8,2, decayendo la actividad hacia ambos lados, pero con una pendiente negativa más pronunciada hacia la zona alcalina. Además la preparación porfírica pierde más actividad que la normal a pH alcalinos. Así a pH 8,6 la preparación normal exhibe aproximadamente la misma actividad que a pH 7,6, mientras que la porfírica está muy por debajo de su valor correspondiente.

EFEECTO IN VIVO DEL HCB SOBRE LA ACTIVIDAD FERROQUELATASA.

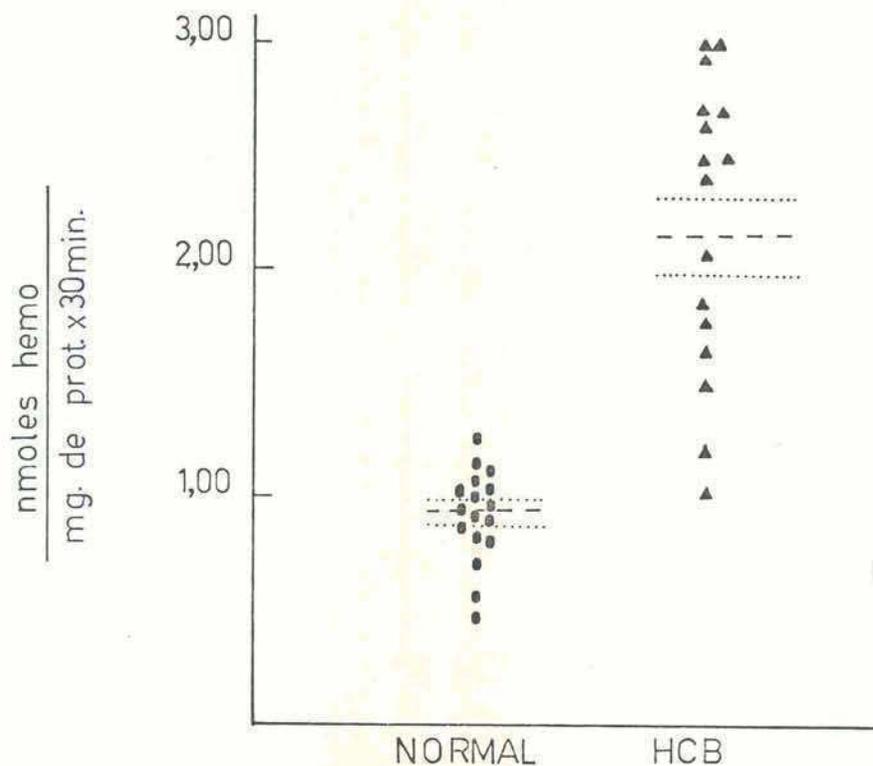
En base a los resultados de los estudios anteriormente mencionados las incubaciones se realizaron, según se detalló en

Fig 45 Curva de pH



Todo el rango de pH fue cubierto con buffer Tris-ClH 5mM. Los resultados son el promedio de dos experiencias. ● Normal; ▲ Porfírica.

Fig 46 Efecto in vivo del HCB sobre la actividad Ferroquelatasa



Los datos representan valores individuales. --- valor medio; ..... E.S.; ● Normal; ▲ Porfírica.

Métodos, en un medio que contenía 100 nmoles de Proto, 200 nmoles de  $Fe^{++}$ , succinato 5 mM, aprox. 8 mg. de proteína, a pH 8,2, con un período de preincubación de 15 min.

Bajo estas condiciones la actividad ferroquelatasa promedio normal dió 0,92 y porfírica 2,01  $\frac{\text{nmoles hemo}}{\text{mg prot} \times 30 \text{ min}}$ , como puede verse en la fig. 46. En ella también se observa que los valores normales tienen un rango de fluctuación estrecho alrededor del valor promedio, encontrando algunas desviaciones hacia valores menores. En cuanto a la actividad determinada para animales porfíricos, presentó una fluctuación mucho más grande; incluso algunos animales que presentaban severos síntomas de porfiria mostraron actividad cercana a la normal, en tanto que otros, en condiciones semejantes, llegaron a tener una actividad el triple respecto de la normal.

#### MESO COMO SUSTRATO DE LA FERROQUELATASA.

Se estudió la actividad de la enzima de ambas fuentes en forma comparativa utilizando un sustrato no fisiológico, semejante a la Proto donde los vinilos están reemplazados por etilos, es decir que sigue siendo una porfirina dicarboxílica como la Proto, por una parte con el objeto de ver si se mantenía la di-

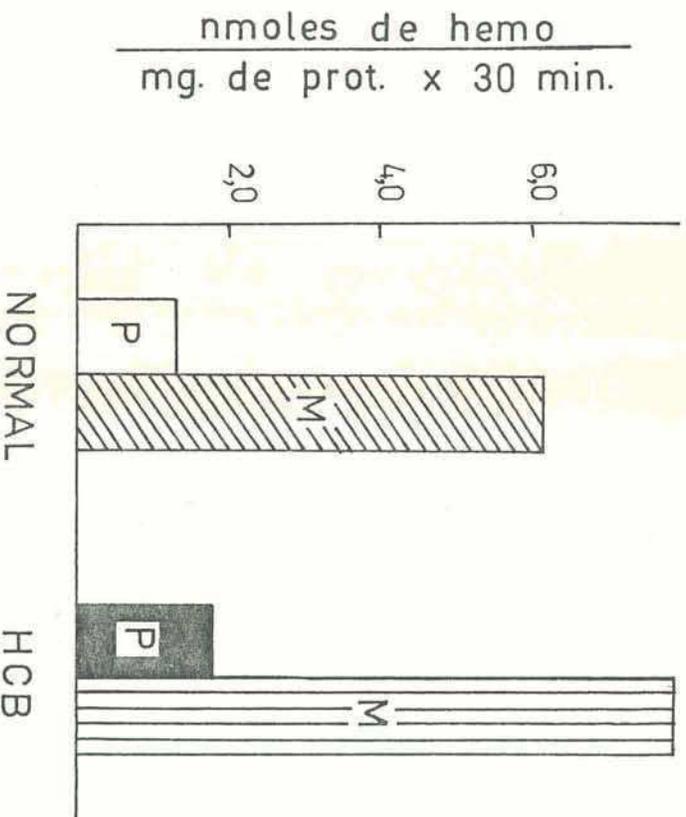
ferencia de actividad entre ambas y en caso afirmativo, para ver si se podría usar este sustrato para aumentar la sensibilidad del método. Como se ve en la fig. 47 la Meso sirve de sustrato para la enzima proveniente de ambas fuentes y con igual afinidad relativa que el sustrato fisiológico (Proto) ya que para ambos sistemas el incremento fue de aproximadamente 5 veces y la relación de actividad entre enzima normal y la de ratas intoxicadas se mantiene.

No obstante la ventaja que presentaba el uso de Meso como sustrato debido a su mayor sensibilidad, en la mayoría de los casos se siguió trabajando con Proto, debido a que es el sustrato fisiológico; pero en algunos casos en que la actividad era baja (como en los ensayos para distribución submitocondrial) se usó este sustrato para corroborar los datos obtenidos con Proto.

#### ESTABILIDAD TERMICA.

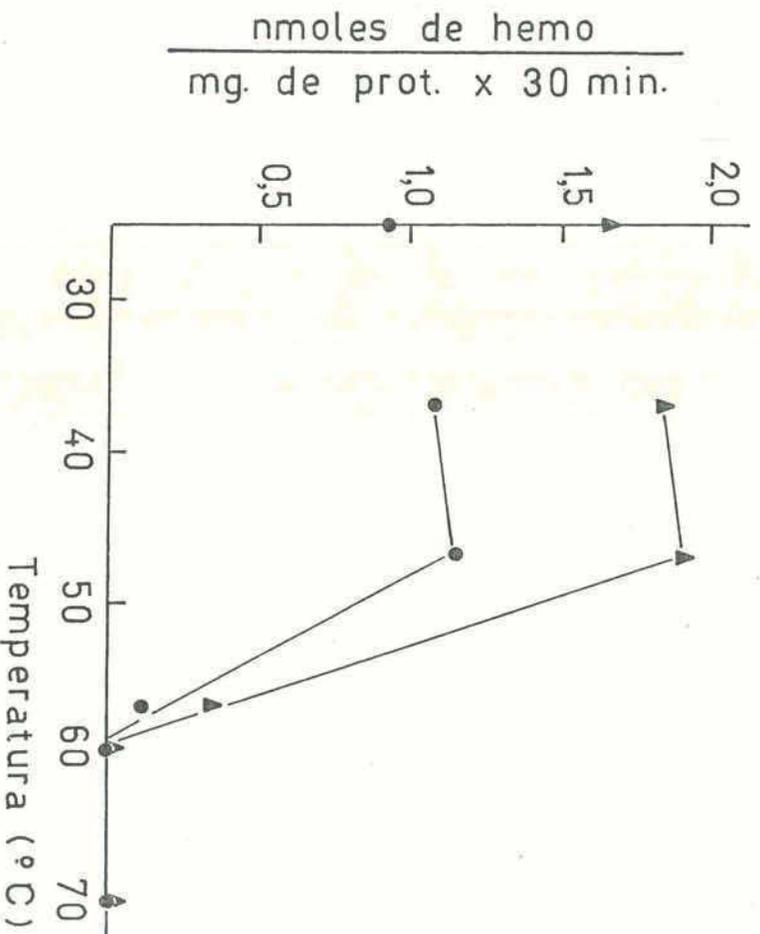
Para ver si había diferencias entre la estabilidad térmica de las enzimas "N" y "HCB", se midió la actividad de ambas después de precalentarlas a distintas temperaturas, durante 10 min. Los resultados obtenidos están presentes en la fig. 48. Los controles, que son las respectivas preparaciones enzimáticas que

Fig 47 Actividad Ferroquelatasa frente a Mesoporfirina



P: sustrato Proto; M: sustrato Meso. Condiciones de incubación en TABLA XVIII.

Fig 48 Estabilidad al calentamiento de la Ferroquelatasa de ratas normales e intoxicadas con HCB



Las condiciones de incubación se detallaron en la TABLA XVIII, La actividad se midió después de precalentar la enzima, durante 10 min a las temperaturas indicadas en el gráfico. ● NORMAL ; ▲ PORFIRICO.

no han sufrido precalentamiento, están representados sobre las ordenadas.

Se puede ver que los precalentamientos a 37 y 47°C aumentan la actividad tanto para la preparación "N" como para "HCB", mientras que el precalentamiento a 57°C la disminuye bruscamente, llegándose a anular a 60°C y temperaturas superiores, en ambos casos. No se observan diferencias significativas entre el comportamiento de la enzima normal y la porfírica en la parte ascendente de las curvas correspondientes, mientras que en la descendente, la pendiente negativa es mayor para la porfírica que para la normal, indicando una mayor inestabilidad de la la. frente al calentamiento.

El precalentamiento a 100°C por un período de tiempo menor (5 min), también provocó inactivación total de estas enzimas.

#### DETERMINACION DEL Km.

A los fines de ver si había diferencias en la afinidad de la ferroquelatasa proveniente de ratas intoxicadas respecto de las normales con respecto a uno de sus sustratos (el  $Fe^{++}$ ) se determinó el Km para el mismo. Los gráficos de Lineweaver-

Burk pueden verse en la fig. 49. Los Km obtenidos fueron:  $1,25 \times 10^{-5}M$  para la enzima normal y  $0,67 \times 10^{-5}M$  para la de animales porfíricos. Los resultados indican que si bien ambos son del mismo orden, la enzima de los animales porfíricos parecería presentar una mayor afinidad que la de normales.

#### EFEECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL PRODUCTO SOBRE LA ACTIVIDAD.

Como se puntualizó anteriormente, el hemo es el producto final y regulatorio de este camino metabólico; para ver si ejercía alguna acción diferencial sobre la ferroquelatasa de ratas normales e intoxicadas por HCB, se midió la actividad de las mismas frente a distintas concentraciones de hemo. Como se puede comprobar en la fig. 50, no se obtuvieron variaciones en las respectivas actividades, a las concentraciones probadas que abarcaron el rango  $0 - 1 \times 10^{-2} M$ .

#### INVESTIGACIONES ACERCA DEL MECANISMO DE ACCION DEL HCB.

##### - Efecto del HCB, PCF y porfirinas.

Dado el alto valor de actividad ferroquelatasa que presentan las ratas porfíricas, respecto a las normales, se quiso

Fig 49 Determinación de Km respecto de Fe<sup>++</sup>

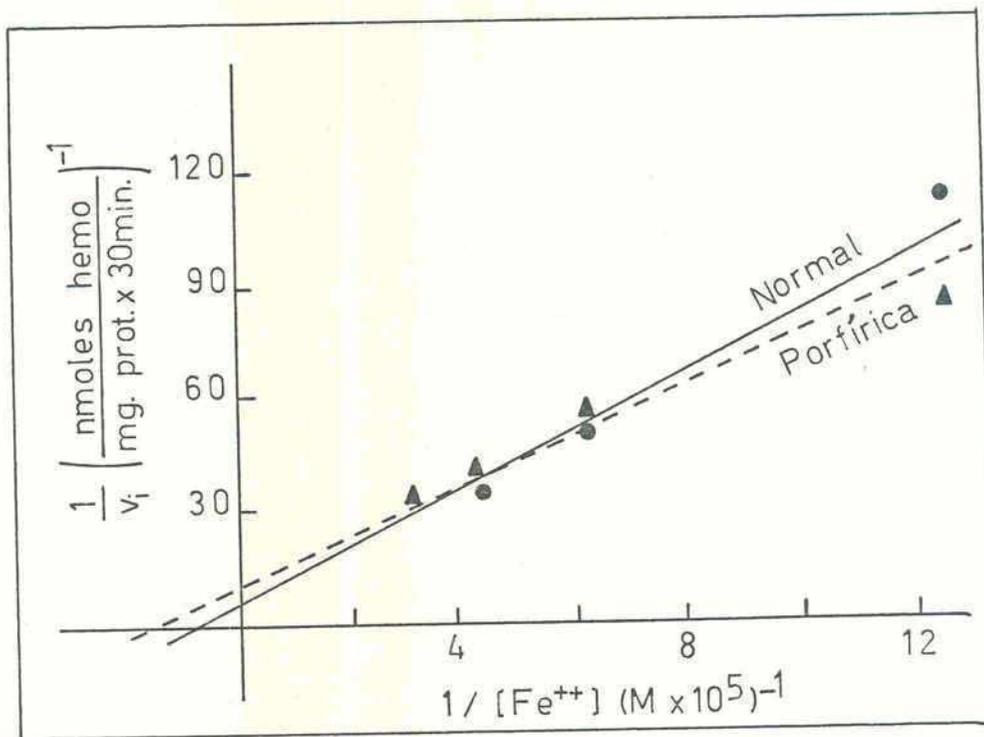
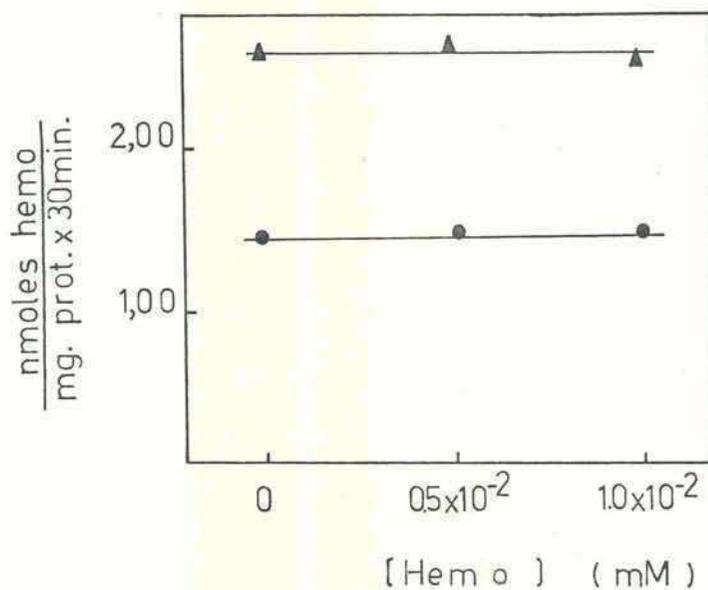


Fig 50 Efecto de l hemo



Las condiciones de ensayo se detallan en la Tabla XVIII,

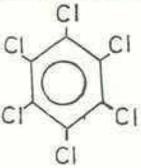
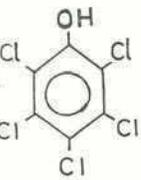
● Normal      ▲ Porfírica

investigar si ello se debía a un efecto directo del HCB sobre la enzima, o al efecto de un metabolito del HCB tal como el PCF o quizás también al efecto de las porfirinas que se acumulan en el hígado de las ratas porfíricas, como consecuencia de la intoxicación con HCB.

Para ello se prepararon soluciones de HCB o PCF de concentraciones adecuadas para lograr la concentración deseada en el medio de incubación, se pipetearon en el tubo y se dejó evaporar el solvente, después de lo cual se continuó con la determinación de la actividad en la forma habitual. Para el caso de porfirinas, se extrajeron las porfirinas totales de mitocondrias de hígado de ratas porfíricas por HCB, en forma semejante a la descrita en Métodos para homogenato de hígado; el extracto seco que contenía principalmente Uro y Firia (relación 3:1), se disolvió en el menor volumen de buffer de incubación, se cuantificó y se incluyó en el medio de ensayo en una cantidad equivalente a las porfirinas endógenas presentes en un ensayo porfírico (aprox. 108 mgr o 135 nmoles).

Los resultados presentes en la tabla XIX indican que ninguno de estos compuestos causa aumento significativo de la ac-

TABLA XIX Efecto "in vitro" del HCB, PCF y porfirinas sobre la actividad ferroquelatasa

AGREGADO	[M]	NORMAL		HCB	
		ACT. ESP.	A.R.	ACT. ESP.	A.R.
		$\frac{\text{nmoles hemo}}{\text{mg. prot.} \times 30 \text{min.}}$	(%)	$\frac{\text{nmoles hemo}}{\text{mg. prot.} \times 30 \text{min.}}$	(%)
NADA	—	0,63	100	1,53	100
HCB 	$10^{-3}$	0,74	117	1,68	110
	$10^{-2}$	0,63	100	1,50	98
PCF 	$10^{-5}$	0,60	95	1,50	98
	$10^{-4}$	0,35	56	0,96	63
	$10^{-3}$	0,00	0	0,08	5
PORFIRINAS	$4,2 \times 10^{-5}$	0,46	73	1,25	82

Las condiciones de ensayo se detallaron en la Tabla XVIII, salvo que aquí se incluyó una preincubación de 15 min, en presencia de Proto.

Las drogas fueron disueltas en benceno, pipeteadas en el tubo de ensayo. y se dejó evaporar el solvente antes de realizar la incubación,

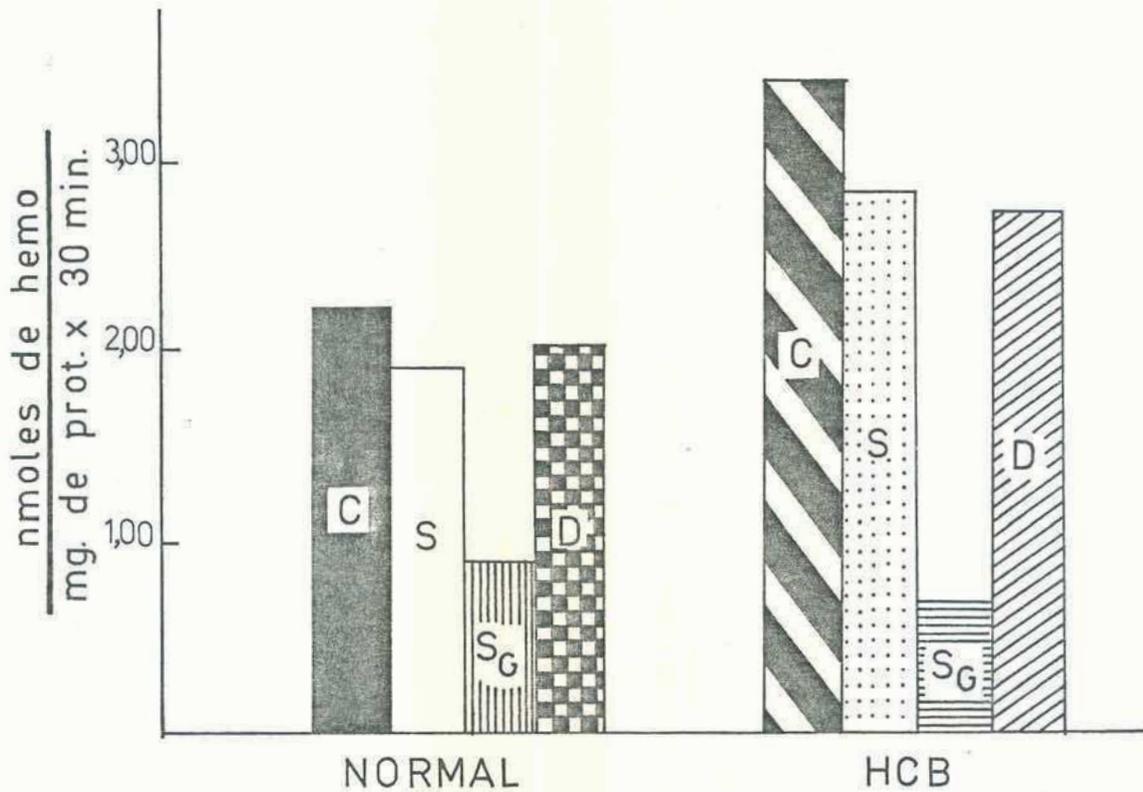
tividad ferroquelatasa, a las dosis probadas; por el contrario los dos últimos, PCF y porfirinas, la inhiben considerablemente, en tanto que HCB no afecta prácticamente la actividad.

- Efecto del tamizaje molecular.

Otra manera de corroborar el efecto de las porfirinas endógenas presentes en las mitocondrias de ratas porfíricas sobre la actividad ferroquelatasa, era separar dichas porfirinas y medir la actividad antes y después de la separación. Para ello se recurrió al uso de la cromatografía a través de Sephadex G-25 y se decidió incluir los ensayos correspondientes a ratas normales, que serían utilizados como control. En algunas experiencias las suspensiones mitocondriales fueron previamente sonicadas. Los resultados están presentes en la fig. 51. Allí se ve que la sonicación disminuyó ligeramente la actividad de ambas preparaciones, en tanto que el tamizaje molecular provocó un gran decremento en la actividad, 60% y 80% para la normal y porfírica, respectivamente. El decremento observado fluctuó mucho de preparación a preparación, estando estrechamente relacionado con la resolución de la columna y en algunos casos llegó a ser del orden del 100 %.

Para verificar si dicho decremento se debía al pasaje a

Fig 51 Efecto de la filtración por Sephadex G-25



C : Controles.

S : Sonicados.

S<sub>G</sub> : Sonicados filtrados a través de Sephadex G-25.

D : Preparación mitocondrial diluída al medio y mantenida en heladera durante el tiempo de corrida de la columna de Sephadex G-25.

Las condiciones de ensayo se dieron en la TABLA XIV.

Las mitocondrias recibieron el tratamiento indicado en cada caso.

través de la columna de Sephadex G-25 o a un problema de dilución y manipuleo, se realizó un ensayo, a partir de la misma suspensión mitocondrial que se pasaría a través del gel, pero que se diluyó a la mitad y se mantuvo en heladera durante el tiempo de corrida de la columna. Los resultados obtenidos están representados por la 4a y 8a barra de la fig. 51. Al hacer la comparación cuantitativa con los correspondientes controles <sup>sonicados</sup>, se comprobó que los decrementos encontrados variaban de 3-17% para las normales y de 16-26% para las porfíricas, pero siempre eran inferiores a los provocados por el pasaje por Sephadex G-25. Esto indicaría que la disminución de la actividad encontrada al realizar la filtración por gel, se debe a un efecto directo del tratamiento sobre la preparación enzimática.

- Ensayos cruzados y de calentamiento.

La disminución de la actividad ferroquelatasa observada luego de la filtración a través de Sephadex G-25 sugeriría la presencia de algún efector de bajo peso molecular, presente en ambas preparaciones enzimáticas. Para dilucidar la existencia o no de dicho activador se realizaron los ensayos cruzados y de calentamiento.

En la tabla XX pueden verse los resultados correspondientes

TABLA XX Efecto de preparaciones desproteinizadas por calentamiento sobre la actividad Ferroquelatasa normal

PREPARACION ENZIMATICA		Símbolo	nmoles hemo mg. prot. x 30min	ACTIVIDAD RELATIVA ( % )		
				N	N+N $\ominus$	N+sobr. N $\ominus$
CONTROL	NORMAL	N	0,92	100		
	PORFIRICO	P	2,38	259		
NORMAL +	NORMAL $\ominus$	N+N $\ominus$	0,68	74	100	
	SOBRENADANTE NORMAL $\ominus$	N+sobr. N $\ominus$	0,48	52		100
	PORFIRICO $\ominus$	N+P $\ominus$	0,80	87	118	
	SOBRENADANTE PORFIR. $\ominus$	N+sobr. P $\ominus$	0,58	63		121
BLANCOS	NORMAL $\ominus$	N $\ominus$	0	0		
	PORFIRICO $\ominus$	P $\ominus$	0	0		

Condiciones de ensayo fueron semejantes a las descritas en la Tabla XIX, Los desproteinizados fueron realizados calentando a 100°C, durante 5 min, la cantidad de proteína enzimática correspondiente a un ensayo, normal o porfírico según los casos. En N $\ominus$  y P $\ominus$  se utilizó la totalidad de la muestra desproteinizada, mientras que en "sobren. N $\ominus$ " y "sobren. P $\ominus$ " se utilizó la cantidad de sobrenadante correspondiente a su centrifugación a 900 xg por 15 min.

a los ensayos de calentamiento. En las dos primeras filas aparecen los controles realizados con las preparaciones normales y porfíricas bajo condiciones standard. En las dos siguientes filas aparece otro tipo de control que consiste en la determinación de la actividad normal en presencia de una preparación mitocondrial de hígado normal, desproteïnizada por calentamiento a 100°C durante 5 min., ya sea total ( $N + N_e$ ) o el sobrenadante de su centrifugación a 900 xg por 15 min ( $N + \text{sobren. } N_e$ ). Ambos ensayos presentaron menor actividad que su control (N).

A continuación están los valores correspondientes a la actividad proveniente de un hígado normal en presencia de cantidad equivalente de mitocondrias provenientes de un hígado "porfírico", desproteïnizadas por calentamiento; aquí también aparecen los datos correspondientes al desproteïnizado total como a su sobrenadante. Si estos datos se comparan con el control normal, se comprueba que presentan actividades relativas del 87 y 63% respectivamente, o sea que hubo disminución de actividad de la enzima normal; pero si se comparan con los correspondientes controles ( $N + N_e$ ) o ( $N + \text{sobren. } N_e$ ), las actividades relativas son 118 y 121% respectivamente, es decir: la actividad aumenta pero en menor grado que el incremento provocado "in vivo" por el HCB

(para este caso la actividad relativa fue del 259%). En la misma tabla se incluyen las determinaciones de actividad para los desproteinizados correspondientes que fueron nulas.

La tabla XXI presenta los resultados correspondientes a los ensayos cruzados, que se realizaron a los fines de ver el efecto de añadir una preparación porfírica sin calentar sobre la actividad normal. Como puede verse allí, en el ensayo cruzado se utilizó la mitad de ml de preparación enzimática que la empleada en los controles, a los fines de incluir en el mismo una cantidad de proteínas aproximadamente igual a la de los ensayos independientes.

El valor teórico se calculó sumando la mitad de los nmoles formados en cada ensayo control y dividiéndola por los mg de proteínas incubadas en el ensayo cruzado. Como puede verse, el valor experimental no difirió del teórico.

#### - Cofactores.

En base a la pérdida de actividad observada al pasar las suspensiones mitocondriales a través de Sephadex G-25 y los resultados negativos que se obtuvieron con los ensayos cruzados y de calentamiento, se decidió probar tentativamente la existencia de un cofactor o activador de bajo peso molecular.

TABLA XXI Actividad Ferroquelatasa normal en presencia de una preparación proveniente de ratas porfíricas

Preparación enzimática (ml)	hemo formado (nmoles)	proteínas (mg.)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA $\frac{\text{nmoles de hemo}}{\text{mg. de prot. x 30min.}}$ A.R. (%)
Normal			
0,8	9,67	10,31	0,94
0,8	14,26	11,47	1,24
0,4	11,82	10,89	1,09
valor teórico	$\frac{9,67+14,26}{2} = 11,97$	10,89	$\frac{11,97}{10,89} = 1,10$ 100

Las condiciones de ensayo se detallaron en la tabla XVIII. Los resultados son el promedio de 3 experiencias, en las que se trabajaron 2 a 3 animales de cada lote.

Para ello se probó el efecto del  $\text{Cu}^{++}$ , pues Wagner y col (245) habían observado un fenómeno semejante ya que al dializar sus preparaciones enzimáticas, éstas perdían actividad pero la recuperaban con el agregado de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$ . Los resultados obtenidos, al agregar 100 nmoles de Cu al ensayo realizado con la preparación porfírica pasada por Sephadex G-25, están presentes en la tabla XXII, e indican que el  $\text{Cu}^{++}$  en este caso fué inefectivo para restaurar la actividad perdida, muy por el contrario la disminuía aún más.

Se empleó entonces fosfato de piridoxal (PPy), teniendo en cuenta sus características y también un trabajo presentado por Labbé y Nielsen (162) en el "1er. Congreso Internacional de Porfirinas", Freiburg (1975), en el cual mencionaron la existencia de una base de Schiff en sus preparaciones de ferroquelatasa, lo cual les sugirió al PPy como una posible "coenzima funcional en la ferroquelatasa", pero no pudieron separarla, como así tampoco ningún otro posible cofactor. En este caso, aparentemente con la columna de Sephadex G-25 se separaría (fig. 51), en tanto que al agregar PPy en el medio de incubación se restaura la actividad (tabla XXII) aunque en muchos casos el % de recuperación no llegó al 100%, dependiendo los valores de la preparación usada. Por

TABLA XXII Investigación sobre la existencia de cofactores

Tratam. de la rata	Preparación enzimática	Agregados	mM	$\frac{\text{nmoles de hemo}}{\text{mg. de prot. x 30min.}}$	AR <sub>c</sub> (%)	AR <sub>c</sub> (%)
NORMAL	Suspensión Mitocondrial (SM)	—		0,53	100	
		PPy	0,10	0,53	100	
	SM / G 25	—		0,13	25	100
		PPy	0,10	0,20	38	154
HCB	SM	—		1,56	100	
		PPy	0,10	1,56	100	
	SM / G 25	—		0,74	47	100
		Cu <sup>++</sup>	0,03	0,37	24	50
	PPy	0,10	1,32	85	178	
	SM / G 25 + PPy	—		1,56	100	211

Los homogenatos de hígado de rata de ambos lotes fueron sometidos a centrifugación diferencial y el "pellet" mitocondrial congelado inmediatamente y descongelado a las 24 o 48hs., para su uso, previa suspensión en el buffer de incubación(SM), SM/G-25: indica el "pool" de los eluidos de una columna de Sephadex G-25, previamente equilibrada con el buffer de incubación, sobre la que se sembró la SM, SM/G-25+PPy:indica el "pool" de los eluidos de una columna de Sephadex-G25,equilibrada con buffer de incubación conteniendo PPy 0,1mM.Los resultados fueron obtenidos en 1 a 3 experiencias donde las mitocondrias hepáticas de 2 ratas se reunieron para su posterior utilización,

ello se incluyeron nuevos ensayos a distintas concentraciones de PPy, pero dada la fluctuación de los resultados, no se pudo establecer la concentración óptima para restaurar la actividad, ya que por encima de cierto valor el PPy causa disminución de la misma. Finalmente se decidió pasar la preparación enzimática a través de una columna equilibrada con buffer más PPy y como se ve en la misma tabla no se encontró la disminución observada anteriormente. Comparando el comportamiento de la enzima normal frente a la porfírica, aparentemente la normal sufriría una mayor pérdida de la actividad al pasarla a través de Sephadex G-25 y el PPy sería menos efectivo para restaurar su actividad que para restaurar la actividad de una preparación porfírica, tratada en idéntica forma; como si en la preparación normal estuviese actuando algún otro factor.

- Localización submitocondrial de la Ferroquelatasa en hígado de rata.

Las fracciones de membrana fueron preparadas usando una modificación del método de Sottocasa y col. (241), propuesta por Jones y Jones (240), que se basa fundamentalmente en hinchar, contraer y sonicar las mitocondrias, con lo que se logra contraer la membrana interna, que se separa de la externa en los pasos

subsiguientes, según se describió en Métodos.

Se usaron como enzimas marcadoras: la malato dehidrogenasa (MD) para matriz mitocondrial (fracción soluble); citocromo c-oxidasa (CcO) para membrana interna (fracción pesada); monoaminoxidasa (MAO) para membrana externa (fracción liviana).

Los resultados se ven en la tabla XXIII.

En ella se ve que la MD estuvo efectivamente presente en la fracción soluble y la MAO en la membrana externa. La CcO, en cambio, apareció en casi todas las fracciones, y si bien en la preparación normal estuvo predominantemente concentrada en la fracción pesada, en la porfírica apareció en mayor proporción en la fracción liviana. Este hecho podría deberse a una alteración a nivel de membrana, en las mitocondrias de los animales porfíricos, ya sea en la localización de las enzimas o en la fuerza de unión a la membrana; o quizás a un artefacto en la determinación, lo cual explicaría la recuperación superior al 100%.

En términos generales, la recuperación de las actividades enzimáticas fué poco satisfactoria, a pesar de que Jones y Jones (240) consideran que usando CLK, la contracción de la membrana interna es realmente efectiva y luego se logra una buena liberación de las enzimas por sonicación.

TABLA XXIII Distribución submitocondrial de la Ferroquelatasa

FRACCIÓN	Malato Dehidrogenasa		Citocromo c-Oxidasa		Monoamino Oxidasa		Ferroquelatasa	
	Act. específica	Act. total	Act. específica	Act. total	Act. específica	Act. total	Act. específica	Act. total
NORMAL	Mitocondria total	1,10	16,7	$0,6 \times 10^{-3}$	0,10	n.d.	2,62	46,8
	Fracción soluble	3,87	9,8	$1,1 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$	n.d.	1,14	5,0
	Fracción liviana			$0,8 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$	18,2	0,93	5,7
	Interfase			$0,4 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	n.d.	0	0
	Fracción pesada			$18,8 \times 10^{-3}$	0,05	n.d.	4,47	12,1
PORFIRICA	Mitocondria total	0,61	11,6	$1,1 \times 10^{-3}$	0,18	n.d.	3,28	52,9
	Fracción soluble	3,59	9,8	$7,8 \times 10^{-3}$	0,02	n.d.	1,26	4,0
	Fracción liviana			$41,9 \times 10^{-3}$	0,36	13,6	0,69	5,7
	Interfase			$0,4 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	n.d.	0	0
	Fracción pesada			$33,3 \times 10^{-3}$	0,10	n.d.	5,54	16,4

Las fracciones mitocondriales fueron preparadas por hinchado y contracción de las mitocondrias en CLK seguido por sonicación. La separación de las mismas se logró por centrifugación en gradiente de sacarosa. Actividades específicas: M.D.  $\frac{\Delta A}{0,01}$  ;  $\frac{CO}{\log A}$  ; MAO  $\frac{\Delta A}{0,001}$  ; Ferroquelatasa:  $\frac{\text{nmoles Co-Meso}}{\text{mg. prot. x 30 min.}}$

En cuanto a la Ferroquelatasa, si bien también estuvo presente en todas las fracciones, con ambas preparaciones enzimáticas (normal y porfírica) apareció fundamentalmente unida a la membrana interna, por lo que se podría pensar que en la porfírica no hay un problema de localización de las enzimas sino que la Cc-O estaría más ligeramente unida a la membrana interna y se libera con los distintos tratamientos que sufre la preparación.

PCL EN ERITROCITOS HUMANOS.

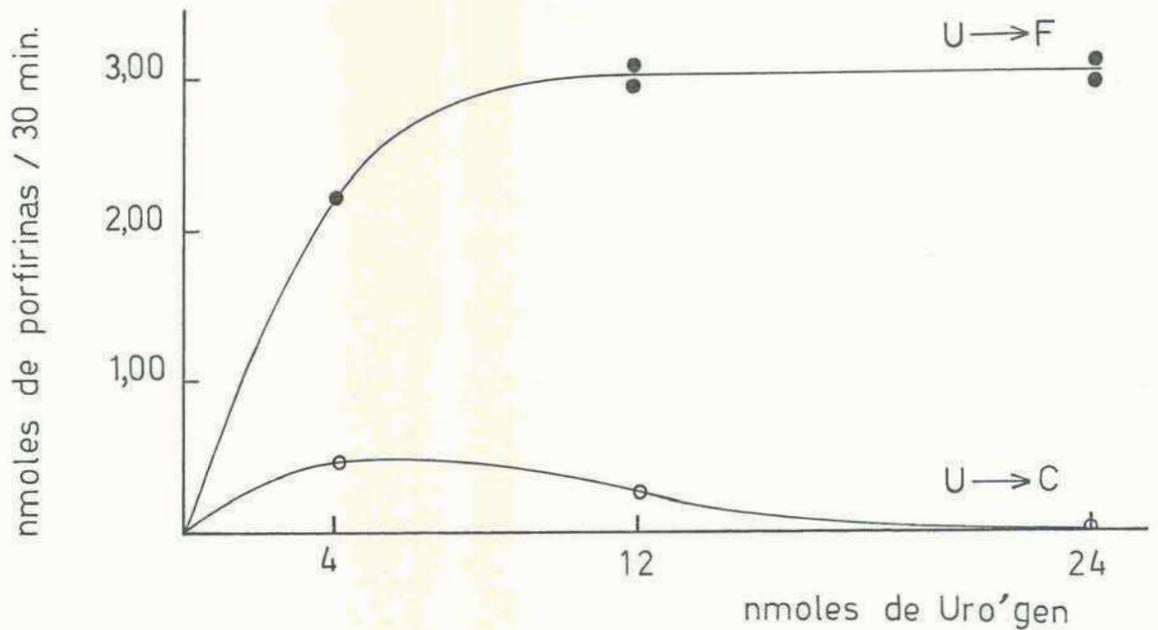
Teniendo en cuenta la gran analogía que existe entre la porfiria aquí estudiada, provocada en ratas por administración de HCB, y la PCT humana, resultó interesante estudiar la actividad PCL en eritrocitos y biopsias de hígado humano. Respecto al sistema de hígado se realizaron ensayos previos, para poner a punto el método para cantidades tan pequeñas de hígado, como las obtenibles de una biopsia, usando hígado de ratas porfíricas por HCB, como material de ensayo. Estas determinaciones, así como su aplicación a las biopsias de pacientes, están bajo estudio y no se describieron aquí.

En cuanto al sistema de eritrocitos, en primer lugar se quiso determinar la concentración de sustrato saturante. Para ello se realizó la curva de actividad en función de la concentración de sustrato (Uro'gen III), que como se ve en la fig.52 con aprox. 10 nmoles de Uro'gen se llega a la saturación para la 1er. etapa ( $U \rightarrow F$ ), en tanto que para la 2a. ( $\rightarrow C$ ) hay un máximo entre 4 y 7,0 nmoles y luego decrece suavemente, a mayores concentraciones de sustrato. En base a esto se decidió trabajar con 8 a 10 nmoles de Uro'gen, considerando que la 1er. etapa estaría saturada y la 2a. sólo levemente disminuída.

La fig. 53 muestra la actividad PCL de eritrocitos de 18 personas normales y 7 pacientes con PCT. Los dos pasos de la decarboxilación del Uro'gen III fueron representados aquí: 1er. etapa (símbolos superiores) y 2da. etapa (símbolos inferiores).

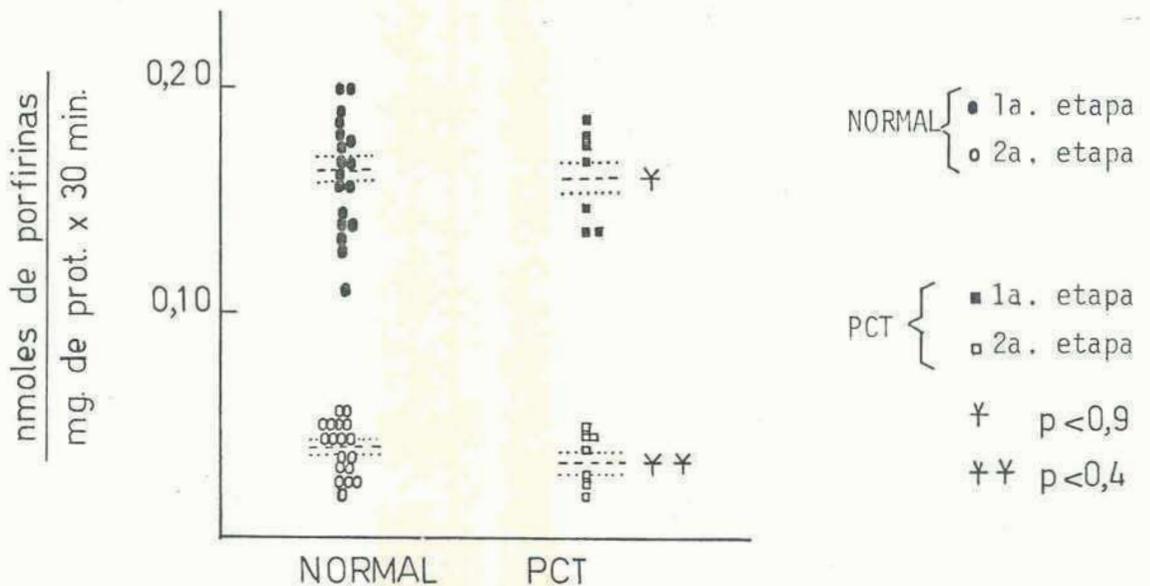
Puede verse que en los 7 casos con PCT, ambas actividades, para la 1er. y 2da. etapa, caen dentro del rango normal, considerando que los promedios obtenidos fueron 0,151 y 0,038 para personas normales y 0,150 y 0,033 para pacientes con PCT, para la 1er. y 2da. etapa respectivamente. Del análisis estadístico de estos datos puede verse que las probabilidades de diferencia a los controles correspondientes no fueron estadísticamente significativas al nivel  $p$  0,05.

Fig 52 Actividad PCL de eritrocitos humanos en función de la concentración de Uro'gen III



La mezcla de reacción contenía buffer fosfato de potasio 0,067M pH 7,0, EDTA mM, GSH 1 mM, 0,3 ml (20 mg de prot) de sobrenadante de hemolizado y los nmoles de Uro'gen III indicados en la fig., en un volumen total de 3 ml. Las determinaciones de los productos de reacción se realizaron según se detalla en la Tabla VII.

Fig 53 Actividad PCL en eritrocitos de controles normales y pacientes con PCT



Se emplearon iguales métodos que los detallados en la fig. 52 usando entre 8-10 nmoles de Uro'gen III como sustrato. Círculos y cuadrados representan valores individuales: ---valor medio; .....E.S.

DISCUSION.

De los datos de contenido y actividad PCL en distintos tejidos de ratas normales e intoxicadas con HCB, la conclusión evidente es que dicha actividad, en hígado y riñón, está verdaderamente disminuída por el tratamiento con esta droga. Esto es así ya que las preparaciones enzimáticas provenientes de ratas porfíricas fueron separadas de las porfirinas endógenas (en los casos que contenían mayor acumulación) por filtración a través de Sephadex G-25, por consiguiente fueron eliminadas las dificultades que pueden causar las porfirinas endógenas tales como inhibición de la actividad enzimática, decremento de la sensibilidad del ensayo enzimático o autooxidación del sustrato por las porfirinas oxidadas (10). A diferencia del método empleado por Taljaard y col(191) quienes sólo descartan la autooxidación por el agregado de GSH en el medio.

Por otra parte, los datos para la actividad PCL aquí presentados, dan en general tanto la velocidad de desaparición de sustrato (Uro'gen  $\longrightarrow$  Firia'gen) como la de aparición de producto ( $\longrightarrow$  Copro'gen) y no solamente esta última, como informan otros autores(10;83;246) con lo que se corre el riesgo de no obtener actividad PCL, como sería el caso presentado en la fila (hígado/

HCB/a) de la tabla VII, cuando en realidad existe y en un grado apreciable. Nuestro procedimiento elimina esta posibilidad. Si lo comparamos con el método de Elder y col.(247), si bien según ellos al usar Penta'gen como sustrato se pueden medir bajas velocidades de decarboxilación, pues la concentración de la correspondiente porfirina presente en el homogenato es también baja para interferir con el ensayo, como bien puntualizan ellos también, el método sólo es válido si ésta es la única enzima, en hígado de rata, que cataliza tanto la conversión de Penta a Copro, como la descarboxilación de los restantes sustratos (U, F y H).

De los datos obtenidos se puede afirmar que en el hígado de las ratas porfíricas hay un gran decremento en la decarboxilación del Uro'gen a Copro'gen, siendo más marcado en la 2a. etapa que en la 1a., análogamente a lo observado "in vitro" con otros agentes que activan o inhiben la 2a. etapa, siempre en mayor grado que a la 1a., como se ha comprobado en otras experiencias de este mismo trabajo y análogamente a lo informado por San Martín de Viale y col.(89) y Aragonés y col. (70).

El decremento en la actividad PCL hepática concuerda con los resultados de Elder y col(247)pero difiere de los de Taljaard

y col(246), quienes no encontraron modificación de la actividad PCL en ratas tratadas con HCB, si bien ellos mismos suponen que es a causa del corto tiempo de administración de la droga.

De los estudios de los pasos de decarboxilación que componen la 2a. etapa comparados con la 1a., que se realizaron a saturación de sustrato usando Firia'gen, Hexa'gen y Penta'gen (tabla IX y fig. 28) se ve claramente que en hígado la remoción de cada uno de los 3-COOH está afectada por el tratamiento con HCB y en grado semejante.

La disminución en la actividad PCL hepática producida por HCB "in vivo" explicaría los datos de acumulación de Uro y Firia y ausencia de Copro o quizás la presencia de sólo trazas de la misma, que no pueden separarse por las técnicas empleadas. Este efecto se ve aún más favorecido por el significativo incremento de las actividades de las enzimas involucradas en pasos anteriores a la síntesis de Uro: ALA-S, ALA-D y PBG-asa, que como se mencionó fué demostrado por otros investigadores de nuestro laboratorio, que aumentaba en función del tiempo de intoxicación, y que fuera informado para ratas con severa porfiria por San Martín de Viale y col.(196).

La acumulación de porfirinas de 8- y 7-COOH encontrada en

hígado de ratas porfíricas, coincide con los resultados cualitativos de San Martín de Viale y col. (189) y con los de Taljaard y col. (191), aunque difieren desde un punto de vista cuantitativo ya que los resultados aquí presentados indican un mayor % de Fíria y un menor % de Uro, así como una mayor acumulación de porfirinas en hígado muy superior ( $\cong$  10 veces mayor) a la observada por el segundo grupo.

Rajmanickan y col. (195) observaron que el HCB produce un incremento inicial de Uro y Copro en hígado (no hacen mención de los intermediarios) con notable incremento de la proporción de Uro y concomitante decremento del % de Copro, a lo largo del tiempo de tratamiento (0-1 mes). Aquí no se encontró Copro incrementada, inclusive no fué posible detectar esta porfirina, en tanto que los resultados a nivel de Uro serían concordantes. La diferencia a nivel de Copro podría deberse a una actividad PCL muy disminuída por estar trabajando con ratas con 11 o más semanas de tratamiento, mientras que los resultados de Rajmanickan a lo sumo abarcan 4 semanas de tratamiento.

Los estudios de riñón indican que hay una acumulación de porfirinas altamente carboxiladas, en respuesta al tratamiento con HCB, al igual que lo informado por Gajdos y Gajdos-Török (190).

Este efecto, al igual que en el caso del hígado, puede atribuirse a una inhibición en la PCL del riñón, principalmente en la 2a. etapa.

De los estudios realizados por San Martín de Viale y col.(189) se sabe que la administración prolongada de HCB produce un incremento en la excreción de Copro por orina, en cantidad semejante a Firia (20%), lo que nos indicaría que la misma se biosintetiza en cantidades apreciables en algún tejido distinto del hepático, donde la biosíntesis de Copro es casi nula; éste podría ser el tejido eritropoyético; es por ello que se estudió la actividad PCL en bazo (que se sabe cumple funciones eritropoyéticas en la rata) y en eritrocitos.

Cabe señalar aquí que la actividad PCL de bazo de ratas normales no se había determinado con anterioridad; en el presente trabajo se encontró que este órgano presenta una significativa actividad comparada con la de hígado. Los únicos antecedentes relacionados con PCL en bazo son los trabajos de Romeo y Levín(83) realizados en bazo de ratones tratados con fenilhidrazina. En cuanto a la actividad PCL de bazo de ratas porfíricas, aquí se encontró que existe sólo un ligero incremento respecto de la normal; por consiguiente al no existir decremento en la actividad

PCL, la acumulación de Uro y Firia, observada en este caso, podría deberse a un incremento de la PBG-asa, hipótesis apoyada por los datos experimentales de San Martín de Viale y col. (196). Esto último llevaría a una mayor síntesis de Uro'gen el cual no alcanzaría a decarboxilarse, ya que la velocidad de decarboxilación permanece en el valor normal. De todos modos tendría que aparecer al menos algo de Copro y es probable que así suceda, pero en tan pequeña cantidad que no es detectable por el método empleado. La acumulación de Firia, que acompaña a la de Uro, en bazo de ratas porfíricas, podría explicarse teniendo en cuenta que, de las dos etapas de la decarboxilación la 1a., que lleva de Uro a Firia, es una etapa rápida mientras que el primer paso de la 2a. etapa, que lleva de Firia a Hexa, es el paso más lento de los 4 involucrados en la decarboxilación total del Uro'gen, de aquí que una buena parte del Uro'gen biosintetizado por el sistema PBG-asa aumentada, pasa a Firia'gen, que se acumula.

De los estudios realizados, con eritrocitos, se observa que en los animales porfíricos no hay acumulación de porfirinas y que la actividad PCL de los mismos es igual en ratas normales y porfíricas, de lo que se concluye que el HCB no tiene efecto sobre este tejido.

En glándula de Harder, un tejido que normalmente presenta una gran acumulación de porfirinas, de aquí el interés de su estudio, el HCB produjo un decremento en el contenido de porfirinas, que podría explicarse por una inhibición en la ALA-D, detectada por San Martín de Viale y col. (196). El leve decremento en la actividad PCL, producido por el HCB en este tejido, está de acuerdo también con el leve incremento provocado por la misma sobre el contenido de Uro.

De lo discutido observamos que si bien la porfiria producida por HCB afecta al hígado y riñón, las principales alteraciones ocurren a nivel hepático, ya que es en el hígado donde se produce la mayor acumulación de porfirinas y el mayor decremento en la actividad PCL. Mientras que en tejido eritropoyético: en sangre no hay alteraciones ni en el contenido en porfirinas ni en actividad PCL y en bazo (que es considerado órgano eritropoyético en la rata) hay sólo un leve efecto tanto en la acumulación de porfirinas como sobre la actividad PCL. Dado la gran analogía, que tanto a nivel químico como patológico presenta la porfiria inducida en ratas por HCB respecto de la PCT humana, podría esperarse que una de las grandes alteraciones metabólicas producidas en estos pacientes sea la disminución de la PCL hepática, sin varia-

ción de la misma en sistema eritropoyético, lo cual estaría de acuerdo con afirmaciones previas de que esta enfermedad está caracterizada por un disturbio a nivel hepático. Actualmente se sabe que la actividad PCL está disminuída en hígado de pacientes con PCT (138, 248-249), mientras que a nivel de sangre hay contradicciones, como se discute más adelante.

Los datos obtenidos para la decarboxilación del Uro'gen I y Uro'gen III, indican que con preparaciones provenientes de ratas normales la velocidad de decarboxilación del III es  $\approx 7,5$  veces mayor que la del I; datos que están de acuerdo con los Mauzerall y Granick (10) quienes propusieron que en eritrocitos de conejo la decarboxilación del Uro'gen I ocurre a la mitad de velocidad que el Uro'gen III; Hoare y Heath (13) también encontraron que ambos porfirinógenos eran sustrato de la PCL pero no calcularon sus velocidades relativas (en *Rhodospseudomonas spheroides*), en tanto que Tomio y col. (68) informan que sus resultados, en eritrocitos de pollo, confirman los datos de Mauzerall y Granick (10).

Chen y Miller (82) también lo demostraron en hojas de tabaco y más recientemente Smith y Francis (73) en hígado de rata, aunque estos últimos informan haber encontrado diferencia en las

velocidades para el 1er. paso de la descarboxilación ( $U \rightarrow F$ ) no así en la producción de producto final, ya que no encuentran diferencias en la velocidad de formación de Copro, con ambas series isoméricas. Los resultados presentados aquí indican que los primeros productos de la descarboxilación, es decir el Firi'gen, se acumulan más en la serie III que en la I, mientras que Penta'gen y Hexa'gen permanecen bajos y constantes. A este respecto iguales resultados obtuvieron Francis y Smith (73).

Por otra parte Cornford (59) trabajando con eritrocitos humanos encontró una ligera ventaja respecto de la serie I ya que informa que la relación entre las velocidades para las series III y I sería 7:8. En cambio Romeo y Levin (83) informan que ambas velocidades serían iguales. En cuanto a la presencia de intermediarios (F, H y P) en la serie isomérica I, los resultados presentados aquí están de acuerdo a los de Aragonés y col. (70) y difieren de los de San Martín de Viale y col. (72) y de los de Romeo y Levin (83) ya que ambos grupos informan no haber podido detectar dichos intermediarios. En el caso de Romeo y Levin, puede deberse al método empleado, ya que en la fase acuosa que ellos separan, y de la cual extraen posteriormente lo que consideran sólo Uro, podrían estar contenidos los interme-

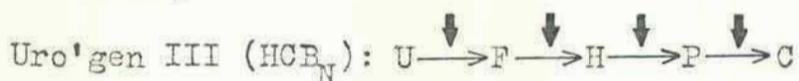
diarios, que al encontrarse en muy pequeña proporción, no alteran la absorción de la Uro y por ende no son detectados, al ignorar su presencia. El hecho de que ellos no hayan obtenido intermediarios con la misma enzima de hígado, posiblemente se deba a la baja actividad decarboxilante de su preparación por el Uro'gen I frente al III comparado con la de eritrocitos o la aquí informada, ya que la relación isómero III: isómero I fue 11,2 y 7,5 para su sistema y los datos aquí presentados, respectivamente. O sea que en el 1er. caso los intermediarios podrían estar presentes y debido a su pequeña cantidad no ser detectados.

Analizando ahora el efecto del HCB sobre la descarboxilación del Uro'gen de ambas series isoméricas, a nivel de % de porfirinas al final de la incubación de la PCL, veríamos en primer lugar que con la enzima normal, el paso más lento en la serie I es  $U \rightarrow F$ , mientras que en la serie III es  $F \rightarrow H$ , a juzgar por la acumulación de Uro y Firia respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de Doss (250) quien localiza la menor velocidad de cada camino, después de la Uro en la serie I y después de la Firia en la III. En segundo lugar, con la enzima proveniente de animales porfíricos, se ve que en la serie I se incrementa el bloqueo entre U y F como así también los % de H y P respecto de los normales. En tanto que en la serie III se afectarían los

4 pasos de la descarboxilación del Uro'gen correspondiente.

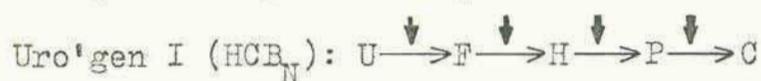
Respecto de las velocidades relativas para los distintos pasos de la descarboxilación del Uro'gen III hasta Copro'gen III, en un primer momento se pensó que estarían afectados en distinto grado por el tratamiento con HCB, debido al notable incremento encontrado de Hexa frente a Penta. Sin embargo cabía la posibilidad de que se debiera a un efecto de menor llegada de sustrato y por consiguiente de no saturación de la enzima. Por ello se realizó la determinación de actividad en función de sustrato y luego se compararon los resultados que estaban a aparente saturación. Así se descartó la posibilidad mencionada, ya que los % de inhibición para cada uno de los 4 pasos de descarboxilación del Uro'gen, al asegurar su saturación con el agregado de porfirinógenos exógenos, fue aproximadamente el mismo (ver fig. 28 tabla IX).

Por lo tanto la acción del HCB sobre la descarboxilación de la serie III, respecto de la misma en animales normales ( $HCB_N$ ) afectaría todos los pasos en grado semejante, como se indica en el siguiente esquema:



Para la serie isomérica I el análisis de los resultados a

nivel de los % de las actividades relativas, indicarían que el HCB actúa según el siguiente esquema:



El análisis de estos resultados permitió también comparar las velocidades de descarboxilación de los porfirinógenos intermediarios con la enzima normal (o en casos normales). Así se vió que Firia'gen es el que se descarboxila a menor velocidad, en tanto que para los restantes se cumple: Hexa  $\succ$  Penta  $\succ$  Uro.

Una relación parece también encontrarse en cuanto a la cantidad de sustrato necesaria para saturar a la enzima, ya que Firia se saturaría con aprox. 10 nmoles, Hexa con 12, Penta con 14 y Uro con 16; como si para los sustratos de los distintos pasos de la 2a. etapa de la descarboxilación del Uro'gen III (F, H y P) se cumpliera que a menor N° de carboxilos se necesita mayor concentración de sustrato para saturar a la enzima. En tanto que para la 1er. etapa la concentración necesaria es aún mayor.

Estos datos están de acuerdo con los Smith y Francis (73) para quienes Firia se descarboxila más lentamente, en tanto que el orden para los otros porfirinógenos estaría algo alterado, ya que según sus datos, las velocidades respectivas serían:  $F < H < P$ ; aunque ellos mismos puntualizan que estos resultados

deben ser interpretados con extremo cuidado. A pesar de las dificultades para la medición exacta del  $K_m$  aparente de todos los porfirinógenos, ellos informan el  $K_m$  para Penta ( $8,1 \pm 0,35 \mu M$ ) y un rango alrededor de  $0,5 - 1,5 \mu M$  estimado para los restantes porfirinógenos. Ellos sugieren que la afinidad de la PCL por los sustratos decrece con cada descarboxilación, lo cual está de acuerdo con los resultados aquí presentes, para los productos parcialmente descarboxilados del Uro'gen III, o sea F, H y P porfirinógenos de la serie III. No así con los resultados correspondientes al Uro'gen III mismo, ya, que como se puntualizó anteriormente, éste sería el que se necesita en mayor concentración para saturar a la enzima; aunque estos resultados también deben interpretarse con cautela.

El análisis de las distintas enzimas en función del tiempo de intoxicación permitió sugerir que la PCL es la enzima que se afecta en 1er. lugar, además de ser la única para la que decrece la actividad con el tratamiento con HCB. Efectivamente aquí se demostró que la PCL decrece su actividad a la primer semana del tratamiento, llegando al máximo decremento para la 2a. etapa a 8a. semana, mientras que para la 1a. aún se obtuvo un mayor decremento a la 11a. semana.

Elder y col. (247), por su parte, habían encontrado, trabajando con ratas intoxicadas con una dieta con HCB al 0,3%(p/p), que si bien a la 4a. semana ya se había establecido la porfiria (excreción aumentada de porfirina urinarias y acumulación de U y F en hígado), la PCL sólo se encontraba alterada muy levemente (10% del control). A partir de ese momento su actividad disminuyó progresivamente hasta llegar a ser un 18% del control, a las 11 semanas de tratamiento.

En el presente trabajo se encontró, ya a la 1er. semana un decremento de aprox. 10%, en tanto que a la 3er. semana había llegado al 36%. Esta diferencia podría explicarse por la diferente forma de intoxicación de los animales, ya que aquí se realizó por sonda gástrica, en tanto que Elder y col. administran el HCB en la comida.

Los resultados difieren más de los de Taljaard y col.(191) ya que al determinar actividad PCL, al tiempo en que las ratas intoxicadas con HCB presentaban un cuadro típico de acumulación de porfirinas, no encontraron efecto sobre la misma por el HCB, salvo en aquellos animales que además habían recibido sobrecarga de Fe. Estos últimos tenían una disminución de la actividad PCL, que llegaba a hacerla no detectable a los 55 días del tratamiento. La falta de disminución observada por ellos suponen que se debe a una administración poco prolongada de la droga; aunque

en base a los resultados aquí expuestos ésta no debe ser la causa, ya que aunque se considere despreciable el decremento observado a la 1er. semana, el de la 3a.sem. ya no lo es y menos aún el de la 8a. semana (comparable con sus 55 días) donde se llega a un 85% de disminución.

Elder y col (247) descartaron la necesidad de sobrecarga de Fe, para el establecimiento de porfiria por HCB, midiendo el contenido de Fe no hémico durante todo el período de administración de HCB, lo cual les dió valores suavemente mayores en ratas porfíricas, pero como las mismas tienen también un hígado mayor, la diferencia no fué significativa o sea que no se desarrolló siderosis a causa del tratamiento con HCB y sin embargo se encontró decremento en la PCL.

Las investigaciones realizadas sobre la existencia de un posible inhibidor de la PCL en hígado de ratas porfíricas por HCB indicaron la presencia de una sustancia termoestable (o parcialmente termoestable) capaz de inhibir la actividad PCL de hígados normales. Como la disminución encontrada en los ensayos de calentamiento no llegó a ser del mismo grado que la provocada por el HCB "in vivo" se realizaron los ensayos cruzados, para descartar la posibilidad de que el tratamiento térmico hubiese afectado la actividad del inhibidor. De los resultados obtenidos

no se pudo descartar ni confirmar esta hipótesis, ya que la preparación porfírica no afectó la actividad de la normal. Ello pudo deberse, en principio, a una de los siguientes motivos:

i) que la afinidad del inhibidor hacia la enzima porfírica fuese muy superior que hacia la enzima normal y por ello no se separaría de la 1a. para actuar sobre la 2a.; ii) que el inhibidor estuviese covalentemente unido a la enzima porfírica; iii) que si bien el inhibidor puede separarse parcialmente de la enzima porfírica para unirse a la normal, no esté en exceso como para afectar igualmente a las dos, por lo que el decremento de actividad que sufriría la normal se vería compensado por un concomitante incremento de la porfírica, al ser separada de su inhibidor. Los estudios sobre el efecto "in vitro" del HCB y compuestos relacionados indicaron en un primer momento al PCF como el metabolito más probable a través del cual actuaría el HCB. Pero los ensayos realizados en función de la concentración de PCF, indicaron que si bien esta droga tiene un gran poder inhibitorio sobre la PCL, existe una concentración límite ( $10^{-5}M$ ) por debajo de la cual no tiene efecto. La cantidad de PCF encontrada en el hígado de una mujer intoxicada con una fuerte dosis de PCF (251) podría dar una concentración de PCF de  $10^{-5}M$  en el medio de ensayo de

incubación de PCL. Por consiguiente, en base a las dos consideraciones anteriores, o el PCF no es el responsable del decremento observado en la actividad PCL por administración de HCB a ratas o su concentración en hígado, por el tratamiento a largo tiempo con HCB, es mayor que la obtenida por una única captación masiva de la droga en sí, por un efecto de acumulación en el hígado o de concentración en el entorno de la enzima.

No se debe descartar la posibilidad de que el PCF, si bien no tiene un efecto directo sobre la actividad PCL, puede afectarla actuando indirectamente, por ejemplo a nivel de síntesis proteica. El decremento observado "in vivo" por el HCB podría ser también la suma de los efectos inhibitorios de varios metabolitos del HCB. Estos resultados concuerdan con las observaciones de que la prolongada administración de PCF a ratas hembras no induce porfiria. Basándose en ello varios autores (211, 214, 252-254) concluyen que el PCF, como el principal metabolito del HCB no juega un papel predominante en el disturbio del metabolismo de porfirinas hepáticas. Sin embargo, recientes hallazgos muestran que el PCF altera los mecanismos de detoxificación hepática (255) y acelera el establecimiento de porfiria hepática inducida por HCB (215). En ratas tratadas con una combinación de HCB y PCF

el establecimiento de porfiria hepática se establece aprox. 3-4 semanas antes que en ratas tratadas con HCB solo (215). En estos experimentos el PCF, cuando se administró sólo, no causó porfiria.

Los cambios en el "pattern" de detoxificación parecen estar asociados con la formación de intermediarios electrofílicos reactivos, por ejemplo epóxidos (256) los cuales se supone que serían los responsables del disturbio en varias funciones celulares, incluyendo efectos mutagénicos y carcinogénicos por unión a macromoléculas celulares. Otro mecanismo a través del cual el PCF generado en el retículo endoplásmico liso puede alterar el "pattern" del metabolismo de los compuestos relacionados al HCB o incrementar la velocidad de turnover del cit P-450 (relacionado a dicho sistema metabólico), sería a través de la formación de un complejo con los fosfolípidos anfofílicos en las membranas, debido a su propio carácter anfofílico, lo cual provocaría una alteración en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos (257). Por otra parte Jones y Sweeney (258) informaron que ratones que responden a la inducción de la aril hidrocarbon hidroxilasa (AHH, relacionada al cit.P-448) desarrollan porfiria al administrarles tetracloro dibenzodioxina (TCDD). Mientras que, los ra-

tones que no responden, no desarrollan porfiria bajo las mismas condiciones. La actividad PCL estuvo deprimida sólo en los ratones sensibles al tratamiento. De ello sugieren que la inducción de cit P-448 y AHH por hidrocarburos aromáticos polihalogenados es probablemente un prerrequisito para la inhibición de la PCL y la consiguiente acumulación de porfirinas hepáticas. Por otra parte la simultanea administración de HCB y fenobarbital (un inductor del cit P-450 y de las oxigenasas de función mixta) promueve el metabolismo del HCB, provocando un aumento en la acción porfirinogénica del mismo (259-260). Todo esto sugiere que un metabolito (quizás el PCF) o un intermediario reactivo de los compuestos relacionados al HCB, sería el responsable de los disturbios del metabolismo de las porfirinas hepáticas.

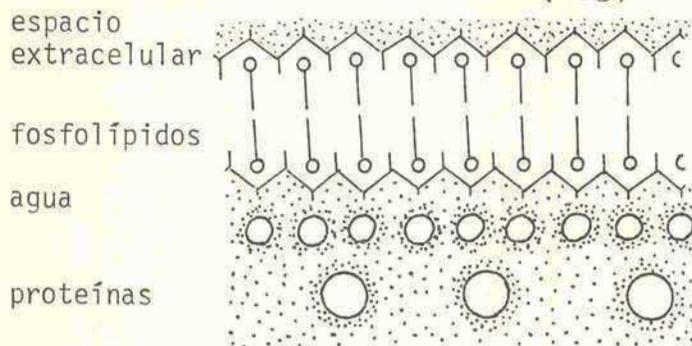
Otro camino de metabolización del HCB, lleva a la formación de metabolitos conteniendo azufre, los cuales pueden derivar de la conjugación con GSH, de una reacción con metionina (261) o de unión covalente de intermediarios reactivos a grupos sulfhidrilos de las enzimas, por ejemplo la PCL.

Estos resultados sugieren que un producto metabólico electrofílico del HCB podría reaccionar con grupos sulfhidrúlicos de la parte catalítica de la PCL hepática, provocando su inactivación.

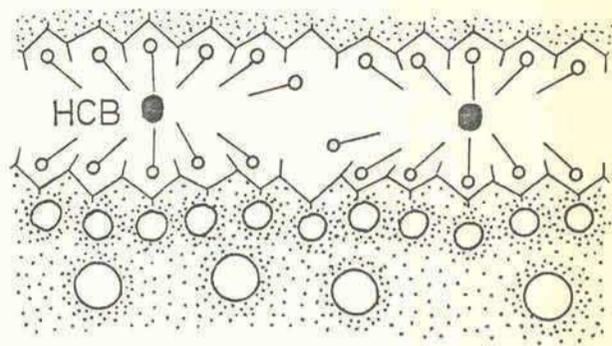
El análisis de los resultados obtenidos con los restantes compuestos indica que el HCB tampoco actuaría, al menos en forma directa, sobre la PCL. Estos datos sin embargo, no descartan la posibilidad de que el HCB actúe en forma directa a nivel de membrana, como propone Simon (262). Según este investigador el HCB aumentaría la permeabilidad de la membrana a sustancias solubles en agua, de bajo PM. Cuando una sustancia fuertemente lipofílica se incorpora a la membrana fosfolipídica causa un cambio en la orientación estrictamente controlada de las moléculas anfipáticas y este cambio en la orientación puede ser suficiente razón para la penetración de sustancias hidrofílicas que aumentan en la vecindad del sitio defectuoso. Tales sustancias serían:  $\delta$  ALA, PEG y Uro; además se necesita una determinada concentración intracelular de ellas para que se produzcan a través del hemo los mecanismos de inhibición por producto final o feedback involucrados en la regulación de este camino biosintético y para llegar así a un estado de equilibrio fisiológico. Los disturbios en el estado de equilibrio provocados por disminución de algún precursor también aumentan el proceso que precede a la formación del mismo precursor.

Estos autores proponen el siguiente esquema para la acción

del HCB a nivel de membrana (263).



Esquema de membrana interna.

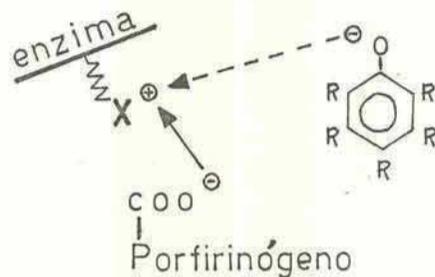


Incorporación del HCB.

Las drogas que exhibieron efecto inhibitorio sobre la PCL fueron fenoles, mientras que las no fenólicas no afectaron la actividad. Estos resultados están de acuerdo con los de Sinclair y Granick (186) quienes encontraron que PCF, tetraclorofenol y 2-4-dinitrofenol, adicionados a homogenato de cultivos de células de embrión de pollo, provocaron acumulación de Uro; pero difieren de los resultados que ellos obtuvieron con 2-4-6-triclorofenol, ya que adicionado a  $10^{-3}$  M no produjo alteración de la decarboxilación de la Uro, en tanto que en la enzima de hígado de rata como se demuestra en el presente trabajo, produjo una inhibición del 70%, a la misma concentración.

El hecho de que los grupos Cl incrementen el efecto inhibitorio del fenol, podría deberse a que los grupos electrofílicos hacen al OH más dissociable y cargado negativamente al pH de la

incubación enzimática; por consiguiente si estos compuestos ejercieran su efecto uniéndose al mismo sitio de unión del sustrato y en este sitio hubiese un grupo (+), a mayor carga negativa del compuesto existiría mayor afinidad por la enzima y mayor efecto inhibitorio, como es lo aquí observado



R = H, Cl u otro grupo electrofílico.

La determinación de la localización subcelular de la PCL en hígados normales y de animales porfíricos, indican que la actividad PCL está concentrada principalmente en la fracción citoplasmática.

Estos resultados concuerdan con los de: Chen y Miller(82) para hojas de tabaco; Tomio y col. (68) para eritrocitos de pollo, Aragonés y col. (70) y Elder y col. (74) para hígado de ratas normales.

La purificación lograda para la enzima proveniente de ambos lotes de animales (normales y porfíricos) fué de aprox. 110 veces. Estos resultados son muy satisfactorios, pues si bien no

se llegó a banda única sobre gel de poliacrilamida la purificación lograda fué paralela para ambas preparaciones, lo que permitió comparar sus propiedades en un buen nivel de purificación.

Romeo y Levin (83) por su parte habían logrado purificar 21 veces la PCL proveniente de bazo de ratón, mediante centrifugación diferencial, fraccionamiento salino y columna de Sephadex G-150. La enzima purificada mostró 6 bandas en gel de poliacrilamida. Chen y Miller (82) purificaron 72 veces la PCL de hojas de tabaco mediante centrifugación diferencial, precipitación fraccionada y absorción en gel de fosfato de Ca. Mientras que Tomio y col. (68) purificaron 220 veces la enzima de eritrocitos de pollo por tratamiento del sobrenadante de hemolizado con DEAE-celulosa en batch, fraccionamiento con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y cromatografía en DEAE-celulosa.

En cuanto a la PCL de hígado de rata, Aragonés y col. (70), trabajando con animales normales, lograron una purificación de 130 veces respecto al sobrenadante de 900 xg; aplicando centrifugación diferencial, fraccionamiento salino, absorción sobre gel de fosfato en batch y columna de DEAE-celulosa, eluída con gradiente de ClK. Los pasos individuales no pudieron compararse pues allí no presentan los valores correspondientes. Al ajustar

las condiciones de incubación para el sistema normal parcialmente purificado, se corroboraron ciertos requerimientos informados en trabajos previos: anaerobiosis (10, 68, 70, 82, 89), protección de grupos sulfhidrilos (10, 71), pH óptimo 6,8 (6,5 para Chen y Miller; 7,6 para Hoare y Heath; 6,8 para Mauzerall y Granick, 7 para Tomio y col.). En cambio el EDTA no modificó significativamente la actividad, dato semejante al de Chen y Miller (82), quienes encuentran sólo una activación del 10% y al de Tomio y col. (68) que informaron 8% de activación; en tanto que difieren de los de Mauzerall y Granick (10) que encontraron un 32% de inhibición; la principal diferencia con el método de trabajo de este último grupo es la fuente enzimática y quizás en eso radique la diferencia obtenida en los resultados.

En cuanto a la temperatura de incubación, se vió que al incrementarla provocaba un aumento de la actividad PCL hasta los 60°C para luego disminuirla bruscamente, a mayores temperaturas; este último efecto quizás a causa de la desnaturalización de la proteína enzimática. Al comparar estos resultados con los correspondientes a la enzima porfírica se vió que el comportamiento frente al EDTA, al GSH y a la temperatura de incubación fué semejante. En cambio, respecto de la aerobiosis, la 1er. etapa con

la preparación normal estuvo más afectada que la correspondiente a la enzima porfírica o a las segundas etapas.

Algo semejante ocurrió con la respuesta al pH, ya que la 1er. etapa normal fué la única cuyo máximo tuvo un ligero corrimiento hacia un pH más alcalino.

Al probar el efecto de sales, agentes quelantes y otro protector de grupos sulfhidrilos, distinto del GSH, se comprobó que: i) el ClNa provocaba un efecto semejante sobre ambas preparaciones enzimáticas (normal y porfírica), a 100 mM no tiene casi efecto en tanto que a 200 mM, si bien no afecta la 1er. etapa provoca una inhibición del 17 y 14%, para la 2da. etapa normal y porfírica respectivamente. Estos resultados difieren cuantitativamente de los de Aragonés y col. (70), quienes trabajando con enzima proveniente de hígado de ratas normales encontraron con ClNa 200 mM inhibiciones del 17 y 37%, para la 1er. y 2da. etapa respectivamente, en este caso la diferencia metodológica sólo es a nivel del grado de purificación de la enzima.

Por su parte Chen y Miller (82) habían encontrado, en su sistema, un efecto mucho mayor ya que a 50 mM el ClNa provocaba una inhibición del 63% y a 250 mM 90% para la reacción total. Estos autores proponen que la inhibición probablemente sea provo-

cada por el anión, dado que el grado de inhibición fué el mismo con las series  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . También proponen que los  $\text{Cl}^-$  y  $\text{F}^-$  pueden unirse a un sitio ácido catiónico sobre la enzima (264). Tal sitio ácido podría estar en o cerca del sitio activo catalítico de la enzima (semejante a lo propuesto aquí para el mecanismo de acción de los clorofenoles). La pérdida de este sitio ácido catiónico podría cambiar el ambiente local del sitio catalítico o más aún, romper la estructura proteica (265).

Una inhibición porcentual (%) I del 10% fué encontrada por Mauzerall y Granick(10) usando  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  a una concentración tan baja como 1 mM comparada con las anteriores, indicando quizás la mayor importancia del anión en la magnitud del efecto, aunque también es factible que el  $\text{S}_2\text{O}_4^-$  tenga un efecto adicional debido a sus características reductoras.

Tomio y col. (68), trabajando con eritrocitos de ave, encontraron que el  $\text{ClNa}$  200 mM provocaban 24 y 50% I para la 1er. y 2da. etapa respectivamente y con 400 mM los % subían a 66 y 80% I.

Con los dos agentes quelantes probados (pirofosfato de sodio y dietilditiocarbamato) sólo se obtuvo una ligera inhibición con el PPNa en tanto que con el DTC fue del orden del 30% para

las dos etapas, valor que se opone al encontrado por Chen y Miller para hojas de tabaco (82), pues encontraron un 241% de actividad relativa en presencia de este quelante, a igual concentración que la probada aquí y en presencia de enzima parcialmente purificada, en tanto que con PPNa logran una actividad relativa del 148%.

Estas diferencias quizás se pueden explicar en base a las diferentes fuentes enzimáticas utilizadas que exhibirían propiedades diferentes. Así la PCL de origen vegetal sería inhibida por metales, en tanto que la PCL de mamíferos, como en el caso de la rata, necesitaría de dichos metales para su actividad. Comparando ahora el comportamiento de la enzima normal frente a la porfírica, se ve que el efecto del PPNa es mayor sobre esta última en tanto que el DTC afectó más la 2a. etapa de la normal. Ello podría indicar un efecto distinto de ciertos metales frente a ambas enzimas, la afinidad de estos quelantes por el  $\text{Cu}^{++}$  es: EDTA (-) ; PPNa < DTC; por lo tanto los resultados podrían indicar una mayor dependencia de  $\text{Cu}^{++}$  para la actividad de la enzima normal.

En cuanto al comportamiento frente a los protectores de grupos sulfhidrilos, analizando más en detalle el comportamiento

presentado por ambas preparaciones enzimáticas frente al GSH, los datos aquí obtenidos concuerdan con los de García y col.(71) quienes encontraron que a bajas concentraciones o no tuvo efecto o sólo provocó una ligera disminución de la actividad. Cuando incrementaban la concentración aparecía un pico de decremento (aprox. a 1 mM) seguido por un posterior incremento. Los autores postulan que la inhibición observada a bajas concentraciones de GSH podría deberse a ruptura de puentes disulfuro necesarios para la actividad total de la enzima. La recuperación de la actividad a mayores concentraciones podría estar relacionada a una función activante del GSH, el cual podría actuar como un anión bivalente y no como un protector de grupos sulfhidrilos.

Chen y Miller (82) y Mauzerall y Granick (10) no encontraron efecto con GSH. En cuanto al otro protector de grupos -SH el ditiotritol disminuyó ligeramente la actividad de las dos etapas, tanto con la preparación normal como con la porfírica. Este efecto podría ser semejante al provocado por el GSH a bajas concentraciones, es decir que actuaría rompiendo puentes disulfuros esenciales para la actividad. La preparación porfírica, se vió más afectada por este tratamiento, indicando quizás una mayor desprotección de estos grupos.

Los intentos de detectar grupos fotooxidables tales como histidina, tirosina o triptofano relacionados al centro activo no arrojaron datos positivos, ya que no hubo diferencia significativa entre los ensayos realizados en oscuridad o en presencia de luz. Sin embargo en presencia de Azul de Metileno se vió un ligero decremento de la actividad, (tanto en los ensayos con luz o en oscuridad) que era dependiente de la concentración del colorante, esto podría deberse a un efecto inhibitorio del colorante en sí o a una interferencia a nivel de determinación de los productos de reacción. Estos efectos si bien se observaron tanto con las preparaciones normales como con las porfíricas, disminuyeron en mayor grado la actividad de esta última (38% I, frente a 24% I para la normal, a la mayor concentración de Azul de Metileno empleada).

Los ensayos para determinar la estabilidad térmica de la enzima, que se realizaron precalentado las preparaciones enzimáticas a 60°C por 3 min., indicaron que la enzima normal es mucho más sensible al precalentamiento que la porfírica; ya que con la la. se obtienen decrementos del 79, 84, 87 y 92% para el 1er, 2do., 3er. y 4to. paso de la descarboxilación total del Uro'gen, en tanto que con la porfírica los valores correspondientes fueron

37, 47, 61 y 74%.

Sobre la estabilidad térmica de la enzima proveniente de ésta u otras fuentes: Elder ha informado, para sobrenadante de hígado de rata, una inhibición del 100% por calentamiento a 90°C durante 2 min., Tomio y col. (68) informan para la enzima purificada a partir de eritrocitos de pollo que el calentamiento a 60°C durante 5 o 15 min provoca una inactivación del 53 y 63% para la 1er. etapa y en ambos casos del 100% para la 2a. Los autores puntualizan que la remoción del 2° carboxilo es más susceptible al precalentamiento que la del 1°, para confirmarlo, realizaron la experiencia utilizando Piria'gen III como sustrato y encontraron que efectivamente la 2a. etapa se ve más afectada por el precalentamiento de la enzima.

Romeo y Levín (83) encontraron inhibición total por calentamiento a 50°C por 5 min y un efecto algo menor a 43°C (64%), indicando además que el DNFB no protege a la enzima contra esta inactivación. En cuanto a la estabilidad frente al almacenamiento: los sobrenadantes fueron los más afectados, luego los precipitados correspondientes a los eluidos del gel de fosfato y por último, los precipitados del sobrenadante, en el rango 35-70% saturación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , que fueron estables por 6 meses.

Ya Hoare y Heath (13) habían informado que la enzima precipitaba a un porcentaje de saturación superior al 35% y que el precipitado era estable guardado por 2 o 3 semanas a  $-15^{\circ}\text{C}$ , aunque ellos le agregaban BAL 0,5 mM para protegerla. En el mismo trabajo puntualizan que la enzima fué inestable en los primeros pasos de la extracción.

Chen y Miller (82) informan que la enzima pura pierde actividad a los 40 días de almacenaje a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aunque en presencia de GSH mantiene un 35% de su actividad. A semejanza de ellos, Romeo y Levín (83) informaron que el DTNB protege a la enzima durante el almacenamiento; este reactivo se uniría a un grupo -SH esencial, ejerciendo así su efecto protector. La reactivación la hacen luego con ditiotreitól. Bajo estas condiciones, sus preparaciones fueron estables por 4 meses, mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los pasos finales de la purificación, o sea el tratamiento con DEAE-celulosa y cromatografía en Sephadex G-100 y G-200, brindaron indicios de que quizás exista una alteración a nivel estructural, en la enzima proveniente de animales intoxicados con HCB.

Analizando el comportamiento de ambas preparaciones sobre

la columna de DEAE-celulosa, se vió que la actividad para la 1er. etapa de la descarboxilación del Uro'gen III aparecía desdoblada en dos picos y que en el caso de la preparación porfírica aumentaba la proporción del pico que eluye a mayor fuerza iónica.

Sobre Sephadex G-200, si bien no se pudo determinar el perfil de elución de la actividad enzimática, en general los picos correspondientes a la preparación porfírica (de la zona donde se cree estaría localizada la actividad PCL) están corridos a mayores volúmenes de elución. Mientras que sobre Sephadex G-100 se obtuvieron con ambas preparaciones 3 picos proteicos principales, estando la actividad enzimática asociada al 2º de ellos. La diferencia más notable, entre la preparación normal y la porfírica, fué que para la normal el punto de máxima actividad, coincidía con el pico II, en tanto que con la porfírica la actividad salía con mayor volumen de elución, o sea que presentaba un corrimiento hacia la derecha.

La purificación total obtenida fué de 115 y 114 veces respectivamente para la enzima normal y la porfírica, aunque en algunos pasos intermedios hubo ciertas diferencias. La más notable fué a nivel del rango de precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , ya que aparentemente la preparación porfírica, comenzaría a precipitar a menor concentración.

Las conclusiones finales serían que: 1) el HCB actuando a través de un metabolito o intermediario reactivo provocaría una alteración en el camino metabólico del hemo; 2) dicha alteración podría ser por efecto directo sobre la PCL o indirectamente por alteración previa del sistema oxidasa de función mixta en general y tendría como consecuencia una acumulación de los intermediarios de este camino metabólico. 3) Todas estas alteraciones estarían localizadas principalmente a nivel hepático; 4) Aparentemente la misma enzima está involucrada en la decarboxilación del Uro'gen I y del Uro'gen III; 5) Deben existir 2 enzimas, para la 1a. y 2da. etapa de la decarboxilación del Uro'gen III. Esta diferencia se observaría también con la preparación porfírica; 6) El HCB actuando "per se" o a través de un metabolito causa una alteración a nivel de la estructura enzimática, actuando "in vivo"; 7) Otro mecanismo alternativo de acción del HCB, podría ser que produjese un metabolito, que se una covalentemente a la enzima. Esta unión si bien causaría una disminución de la actividad, protegería a la enzima frente a determinados agentes inactivantes (calentamiento, aerobiosis ) y explicaría su distintos comportamiento en columnas de DEAE-celulosa y G-100.

La puesta a punto del método de determinación de actividad

Ferroquelatasa arrojó resultados muy satisfactorios. En primer lugar no se presentaron los problemas de turbidez encontrados en el método de Goudy y col. (116), siendo los resultados de una buena reproducibilidad. En 2º lugar los valores correspondientes a los blancos, fueron en general bajos (a diferencia de los de Labbé y col. (119)), inclusive se podían minimizar aún más perfundiendo los hígados con solución fisiológica; este tratamiento no afectó el valor de la actividad, por lo que se descartó su uso.

Y en 3er. lugar, fué metodologicamente sencillo y debido al método de solubilización de mitocondrias (por congelamiento y descongelamiento a las 24 o 48 hs) permitió realizar el estudio simultáneo de otras enzimas, provenientes de los mismos animales.

Comparando los resultados correspondientes a los distintos métodos de solubilización de mitocondrias, se comprueba que, el método de congelamiento y descongelamiento, presenta también otras ventajas frente a los restantes. Así: la sonicación y el tratamiento con detergente disminuyó la actividad Ferroquelatasa, tanto de las preparaciones normales como de las porfíricas, en tanto que el congelamiento y descongelamiento, las mantuvo constante.

Por otra parte el tratamiento con Tween, sobre mitocondrias que habían sido guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , también provocó una disminución de la actividad de ambas preparaciones enzimáticas. Estos resultados estarían en contraposición con los de Labbé y Hubbard (119) quienes informan que repetidos congelamientos y descongelamientos de la Ferroquelatasa no disminuyen su actividad, aunque algunas proteínas desnaturalizadas ocasionalmente precipitan, e inclusive afirman (sin dar datos numéricos) que guardando las mitocondrias a  $-20^{\circ}\text{C}$  se puede extraer y generalmente mejora la posterior extracción de la enzima con Tween. Las principales diferencias, con el método empleado aquí con el detergente, es que ellos suspenden las mitocondrias en  $\text{CO}_3\text{HK}$  0,10 M, en lugar de buffer tris 25 mM pH 8,2 y que, después del tratamiento con Tween, realizan una centrifugación a 36.000 xg por 30 min. a  $0^{\circ}\text{C}$ . Obtienen así un sobrenadante rojizo claro, que guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso y que es estable por varias semanas. Quizás con la centrifugación elimine algún compuesto que inestabiliza a la enzima.

Similares resultados, respecto a estabilidad, obtuvieron Porra y col.(142) tratando a las mitocondrias con Tween 20, centrifugando a 20.000xg por 10 min, dializando contra buffer Tris y centrifugando a 80.000 xg por 60 min. Separan así un sobrenadante amarillo, que guardan en alícuotas a  $-15^{\circ}\text{C}$  y es estable

por varios meses. Nuevamente los resultados parecen indicar que la centrifugación, además de los pasos adicionales, mejoran notablemente la estabilidad de la enzima al almacenamiento.

Al estudiar las condiciones de ensayo se comprobó que tanto la enzima normal como la porfírica llegan a actividad constante con aprox. 100 nmoles de Proto y una concentración entre 60-90 $\mu$ M de  $\text{SO}_4\text{Fe}$ .

Labbé y Hubbard (119, 123) informan haber encontrado un pico de actividad con 24-36 nmoles/ml de  $\text{Fe}^{++}$  y aprox. igual concentración de Proto; mientras que mayores concentraciones de Fe inhiben la actividad. Los autores sugieren que este efecto del  $\text{Fe}^{++}$  sería probablemente por una reacción con grupos -SH esenciales para la actividad, ya que si en vez de ascórbico usan GSH como agente reductor, no encuentran dicha inhibición. Ellos trabajaron con mitocondrias solubilizadas con Tween-20, sin posterior purificación, en tanto que Nishida y Labbé (14) trabajando con enzima parcialmente purificada (4 a 5 veces) encuentran un efecto semejante del  $\text{Fe}^{++}$ . Esta inhibición fué observada también por Krueger y col. (155) usando eritrocitos de pato pero no por Golberg y col. (266) para eritrocitos de pollo. Los diferentes comportamientos podrían deberse tanto al método de obtención

de las mitocondrias solubilizadas, como a la naturaleza del reductor empleado o al distinto origen enzimático, en los últimos trabajos mencionados.

En cuanto al agente reductor aquí utilizado, se eligió succinato en base a las objeciones que presentaba el uso de GSH y reactivos tiólicos en general, que causan destrucción del producto final, hemo (116, 128, 142). Mientras que Jones y Jones (143) no encontraron dificultades con el uso de succinato.

Por otra parte también es factible que las preparaciones enzimáticas aquí utilizadas tengan un alto contenido en catalasas que prevendrían la mencionada destrucción del hemo (14, 142). La acción protectora de las catalasas sugiere que la destrucción aeróbica del hemo libre en presencia de tioles involucra peróxidos libres (116, 142).

Al analizar comparativamente las condiciones de incubación óptimas, para las preparaciones porfíricas frente a las normales, se ve que coinciden para ambas preparaciones.

El estudio de la actividad en función del tiempo de incubación demostró la existencia de un "lag", de 15 y 5 min para las preparaciones normal y porfírica respectivamente. Este período fué coincidente con el período de preincubación que necesitaron

sendas preparaciones para alcanzar la velocidad máxima.

En este aspecto también difiere el comportamiento normal del porfírico en que el aumento de la actividad con mayores tiempos de preincubación es más lento para el normal.

El "lag" mencionado podría estar indicando la existencia de un intermediario enzima-Proto. Similares conclusiones obtuvieron Nishida y Labbé (14) y Llambías (115) de sus trabajos realizados con mitocondrias de hígado de rata y cerdo, respectivamente. Por otra parte estos resultados difieren de los de Porra y Jones (109) quienes consideran que el "lag" por ellos también encontrado, es debido al tiempo necesario para sacar todo el  $O_2$  de la mezcla de reacción, ya que pudieron eliminarlo burbujeando  $N_2$  30 min. antes de la adición de  $Fe^{++}$  y GSH. Además no encontraron formación incrementada de hemo cuando la enzima fué preincubada con Proto, en vacío, con GSH como reductor.

Las diferencias puede deberse al distinto origen enzimático, ya que ellos trabajan con mitocondrias de hígado de cerdo. En tanto que el diferente comportamiento de la preparación porfírica frente a la normal parecería indicar que la enzima porfírica tiene mayor afinidad que la normal por la Proto o que de alguna manera se ve favorecida la unión de la Proto a la primera o también

podría ser que una configuración molecular distinta del complejo enzima-porfirina, facilite la posterior incorporación del ión metálico a la porfirina unida.

El valor de pH óptimo encontrado (8,2) fué el mismo para ambas preparaciones enzimáticas y está en el rango (7-9) informado por la literatura (14, 109, 114, 119, 120, 125, 128, 141). Sin embargo la actividad a pH alcalinos, superiores al pH óptimo, indica que la preparación porfírica se ve más afectada que la normal, lo cual podría estar indicando un comportamiento iónico distinto.

Al estudiar comparativamente la actividad Ferroquelatasa normal y porfírica en condiciones óptimas de ensayos, se comprobó que el HCB produce "in vivo" un aumento en dicha actividad de 2,2 veces, aunque la respuesta varía mucho de animal a animal, pudiendo llegar a encontrar en ratas con severo cuadro de porfiria desde una actividad Ferroquelatasa normal hasta una 4 veces superior.

El ensayo de la actividad Ferroquelatasa usando Meso como sustrato, indicó que la misma era utilizada tanto por la enzima normal como por la porfírica y con igual afinidad relativa que respecto de la Proto. La actividad resultante en ambos casos fué

5 veces mayor con Meso que con Proto.

Estos resultados están de acuerdo con los de Labbé y col. (124) aunque ellos informan una velocidad relativa de Meso frente a Proto de 1,5 veces. Estos autores concluyen, del estudio comparativo con una serie de sustratos que los grupos vinilo en 2 y 4 no son esenciales para que la porfirina sea sustrato, mientras que grupos carboxilos libres sobre cadenas laterales ácido propiónico en 6 y 7 si lo son. El carácter nucleofílico o electrofílico de los sustituyentes periféricos afectan la basicidad del N porfirínico (144, 152) y puede esperarse que influyan sobre la velocidad de incorporación del  $Fe^{++}$ ; de lo cual el comportamiento de Proto y Meso serían un ejemplo.

Porra y Jones (109, 110) también encontraron una actividad muy superior (10-15 veces) al utilizar Meso como sustrato. En el 2º trabajo prueban una serie de compuestos porfirínicos y concluyen que solamente porfirinas dicarboxílicas pueden convertirse en los hemos correspondientes, pero no todos los compuestos dicarboxílicos testeados fueron sustratos de la Ferroquelatasa.

La estabilidad al calentamiento exhibida por la enzima normal fué semejante a la porfírica entre 37 y 47°C, aumentando la actividad de ambas con el precalentamiento a esas temperaturas

Mientras que a temperaturas superiores, si bien ambas pierden actividad, la porfírica se ve mucho más afectada; indicando una mayor inestabilidad de esta última frente al calentamiento.

El precalentamiento a 100°C por 5 min. inactivó tanto a la enzima normal como a la porfírica.

Datos correspondientes a la enzima proveniente de ratas porfíricas no hay en la literatura, sí para ratas normales y son semejantes a los presentados aquí. Así Labbé (108) informa que su preparación enzimática es completamente estable a 56°C pero pierde la mitad de su actividad en 10 min a 60°C. Minakami (125) informa que la actividad Ferroquelatasa desaparece por calentamiento a 100°C durante 30 seg., mientras que Goldin y Little (128) obtienen iguales resultados por el precalentamiento durante 1 min.

El Km aparente para la enzima normal fué  $1,25 \times 10^{-5} M$  y para la porfírica  $0,67 \times 10^{-5} M$ . Si bien son del mismo orden podrían indicar una mayor afinidad de la enzima proveniente de animales porfíricos que de normales, hacia el  $Fe^{++}$ . Esto también estaría de acuerdo con las conclusiones de las experiencias de actividad en función del tiempo de incubación y de preincubación.

Los datos normales están dentro del orden ( $2-6 \times 10^{-5} M$ ) de los informados por otros investigadores (108, 146, 154). Al pro-

bar el efecto de la hemina sobre la actividad Ferroquelatasa, no se obtuvieron variaciones en la actividad normal ni en la porfírica, indicando que en ninguno de los casos hay inhibición por producto final.

Tampoco tuvieron el efecto esperado el HCB, PCF y porfirinas, ya que no incrementaron la actividad normal. Por el contrario PCF y porfirinas la inhiben, en tanto que el HCB no la afecta.

La comparación de estos resultados con los obtenidos por igual tratamiento de la enzima proveniente de animales porfíricos, mostró que el HCB tampoco afecta su actividad, en tanto que el PCF y porfirinas parecen afectar en mayor grado a la enzima normal.

El pasaje a través de columnas de Sephadex G-25, en cambio, afectó en mayor grado la actividad porfírica, ya que provocó un decremento del 80%, frente a un 60% para la normal. Aunque esto quizás sea a causa de que con la preparación porfírica sólo se tomaban los los. tubos de los eluidos, para lograr una mejor separación de las porfirinas. Semejantes resultados se obtuvieron con los ensayos de dilución, que aunque en forma leve decrecieron más la actividad porfírica que la normal. Estas diferencias podrían indicar una mayor inestabilidad de la preparación porfíri-

ca por dilución, pero fundamentalmente, la dependencia de la actividad de ambas preparaciones de un factor que se separaría en la columna de Sephadex G-25.

Los ensayos de calentamiento mostraron la existencia en los desproteinizados de las preparaciones normales, de un factor que disminuye la actividad normal. Dicho factor estaría presente también en los desproteinizados porfíricos, ya sea en menor cantidad o con menor poder inhibitorio frente a la actividad normal. Otra posible explicación es que el calentamiento altere la estructura de ese inhibidor y que en el caso de la preparación porfírica, esté más resguardado y por ende se afecte en menor grado por el calentamiento. Comparando, en estos ensayos,  $(N + \Theta N)$  con  $(N + \Theta P)$  se ve que este último tuvo una actividad relativa, respecto del primero, de 118, 121%, con los desproteinizados totales o sus sobrenadantes respectivamente y que este incremento en la actividad fué superior a la diferencia entre los decrementos producidos por los desproteinizados normal y porfírico sobre la actividad normal. Estos resultados indicarían la existencia, en la preparación porfírica, de una sustancia termoestable o parcialmente termoestable, capaz de restaurar en parte, la actividad normal disminuída por el desproteinado de una preparación nor-

mal. Este incremento fué inferior que el provocado por el HCB "in vivo" sobre la actividad Ferroquelatasa.

Los ensayos cruzados no aportaron mayores evidencias sobre la existencia de un activador en la preparación porfírica, ya que el valor experimental coincidió con el teórico. Esto podría estar de acuerdo también con la existencia en la preparación normal de un inhibidor más afectivo que el presente en la porfírica y que anularía el efecto del activador presente en esta última.

Labbé y Hubbard (119) por el contrario informaron que el extracto enzimático inactivado por calentamiento no afectó la actividad enzimática. Mientras que Goldin y Little (128) informan que el agregado de enzima calentada inhibe la incorporación no enzimática. Este efecto no tendría mayor peso en los resultados aquí presentados, ya que la incorporación no enzimática es nula, debido quizás a la concentración de Tween 80 que aporta la solución de Proto al medio de incubación (113).

Los intentos de restaurar la actividad Ferroquelatasa, perdida por el pasaje a través de columna de Sephadex G-25, mediante el agregado de  $\text{Cu}^{++}$  fueron inefectivos; por el contrario el  $\text{Cu}^{++}$  produjo una mayor pérdida de actividad. Estos resultados están de acuerdo con aquellos trabajos en los que se demostró

que el  $\text{Cu}^{++}$  es un inhibidor de la Ferroquelatasa (123, 156) no así con el de Wagner y col. (146) que encuentran un efecto activador del  $\text{Cu}^{++}$ . Estos últimos autores explican la diferencia en base a la concentración de GSH en el medio, ya que el efecto restaurador del Cu sobre la Ferroquelatasa fué totalmente dependiente de la concentración de GSH empleada.

Los resultados obtenidos con PPy, indicarían a éste, como un probable cofactor de la Ferroquelatasa, ya que, al pasar la preparación enzimática a través de una columna equilibrada con buffer conteniendo PPy, no se encontró la pérdida de actividad observada anteriormente por el pasaje a través de columnas equilibradas con buffer solamente.

En cuanto a la comparación entre el comportamiento de la enzima normal y la porfírica, aquí se trabajó extremando las precauciones para que ambas enzimas recibieran igual tratamiento (ml. de siembra, tamaño de la columna, ml. recogidos, etc.) y en estas condiciones se comprobó que aparentemente la normal sufre una mayor pérdida de actividad por el pasaje a través de Sephadex G-25. Por otra parte el PPy es menos efectivo para restaurar esta pérdida de actividad. Por consiguiente en la preparación normal debe existir otro factor que produce una disminución del poder

catalítico, al someterla a filtración molecular.

Estos resultados estarían de acuerdo con los de Labbé y Nielsen (162) quienes proponen que el PPy debe tener un rol funcional en la Ferroquelatasa. Estos autores proponen que: dado que todas las funciones del PPy involucran la quelación de metales bivalentes por la coenzima y que el Fe es utilizado al estado ferroso por la Ferroquelatasa, el PPy operaría en el sitio de unión del  $Fe^{++}$ .

En base a los resultados obtenidos en los estudios de localización submitocondrial, se puede pensar que la Ferroquelatasa está efectivamente unida a la membrana interna, tanto en la preparación mitocondrial normal como en la porfírica. Los valores obtenidos en las restantes fracciones podrían indicar contaminación de las mismas con fragmentos de membrana interna, ya que el mismo efecto se observó a nivel de CcO (enzima marcadora de membrana interna). La CcO inclusive presentó un valor extremadamente alto en la fracción liviana, pero debe ser un problema a nivel de determinación de actividad, ya que da un % de recuperación en esa fracción cercano al 200%. Estos valores inesperados de recuperación quizás se deban a cambios estructurales resultantes de las técnicas de fraccionamiento (267).

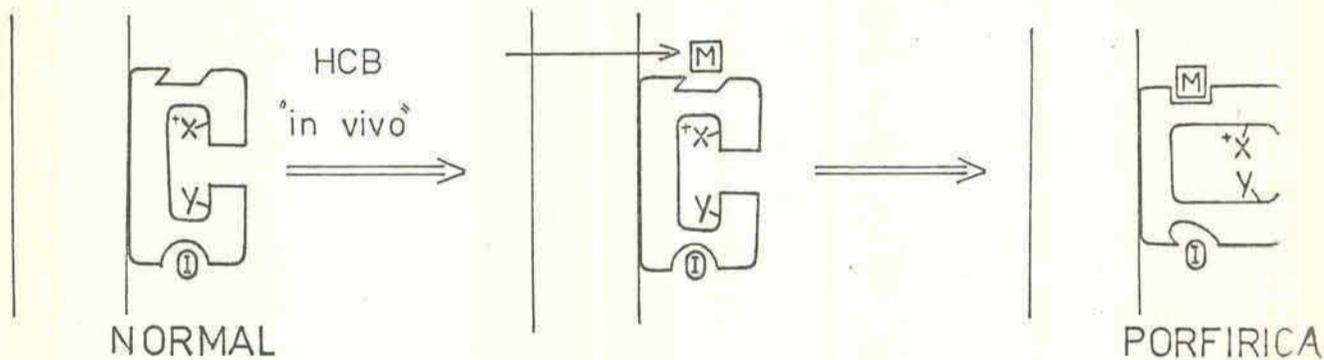
McKay y col. (145) aislaron fracciones de membrana por tra-

tamiento con digitonina o por sonicación y las examinaron mediante microscopía electrónica, Tanto en las fracciones 40-P y "pesada" las membranas internas estuvieron mínimamente contaminadas con membrana externa. Las fracciones 144-P y "liviana", sin embargo, mostraron significativa contaminación con fragmentos de membrana interna. Los resultados presentados por McKay y col. (145) para mitocondrias provenientes de ratas normales y porfíricas por dietil 1,4-dihidro-2,4,6-trimetil piridín-3,5-dicarboxilato, concuerdan con los aquí presentados e indican que no hay diferencias en la localización submitocondrial de las enzimas, en ambos lotes de animales.

De todos los datos presentados para la actividad Ferroquelatasa hepática, de ratas normales (FN) y porfíricas (FP) por HCB, se concluye que:

- 1) Existe un intermediario activo entre la enzima y la Proto(E-P).
- 2) La FP tiene mayor afinidad que la FN por Proto o bien su configuración facilita la entrada del  $Fe^{++}$ .
- 3) La alteración configuracional quizás deje más expuesto el centro activo de la FP, de allí su mayor afinidad por el sustrato y ésta quizás sea también la causa por la cual la FP se ve más afectada por pH alcalinos, altas temperaturas y dilución.

- 4) En la FP probablemente exista un activador de la actividad de la FN.
- 5) En la FN probablemente exista un inhibidor de la actividad de la FN presente también en FP pero menos efectivo.
- 6) El PPy es un posible cofactor tanto de la FN como de la FP.
- 7) La localización submitocondrial de la Ferroquelatasa no se ve afectada por el tratamiento con HCB "in vivo".
- 8) Si el HCB o un metabolito alterase la permeabilidad de la membrana, podría suceder que un compuesto de bajo PM, normalmente ausente en la matriz, penetre a la misma y entre en contacto con la Ferroquelatasa unida a la membrana interna, inclusive podría unirse a ella en forma covalente, alterando así su configuración.

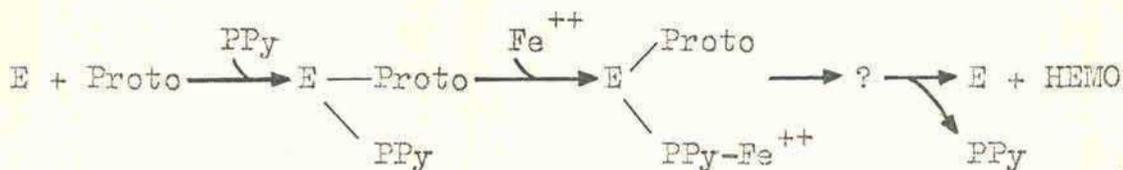


x<sup>+</sup> y sitios de unión para Proto y Fe<sup>++</sup> respectivamente.

M: metabolito, activador      I: inhibidor.

M también podría ser el HCB o un metabolito del mismo.

- 9) El mecanismo de reacción en ambos casos sería:



10) Dado que los resultados obtenidos en los ensayos de calentamiento no dan cuenta del alto incremento de actividad Ferroquelatasa provocado por el HCB "in vivo", cabe la posibilidad de que esta droga actúe también a nivel de síntesis proteica, causando un aumento en la cantidad total de la proteína enzimática.

Las curvas de actividad PCL eritrocitaria humana en función de nmoles de Uro'gen III indicaron que a una concentración 2,7 - 3,3  $\mu\text{M}$ , la actividad para 1er. etapa se hace independiente de la concentración de sustrato. La actividad para la 2da etapa llega a un máximo a 2,7  $\mu\text{M}$ , decreciendo luego levemente a mayor concentraciones de Uro, lo que estaría indicando inhibición por este sustrato para la 2a. etapa. Similares resultados obtuvieron García y col. (71) trabajando con la enzima de eritrocitos de ave para la actividad de la 2a. etapa, no así para la de la 1a., ya que ellos también encuentran inhibición por Uro'gen sobre su propia descarboxilación. Este comportamiento diferente podría ser a causa del distinto origen enzimático.

Los valores de actividad PCL estudiada en pacientes con PCT estuvo en el rango normal, tanto para la 1er. como para la 2a. etapa de la descarboxilación del Uro'gen III. Los datos con sujetos normales estuvieron en el mismo rango tanto en hombres como en mujeres. Esto difiere de los resultados de Kushner y col. (248) quienes informaron diferencias en la actividad PCL dependiente del sexo.

Los resultados aquí presentados están de acuerdo con los de Blekkenhorst y col. (268) Elder y col. (252) y de Verneuil y col. (269). Difieren de los de Kushner (248, 249) quienes encontraron un decremento de aprox. 60% de actividad PCL en pacientes con PCT. En base a ello Kushner y col. sugieren que el defecto hereditario en PCT sería un decremento general de la actividad de esta enzima, en todos los tejidos. Los resultados del presente trabajo, anteriormente mencionados, no están de acuerdo con estas conclusiones.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En base a los estudios realizados tendientes a determinar el alcance de los disturbios metabólicos ocasionados por el HCB, localizar los puntos de acción de la droga a lo largo de la cadena metabólica del hemo y aportar datos tendientes a elucidar el mecanismo de acción de la misma, se llegó a las siguientes conclusiones:

- El hígado es el principal sitio de acción del HCB. En este órgano es donde se produce, por efecto de la droga, la mayor acumulación de porfirinas, cuya naturaleza altamente carboxilada puede atribuirse al gran decremento que provoca la droga sobre la actividad PCL hepática.
- En 2° lugar estaría afectado el riñón, en el cual existe también una gran acumulación (aunque menor que en hígado) de porfirinas altamente carboxiladas, como respuesta al tratamiento con HCB, acompañada aquí también por la disminución en la actividad PCL.
- El tejido eritropoyético (representado en la rata por los eritrocitos y el bazo) se vió muy poco afectado por la droga. En bazo hubo incremento en Uro y Firia, con un ligero incremento en la actividad PCL, mientras que en eritrocitos no hubo acumulación de porfirinas ni variación en la actividad PCL.
- En glándula de Harder hubo disminución en el contenido en porfirinas y un ligero decremento en la actividad PCL, con el correspon-

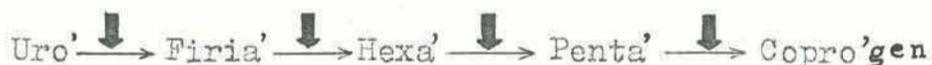
diente leve incremento en Uro.

- En los tejidos afectados, el HCB actuó sobre ambas etapas de la decarboxilación del Uro'gen: Uro'gen  $\rightarrow$  Firia'gen (1a. etapa) y Firia'gen  $\rightarrow$  Copro'gen (2a. etapa); siendo, en general, el efecto más marcado a nivel de la 2a. etapa.

- Dado que la PCL de origen hepático fué la que presentó mayor decremento por efecto del HCB, los restantes estudios se realizaron a partir de la enzima proveniente del hígado.

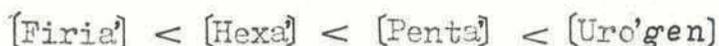
- Si bien la velocidad de decarboxilación del Uro'gen III es aprox. 7,5 veces la del Uro'gen I (en hígado normal), el HCB afecta ambas velocidades en grado semejante, indicando quizás que la misma enzima decarboxila ambas series isoméricas.

- Un estudio más fino se realizó con la serie isomérica III, utilizando los distintos porfirinógenos involucrados en cada paso, agregados a saturación en el medio de incubación. Así se comprobó que la acción del HCB sobre la decarboxilación de la serie III respecto de la misma en los animales normales afectó los 4 pasos en grado semejante, como se indica en el siguiente esquema:



- Comparando la  $V_{\text{máx.}}$  de decarboxilación se vió que Firia'gen es el que se decarboxila mucho más lentamente, en tanto que para los restantes sustratos se cumple que:  $V_{\text{HEXA}'} \geq V_{\text{PENTA}'} \geq V_{\text{URO}'\text{gen}}$

- Por otra parte, la cantidad de sustrato necesaria para saturar a la enzima, guardó la siguiente relación:



aquí se ve que para los pasos que componen la 2a. etapa se cumpliría que a menor número de carboxilos se necesita mayor concentración de sustrato para saturar a la enzima; en tanto que para la 1er. etapa la concentración necesaria es aún mayor.

- La PCL es la enzima que se afecta en 1er. lugar, (ya a la 1er. semana de tratamiento), en mayor grado y la única que disminuye su actividad por efecto del HCB. En tanto que la Ferroquelatasa sufre un incremento en su actividad, observable recién a partir de la 3er. semana de tratamiento.

- Investigaciones sobre la existencia de un posible inhibidor indicaron la presencia, en el hígado de los animales intoxicados, de una sustancia termoestable (o parcialmente termoestable) capaz de inhibir la actividad PCL de un hígado normal.

- Ensayos in vitro con PCF y HCB indican como poco probable la posibilidad de un efecto directo de los mismos sobre la actividad PCL. Sin embargo podrían ejercer su efecto a través de uno o varios de los caminos propuestos por la literatura: alteración de los mecanismos de detoxificación hepática, formación de epóxidos, alteración de las propiedades de los lípidos de membrana, transformación en

metabolitos azufrados por reacción con grupos -SH esenciales de la enzima. No debe descartarse la posibilidad de que el PCF o algún otro metabolito actúe a nivel de síntesis proteica. Y también es muy factible que el decremento producido "in vivo" por el HCB sea consecuencia de la suma de los efectos inhibitorios de varios metabolitos del mismo.

- Al probar otros compuestos, como posibles inhibidores, se encontró que las drogas que exhibieron efecto inhibitorio sobre la PCL fueron en general de naturaleza fenólica, mientras que las no fenólicas no afectaron la actividad. El hecho de que grupos Cl sobre el anillo fenólico aumentaron su efecto inhibitorio podría deberse a que los grupos electrofílicos hacen más disociable al oxhidrilo y cargado negativamente al pH de incubación. Por lo tanto si estos compuestos ejercieran su efecto uniéndose al mismo sitio (+) de unión del sustrato, a mayor carga (-) mayor afinidad por la enzima y mayor efecto inhibitorio.

- En cuanto a propiedades generales se encontró que: la enzima proveniente de ambos lotes de animales (normal: N, porfírica: P) se encuentra localizada en citoplasma, requiere para su actividad óptima anaerobiosis (la normal en mayor grado), protección de grupos SH, no requiere EDTA, la actividad aumenta con la temperatura hasta los 60°C para luego caer bruscamente. El pH óptimo fué 6,8 aunque

para la 1er. etapa normal estuvo ligeramente corrido hacia pH más alcalino.

- El efecto de las sales se probó mediante el uso de ClNa 100 y 200mM encontrando que a la la. concentración no tiene efecto en tanto que a 200mM afecta la 2a. etapa de ambas preparaciones.

- Dos agentes quelantes distintos provocaron distinto efecto sobre la preparación N y P; así: el pirofosfato de Na inhibió sólo ligeramente la N teniendo un mayor efecto sobre la P, en tanto que el dietilditiocarbamato inhibió en un 40% la N frente a un 33% de la P.

Estas diferencias podrían indicar un efecto distinto de ciertos metales frente a ambas preparaciones enzimáticas; podría ser, por ejemplo, que la actividad N fuera más dependiente de la (Cu) en el medio.

- La disminución en la actividad encontrada con ambas preparaciones enzimáticas frente a bajas (GSH) y frente al ditiotreitól, podría deberse al efecto que ellos ejercen sobre los puentes disulfuro, rompiendo su unión, la cual contribuiría a la actividad. La preparación P se vió más afectada por el 2º de los agentes mencionados, lo cual podría indicar una mayor desprotección de los grupos S-S.

- Los ensayos tendientes a detectar grupos fotooxidables, tales como histidina, tirosina y triptofano, arrojaron resultados negativos, ya que no hubo diferencias significativas entre los ensayos realiza-

dos en luz u oscuridad. Sin embargo en presencia de azul de metileno se vió un ligero decremento de actividad (tanto en luz como en oscuridad) que era dependiente de la concentración del colorante. Estos efectos fueron mayores con la preparación porfírica, lo cual, por tratarse de un colorante catiónico, podría estar indicando un mayor carácter aniónico de la enzima porfírica o la mayor exposición en la misma de un grupo (-) de importancia para la actividad.

- La estabilidad térmica de la enzima N es menor que la de la P. Mientras que las estabilidades al almacenamiento fueron semejantes, cumpliéndose, en ambos casos, que la estabilidad del precipitado con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  35-70% de saturación del sobrenadante de 11.000 xg fué mucho mayor que la del precipitado con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  75% de sat. de los eluidos de gel de fosfato y esta última fue semejante a la del sobrenadante de 11.000 xg.

- Los pasos finales de la purificación, o sea el tratamiento con DEAE celulosa y cromatografía en G-100, brindaron indicios de que quizás exista una alteración a nivel estructural, en la enzima proveniente de animales intoxicados con HCB.

La purificación final lograda fué de aprox. 110 veces, siendo el comportamiento de ambas preparaciones paralelo, aunque se notó una diferencia a nivel de precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , ya que la P comienza a precipitar a menor concentración salina.

- Analizando el comportamiento de ambas preparaciones sobre columnas de DEAE-celulosa se vió que la actividad de la 1a. etapa aparecía desdoblada en 2 picos, en tanto que para la 2a. no. En base a este comportamiento diferente y a la respuesta distinta frente a numerosos agentes físicos y químicos, se sugiere que pueden existir 2 enzimas para la 1a. y 2a. etapa de la descarboxilación del Uro'gen III.
- Analizando el comportamiento de la preparación porfírica frente a la normal, sobre columna de DEAE-celulosa, se vió por una parte que, en el caso de la preparación porfírica, aumenta la proporción del pico que eluye a mayor fuerza iónica (de los dos picos correspondientes a la 1er. etapa) Y, por otra parte, tanto estos picos como el correspondiente a la 2a. etapa, eluyeron a mayor fuerza iónica en el caso de la preparación porfírica que en el de la normal.
- Sobre Sephadex G-100 la diferencia más notable entre la preparación normal y la porfírica fué que para la normal el punto de máxima actividad coincidía con el 2º pico (pico III), en tanto que con la porfírica la actividad salía con mayor volumen de elución. El PM, determinado por filtración a través de una columna calibrada de Sephadex G-100, fué de 41.000 para la normal y 46.000 para la porfírica.

- Las cromatografías sobre DEAE-celulosa y Sephadex G-100 y G-200 brindan indicios de que existe una alteración a nivel estructural en la enzima proveniente de animales intoxicados por HCB.
- Otro mecanismo alternativo de acción del HCB, podría ser que produjese un metabolito, que se una covalentemente a la enzima ya sintetizada. Esta unión si bien causaría una disminución de la actividad, protegería a la enzima frente a determinados agentes inactivantes (calentamiento, aerobiosis) y explicaría su distinto comportamiento en columnas de DEAE-celulosa y G-100.
- Con respecto a Ferroquelatasa se realizó la puesta a punto de las condiciones de extracción de la enzima a partir de mitocondrias hepáticas, así como de las condiciones de ensayo para la enzima de ambos lotes de animales.
- Se observó que en ambos casos resultó efectivo el método de solubilización por congelamiento y descongelamiento de las mitocondrias y que tanto para la enzima normal (FN) como porfírica (FP) se llega a actividad constante con 100 nmoles de Proto y con  $\text{SO}_4\text{Fe}$  60-90  $\mu\text{M}$ , utilizando succinato como reductor y a un pH óptimo de 8,2.
- Se demostró la existencia de un lag de 15 y 5 min., para la

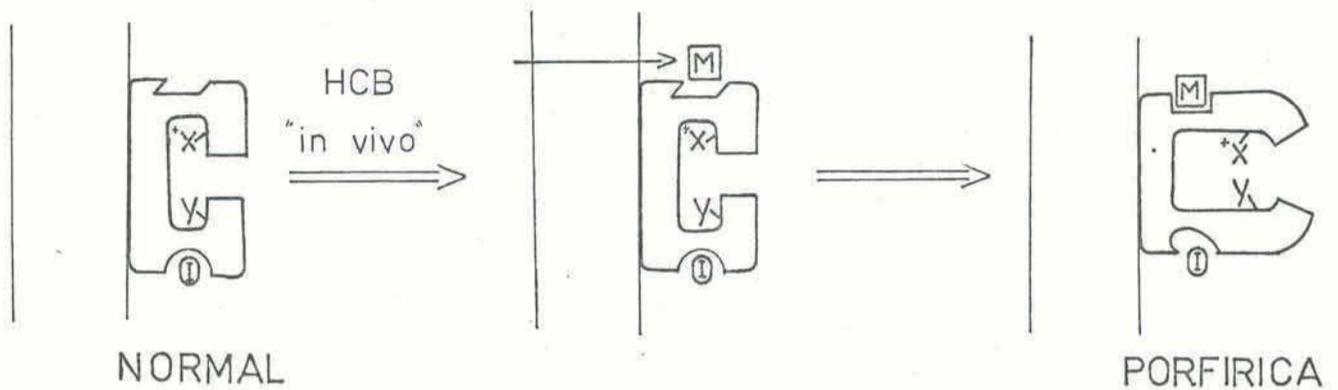
FN y FP respectivamente. Período coincidente con el período de preincubación con Proto, que necesitan ambas preparaciones para alcanzar la  $V_{m\acute{a}x.}$ . El comportamiento de la enzima N fué distinto que el de la P, ya que el aumento de actividad a mayores tiempos de preincubación fué más lento para la N. El lag mencionado podría indicar la existencia de un intermediario enzima-Proto.

- El diferente comportamiento de la preparación porfirica frente a la normal parecería indicar que la FP tiene mayor afinidad que la FN por la Proto o también podría ser que una configuración molecular distinta del complejo Ferroquelata-sa-porfirina facilite la posterior incorporación del ión metálico ( $Fe^{++}$ ) a la porfirina unida.
- La alteración configuracional quizás deje más expuesto el centro activo de la FP de allí su mayor afinidad por el sustrato y ésta quizás sea también la causa por la cual la FP se ve más afectada por pH alcalinos, altas temperaturas y dilución.

- Al estudiar la actividad FN y FP, en condiciones óptimas de ensayo, se comprobó que el HCB "in vivo" produce un aumento de dicha actividad de 2,2 veces en promedio, pudiendo llegar, en casos extremos, a ser 4 veces superior a la actividad normal.
- Meso es sustrato de la Ferroquelatasa de ambas fuentes, con igual afinidad relativa para ambas. La actividad resultante tanto para la FN como para la FP fué 5 veces superior con Meso que con Proto.
- El  $K_{m_{Fe}}$  aparente para la FN fué de  $1,25 \times 10^{-5}$  M y de  $0,67 \times 10^{-5}$  M para la FP. Si bien son del mismo orden podrían indicar una mayor afinidad de la FP que de la FN hacia el  $Fe^{++}$ .
- HCB, PCF y porfirinas no incrementan la actividad normal. HCB no afecta ni la FN ni la FP; mientras que PCF y porfirinas inhiben a ambas, pero en mayor grado a la FN.
- En la FP probablemente exista un activador de la actividad de la FN.
- En la FN existe un inhibidor de la actividad de la FN presente también en la FP, pero menos efectivo.
- El fosfato de piridoxal (PPy) es un posible cofactor tanto de la FN como de la FP.
- La localización submitocondrial de la Ferroquelatasa no se

ve afectada por el tratamiento con HCB "in vivo".

- Si el HCB o un metabolito alterase la permeabilidad de la membrana, podría suceder que un compuesto de bajo PM, normalmente ausente en la matriz, penetre a la misma y entre en contacto con la Ferroquelatasa unida a la membrana interna, inclusive podría unirse a ella en forma covalente, alterando así su configuración.



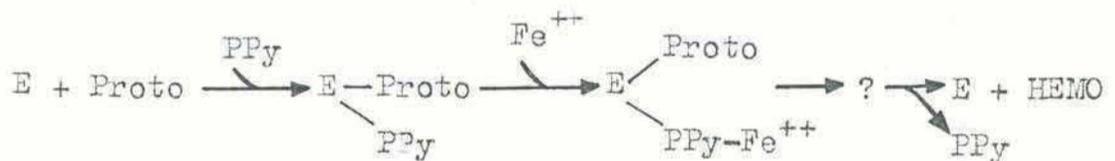
x<sup>+</sup> y sitios de unión para Proto y Fe<sup>++</sup> respectivamente.

M: metabolito, activador

I: inhibidor.

M también podría ser el HCB o un metabolito del mismo.

- El mecanismo de reacción en ambos casos sería:



- Dado que los resultados obtenidos en los ensayos de calenta-

miento no dan cuenta del alto incremento de actividad Ferroquelatasa provocado por el HCB "in vivo", cabe la posibilidad de que esta droga actúe también a nivel de síntesis proteica, causando un aumento en la cantidad total de la proteína enzimática.

Finalmente comparando el modelo experimental aquí empleado con la PCT humana, es interesante recalcar que en ratas con porfiria por HCB, la actividad PCL\* no estuvo disminuída, en tanto que la enzima hepática sufrió un fuerte decremento de su actividad. Resultados semejantes fueron obtenidos aquí para eritrocitos de pacientes con PCT y por Elder y col. (252) para la enzima hepática. Estos hechos proveen un ejemplo más de la semejanza entre la porfiria por HCB y la PCT humana. En ambos casos la anomalía parece estar limitada al hígado.

El defecto enzimático primario sería una fuerte disminución de la actividad PCL, con la consiguiente acumulación de porfirinas altamente carboxiladas en el hígado. Por su parte la actividad Ferroquelatasa, también desempeñaría un papel importante en este tipo de porfiria humana y su modelo experimental.

En cuanto al modo de acción del HCB sobre el sistema hepático, aparentemente tendría: i) una acción directa sobre ambas enzimas; en el caso de la PCL por efecto de un inhibidor y de la

\* en eritrocitos

Ferroquelatasa, por un activador, ii) como los resultados obtenidos por acción de estos efectores, probados "in vitro" por distintos métodos, no justifican los altos % de decremento e incremento de las actividades PCL y Ferroquelatasa respectivamente, provocados por el HCB "in vivo", se supone que la droga debe actuar además a nivel estructural o de síntesis proteica.

Los resultados del presente estudio indican que ambas enzimas podrían estar alteradas configuracionalmente (como consecuencia de la unión covalente a un metabolito de la droga) o estructuralmente, en el hígado de los animales intoxicados.

Sin embargo no se puede descartar aún la posibilidad de que el HCB provoque un efecto a nivel de síntesis proteica y que los efectos observados "in vivo" sean la suma de una serie de alteraciones provocadas por la droga, sobre el metabolismo hepático en general.



Dra. LEONOR C. SAN MARTÍN de VIALE  
PROFESOR TITULAR  
DEPTO. QUÍMICA BIOLÓGICA



### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- HOPPE-SEYLER, F.; Z. Physiol. Chem., 4 (1880) 193 y 95 (1915) 34.
- 2.- FISCHER, H.; Z. Physiol. Chem.; 95 (1915) 34.
- 3.- "I.U.P.A.C. rules for nomenclature": J. Am. Chem. 82 (1960) 5582.
- 4.- CAVALEIRO, J.A.S.; KENNER, G.W. y SMITH, K.M.; J.C.S. Perkin I, 1188.
- 5.- ELDER, G.H.; Biochem. J., 126 (1972) 877.
- 6.- JACKSON, A.H.; SANCOVICH, H.A.; FERRAMOLA, A.M.; EVANS, N.; GAMES, D.E. y MATLIN, S.A.; Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, (1976) 191.
- 7.- NEVE, R.A.; LABBE, R.F. y ALDRICH, R.A.; J. Am. Chem. Soc., 78 (1956) 691.
- 8.- FISCHER, H. y ORTH, H.; Die Chemie des Pyrrols, Leipzig, Akad. Verlag, 2 pt. 1 (1937) 472.
- 9.- RIMINGTON C. y ZIEGLER G.; Biochem. Pharmac., 12 (1963) 1387.
- 10.- MAUZERALL, D. y GRANICK, S.; J. Biol. Chem, 232 (1958) 1141.
- 11.- BOGORAD, L.; Science 121 (1955) 878.
- 12.- BOGORAD, L.; J. Biol. Chem., 233 (1958) 516.
- 13.- HOARE, D.S. y HEATH, H.; Biochem. J. 73 (1959) 679.
- 14.- NISHIDA, G. y LABBE, R.F.; Biochim. Biophys. Acta, 31 (1959) 519.
- 15.- BATLLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M.; Biochim. Biophys. Acta 82 (1964) 13.
- 16.- RIMINGTON, C.; Rev. Pure Appl. Chem., 8 (1958) 129.
- 17.- BATLLE, A.M. del C.; Ciencia e Invest., 22 (1966) 259.
- 18.- GIDARI, A.S. y LEVERE, R.D.; Sem. in Hematology, 14 (1977) N°2, 145.
- 19.- SHEMIN, D., RUSSELL, C. y ABRANSKY, T.; J. Biol. Chem., 215 (1955), 613.
- 20.- LABBE, R.F.; KURUMADA, T. y ONISAWA, J.; Biochim. Biophys. Acta, 3 (1965) 403.
- 21.- HAGER, L.P.; BOYER, LARDY y MYRBACK: The enzymes, 6 (1962) 387 (Acad. Pres, N.Y.)
- 22.- GRINNELL, F. y NISHIMURA, J.S.: Biochemistry, 8 (1969) 568.
- 23.- WIDER DE XIFRA, E.A. y BATLLE, A.M. del C.; Porphyrins in Human Diseases, Doss, M., ed. (Karger/Basel 1976) 25.

- 24.- CHA,S; CHA,C.M. y PARKS,R.E.; J. Biol. Chem., 242 (1967) 2582.
- 25.- KAPPAS,A.; LEVERE,R.D. y GRANICK,S.; Sem. Hematol., 5 (1968) 323.
- 26.- GRANICK,S. y URATA,J.; J. Biol. Chem., 238 (1963) 821.
- 27.- TSCHUDY,D.P.; WELLAND,F.H.; COLLINS,A. y HUNTER,G.; Metab. Clin. Exptl., 13 (1964) 396.
- 28.- TSCHUDY,D.P.; PERLROTH,M.G.; MARVER,H.S.; COLLINS,A. y HUNTER,G.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 53 (1965) 841.
- 29.- WHITING,M.J. y ELLIOTT,W.H.; J. Biol.Chem., 247 (1972) 6818.
- 30.- JORDAN,P.M. y SHEMIN,D.; The enzymes, (Boyer,P.D., ed) 7 (1972) 339 (Acad. Press.N.Y.).
- 31.- HAYASHI,N.; YODA,B. y KIKUCHI,G.; Arch. Biochem. Biophys., 131 (1969) 83.
- 32.- GROSS,S.R. y HUTTON,J.J.; J. Biol. Chem., 246 (1971) 606.
- 33.- SCHOLNICK,P.L.; HAMMAKER,L.E. y MARVER,H.S.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63 (1969) 65.
- 34.- WHITING,M.J. y GRANICK,S.; J. Biol. Chem., 251 (1976) 1340.
- 35.- OHASHI,A. y KIKUCHI,G.; Arch. Biochem. Biophys., 178 (1977) 607.
- 36.- YAMAUCHI,K.; HAYASHI,N. y KIKUCHI,G.; J. Biol. Chem., 255 (1980) 1746.
- 37.- SCHOLNICK,P.L.; HAMMAKER,L.E. y MARVER,H.S.; J. Biol. Chem., 247 (1972)4132.
- 38.- WHITING,M.J. y GRANICK,S.; J.Biol. chem., 251 (1976) 1347.
- 39.- GRANICK,S.; SINCLAIR,P.; SASSA,S. y GRIENINGER,G.; J. Biol. Chem., 250, (1975) 9215.
- 40.- GROSS,M. y RABINOVITZ,M.; Proc. Nat. Acad. Sci., 69 N°6 (1972), 1561.
- 41.- GRANICK,S.; J. Biol. Chem., 241 (1966) 1359.
- 42.- MARVER,H.S.; SCHMID,R. y SCHÜTZEL,H.; Biochem. Biophys. Res.Comm., 33 (1968) 969.
- 43.- SIMPSON,D.M. Y BEATTIE,D.S.; J. Biol, Chem., 255 (4) (1980) 1630.
- 44-- OHASHI,A. y KIKUCHI,G.; J. Biochem., 85 (1979) 239.
- 45.- ZAMAN,Z.; JORDAN,P.M. y AKHTAR,M.; Biochem. J. 135 (1973) 257.

- 46.- ABBOUD, M.M.; JORDAN, P.M. y AKHTAR, M.; Chem. Commun., (1974) 643.
- 47.- NANDI, D.L.; BAKER-COHEN, K.F. y SHEMIN, D.; J. Biol. Chem., 243(1968) 1224.
- 48.- SHEMIN, D.; Porphyrins and Related Compounds, (Goodwin, T.W., ed) (1968) 75, Acad. Press. London.
- 49.- NANDI, D.L. y SHEMIN, D.; J. Biol. Chem. 243 (1968) 1231.
- 50.- WU, W.; SHEMIN, D.; KENNETH, E.R. y ROBLEY, C.W.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71(5) (1974) 1767.
- 51.- SHEMIN, D.; Phil. Trans. R. Soc. London, B, 273 (1976) 109.
- 52.- BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HÖHBERGER, L. y SHEMIN, D.; J. Biol. Chem., 252(1977) 8965.
- 53.- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T. y SANO, S.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 67 (1975) 294.
- 54.- BATLLE, A.M. de l C.; STELLA, A.M.; FERRAMOLA, A.M.; SOPENA, Y.; WIDER DE XIFRA, E.A. y SANCOVICH, H.A.; Int. J. Biochem., 9 (1978) 401.
- 55.- BATTERSBY, A.R. y Mc DONALD, E.; Acc. Chem. Res. 12, (1979) 14.
- 56.- CARPENTER, A. y SCOTT, J.J.; Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 195.
- 57.- BATTERSBY, A.R. y Mc DONALD, E.; Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 273(1976) 161.
- 58.- BATTERSBY, A.R.; HUNT, E. y Mc DONALD, E.; J. Chem. Soc. Chem. Commun., (1973) 442.
- 59.- FRYDMAN, R.B.; REIL, S. y FRYDMAN, B.; Biochemistry, 10 (1971) 1154.
- 60.- VALASINAS, A.; LEVY, E.S. y FRYDMAN, B.; J. Org. Chem., 39 (1974) 2872.
- 61.- FRYDMAN, R.B.; VALASINAS, A. y FRYDMAN, B.; Biochemistry, 12 (1973) 80.
- 62.- FRYDMAN, R.B.; VALASINAS, A. y RAPOPORT, H. y FRYDMAN, B.; FEBS Lett., 38(1974) 134.
- 63.- COOKSON, G.H. y RIMINGTON, C.; Biochem. J., 57 (1954) 476.
- 64.- BULLOCK, A.W.; JOHNSON, A.W.; MARKHAM, E. y SHANO, K.E.; J. Chem. Soc. (1958) 1430.
- 65.- MATHEUSON, J.H. y CORWIN, A.H.; J. Am. Chem. Soc., 83 (1961) 135.
- 66.- BATTERSBY, A.R.; FOOKES, Ch.; MATCHAM, R.G.W.J. y Mc DONALD, E.; J. Chem. Soc. Chem. Commun., (1978) 1064.
- 67.- SCOTT, I.A.; BURTON, G. y FAGERNES, S.; J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 199.
- 68.- TOMIO, J.M.; GARCIA, R.C.; SAN MARTIN DE VIALE, L.C. y GRINSTEIN, M.; Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 353.

- 69.- CHU,T.C. y CHU,E.; Biochim. Biophys. Acta, 215 (1970) 377.
- 70.- ARAGONES,A.; GARCIA,R.C.; SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; TOMIO,J.M. y GRINSTEIN, M.; Anales. Asoc. Quím. Arg., 60 (1972) 239.
- 71.- GARCIA,R.C.; SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; TOMIO, J.M. y GRINSTEIN,M.; Biochim. Biophys. Acta, 309 (1973) 203.
- 72.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; ARAGONES,A. y TOMIO,J.M.; Acta Physiol. Latinoam. 26 (1976) 403.
- 73.- SMITH,A.G. y FRANCIS,J.E.; Biochem. J., 183(2) (1979) 455.
- 74.- ELDER,G.H.; EVANS,J.O. y MATLIN,S.A.; Clin. Sci. Molec. Med., 51 (1976)71.
- 75.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; R. de MOLINA, M. del C.; W. de CALMANOVICI,R. y TOMIO, J.M.; Biochem. J., 168 (1977) 393.
- 76.- R. de MOLINA, M. del C.; W. de CALMANOVICI,R. y S.M. de VIALE,L.C.; Int. J- Biochem., 12 (1980) 1027.
- 77.- R. de MOLINA, M. del C.; W. de CALMANOVICI,R.; GRINSTEIN,M. y SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; Clin. Chim. Acta, 108 (1980) 447.
- 78.- CORNFORD,P.; Biochem. J., 91 (1964) 64.
- 79.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; W. de CALMANOVICI,R.; R. de MOLINA, M. del C. y GRINSTEIN.M.; Clin. Chim. Acta, 69 (1976) 375.
- 80.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; W. de CALMANOVICI,R.;R. de MOLINA, M. del C. y GRINSTEIN,M.; Porphyrins in Human Diseases, (Kargel/Basel, 1976)398.Ed.M.Doss.
- 81.- KUSHNER, J.y BARBUTO, A.;Clin. Research., 22 (1974) 178.
- 82.- CHEN,T.C. y MILLER,G.W.; Plant and Cell. Physiol., Tokio, 45 (1974) 993.
- 83.- ROMEO,G. y LEVIN,E.Y.; Biochim. Biophys. Acta, 230 (1971) 330.
- 84.- HEATH,H. y HOARE,D.S.; Biochem. J., 72 (1959) 14.
- 85.- BOOIJ, H.L. y RIMINGTON,C.; Biochem. J., 65, 4P (1957).
- 86.- GRANICK,S. y LEVERE,R.D.; Progr. Hemat., 4 (1964) 1.
- 87.- URATA,G. y KIMURA,H.;J.: Biochem., Tokio, 47 (1960) 150.
- 88.- KREIMER BIRNBAUM,M. y GRINSTEIN,M.; Biochim. Biophys. Acta 111 (1965)110.
- 89.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; GARCIA,R.C.; K. de PISAREV,D.L.; TOMIO,J.M. y GRINSTEIN,M.; FEBS Lett., 5 (1969) 149.
- 90'.- LASCELLES, J.: Biochem. J., 62 (1956) 78.

- 90.- FALK,J.E.; DRESEL,E.I.B. y RIMINGTON,C.; Nature, 172 (1953) 292.
- 91.- BOGORAD,L. y GRANICK,S.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 39(1953) 1176.
- 92.- FALK,J.E.; DRESEL,E.I.B.; BENSON,A. y KNIGHT,B.C.; Biochem.J., 63(1956)86.
- 93.- FALK,J.E.; APPLEBY,C.A. y PORRA,R.J.; Symposia Soc. Exptl. Biol., 8(1959)73.
- 94.- TOMIO,J.M. y GRINSTEIN,M.; European J. Biochem. 6 (1968) 80.
- 95.- BATLLE,A.M.del C. y GRINSTEIN,M.; Biochim. Biophys. Acta,57 (1962) 191.
- 96.- BATLLE,A.M.del C. y GRINSTEIN,M.; Biochim. Biophys. Acta 62 (1962) 197.
- 97.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C. y GRINSTEIN,M.; Biochim. Biophys. Acta, 158(1968)79.
- 98.- GRINSTEIN,M.; SCHWARTZ,S. y WATSON,C.J.; J. Biol. Chem., 157 (1945) 323.
- 99.- ELDER,G.H. y EVANS,J.O.; Biochem. J., 172 (1978) 345.
- 100.- BATTERSBY,A.R.; BALDAS,J.;COLLINS,J.; GRAYSON,D.H.; JAMES,K.J. y Mc DONALD,E.; J.C.S. Chem. Commun., (1972) 1265.
- 101.- SANO,S.; J. Biol. Chem., 241 (1966) 5276.
- 102.- SANO,S.; y GRANICK,S.; J. Biol. Chem., 236 (1961) 1173.
- 103.- CAVALEIRO, J.A.S.; KENNER,G.W. y SMITH,K.M.; J.B.S. Chem. Commun,(1973)183.
- 104.- PORRA,R.J. y FALK,J.E.; Biochem. J., 90 (1964) 69.
- 105.- JACKSON,A.H.; GAMES,D.E.; COUCH,P.; JACKSON,J.R.; BELCHER,R.B. y SMITH,S.; Enzyme, 17 (1974) 81.
- 106.- POULSON,R.; J. Biol. Chem., 251 (1976) 3730.
- 107.- POULSON,R. y POLGEASE,W.J.; J. Biol. Chem. 249 (1974) 6367.
- 108.- LABBE,R.F.; Biochim. Biophys. Acta, 31 (1959) 589.
- 109.- PORRA,R.J. y JONES, O.T.G.; Biochem. J., 87 (1963) 181.
- 110.- PORRA,R.J. y JONES, O.T.G.; Biochem. J., 87 (1963) 186.
- 111.- OYAMA,H.; SUGITA,Y.; YONEYAMA,Y. y YOSHIKAYA,H.; Biochim. Biophys. Acta, 47 (1961) 413.
- 112.- HEIKEL,T.; LOCKWOOD,W.H. y RIMINGTON,C.; Nature, 182 (1958) 313.
- 113.- KASSNER,R.J. y WALCHAK,H.; Biochim. Biophys. Acta, 304 (1973) 294.

- 114.- TOKUNAGA,R. y SAHO,S.; Biochim. Biophys. Acta, 264 (1972) 263.
- 115.- LLAMBIAS,E.B.C.; Int. J. Biochem., 7 (1976) 33.
- 116.- GOUDY,B.; DAWES,E.; WILKINSON,A.E. y WILLS,E.D.; European J.B.,3(1967) 208
- 117.- PORRA,R.J. y ROSS,B.D.; Biochem. J. 94 (1965) 557.
- 118.- RIETHMUELLER,G. y TUPPY,H.; Biochem. Z., 340 (1964) 413.
- 119.- LABBE,R.F. y HUBBARD,N.; Biochim. Biophys. Acta, 41 (1960) 185.
- 120.- MINAKAMI,S.;KAGAWA,Y.; SUGITA,Y. y YONEYAMA,Y.; Biochim. Biophys. Acta, 35(1959) 569.
- 121.- JENSEN,W.N.; ASCHENBRUCKER,J.; CARTWRIGHT,G.E. y WINTROBE,M.M.; J. Lab.Clin. Med., 42 (1953) 833.
- 122.- YONEYAMA,Y.; TAMAI,A.; YASUDA,T. y YOSHIKAWA,H.; Biochim. Biophys. Acta, 105(1965) 100.
- 123.- LABBE,R.F. y HUBBARD,N.; Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 130.
- 124.- LABBE,R.F.; HUBBARD,N. y CAUGHEY,W.S.; Biochemistry, 2 (1963) 372.
- 125.- MINAKAMI,S.; J. Biochem. Tokyo, 45 (1958) 833.
- 126.- MANYAN,D.R. y YUNIS,A.A.; Biochem. Biophys. Research. Commun. 41, (1970)926
- 127.- NEUBERGER,A. y TAIT,G.H.; Biochem. J., 90 (1964) 607.
- 128.- GOLDIN,B.R. y LITTLE,N.H.; Biochim. Biophys. Acta, 171, (1969) 321.
- 129.- KING,R.F. y PAGE,E.R.; Biochem. J., 110 (1968) 45P.
- 130.- JONES,O.T.G.; Biochem. J., 107 (1968) 113.
- 131.- PORRA,R.J. y LASCELLES,J.; Biochem. J., 108 (1968) 343.
- 132.- LASCELLES,J.; J. Gen. Microbiol., 15 (1956) 404.
- 133.- GRANICK,S. y GILBER,H.; J. Gen Physiol., 30 (1946) 1.
- 134.- DAILEY,H.A. Jr.; J. of Bacteriology, 132 (1977) 302.
- 135.- JONES,M.S. y JONES, O.T.G.; Biochem. J., 119 (1970) 453.
- 136.- LANGELAAN,D.E.; LOSOWSKI,M.S. y TOOTHILL,C.; Clin. Chim. Acta, 26(1969) 245
- 137.- VERHOEF,N.J.; NOORDELOSS,P.J. y LEI,B.; Clin. Chim. Acta, 82(1-2) (1978) 45
- 138.- BONKOWSKY,H.L.; BLOOMER,J.R.; EBBERT,P.S. y MAHONEY,M.J.; J. of Clin. Invest. 56 (1975) 1139.

- 139.- VILJOEN, D.J.; CAYANIS, E.; BECKER, D.M.; KRAMER, S.; DAWSON, B. y BERNSTEIN, R.; Am. J. Haematol., 6(3) (1979) 185.
- 140.- BLOOMER, J.R.; J. Clin. Invest., 65(2) (1980) 321.
- 141.- PAUL, K.G.; THEORELL, H. y ÅKESON, Å.; Acta Chem. Scand., 7 (1953) 1284.
- 142.- PORRA, R.J.; VITOLS, K.S.; LABBE, R.F. y NEWTON, N.A.; Biochem. J., 104(1967)321.
- 143.- JONES, M.S. y JONES, O.T.G., Biochem. J., 113 (1969) 507.
- 144.- CAUGHEY, W.S.; DEAL, R.M.; McLEES, B.D. y ALBEN, J.O.; J. Am. Chem. Soc., 84 (1962) 1735.
- 145.- MCKAY, R.; DRUYAN, R.; GETZ, G.S. y RABINOWITZ, M.; Biochem. J., 114(1969)455.
- 146.- WAGNER, G.S.; DINAMARCA, M.L. y TEPHLY, T.R.; "Porphyrins in Human Diseases" (Karger/Basel, 1976) 111. Ed. M. Doss.
- 147.- SCHWARTZ, H.C.; HILL, R.L.; CARTWRIGHT, G.E. y WINTROBE, M.M.; Federation Proc., 18 (1959) 545.
- 148.- PORRA, R.J. y SKYRING, G.W.; "Porphyrins in Human Diseases" (Karger/Basel, 1976) 459. Ed. M. Doss.
- 149.- GOLBERG, A.; Brit. J. Haematol., 5 (1959) 150.
- 150.- WILLS, E.D.; Biochem. J., 99 (1966) 667.
- 151.- LEWIS, S.E. y WILLS, E.D.; Biochem. Pharmacol., 11 (1962) 901.
- 152.- PHILLIPS, J.N.; Rev. pure appl. Chem. 10 (1960) 35.
- 153.- PHILLIPS, J.N.; Enzymología, 32 (1967) 13.
- 154.- WAGNER, G.S. y TEPHLY, T.R.; Cytochromes P-450 and b<sub>5</sub>. Ed. Cooper, Rpsenthal, Snyder and Witner, pag. 343.
- 155.- KRUEGER, R.C.; MELNICK, J. y KLEIN, J.R.; Arch. Biochem. Biophys., 64 (1956) 302.
- 156.- TEPHLY, T.R.; HASEGAWA, E. y BAROK, J.; Metabolism., 20 (1971) 200.
- 157.- YONEYAMA, Y.; SAWADA, H.; TAKESHITA, M. y SUGITA, Y.; Lipids, 4(1969) 321.
- 158.- SCHWARTZ, H.C.; GOUDSMIT, R.; HILL, R.I.; CARTWRIGHT, S.F. y WINTROBE, M.M.; J. Clin. Invest. 40 (1961) 188.
- 159.- LABBE, R.F.; ZASKE, M.R. y ALDRICH, R.A.; Science, 129 (1959) 1741.
- 160.- MAZANOWSCA, A.M.; NEUBERGER, A. y TAIT, G.H.; Biochem. J., 98(1966) 117.
- 161.- ERIKSEN, L. y ERIKSEN, N.; "Porphyrins in Human Diseases"(Karger/Basel,, 1976)105. Ed. M. Doss.
- 162'.- MARGOLIASH, E.; Ann. Rev. Biochem., 30 (1961) 549.

- 162.- LABBE,R.F. y NIELSEN,L.; "Porphyrins in Human Disease" (Karger/Basel,1976)141.
- 163.- SAEZ DE CORDOVA,C.; COHEN,R.; GONZALEZ-CADAVID,N.F.; Biochem. J., 166(3), (1977) 305.
- 164.- SANO,S.; INOUE,S.; TANABE,Y.; SUMIYA,C. y KOIKE,S.; Science, 129(1959) 275.
- 165.- GRANICK,S.; Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. 2, 25 (1962) 53.
- 166.- PATTON,G.M. y BEATIE,D.S.; J. Biol. Chem., 248 (1973) 4467.
- 167.- BATTERSBY,A.R.; JONES,K.; Mc DONALD, E.; ROBINSON, J.A. y MORRIS, H.R.; Tetrahedron Lett. (1977) 2213.
- 168.- BATTERSBY,A.R.; Mc DONALD, R.; MORRIS, H.R.; THOMPSON, M.; WILLIAMS,D.C.; BYKHOVSKY,V.Ya.; ZAITSEVA,N.I. y BUKIN, V.N.; Tetrahedron Letters, 25(1977)2217.
- 169.- SCOTT,A.I.; IRWIN,A.J.; SIEGEL,L.M. y SHOOLERY,J.N.; J. Am. Chem. Soc., 100 (1978) 316.
- 170.- SCOTT,A.I.; Acc. Chem. Res., 11 (1978) 29.
- 171.- NACHT,S.; "Estudio químico de porfirinas excretadas por orina en estados de porfiria". Tesis para optar al título de Dr. en Química (1963) U.B.A.
- 172.- GRINSTEIN, M.; Bioquím. Clín., VI (1972) 157.
- 173.- ROMEO, G.; Hum. Genet., 39 (1977) 261.
- 174.- SARACENO,E.F.; La semana médica, 155(3) (1979) 72.
- 175.- KRAMER,S.; BECKER, D.M. y VILJOEN, J.D.; British. J. Haematol., 37 (1977)439.
- 176.- DE MATTEIS,F.; Pharmac. Reviews, 19 (1967) 523.
- 177.- MARKS,G.S.; "Heme and Chlorophyll, Chemical, Biochemical and Medical Aspects", D. Van Nostrand Cía Ltd, London (1969).
- 178.- TSCHUDY,D.P. y BONKOWSKY,H.L.; Fed. Proc., 31 (1972) 147.
- 179.- de MATTEIS,F. y STONARD,H.; Semin. Hamat.14 (1977) 187.
- 180.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; La Semana Médica, 155 (1979) 95.
- 181.- CETINGIL,A.I. y OZEN,M.A.; Blood, 16 (1960) 1002.
- 182.- SCHMID,R.; New Engl. J. Med., 263 (1960) 397.
- 183.- CAM,C. y NIGOGOSYAN,G.; J. Am. Med. Assoc., 183 (1963) 90.
- 184.- OCKNER,R.K. y SCHMID,R.; Nature, 189 (1961) 499.

- 185.- PARKE, D.V. y WILLIAMS, R.T.; *Biochem. J.*, 74 (1960) 5.
- 186.- SINCLAIR, P.R. y GRANICK, S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61(1974)124.
- 187.- De MATTEIS, F.; PRIOR, B.E. y RIMINGTON, C.; *Nature*, 191 (1961) 363.
- 188.- VOS, J.G.; MAAS, H.L. VAN DER: MUSCH, A. y RAM, E.; *Toxic. appl. Pharmac.*, 18 (1971) 944.
- 189.- SAN MARTIN DE VIALE, L.C.; VIALE A.A.; NACHT S. y GRINSTEIN M.: *Clin. Chim. Acta* 26 (1970) 13
- 190.- GAJDOS, A. y GAJDOS-TÖROK, M.; *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 6(1961) 549.
- 191.- TALJAARD, J.J.F.; SHANLEY, B.C. y JOUBERT, S.M.; *Life Sci.*, 10 (1971) 887.
- 192.- DOWLE, E.; GOLDSWAIN, F.; SPONG, N. y EALES, L.; *Clin. Sci.*, 39(1970) 147.
- 193.- KAPPAS, A. y ALVARES, A.P.; *Scientific Offprints Am.*, 232, N°6 (1975) 22.
- 194.- WADA, O.; YANO, Y.; URATA, G. y NAKAO, K.; *Biochem. Pharmacol.*, 17(1968) 595.
- 195.- RAJAMANICKAN, C.; AMRUTAVALLI, J.; RAO, M.R.S. y PADMANABAN, G.; *Biochem. J.*, 129 (1972) 381.
- 196.- SAN MARTIN DE VIALE, L.C.; TOMIO, J.M.; FERRAMOLA, A.M.; SANCOVICH, H.A. y TIGIER, H.A.; "Porphyrins in Human Diseases", (Karger/Basel, 1976) 453, Ed. M. Doss.
- 197.- KAPPAS, A. y GRANICK, S.; *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 346.
- 198.- WADA, O.; TOYOKAWA, K.; URATA, G.; YANO, Y. y NAKAO, K.; *Biochem. Pharmac.*, 18 (1969) 1533.
- 199.- GAJDOS, A. y GAJDOS-TÖROK, M.; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45(1963) 1227.
- 200.- ELDER, G.H.; *Semin. Hematol.*, 14(2) (1977) 227.
- 201.- DOSS, M.; SCHERMULY, E. y KOSS, G.; *Ann. Clin. Res.*, 8 suppl. 17 (1976) 171.
- 202.- LUI, H.; SAMPSON, R. y SWEENEY, G.D.; "Porphyrins in Human Diseases" (Karger/ Basel 1976) 405. Ed. M. Doss.
- 203.- ELDER, G.H.; *Enzyme*, 17 (1974) 61.
- 204.- DEBETS, F.M.H.; HAMES, W.J.H.M.B. y STRIK, J.J.T.W.A.; *Int. J. Biochem.*, 12 (1980) 1019.
- 205.- STONARD, M.D.; *British J. Haemat.*, 27 (1974) 617.
- 206.- TURNER, J.C. y GREEN, R.S.; *Biochem. Pharmacol.*, 23 (1974) 2387.

- 207.- MEHENDALE, H.M.; FIELDS, M. y MATTHEWS, H.B.; J. Agricult. Food. Chem., 23(2) (1975) 261.
- 208.- KOSS, G.; KORANSKY, W. y STEINBACH, K.; Arch. Toxicol. 35 (1976) 107.
- 209.- KOEMAN, J.H.; NUEVER DE BRAUW, M.C. y VOS, R.M.; Nature (London) 221(1969) 1126.
- 210.- HAMMOND, A.L.; Science, 175 (1972) 155.
- 211.- LUI, H. y SWEENEY, G.D.; FEBS Lett. 51 (1975) 225.
- 212.- IATROPOULOS, M.J.; MILLING, A.; MÜLLER, W.F.; NOHYNEK, G.; ROZMAN, K.; COULSTONE, F. y KORTE, F.; Envirom. Res. 10 (1975) 384.
- 213.- GOLDSTEIN, J.A.; FRIESEN, M.; LINDER, R.E.; HICKMAN, P.; HASS, J.R. y BERGMAN, H.; Biochem. Pharmacol. 26 (1977) 1549.
- 214.- WAINSTOK DE CALMANOVICI, R. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C.; Int. J. Biochem., 12 (1980) 1039.
- 215.- DEBETS, F.M.H.; STRIK, J.J.T.W.A. y OLIE, K.; Toxicology, 15 (1980) 181.
- 216.- KOSZO, F.; SIKLOSI, C.; SIMON, N. y ACZEL, A.; Proc. Hung. Ann. Meet. Biochem. 19 (1979) 115.
- 217.- KOSS, G.; SEUBERT, S.; SEUBERT, A.; KORANSKY, W.; KRAUS, P. e IPPEN, H.; Int. J. Biochem. 12 (1980) 1003.
- 218.- DEBETS, F.M.H. y STRIK, J.J.T.W.A.; Chemical Porphiria in Man (Elsevier North Holland, Amsterdam -1979) 181. Ed. J.J.T.W.A. Strik y Koeman, J.H.
- 219.- KREIMER, M.; "Metabolismo de porfirinas en estados de intoxicación por plomo" Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales., U.B.A., 1963.
- 220.- GRINSTEIN, M.; J. Biol. Chem., 167 (1947) 515.
- 221.- SAN MARTIN DE VIALE, L.C. y GRINSTEIN, M.; Actas 1er. Congr. Latinoam. de Bioquím. Clín., 2 (1968) 241.
- 222.- NICHOLAS, R.E.H.; Biochem. J., 48 (1951) 309.
- 223.- KEILIN, D. y HARTREE, E.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 124(1938) 397.
- 224.- HENNESEY, W. y HWENNE KENS, G.; J. of Clin. Invest., 41 (1962) 1258.
- 225.- FALK, J.E. y BENSON, A.; Biochem. J., 55 (1953) 101.
- 226.- FALK, J.E.; Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, New York (1964).
- 227.- BATLLE, A.M. del C.; "Biosíntesis de Porfirinas", Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., 1970.

- 228.- RIMINGTON,C. y SVEINSSON,S.L.; Scand. J. Clin. Lab. Invest.,2 (1950) 209.
- 229.- SALUM,I.; BATLLE,A.M.del C. y GRINSTEIN,M.; Anales Asoc. Quím. Arg.,  
49 (1961) 3.
- 230.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C. y TOMIO,J.M.; Bioq. Clín., 6 (1972) 246.
- 231.- MARTINEZ,C.A. y MILLS,G.C.; Clin. Chem., 17 (1971) 199.
- 232.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; "Biosíntesis del hemo", Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., 1970.
- 233.- FISCHER,H. y STERN,A.; DieChimie des Pyrrols, Leipzig, 2 (1940) 420.
- 234.- MOLINA,M.C.R. de; CALMANOVICI,R.W. de; TOMIO, J.M. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C.; Anales Asoc. Quím. Arg., 63 (1975) 313.
- 235.- RAY,M.J.; "Methods in Enzymology"XI(1962) 490 (Ed. Colowick S.P. y Kaplan, N.D.. Acad. Press, N.Y.
- 236.- WESTHAND, E.W.; "Methods in Enzymology" XXV (1962) 401 (Ed. Colowick,S.P. y Kaplan, N.D., Acad. Press. N.Y.
- 237.- FRYDMAN,R.B. y FRYDMAN,B.; Arch. Biochem. Biophys., 136 (1970) 193.
- 238.- ORNSTEIN,L.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 (1964) 321.
- 239.- DAVIS,B.J.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 (1964) 404.
- 240.- JONES,M.S. y JONES,O.T.B.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 (1968) 977.
- 241.- SOTTOCASA,G.L.; KUYLENSTIERNA,B.; ERNSTER,L. y BERGSTRAND,A.; "Methods in Enzymology" X (1967) 448. Ed. Estabrook, R. W. y Pullman,M.E., N.Y. & London Acad. Press.
- 242.- OCHOA,S.; "Methods in Enzymology" I (1955) 735. Ed. Colowick, S. y Kaplan, N. N.Y. y London. Acad. Press.
- 243.- COOPERSTEIN,S.J. y LAZAROW,A.; J. Biol. Chem., 189 (1951) 665.
- 244.- TABOR,C.W.; TABOR, H. y ROSENTHAL,S.M.; J. Biol. Chem., 208(1954)645.
- 245.- WAGNER,G.S. y TEPHLY,T.R.; Cytochromes P-450 and b<sub>5</sub>. Ed. Cooper, Rosenthal, Snyder and Witner, pag. 343.
- 246.- TALJAARD,J.J.F.; SHANLEY, B.C.; DEPPE, W.M. y JOUBERT, S.M.; Br. J. Haematol. 23 (1972) 587.
- 247.- ELDER,G.H.; EVANS, J.O. y MATLIN.S.: "Porphirins in Human Diseases"(Karger/ Basel, 1976) 424. Ed. M. Doss.

- 248.- KUSHNER, J.P.; BARBUTO, A.J. y LEE, G.R.; J. Clin. Invest. 58(1976)1089.
- 249.- BENEDETTO, A.V.; KUSHNER, J.P. y TAYLOR, J.S.; N. Engl. J. Med., 298 (1978) 358.
- 250.- DOSS, M.; SCHERMULY, D.; LOOK, D. y HENNING, H.; "Porphyrins in Human Diseases", (Karger/Basel, 1976) 286, Ed. M. Doss.
- 251.- HALEY, T.V.; Ecotoxicol. envir. Safety, 1 (1977) 343.
- 252.- ELDER, G.H.; PATH, M.R.C.; LEE, G.B. y TOVEY, J.A.; N. Engl. J. Med., 299 (1978) 274.
- 253.- KIMBROUGH, R.D. y LINDER, E.; Toxicol. Appl. Pharmacol., 46 (1978) 151.
- 254.- KOSZO, F.; SIKLOSI, Cs. y SIMON, N.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 80 (1978) 781.
- 255.- ARRHENIUS, E.; RENBERG, L.; JOHANSSON, L. y ZETTERQVIST, M.; Chem. Biol. Interact., 18 (1977) 35.
- 256.- ARRHENIUS, E.; Chem-Biol. Interact., 1 (1969/70) 381.
- 257.- HRUBAN, Z.; Environ. Health Persp., 16 (1976) 111.
- 258.- JONES, K.G. y SWEENEY, G.D.; Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 17 (1977) 631.
- 259.- KERKLAAN, P.R.M.; STRICK, J.J.T.W.A. y KOEMAN, J.M.; "Chemical Porphyria in Man" (Elsevier/North Holland, Amsterdam-1979) 151, Ed. Strik, J.J.T. W.A. y Koeman, J.H.
- 260.- WAINSTOK DE CALMANOVICI, R.W. de; MOLINA, M.C.R. DE; TAIRA, M.C.; TOMIO, M.J. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C.; Arq. Biol. Tecnol., 24(1) (1981) 89.
- 261.- MIO, T.; SUMINO, K. y MIZUTANI, T.; Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 24 (1976) 1958.
- 262.- SIMON, N.; SIKLOSI, Cs. y KOSZO, F.; "Porphyrins in Human Diseases" (Karger/Basel, 1976) 432, Ed. M. Doss.
- 263.- SIMON, N. y SIKLOSI, Cs.; Mykosen, 19(3) (1976) 98.
- 264.- FRIDOVICH, I.; J. Biol. Chem., 238 (1963) 592.
- 265.- WARREN, A.; J. Biol. Chem., 241 (1966) 309.
- 266.- GOLDBERG, A.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G.E. y WINTROBE, M.M.; Blood, II (1956) 821.
- 267.- SOTTOCASA, G.L.; KUYLENSTIERNA, B.; ERNSTER, L. y BERGSTRAND, J.; J. Cell. Biol., 32 (1967) 415.

268.- BLEKKENHORST, G.; PIMPSTONE, N.R. y EALES, L.; Porphyrins in Human Diseases, (Karger/Basel, 1976) 299. Ed. M. Doss.

269.- DE VERNEUIL, H.; AITKEN, G. y NORDMANN, Y. Human. Genet. 44 (1978) 145.