



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Acción de heptaclor y lindano sobre el metabolismo del hemo

Taira, María Cristina

1990

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: 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

"ACCION DE HEPTACLOR Y LINDANO SOBRE EL METABOLISMO DEL HEMO"

MARIA CRISTINA TAIRA

DIRECTOR: Dra. LEONOR C. SAN MARTIN DE VIALE.

- 2285 -

g.2

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1990 -

A Horacio, mi esposo.

A mis hijos: Nicolás, Florencia,
Alejandra y Mariana.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento:

A la Dra. LEONOR C. SAN MARTIN DE VIALE por haberme dirigido en este trabajo y por haber conseguido los medios para realizarlo.

A ROSA WAINSTOK y MARIA DEL CARMEN RIOS por haberme transmitido toda su experiencia en mis inicios en la investigación, a MARIA DEL CARMEN VILA con quien hicimos los experimentos de Distribución subcelular y Ferroquelatasa, a SILVIA BILLI quien realizó las separaciones por HPLC que figuran en este trabajo y a CARMEN ALDONATTI por su valiosa colaboración en algunos experimentos y por su especial predisposición a colaborar en todo momento. A todas ellas, agradezco además su permanente apoyo y estímulo.

A LILIANA I. VAZQUEZ por su excelente trabajo dactilográfico.

A todos los integrantes del Departamento de Química Biológica por su compañerismo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme dado el lugar de trabajo.

A MIS PADRES y HERMANOS y a la FLIA. MIYASHIRO por brindarme su ayuda en todo momento.

A MI ESPOSO a quien debo este logro y por ello mi especial agradecimiento por su infinita paciencia.

ABREVIATURAS

A	: -CH ₂ -COOH.
Act D	: Actinomicina D.
AIA	: Alilisopropilacetamida.
ALA	: ácido δ -Aminolevúlico.
ALA-D	: δ -Aminolevúlico dehidrasa.
ALA-S	: δ -Aminolevúlico sintetasa.
cDNA	: DNA copia.
CoASH	: Coenzima A.
Copro	: Coproporfirina.
Copro'gen	: Coproporfirinógeno.
Coprogen-O	: Coproporfirinógeno oxidasa.
CX	: Ciclo heximida.
DDC	: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.
Deutero	: Deuteroporfirina.
DMSO	: Dimetilsulfóxido.
EDTA	: ácido etilendiamino tetraacético.
FB	: Fenobarbital.
FeQ	: Ferroquelatasa.
GSH	: Glutation.
Hemato	: Hematoporfirina.
Hepta	: Porfirina heptacarboxílica.
Hexa	: Porfirina hexacarboxílica.
HPLC	: Cromatografía líquida de alta presión.
INT	: Clorhidrato de 2-(p-Iodofenil)-3-(p-Nitrofenil) 5-feniltetrazolium.

Me	: -CH ₃
Meso	: Mesoporfirina.
P	: -CH ₂ -CH ₂ -COOH.
PBG	: Porfobilinógeno.
PBG-asa	: Porfobilinogenasa.
PBG-D	: Porfobilinógeno deaminasa.
PCL	: Porfobilinógeno carboxiliasa.
p-DMAB	: p-dimetil amino benzaldehído.
PM	: Peso molecular.
PPal	: Fosfato de piridoxal.
Proto	: Protoporfirina.
Proto'gen	: Protoporfirinógeno.
Proto'gen-O	: Protoporfirinógeno oxidasa.
SDH	: Succínico dehidrogenasa.
SDS	: Dodecilsulfato de sodio.
SKF-525 A	: Clorhidrato de 2,2 dietil-aminoetil-2,2-difenil-valerato.
Succ. CoA	: Succinil Coenzima A.
Succ. CoA-S	: Succinil Coenzima A-sintetasa.
TCA	: Acido tricloroacético.
TCDD	: 2,3,7,8-tetracloro dibenzo-p-dioxina.
Tris	: Tri (hidroximetil) aminometano.
Uro	: Uroporfirina.
Uro-CoS	: Uroporfirinógeno III cosintetasa.
Uro'gen	: Uroporfirinógeno.
U.V.	: Ultravioleta.

INDICE

Página.

INTRODUCCION.

PORFIRINAS Y HEMO.....	1.
I. BIOSINTESIS DEL HEMO.....	3.
I.1. Biosíntesis de ALA.....	8.
I.2. Biosíntesis de PBG.....	21.
I.3. Biosíntesis de Uroporfirinógeno III.....	27.
I.4. Transformación de Uroporfirinógeno III en Coproporfirinógeno III.....	35.
I.5. Transformación de Coproporfirinógeno III en Protoporfirinógeno IX.....	40.
I.6. Transformación de Protoporfirinógeno IX en Protoporfirina IX.....	44.
I.7. Biosíntesis de hemo.....	47.
II. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE HEMO HEPATICO...	52.
II.1. Represión de la síntesis de ALA-S por hemo....	52.
II.2. Inhibición por hemo de la translocación de ALA-S del citosol a la mitocondria.....	57.
II.3. Inhibición, "feed back" de la actividad de ALA-S.	61.
III. PORFIRIAS.	
III.1. Porfirias humanas.....	63.
III.2. Porfirias experimentales.....	65.
III.2.a. Porfiria experimental inducida por AIA.....	67.
III.2.b. Porfiria experimental inducida por DDC.....	72.
III.2.c. Porfiria experimental inducida por HCB y otros compuestos halogenados.....	78.

IV. LINDANO Y HEPTACLOR.

IV.1. Estructuras químicas, usos y efectos generales	82.
IV.2. Efecto sobre el metabolismo del hemo.....	87.

<u>OBJETIVO DEL TRABAJO.....</u>	89.
----------------------------------	-----

MATERIALES.

DROGAS.....	94.
SUSTRATOS.....	94.
SOLVENTES.....	95.
OTRAS DROGAS.....	95.
MATERIAL AUXILIAR.....	96.
ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	96.

METODOS.

I. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

I.1. Inoculación de embriones.....	97.
I.2. Inoculación de pollitos.....	97.
I.3. Obtención del hígado.....	99.

II. ANALISIS DE PORFIRINAS.

II.1. Determinación del contenido hepático de porfirinas.....	99.
II.2. Análisis de la naturaleza de las porfirinas acumuladas.....	101.
II.2.a. Esterificación de las porfirinas.....	101.
II.2.b. Pasaje a cloroformo.....	101.
II.2.c. Identificación de porfirinas por cromatografía en placa delgada.....	102.

II.2.d. Determinación cuantitativa de porfirinas metil éster.....	103.
II.2.e. Separación de porfirinas metil ésteres por HPLC.....	104.
III. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S.....	105.
IV. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S.	
IV.1. Obtención de las fracciones subcelulares.....	106.
IV.2. Medición de la actividad de ALA-S con agregado de Succ-CoA-S.....	107.
IV.3.a. Obtención de Succinil-CoA-S.....	108.
IV.3.b. Medición de la actividad de Succ-CoA-S.....	109.
IV.4. Medición de la actividad de Succínico deshidrogenasa.....	110.
V. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PORFIRINOGENO CARBOXILIASA.	
V.a. Preparación de Uroporfirinógeno III.....	111.
V.b. Preparación de la amalgama de sodio.....	111.
V.c. Ensayo de actividad.....	112.
V.d. Separación de porfirinas metil éster por cromatografía en papel.....	113.
V.e. Determinación de proteínas.....	115.
VI. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FERROQUELATASA.	
VI.a. Preparación de la solución de Mesoporfirina IX.	115.
VI.b. Ensayo de actividad.....	116.
VII. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	118.

RESULTADOS

I. EFECTO DE LINDANO Y HEPTACLOR SOBRE EL CONTENIDO Y LA NATURALEZA DE PORFIRINAS EN HIGADO.

- I.1. Efecto de lindano y heptaclor sobre el contenido hepático de porfirinas en embriones de pollo de la cepa White Leghorn..... 119.
- I.2. Efecto de lindano y heptaclor sobre el contenido de porfirinas en hígado de embriones New Hampshire. 122.
- I.3. Naturaleza de las porfirinas acumuladas..... 122.

II. EFECTO DE LINDANO Y HEPTACLOR SOBRE ALA-SINTETASA.

- II.1. Efecto de lindano sobre la actividad de ALA-S... 127.
- II.2. Efecto de heptaclor sobre la actividad de ALA-S. 127.
- II.3. Efecto de la variación del tiempo de tratamiento con lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S..... 129.
- II.4. Relación entre el desarrollo del embrión y el efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S..... 131.
- II.5. Efecto "in-vitro" de lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S de hígado de embrión normal..... 133.
- II.6. Efecto del pretratamiento con Fenobarbital sobre el aumento de actividad de ALA-S producido por lindano..... 135.
- II.7. Efecto del pretratamiento con Fenobarbital sobre el aumento de actividad de ALA-S producido por heptaclor..... 139.

II.8. Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la respuesta de ALA-S a lindano.....	139.
II.9. Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la respuesta de ALA-S a heptaclor.....	147.
II.10. Distribución subcelular de ALA-S.....	151.
II.11. Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a lindano.....	154.
II.12. Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a heptaclor.....	158.
III. ESTUDIOS SOBRE PORFIRINOGENO CARBOXILIASA.....	162.
III.1. Estudios tendientes a la caracterización de PCL de hígado de embrión de pollo.	
III.1.a. Efecto de la concentración de enzima.....	162.
III.1.b. Efecto de la concentración de Uro'gen III...	165.
III.1.c. Curso de la reacción.....	167.
III.1.d. Determinación del pH óptimo.....	167.
III.1.e. Efecto de la temperatura de incubación.....	170.
III.1.f. Efecto del precalentamiento sobre la actividad de PCL.....	170.
III.1.g. Efecto de GSH, EDTA y aerobiosis.....	171.
III.1.h. Efecto de Fosfato de Piridoxal, Cisteína y Ditiotreitól y reactivos quelantes de metales.....	173.
III.1.i. Efecto de haluros de metales alcalinos.....	173.
III.1.j. Efecto de SO_4Fe sobre PCL.....	176.
III.2. Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL de hígado de embrión de pollo.	

III.2.a. Respuesta de la enzima en embriones New Hampshire.....	179.
III.2.b. Respuesta de la enzima en embriones White Leghorn.....	182.
III.2.c. Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL hepática en pollos.....	184.
III.2.d. Influencia de SKF-525 A y FB en la respuesta de PCL hepática a lindano y heptaclor.....	186.
IV. ESTUDIOS SOBRE FERROQUELATASA.	
IV.1. Ajuste de las condiciones de medición de FeQ...	189.
IV.3. Efecto de lindano y heptaclor sobre FeQ.....	193.
<u>DISCUSION</u>	195.
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	222.
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	226.

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

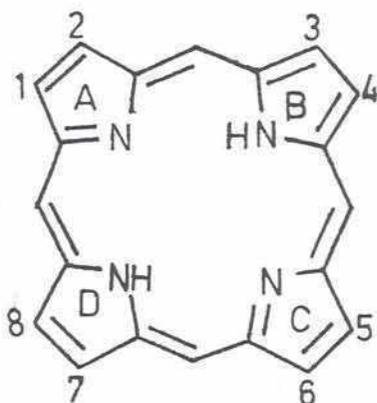
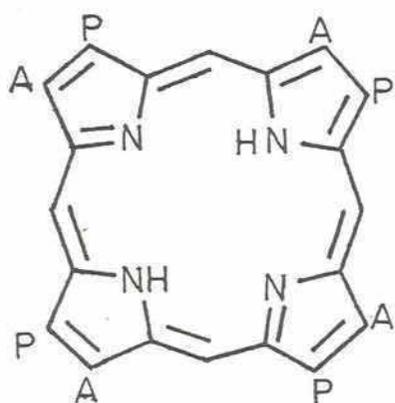


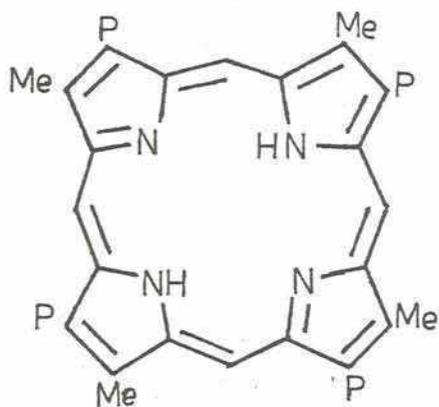
Figura 1: Estructura de la Porfina.



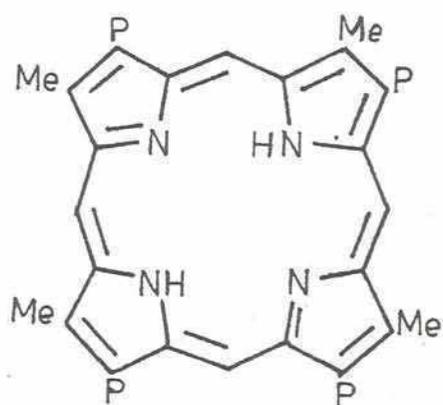
Uro I



Uro III



Copro I



Copro III

Figura 2: Estructura de los isómeros I y III de Uroporfirina y Coproporfirina.

Los porfirinógenos son las formas reducidas de las porfirinas, tienen 6 átomos adicionales de hidrógeno, (Figura 3) y son los verdaderos intermediarios en la biosíntesis.

El hemo, grupo prostético de muchas hemoproteínas, es un derivado de la Protoporfirina IX (Proto IX) que pertenece a la serie isomérica III. El hemo está constituido por Proto IX unido a hierro ferroso (Figura 4).

I. BIOSÍNTESIS DEL HEMO.

No había evidencias experimentales para el mecanismo de biosíntesis de hemo hasta que en 1945, Bloch y Rittenberg (1) reportaron que alimentando ratas con acetato de sodio marcado con deuterio encontraban que este isótopo se incorporaba al hemo sanguíneo. Shemin y Rittenberg (2, 3) hallaron que las porfirinas de la sangre de humanos y ratas que recibieron glicina-¹⁵N tenían un contenido relativamente alto de este isótopo.

Posteriormente, se demostró que la glicina es un precursor biológico de las porfirinas y provee los cuatro átomos de N del anillo tetrapirrólico (4 - 7) y ocho átomos C α del mismo son incorporados en cada molécula de hemo (6, 8 - 10).

El átomo del C α de la glicina es la fuente de los C de los puentes metenos y de la posición 2 de cada anillo pirrólico (6, 9). Los grupos carboxilos de la glicina no son utilizados para la síntesis de porfirinas (8, 11).

Shemin y Wittenberg (12), demostraron posteriormente que los 26 átomos de C restantes de Proto provenían de acetato. El acetato era utilizado a través de la conversión a un compuesto asimétrico de 4C vía ciclo de los ácidos tricarbónicos y Shemin y Kumin (13) sugieren que este precursor es succinato activado posiblemente como complejo succinil-coenzima A (Succ-CoA).

Más tarde, Shemin y Russell (14) demuestran que el ácido δ -aminolevúlico (ALA), que puede ser formado por condensación de succinato activado y glicina, puede reemplazar a esos dos sustratos para la síntesis de porfirinas. La aminocetona ALA sirve como fuente de todos los átomos de C y N de las porfirinas.

Si el succinato activo condensa con el átomo de C α de la glicina para formar un intermediario, el ácido α -amino- β cetoalópico, éste puede ser rápidamente decarboxilado y así se separa el grupo COOH de la glicina. Luego, la condensación de 2 moléculas de ALA da un pirrol en el cual el átomo de C α de la glicina debe estar en la posición 2 y en el α sustituyente del pirrol y ser así la fuente de los pentos metenos.

Shemin y col. (15), incubando ALA-5¹⁴C con un hemolizado de eritrocitos de pato, encontraron que la hemina biosintetizada contenía ¹⁴C y se obtenía la misma distribución que a partir de glicina-2¹⁴C, esto confirma que el intermediario formado a partir de glicina y succinato activado es ALA.

Posteriormente, se demostró la formación del pirrol

Porfobilinógeno (PBG) a partir de ALA y su conversión a porfirinas en sistemas biológicos (16-19) lo cual sugiere que debe ser un normal intermediario en la biosíntesis del hemo.

En la Figura 5 está esquematizado el camino de síntesis del hemo. El primer paso está catalizado por la enzima δ -ALA-sintetasa (ALA-S) y lleva a la formación de ALA a partir de los precursores Glicina y Succ-CoA.

Luego, dos moléculas de ALA se condensan para dar el pirrol PBG y la enzima que cataliza este paso es la δ -ALA-dehidrasa (ALA-D).

En un paso siguiente, 4 moléculas de PBG se condensan para dar el primer tetrapirrol cíclico que es el Uroporfirinógeno III (Uro'gen III). Este paso está catalizado por la Porfobilinogenasa (PBG-asa) que está constituido por dos enzimas: la PBG deaminasa (PBG-D) también llamada Uroporfirinógeno I sintetasa y la Isomerasa o Uroporfirinógeno III co-sintetasa (Uro-CoS). Cuando están presentes ambas enzimas se forma el tetrapirrol fisiológico Uro'gen III, cuando no se halla presente la Isomerasa se forma el Uro'gen I.

Luego, el Uro'gen III (octacarboxílico) se decarboxila secuencialmente pasando por intermediarios de 7,6 y 5 carboxilos hasta llegar a Coproporfirinógeno III (Copro'gen III), porfirina tetracarboxilada. Esta decarboxilación está catalizada por la enzima Porfirinógeno carboxilasa (PCL) o Uroporfirinógeno decarboxilasa.

Luego el Copro'gen III se decarboxila oxidativamente por acción de la coproporfirinógeno oxidasa (Copro'gen-O)

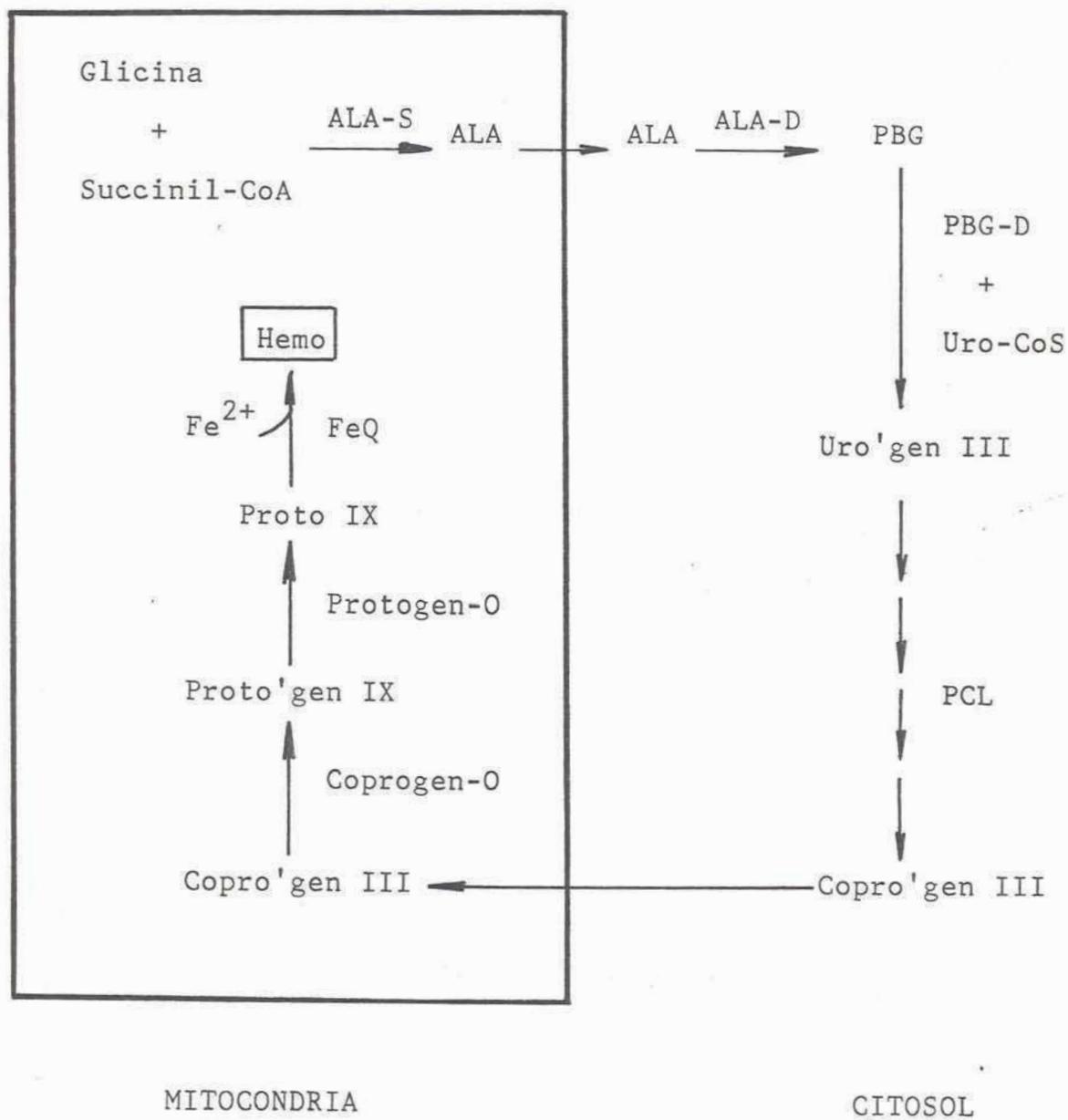


Figura 5: Camino biosintético del Hemo.

para dar Protoporfirinógeno IX (Proto'gen IX) éste se oxida a Protoporfirina IX (Proto IX) por intermedio de la Protoporfirinógeno oxidasa (Protogen-0).

Por último, la Ferroquelatasa (FeQ) inserta Fe^{2+} en el núcleo de Proto IX, obteniéndose el hemo.

Tanto la primera como las tres últimas reacciones tienen lugar en la mitocondria, mientras que las restantes enzimas están localizadas en la fracción soluble de la célula.

I.1. Biosíntesis de ALA.

El primer paso en la biosíntesis del hemo es la condensación de Glicina y Succ-CoA para formar ALA, este paso está catalizado por la enzima ALA-sintetasa (ALA-S). Estudios previos acerca de las propiedades de esta enzima, utilizando preparaciones parcialmente purificadas de Rhodopseudomonas spheroides (20-22) o preparaciones crudas de reticulocitos de conejo (23) e hígado de mamíferos (24), han mostrado que requiere fosfato de piridoxal (PPal) como cofactor. Es además una enzima sulfhidrónica y tiene un requerimiento absoluto para los sustratos Glicina y Succ-CoA.

En condiciones normales, los niveles de esta enzima en hígado son muy bajos, pero su actividad puede incrementarse varias veces por la acción de diversas drogas y esteroides (24-28). Además, su actividad está elevada en ciertas porfirias transmitidas genéticamente en el hombre (29, 30).

En células eucarióticas, se ha demostrado que ALA-S funciona en las mitocondrias. La enzima ha sido localizada

en la matriz mitocondrial o muy débilmente unida a la membrana interna (31-34), donde el sustrato Succ-CoA está disponible a través del ciclo de Krebs.

Luego de la inducción con dos de los agentes porfirinogénicos más potentes alilisopropilacetamida (AIA) o 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC), se ha demostrado que una forma citosólica de la enzima se acumula en cantidades importantes que pueden llegar hasta el 30% de la actividad hepática total en hígado de ratas (35, 36), cobaros (37) y pollos adultos (38).

La purificación de ALA-S ha sido intentada por diversos laboratorios y a partir de distintas fuentes. Así, la enzima ha sido purificada de bacterias fotosintéticas Rhodospseudomonas spheroides (39, 42), de mitocondrias (37, 43-44) y citosol (45, 46) de hígado de ratas, de mitocondrias de hígado de embriones de pollo (47, 48) y de levaduras (49).

Cabe señalar que la enzima tiene una vida media muy corta. Se ha determinado que en hígado de ratas la vida media de la enzima en la fracción mitocondrial es de 70 minutos, en tanto que en citosol es de 20 minutos (35). En cultivos de células de hígado de embrión de pollo Sassa y Granick (50) reportaron una vida media de 3 horas y Tomita y col. (51) de 2 horas. En hígado de embriones de pollo in "ovo" la vida media es de 15-20 minutos, en hígado de pollos adultos de 30 minutos para la enzima mitocondrial y 12 minutos para la citosólica (38).

ALA-S soluble parcialmente purificada a partir de hígado de ratas tratadas con AIA (45) requirió una alta concentración de cationes (NaCl 0.3 M) para su máxima actividad. El pH óptimo fué de 7.5 y mostró requerimiento absoluto para los sustratos Glicina y Succ-CoA y para el cofactor PPal. Los valores de KM determinados fueron 1.1×10^{-2} M para glicina, 7×10^{-5} M para Succ. CoA y 3×10^{-6} M para PPal. Es una enzima sulfhidrúlica y el grupo SH está en el sitio activo probablemente involucrado en la unión del PPal a la enzima (52). El PM estimado por filtración molecular fue de 295.000 ± 30.000 en presencia de ClNa 0.25 M y 500.00 en ausencia de sales.

La enzima mitocondrial purificada por Whiting y Elliot (37) a partir de hígado de ratas inducidas con DDC mostró un KM para Glicina y Succ-CoA de 1.9×10^{-2} M y 2×10^{-4} M respectivamente; el KM para PPal estuvo en el rango de 1-10 μ M. El PM estimado por filtración molecular fue de 77.000.

Paterniti y Beattie' (44), por otro lado, purificaron la enzima a partir de mitocondrias de ratas normales y hallaron un KM para Glicina de 5×10^{-3} M, y el pH óptimo fue 7.5. La enzima, cuando se cromatografió por tamiz molecular, presentó dos picos de actividad, uno correspondiente a un PM de 120.000 y otro a 60.000. Por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se obtuvo un PM de 58.000. Aparentemente la enzima nativa existe como dímero.

Hayashi y col. (53) determinaron que los tamaños moleculares de la enzima mitocondrial y citosólica son 115.000 y 600.000 respectivamente, por filtración molecular y 113.000 y 178.000 por centrifugación en gradiente de sacarosa.

Los diferentes PM reportados, se debe a que las preparaciones crudas o parcialmente purificadas de ALA-S, preparadas a partir de citosol o de mitocondrias, forman agregados o complejos con otras proteínas, especialmente a bajas concentraciones sales y exhiben tamaños moleculares muy heterogéneos desde 70.000 a 650.000 cuando se estiman por filtración molecular. Ohashi y Kikuchi (54) purificaron una forma citosólica compleja de ALA-S que presentó un PM de 320.000 por filtración molecular y que estaba compuesta por tres proteínas diferentes de las cuales solo una era catalíticamente activa. Este complejo puede ser disociado por centrifugación en gradiente de sacarosa o por tratamiento con papaína.

Nakakuki y col. (46), empleando la digestión con papaína en presencia de cantidades suficientes de Glicina; Succinato y PPal para prevenir la inactivación de ALA-S lograron purificar la enzima citosólica cercana a la homogeneidad. La enzima purificada presentó un pH óptimo de 7.5 y los KM para Succ-CoA y glicina fueron $1,1 \times 10^{-5}$ M y 7.5×10^{-3} M respectivamente.

El PM estimado por centrifugación en gradiente de sacarosa fué de 110.000 y el PM de la subunidad fue 51.000, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Aparentemente la enzima consiste de dos subunidades i-

dénticas con un PM de subunidad de 51.000 y esto fue confirmado por entrecruzamiento con dimetil suberimidato.

Este mismo grupo de trabajo, haciendo una síntesis "in vitro" de ALA-S determinaron que el PM de la enzima citosólica es de 75.000 (55) y esta forma citosólica de ALA-S parece ser muy susceptible a proteasas endógenas.

Para la enzima mitocondrial, Paterniti y Beattie (44) reportaron un PM mínimo de 58.000 y Yamauchi y col. (56) de aproximadamente 45.000, pero luego este valor fué reexaminado y se determinó que el PM mínimo es 66.000 (55). Por otro lado, Srivastava y col. (43), mediante un procedimiento que permite el aislamiento de ALA-S no degradada determinaron un PM de 70.000, por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Por digestión con papaína, mostraron que esta proteína de PM 70.000 fue degradada a formas de tamaño molecular 56.000 sin pérdida de actividad. Estos autores establecen que la forma de PM 70.000 es aparentemente la forma intacta de la enzima. Estos mismos autores luego, haciendo una síntesis "in vitro" a partir de RNA de hígado de ratas tratadas con DDC, determinan que el PM mínimo de la enzima citosólica es de 76.000.

Los ensayos inmunológicos indican que ambas ALA-S, citosólica y mitocondrial son inmunológicamente idénticas (37, 46). En realidad, ALA-S citosólica es un precursor en tránsito a la mitocondria. La enzima es codificada por un gen nuclear y es sintetizada en los polirribosomas libres (57)

como un precursor citosólico (pre-ALA-S) de masa molecular mayor que la forma mitocondrial madura (45, 55, 58, 59). El precursor es procesado a la forma madura durante la translocación a la mitocondria (60) y por analogía con otros precursores mitocondriales se presume que la maduración ocurre a través del clivaje de una secuencia de aminoácidos N-terminales de dicho precursor.

La purificación y la determinación del PM de ALA-S de embrión de pollo ha sido intentada por numerosos laboratorios. Whiting y Granick (47) aislaron la enzima a partir de hígado de embrión de pollo tratados con AIA y DDC. Los valores de KM obtenidos fueron 2×10^{-6} M para Glicina y menor a 3×10^{-5} M para Succ-CoA. La solución de enzima muestra un espectro de absorción característico de enzimas conteniendo PPal con la presencia de una base a Schiff probablemente con el grupo E-NH₂ de un residuo lisina. El PM estimado por filtración molecular fué 87.000 y el PM de la subunidad fué 49.000 por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Tomita y col. (51) determinaron un PM de 250.000 por filtración molecular.

En hígado de embrión de pollo, ya sea cultivado o "in ovo", la actividad de ALA-S no se acumula apreciablemente en el citosol aún luego de extensiva inducción con AIA ó DDC (51, 57), determinado por métodos colorimétricos. Pero, Srivastava y col. (58) empleando un método radioquímico e inmunoprecipitación, encontraron que al igual que en ratas, ALA-S puede ser detectada en el citosol.

ALA-S purificada a partir de hígado de embrión de pollo tiene un PM de 49.000 (47). A partir de traducción en sistemas libres de células se ha demostrado que el producto primario de la traducción es un polipéptido de PM: 70.000 (61).

Ades y Harpe (59, 62) reportaron que ALA-S de hígado de embrión de pollo presente en mitocondrias tiene un PM de 65.000 \pm 2.000 y que la enzima parece ser sintetizada como un precursor de 75.000 daltons. Por otra parte, Borthwick y col. (48) reportaron que ALA-S purificada de mitocondrias tiene un PM de 68.000 y la enzima sintetizada "in vitro" usando poli A-RNA de hígado de embrión de pollo tiene un PM de 74.000 (58). La diferencia en los PM estimados por los distintos laboratorios pueden deberse a diferencias en las condiciones de electroforesis y proteínas marcadoras utilizadas.

La forma de PM 49.000 inicialmente reportada (47) es en realidad una forma activa pero parcialmente degradada de la enzima (59, 62). Esto fué confirmado haciendo una digestión con papaína, la enzima de PM 68.000 fué progresivamente degradada a 50.000 sin pérdida de actividad (48).

La enzima purificada aparentemente es un dímero formado por subunidades idénticas ya que por tratamiento con glutaraldehído se obtuvo un producto de entrecruzamiento de PM 140.000 (48). Esto fue corroborado por estudios de microscopía electrónica de la enzima purificada, observándose que está formada por dos subunidades idénticas y curvadas estimándose el PM de cada una en 70.000 (63).

Watanabe y col. (66) purificaron las formas madura y precursora de ALA-S, casi a homogeneidad, a partir de mitocondrias y citosol de hígado de pollo respectivamente. La enzima purificada a partir de mitocondria tiene un PM de subunidad de 65.000 y la enzima purificada a partir de citosol muestra un PM de 71.000, que es algo menor que el estimado para la enzima citosólica nativa (73.000). La forma citosólica parece ser degradada por alguna proteasa endógena durante la purificación. Por centrifugación en gradiente de sacarosa tanto la forma mitocondrial como la citosólica muestran un PM de 140.000, indicando que ambas existen como dímeros, más aún ALA-S recién sintetizada en un sistema libre de células también existe como dímero. Aparentemente, la secuencia extra de aminoácidos del precursor no afecta la estructura cuaternaria de la enzima.

Además, las propiedades cinéticas de las dos enzimas, así como el pH óptimo (7,6) y los valores de KM para glicina (4,8 mM) y Succ.CoA (2,7 μ M) fueron idénticos indicando que la secuencia extra tampoco afecta las propiedades catalíticas de ALA-S.

El pI de ALA-S citosólica fue 7,5, mientras que el de la enzima mitocondrial fue 7,1, lo cual indicaría que la secuencia extra debe ser relativamente rica en aminoácidos básicos. Esta presecuencia básica parece tener algún rol en la translocación de la proteína a la mitocondria.

Recientemente, se ha reportado el aislamiento de clones cDNA conteniendo la secuencia codificante para ALA-S de hígado de embrión de pollo (65). Se ha podido determinar así la secuencia primaria completa del precursor de ALA-S deducido

a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA (66).

El precursor de 70.029 daltons consiste de 635 aminoácidos e incluye una presecuencia N-terminal de 56 aminoácidos de masa molecular 6.100. La proteína madura consiste de 579 aminoácidos y tiene una masa molecular de 63.903 daltons. Los PM estimados aquí son compatibles con los valores determinados electroforéticamente para la proteína purificada (48, 58, 59, 62).

El gen para ALA-S de levadura también ha sido secuenciado (67) y la secuencia de aminoácidos indica que existe homología entre las formas maduras de ALA-S de levadura y embrión de pollo. La enzima de levadura consiste de 548 aminoácidos con una presecuencia más corta, de 30-35 residuos, también de carácter básico.

Por otra parte, los análisis preliminares de secuencia de un cDNA para ALA-S de rata muestran un alto grado de homología con la enzima de pollo (66). La presecuencia de ALA-S se asemeja en su naturaleza altamente básica a otras preproteínas mitocondriales, tales como ornitina carbamoiltransferasa (68) y algunos precursores de proteínas mitocondriales de células linfoides (69). El significado del carácter básico de estas presecuencias no está claro, pero es probable que jueguen un rol en la interacción de los precursores con receptores de la membrana externa durante el proceso de translocación de la proteína a la mitocondria (70).

Ha sido sugerido que las regiones homólogas presentes en las presecuencias funcionan como señales para el trans-

porte de las proteínas a través de la membrana mitocondrial. Durante el transporte a la mitocondria, los precursores son clivados por una proteasa localizada en la matriz (71). Una comparación de los sitios de clivaje de los precursores mitocondriales (70, 72) revela que la proteasa no reconoce una unión específica sino que el corte se produce después de un aminoácido no cargado. Esto también se observa para pre ALA-S de embrión de pollo, donde el corte ocurre después de un residuo de glutamina.

En un trabajo reciente, se ha reportado el aislamiento del gen para ALA-S de pollo y la determinación de su secuencia nucleotídica (73). El gen estructural tiene una longitud de 6,9 kilobases y está dividido en 10 exones de 156 a 280 pares de bases, separados por 9 intrones de longitud variable. Los 10 exones contienen 2103 nucleótidos y codifican la proteína precursora de 635 aminoácidos. Comparando con la secuencia del gen para ALA-S de *Rhizobium melitoli*, reportada por Leong y col. (74), se ha deducido que el sitio activo de la enzima de pollo está codificada por los exones 4 a 10, el exón 1 define la presecuencia mitocondrial y la función de los dominios codificados por los exones 2 y 3 no está determinada aún.

A pesar de todo lo que se conoce de ALA-S hepática, tanto a nivel protéico como molecular, mucho menos se sabe acerca de la enzima de células eritroides. Algunos reportes indican que ALA-S eritroide es diferente de su contrapartida hepática.

Bishop y col. (75) encontraron que las enzimas de tejido eritroide y no eritroide de cobayos se comportan en forma diferente en cuanto a propiedades cinéticas y unión a ligandos, sugiriendo la existencia de isoenzimas.

Watanabe y col. (76) presentaron evidencias que en pollos, ALA-S aislado de hígado y de reticulocitos son diferentes en base a diferencias halladas en propiedades inmunológicas y tamaño molecular. Encontraron que mientras ALA-S sintetizada "in vitro" a partir de polisomas de células eritroides mostró un PM de subunidad de 55.000, la enzima hepática sintetizada "in vitro" tuvo un PM de 73.000. Por otra parte, mientras ALA-S aislada de mitocondrias de células eritroides mostró un PM de 53.000, la enzima de mitocondrias de hígado presentó un PM de 65.000. A pesar que tanto la enzima hepática como la eritroide son sintetizados como precursores de mayor tamaño, ALA-S eritroide sintetizado "in vitro" fué aproximadamente 18.000 daltons más pequeña que la hepática sugiriendo que el mRNA para la enzima eritroide difiere del m-RNA para la enzima hepática.

Posteriormente, Yamamoto y col. (77) reportaron la existencia de distintos mRNAs de diferentes tamaños codificantes para la enzima de hígado, reticulocitos, cerebro y otros tejidos de pollos, sugiriendo la existencia de una familia multigénica para ALA-S.

En contraste a este reporte, Elferink y col. (78) hallaron que el mRNA para ALA-S de hígado y reticulocitos de pollo son idénticos y mostraron que una sola especie de mRNA

está presente en hígado, reticulocitos, cerebro y corazón de pollo. Los resultados indican la existencia de sólo una copia del gen para ALA-S en el genoma haploide del pollo, sugiriendo que la enzima está codificada por un único gen que se expresa como una única especie en todos los tejidos. Este hallazgo ha sido reportado también para ALA-S de ratones encontrándose que el mRNA de hígado, bazo y células de eritroleucemia son del mismo tamaño (79) siendo improbable la existencia de diferentes isoenzimas.

Como se dijo al inicio, ALA-S cataliza la condensación de glicina y Succ-CoA para dar ALA en una reacción dependiente de PPal como cofactor (Figura 6).

Kikuchi y col. (20) postularon un mecanismo para la reacción que involucra un ataque nucleofílico del carbanión de glicina, estabilizado por la formación de una base de Schiff con PPal unido a la enzima, sobre el átomo de C carbonílico de Succ. CoA para formar el ácido α -amino- β -cetoadípico y finalmente la formación de ALA por descarboxilación del grupo COOH de glicina.

Akhtar y col. (80) han mostrado que el átomo de H pro R de la posición 2 de glicina es removido originando el carbanión y el átomo pro S es retenido y ocupa la configuración pro S 5 de la molécula de ALA.

Se ha reportado que la formación de una unión base de Schiff entre la enzima y su cofactor PPal es el primer evento de la reacción enzimática. Scholnick y col. (52) por estudios con ALA-S de hígado de rata, postularon la formación

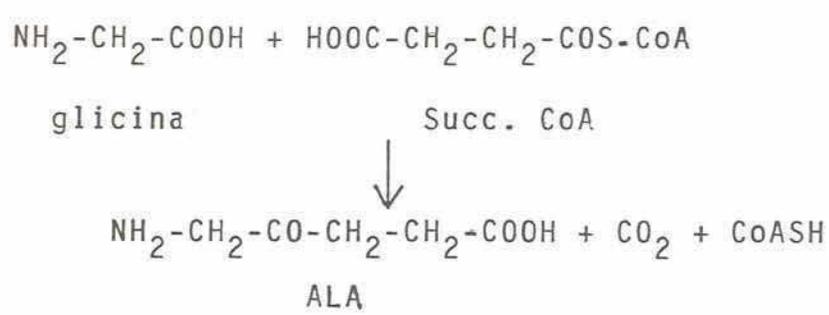


Figura 6: Reacción de formación de ALA catalizada por ALA-S.

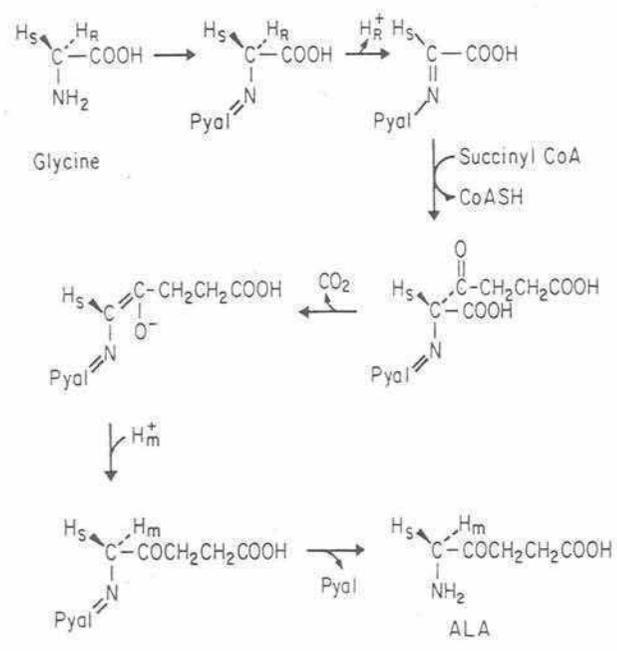


Figura 7: Mecanismo de la reacción de ALA-S propuesto por Akhtar y col. (80).

de un tiohemiacetal por reacción del PPal con un grupo SH del sitio activo.

Nandi (81) y Davies y Neuberger (82) postularon que el PPal está unido a ALA-S como un imino a un grupo E-NH₂ de lisina. Este grupo NH₂ es entonces desplazado por glicina para formar una segunda base de Schiff por una reacción de transiminación.

En la Figura 7 se muestra la reacción de formación del complejo Enzima-PPal-Glicina y el probable mecanismo de la formación de ALA catalizado por ALA-S, propuesto por Akhtar y col. (80).

I.2. Biosíntesis de PBG.

ALA-dehidrasa (ALA-D) o también llamada PBG-sintetasa, la segunda enzima del camino biosintético del hemo, cataliza la condensación asimétrica de dos moléculas de ALA para formar PBG (83, 84).

Como se observa en la Figura 8, una molécula de ALA da la cadena propiónico del PBG, siendo su N incorporado al anillo pirrólico, mientras que la otra molécula de ALA forma la cadena acético reteniendo su grupo NH₂ libre.

El PBG es el monopirrol precursor de hemo, clorofilas y corrinas (85, 86).

ALA-D ha sido purificada de varias fuentes incluyendo hígado de bovinos (87- 89), de ratones (90) y de perros (91) bacterias fotosintéticas (92) y eritrocitos humanos (93-96).

La enzima de mamíferos tiene un PM alrededor de 280.000,

es un octámero compuesta por 8 subunidades iguales de PM 35.000 (91, 93, 96, 97).

La enzima purificada de eritrocitos humanos tiene un pH óptimo de 6.6 a 6.8 (93, 95) y el K_M aparente para el sustrato ALA es 2.87×10^{-4} M (95).

Las dehidrasas de todas las fuentes estudiadas requieren la presencia de un tiol exógeno, así como 2-mercaptoetanol, ditiotreitól o ditioeritritól, para la máxima actividad catalítica (83). En ausencia de estos reactivos, el oxígeno causa una inactivación reversible de la enzima que puede ser revertida cuantitativamente por reincubación de la enzima oxidada con tioles.

La alta sensibilidad al oxígeno está relacionada a la presencia de 32 grupos tiólicos reactivos por octámero, 4 por subunidad, de los cuales 2 son cisteínas altamente reactivas (98-102), y esenciales para la actividad y estabilidad de la enzima.

La enzima de mamíferos requiere Zn^{2+} para la máxima actividad catalítica (100, 102-106) y estudios con $^{65}Zn^{2+}$ han mostrado que 8 moles de Zn^{2+} se unen por mol de octámero. El tratamiento de la enzima con oxígeno o con reactivos para tioles causa liberación de $^{65}Zn^{2+}$ e inactivación de la enzima revelando la importancia de la disponibilidad de grupos tioles libres, para la unión del Zn^{2+} (98).

En un trabajo reciente, Hasnain y col. (107) usando espectroscopía de absorción de rayos X, con ALA-D de eri-

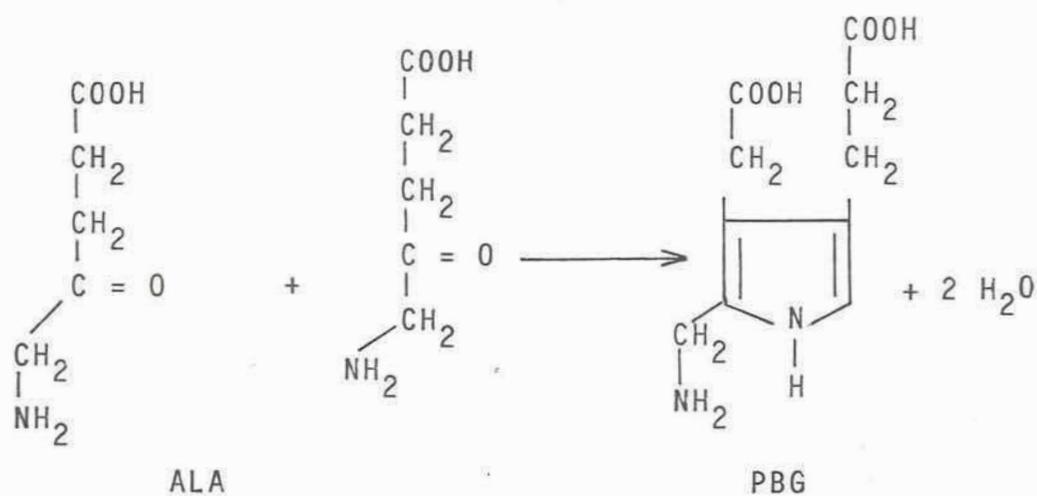


Figura 8: Reacción de formación de PBG a partir de ALA.

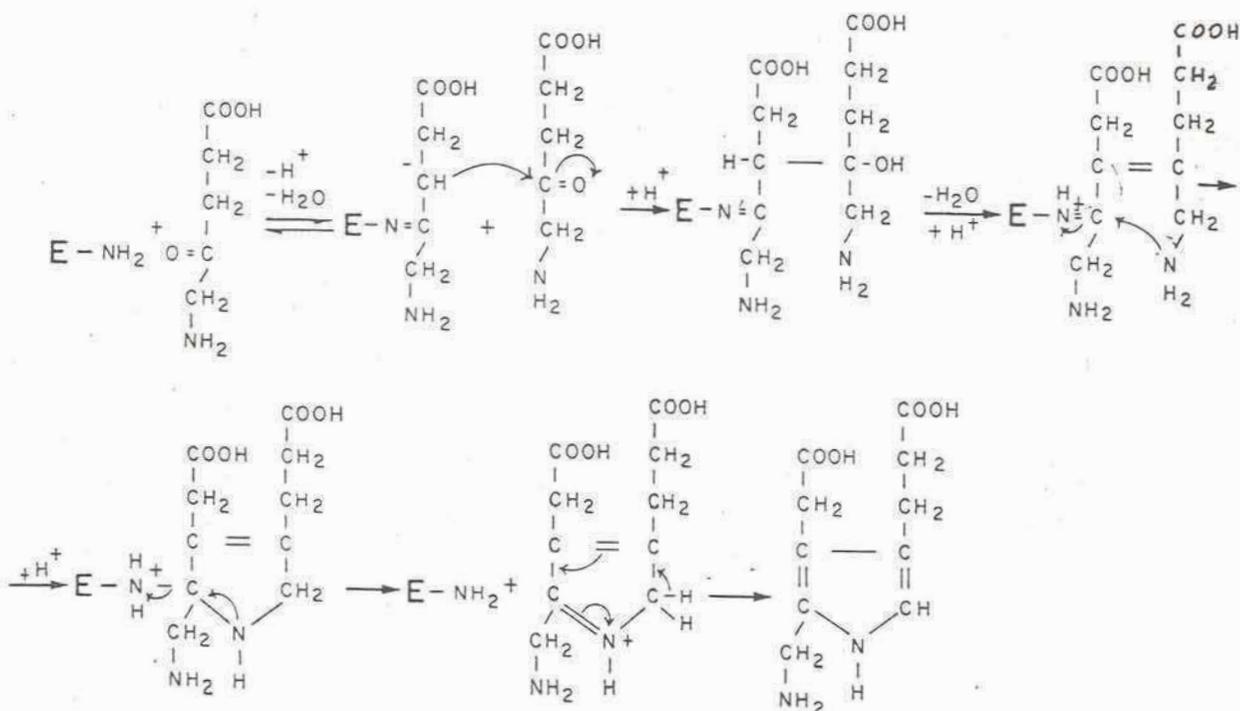


Figura 9: Mecanismo de la síntesis de PBG propuesto por Nandi y Shemin (111).

trocitos humanos conteniendo 8 átomos de Zn por octámero, establecieron que el Zn^{2+} está coordinado a 3 átomos de azufre y sugieren que el Zn^{2+} tiene un rol estructural más que catalítico.

ALA-D humana es notoria por su extrema sensibilidad a iones Pb^{2+} , la actividad de la enzima eritrocitaria está dramáticamente disminuída aún en individuos que tienen baja concentración de Pb^{2+} en sangre (108, 109).

Recientemente, se ha clonado el c-DNA para ALA-D de hígado humano y a partir de la secuencia de nucleótidos se predijo la secuencia de aminoácidos que resultó esencialmente colineal con la secuencia de ALA-D bovino (110).

La síntesis de PBG, a partir de dos moléculas de ALA, requiere una condensación aldol, la eliminación de una molécula de agua y la formación de una base de Schiff con la eliminación de otra molécula de agua.

Nandi y Shemin, estudiaron el mecanismo de esta reacción usando la enzima de *Rhodopseudomonas spheroides* (111). Propusieron que una molécula de ALA forma una base de Schiff con un residuo de lisina del sitio activo de la enzima. Esto es seguido por un ataque nucleofílico del carbanión intermedio sobre el átomo de C carbonílico de una segunda molécula de ALA. El aldol resultante pierde agua y el grupo amino de la segunda molécula de sustrato desplaza el grupo amino de la enzima (Figura 9).

Según estos autores, la molécula de ALA que luego dará la cadena acético del PBG es la que forma la base de Schiff con la enzima.

La observación de este mecanismo sugiere el requerimiento de varias secuencias de protonación/desprotonación catalizadas por un residuo particular. El hallazgo de residuos cisteína de alta reactividad sugieren que éstos grupos podrían participar en la catálisis ácido-base (99). Cada grupo, posiblemente anióntiolato y tiol, pueden alternar su estado ácido-base. Una forma conveniente de alcanzar ésto es interponiendo un puente imidazol para regenerar el estado requerido. Consistente con esta sugestión, es la observación que un residuo histidina es esencial para la catálisis de ALA-D (89).

En base a estas consideraciones y teniendo en cuenta el mecanismo de Nandi y Shemin, Barnard y col. (99) proponen un mecanismo que involucra una desprotonación inicial de la molécula de ALA del sitio A, posiblemente por un tiolato y la protonación del grupo carbonilo del sitio P posiblemente por un tiol. El estado inicial del anióntiolato y el tiol son regenerados por mediación de puente imidazol.

ALA-D tiene ocho subunidades, pero sólo cuatro reaccionan con ALA y producen una base de Schiff (84). Aparentemente, la estructura mínima necesaria para la actividad catalítica es un dímero funcional formado por dos subunidades que a pesar de tener posiblemente similar composición, juegan un rol diferente en la síntesis de PBG, (112). Teniendo en cuenta esta observación y además el rol de histidina en la transferencia de protones desde y hacia el centro activo, Batlle y Stella (113) postularon el mecanismo que se muestra en la Figura 10.

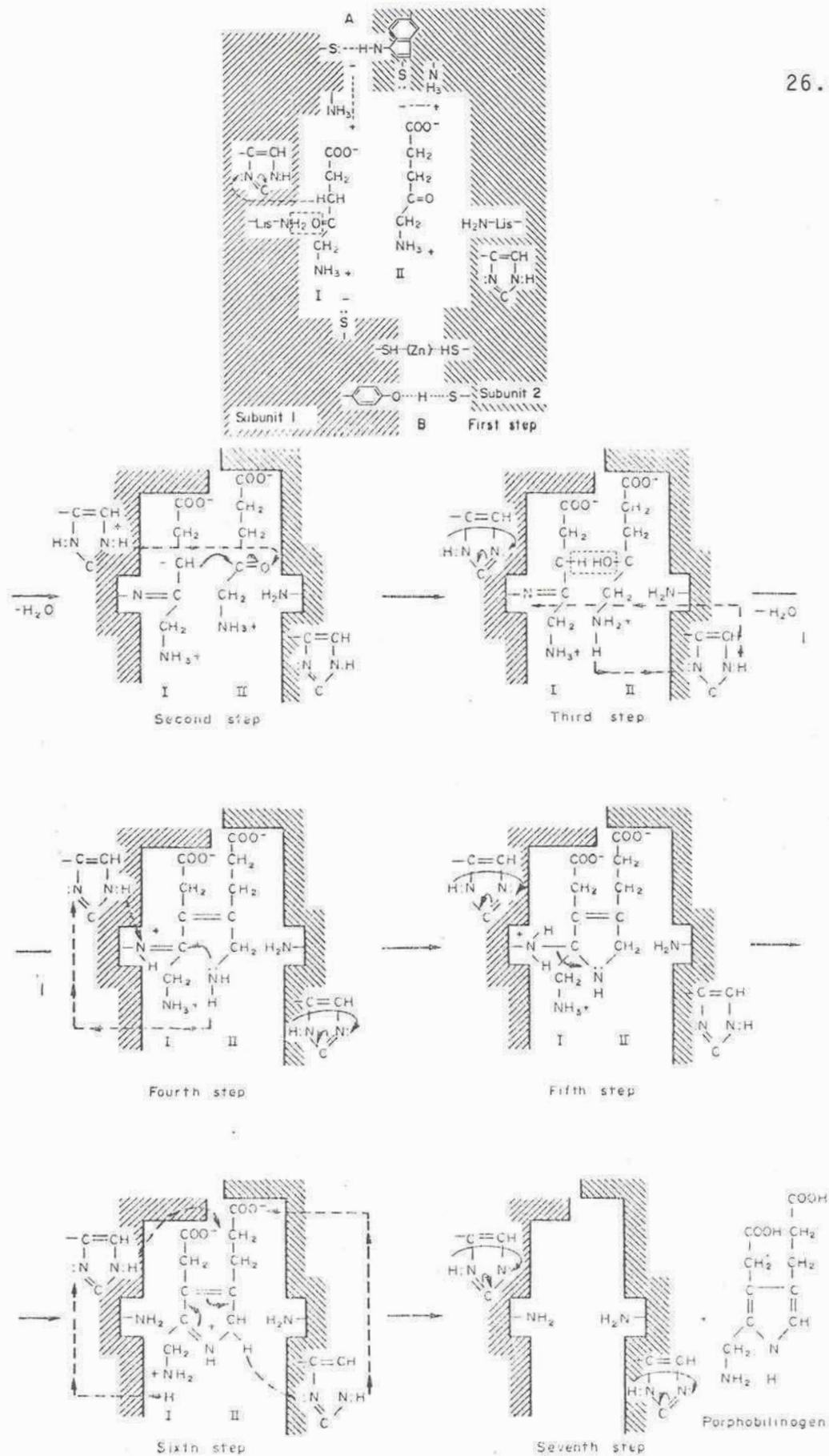


Figura 10: Esquema de la formación enzimática de PBG según Batlle y Stella (113).

Más recientemente, trabajando con la enzima de hígado bovino, se ha determinado que la enzima de mamíferos también forma una base de Schiff con una de las moléculas de sustrato (114).

Jordan y Seehra (115, 116), en base a sus estudios con la enzima de hígado bovino, proponen un mecanismo para la reacción enzimática en la cual la primer molécula de ALA, que forma la base de Schiff con la enzima, es incorporada en el pirrol del lado que contiene la cadena ácido propiónico (Figura 11). Estos mismos autores reportaron que la enzima de *Rhodopseudomonas spheroides* sigue la misma secuencia de unión de las dos moléculas de sustrato que la enzima de mamíferos (116). Recientemente, Jordan y Gibbs (117) confirmaron este mecanismo trabajando con la enzima de eritrocitos humanos.

I.3. Biosíntesis de Uroporfirinógeno III.

La biosíntesis del tetrapirrol Uro'gen III a partir de PBG está catalizada por el complejo Porfobilinogenasa (PBG-asa) formado por dos enzimas: la PBG-deaminasa (PBG-D) o Uro'gen I sintetasa (Uro-S) ó Hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) y la Isomerasa o Uro'gen III cosintetasa (Uro-CoS) (85) Figura 12.

El rol de la PBG-D es unir 4 moléculas de PBG para formar un tetrapirrol lineal, que es liberado de la enzima como hidroximetilbilano. Este bilano es el sustrato de Uro-CoS, cuya función es ciclar el bilano lineal con reordenamiento intramolecular del anillo D para dar Uro'gen III. En ausencia

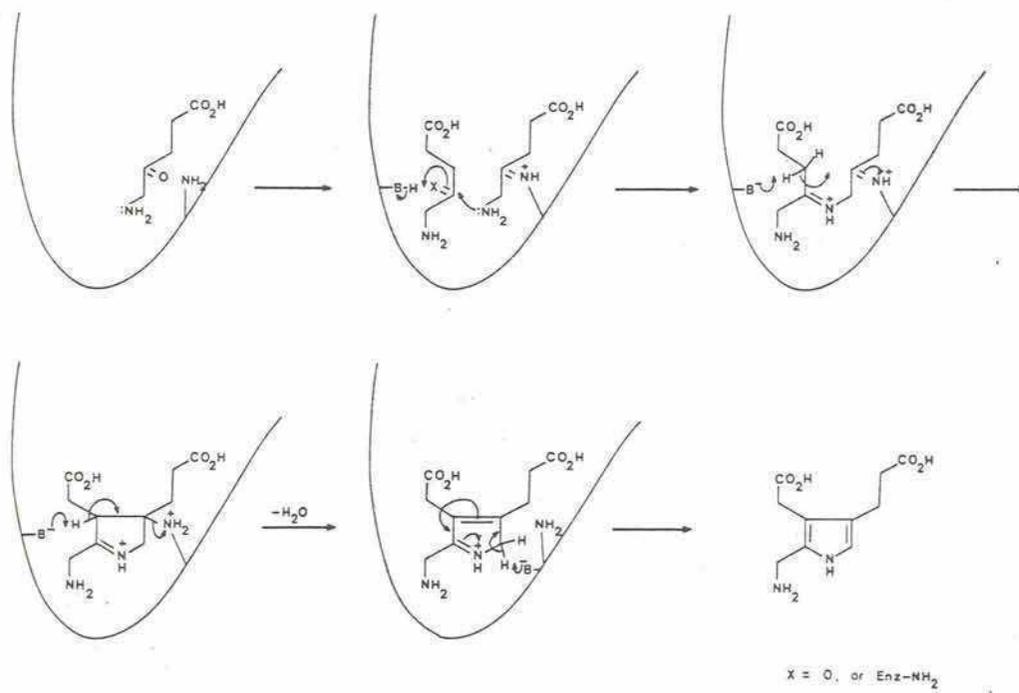


Figura 11: Mecanismo de la síntesis enzimática de PBG
propuesto por Jordan y Seehra (116).

de la enzima termolábil, Uro-CoS, se obtiene Uro'gen I.

PBG-D ha sido purificada y caracterizada a partir de diversas fuentes (118-131). Los valores de PM reportados por los distintos autores son similares. Se ha determinado un PM de 36.000 para la enzima de *Rhodopseudomonas spheroides* (122, 123), 38.000-40.000 para hojas de espinaca (125), 40.000 para callos de soja (120) e hígado bovino (119), 43.000 para bazo de ratón (131), 44.000 para eritrocitos bovinos (128), 40.000-41.000 para *Euglena gracilis* (129, 130) y 36.000-38.000 (127) y 44.000 (128) para la enzima de eritrocitos humanos, aunque para ésta última fuente también ha sido informado un PM de 25.000 (124).

Cabe destacar que Rossetti y col. (129) detectaron, además de la forma de 40.000, una forma activa de *Euglena gracilis* de PM 20.000, y sugieren que en solución la PBG-D existe normalmente como un dímero de dos subunidades iguales de PM 20.000, valor que se acerca al informado por Frydman y Feinstein para la enzima de eritrocitos humanos (124).

El pH óptimo de la enzima fué 7.2 en callos de soja (120), 7.6 en *Rhodopseudomonas spheroides* (123) y 8.2 en eritrocitos humanos (127), para esta última fuente se ha determinado un K_M para el sustrato de 6×10^{-6} M que es del orden del reportado para la enzima de bazo de ratón 2.59×10^{-6} M (131).

La Uro-CoS también ha sido parcialmente purificada a partir de numerosas fuentes (119, 124, 125, 132, 133) y pre

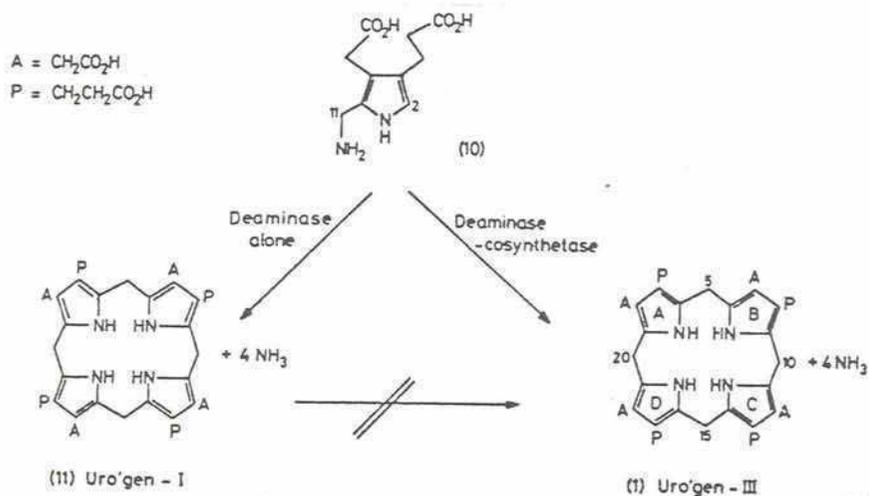


Figura 12: Biosíntesis de Uroporfirinógeno I y III.

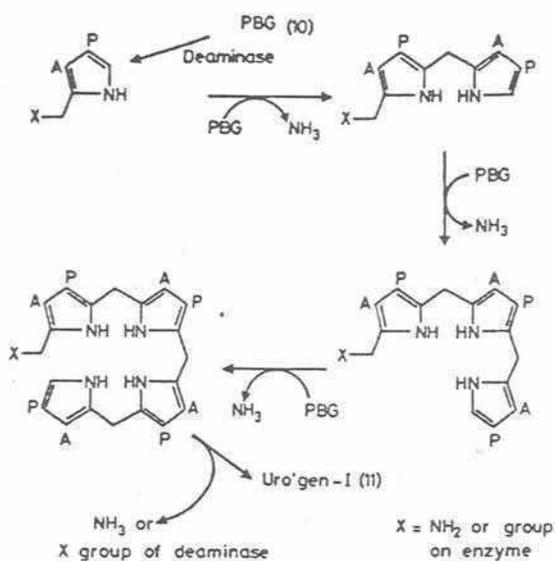


Figura 13: Secuencia de formación de Uro'gen I por PBG-D según Battersby y McDonald (137).

paraciones homogéneas de la enzima se han obtenido a partir de hígado de rata (134), *Euglena gracilis* (135) y eritrocitos humanos (136),

Para la enzima de *Euglena gracilis*, Hart y Battersby (135) hallaron un PM de 38.500 por filtración molecular y 31.000 por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Esto claramente indica que es monomérica. El valor del PM es semejante al reportado anteriormente por Rossetti y col. (129), aunque es mucho menor que el valor de 62.000 hallado para la enzima de germen de trigo (125).

Para la enzima de hígado bovino (126) y de eritrocitos humanos (136) se ha reportado un PM de 30.000 y para Uro-CoS de hígado de ratas se ha hallado un PM de 42.000 (134).

Las variaciones de PM pueden reflejar diferencias entre las enzimas aisladas de distintas fuentes o también, pueden deberse al grado de agregación de Uro-CoS (129).

Kohashi y col. (134) han reportado que la Uro-CoS aislada de hígado de rata contiene un derivado tetrahydrofolato y que éste puede actuar como una coenzima para la biosíntesis de Uro'gen III. Por el contrario, Hart y Battersby (135) concluyen que la enzima de *Euglena gracilis* no contiene ni requiere un folato como cofactor. Es probable que la Uro-CoS de hígado de rata difiera en su mecanismo y utilice folato.

Para la enzima de *Euglena gracilis* se ha reportado un valor de K_M de $12-40 \times 10^{-6}$ M (135) para hidroximetilbilano

que es del orden del valor hallado para la enzima de eritrocitos humanos, $5-20 \times 10^{-6}$ M (136).

Aparentemente un residuo Arginina y posiblemente también en residuo Lisina son esenciales para la actividad (135).

El mecanismo de formación de Uro'gen III a partir de PBG, catalizado por el sistema Deaminasa-Cosintetasa ha sido objeto de un amplio estudio por varios laboratorios.

El grupo Battersby (137) trabajando con la enzima de *Euglena gracilis* ha demostrado que las 3 moléculas de PBG que proveen los anillos A, B y C del Urógen III son incorporados intactos en tanto que la cuarta molécula que formará el anillo D sufre un reordenamiento intramolecular. Estos autores sugieren una secuencia para la formación de Urógen I por PBG-D, consistentes con el conocimiento que esta enzima efectúa la condensación cabezocola de las 4 unidades de PBG (Figura 13).

Berry y Jordan (138) y Battersby y col. (134) han establecido que la enzima une las moléculas de PBG en forma secuencial y ordenada comenzando por el anillo A, seguido por B, C y finalmente D. El residuo de PBG que forma el anillo A es el único que se une covalentemente a la enzima, posiblemente la unión sea a través de un grupo E-NH₂ de un residuo Lisina (139). Los distintos intermediarios de la reacción catalítica involucrando 1,2 ó 3 unidades pirróllicas unidas a PBG-D pueden ser separados electroforéticamente (127, 140).

Uro-CoS debe producir el reordenamiento del anillo D sobre un intermediario formado por PBG-D o bien, modificando el modo por el cual la PBG-D lleva a cabo uno de los pasos de condensación, para dar Uro'gen III.

Battersby y McDonald (137) demostraron que el reordenamiento no ocurre a nivel de monopirrol.

El grupo de Frydman (141-143) y posteriormente Scott (144) sugirieron que el reordenamiento para producir Uro'gen III ocurría a nivel de dipirrol.

El grupo de Battersby (145, 146) encontró que en presencia de PBG-D-Uro-CoS, dos moléculas del dipirrol AP-AP pueden combinarse y reordenarse de manera altamente específica para generar Uro'gen III. Estos autores presentaron claras evidencias que el reordenamiento del anillo D ocurre a nivel del tetrapirrol y sugirieron que un bilano no ordenado es un precursor clave en la biosíntesis del Uro'gen III (137).

Burton y col. (147) postularon que el rol de PBG-D es formar un intermediario de muy corta vida, el preuroporfirinógeno (pre-Uro'gen), el cual actuaría como sustrato para Uro-CoS. El pre-Uro'gen es un tetrapirrol cíclico que en ausencia de Uro-CoS se reordena espontáneamente a Uro'gen I (Figura 14).

Posteriormente, Battersby y col. (148, 149) propusieron que un tetrapirrol lineal no ordenado, el hidroximetilbilano, es el verdadero intermediario y no el pre-Uro'gen cíclico. El rol de PBG-D es unir las 4 moléculas de PBG para

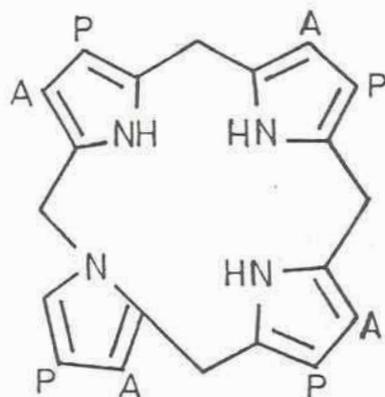


Figura 14: Estructura del Pre Urogen (147).

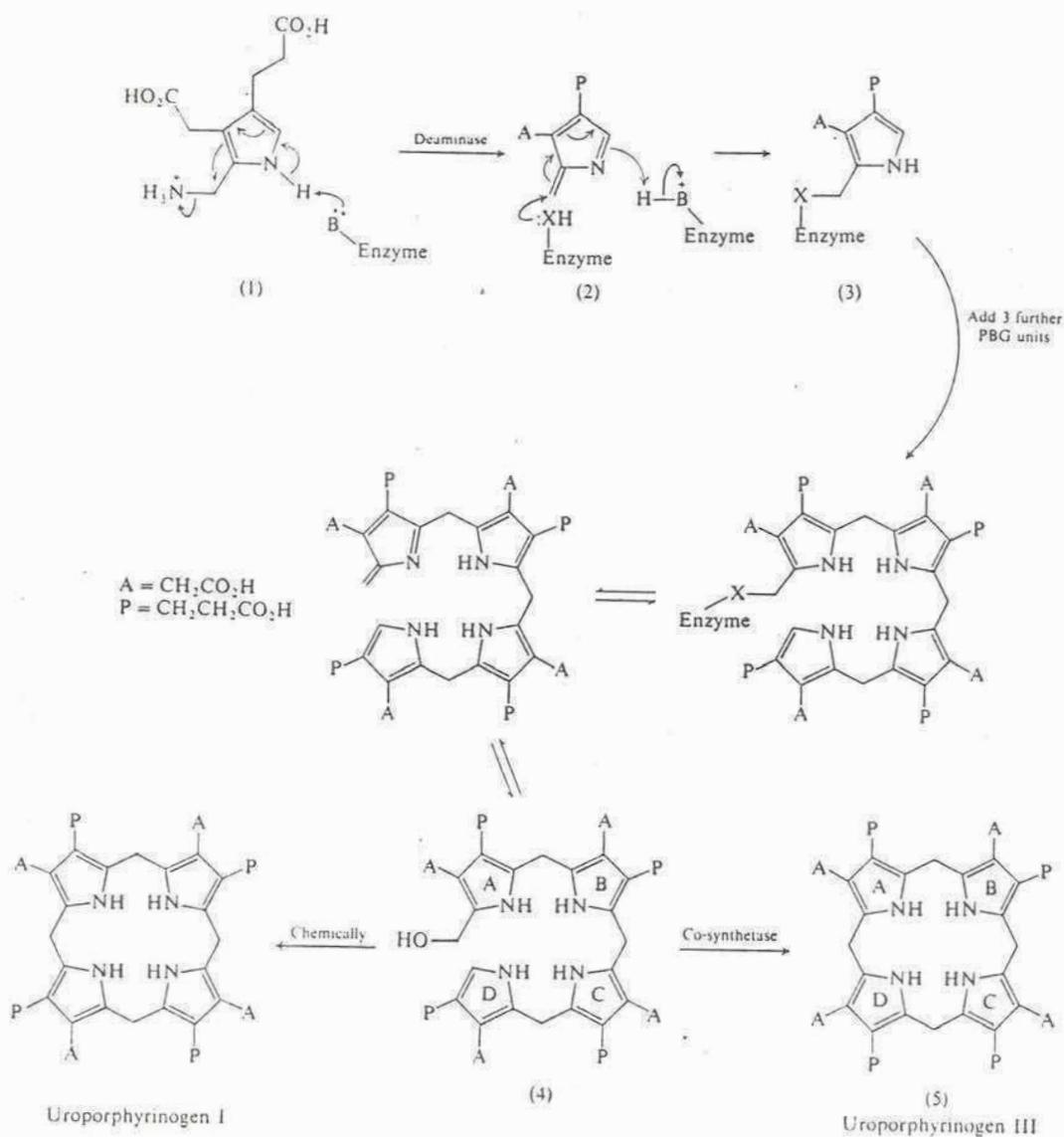


Figura 15: Biosíntesis de Uro'gen I y III propuesto por Hart (139).

formar un tetrapirrol lineal no ordenado, el cual es liberado de la enzima como hidroximetilbilano. Este es el sustrato para Uro-CoS, cuya función es ciclar el bilano lineal con un concomitante reordenamiento del anillo D para formar Uro'gen III. En la Figura 15 se muestra el esquema propuesto por Hart para la biosíntesis de Uro'gen I y III reuniendo los conocimientos disponibles hasta el momento (139).

I.4. Transformación de Uroporfirinógeno III en Coproporfirinógeno III.

Uro'gen III (8-COOH) es convertido en Copro'gen III (4-COOH) por la enzima citosólica Porfirinógeno carboxilasa (PCL) también llamada Uroporfirinógeno decarboxilasa. Esta enzima cataliza la decarboxilación secuencial de las cadenas laterales acético del Uro'gen III, pasando por los porfirinógenos intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicos, dando Copro'gen III como producto final (150-153); también cataliza la decarboxilación de la serie I (150, 153).

La enzima ha sido parcialmente purificada y caracterizada a partir de *Rhodopseudomonas spheroides* (154) y *Rhodopseudomonas palustris* (155), eritrocitos de ave (153, 156), bazo de ratón (157), hojas de tabaco (158), eritrocitos humanos (159, 160) e hígado de rata (161-163).

En los últimos años, se han logrado obtener preparaciones homogéneas de PCL a partir de hígado bovino (164), eritrocitos humanos (165, 166) y eritrocitos de pollo (167).

El PM aparente de la enzima nativa de eritrocitos hu-

manos, aislada a partir de sangre fresca fué 58.000 determinado por filtración molecular (160, 165, 166). Cuando se utilizó una preparación enzimática purificada a partir de sangre envejecida, el PM aparente fué significativamente menor (50.000) (165, 166). Por electroforesis en gel de poliacrilamida se obtuvo unPM de 46.000 (165, 166) y 39.500 (160). Estos datos sugieren que la proteína enzimática es monomérica.

En concordancia con lo anterior, la enzima de hígado bovino mostró un PM de 56.000-58.000 determinado por filtración molecular o electroforesis (164) y el PM de la enzima purificada a partir de *Rhodopseudomonas palustris* fué 46.000 por filtración molecular (155).

En cambio PCL purificada a partir de eritrocitos de pollo parece ser dimérica ya que la enzima nativa tuvo un PM de 79.000, en tanto que en electroforesis en condiciones desnaturalizantes reveló un PM de 39.700 (167).

El pH óptimo para la decarboxilación de los porfirinógenos de la serie III fué 6.8 en todos los casos (165, 167). En cambio para los porfirinógenos de la serie I, De Verneuil y col. (165) determinaron para la enzima de eritrocitos humanos, un pH óptimo igual a 6.2 para la decarboxilación de Uro'gen I y 5,4 para Penta'gen I.

Los valores de K_M determinados a pH 6.8 fueron 0.8 μ M para Uro'gen I, 0.35 μ M para Uro'gen III, 0.07 μ M para Penta'gen I y 0.05 μ M para Penta'gen III (165).

La actividad enzimática es inhibida por reactivos modificadores de tioles (150, 158, 160, 164-168) indicando que al menos un grupo tiol estaría involucrado en el proceso de decarboxilación.

La enzima no requiere metales ni cofactores demostrables (167, 168).

La actividad de la enzima de hígado bovino fué disminuída por iones metálicos bivalentes como Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} (164). La enzima de eritrocitos humanos se vió fuertemente inhibida por Hg^{2+} , Pt^{2+} y Cu^{2+} pero no fue afectada por Fe^{2+} o Fe^{3+} (165).

Respecto al efecto del Fe^{2+} sobre la PCL, hay informes conflictivos. Kushner y col. (169) fueron los primeros en reportar inhibición de PCL de hígado de cerdo por Fe^{2+} en presencia de O_2 y cisteína. Recientemente se ha reportado que el Fe^{2+} inhibe la enzima de hígado bovino altamente purificada (164), la enzima de hígado de ratón (170) y de *Rhodopseudomonas palustris* (168). Otros reportes han mostrado que el Fe^{2+} activa (171) o no tiene efecto (172, 173). Mukerji y col. trabajando con enzima parcialmente purificada de hígado de rata han encontrado que el Fe^{2+} inhibe en ausencia o presencia de O_2 y la cisteína protege la enzima solo en condiciones estrictamente anaeróbicas (174).

Las sucesivas decarboxilaciones de Uro'gen son catalizadas por una única proteína que tendría más de un sitio activo (153, 155, 159, 164, 165). De Verneuil y col. (175) estudiando las propiedades cinéticas de PCL de eritrocitos hu-

manos postula que los porfirinógenos de ambas series isoméricas con el mismo número de carboxilos son decarboxilados en el mismo sitio activo, pero la decarboxilación secuencial del Uro'gen para dar Copro'gen ocurre en cuatro diferentes sitios activos.

Se ha establecido que la decarboxilación de Uro'gen III ocurre en forma ordenada en el sentido de las agujas del reloj comenzando por la cadena acético del anillo D y siguiendo por los anillos A, B y finalmente C (176) (Figura 16). Por el contrario, las 4 reacciones de decarboxilación del Uro'gen I parecen ocurrir al azar (177).

Muchos investigadores han reportado que Uro'gen III es decarboxilado a Copro'gen a mayor velocidad que Uro'gen I (150, 154, 155, 166, 175, 178-181), aunque algunos autores no encuentran diferencias entre ambos isómeros (157, 169).

Ha sido sugerido que la conversión total de Uro'gen III a Copro'gen III es cinéticamente un proceso bifásico en el cual el primer grupo carboxilo es eliminado a mayor velocidad que los tres siguientes (153, 155, 175, 178-182). Las dos etapas son susceptibles en forma diferente a condiciones tales como precalentamiento, alta concentración de ClNa, O_2 y GSH (153, 156).

Barnard y Akhtar (183) estudiaron el curso esteroquímico de la reacción y mostraron que la misma procede con retención de la configuración de los carbonos metilénicos de las cuatro cadenas laterales del acetato. Estos autores pro

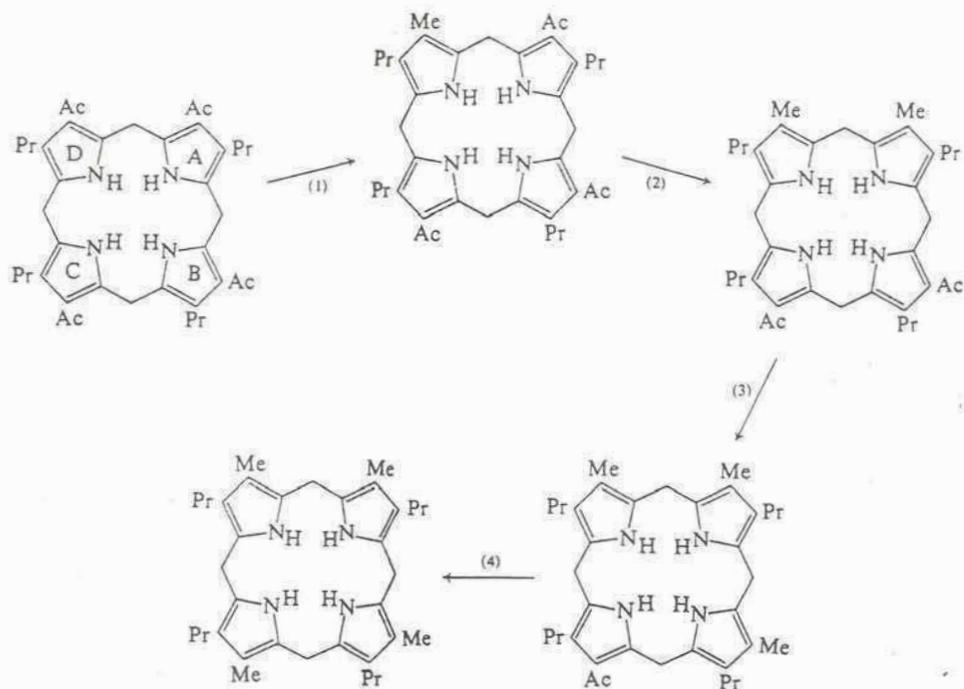


Figura 16: Decarboxilación secuencial de Uro'gen III catalizado por PCL (176).

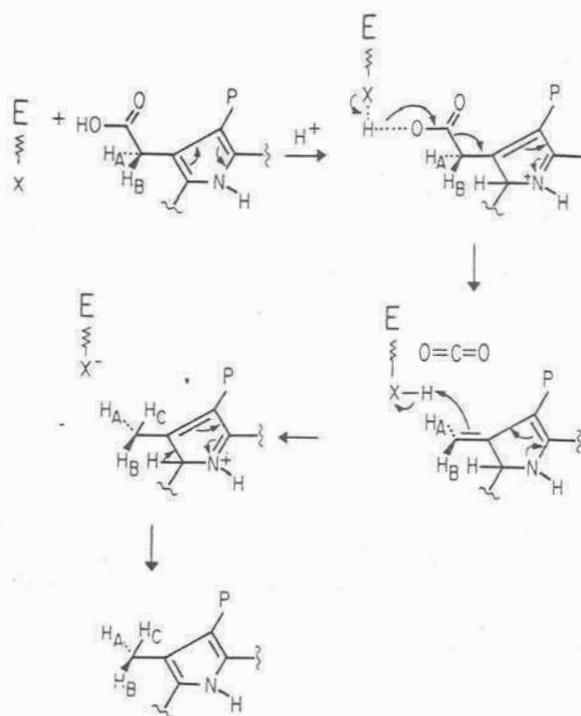


Figura 17: Mecanismo de decarboxilación de los grupos acético de Uro'gen para dar Copro'gen de acuerdo a Barnard y Akhtar (183).

ponen un posible mecanismo para la reacción de decarboxilación que se muestra en la Figura 17.

La presencia de un grupo tiol en el centro activo, es compatible con este mecanismo de protonación-desprotonación (152).

Cabe señalar que recientemente se ha logrado clonar y secuenciar el cDNA completo que codifica para PCL humana y la secuencia aminoacídica deducida concuerda con la composición de la enzima purificada (184).

PCL es una enzima clave en la porfiria inducida por compuestos clorados, así se la ha hallado disminuída por hexa clorobenceno (HCB) (185-187), tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (180, 188, 189), bifenilos policlorados (167, 190) y metabolitos del HCB (191).

I.5. Transformación de Coproporfirinógeno III en Protoporfirinógeno IX.

Coproporfirinógeno oxidasa (Copro-O) es la enzima que cataliza la decarboxilación oxidativa de las cadenas ácido propiónico de las posiciones 2 y 4 del Copro'gen III a grupos vinílos, dando Proto'gen IX (Figura 18).

En hígado, Copro-O fué localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria (192, 193), en cambio en levaduras parece estar localizada en el citosol de la célula (194).

Esta enzima fué estudiada y purificada a partir de hígado de rata (195, 196), hígado bovino (197) y levaduras (194, 198).

Yoshinaga y Sano (197) purificaron la enzima de hígado bovino a homogeneidad y encontraron que es un monómero de PM 71.600. El estudio de la enzima reveló que no contenía grupos prostéticos así como hemo o flavina y tampoco se detectó la presencia de metales. Reactivos de grupos sulfhídricos, metales o quelantes de metales no afectan la actividad enzimática por lo tanto, ni grupos tiólicos ni metales están involucrados en el sitio activo de Copro-0.

Se determinó un pH óptimo igual a 7.4 y el valor de K_M para Copro'gen III fué 48 μ M. El oxígeno fué requerido obligatoriamente para la actividad enzimática y no pudo ser reemplazado por otro oxidante.

La enzima purificada fué activada por un extracto crudo de fosfolípidos extraídos de mitocondria de hígado así como por fosfolípidos comerciales.

Recientemente Camadro y col. (194) han logrado purificar a homogeneidad la enzima de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El PM determinado por filtración molecular fue 70.000, que es cercano al PM reportado para la enzima purificado de hígado bovino (197). Sin embargo, el análisis en gel de poliacrilamida con SDS revela un PM de 35.000, sugiriendo que la enzima es un dímero.

La enzima purificada mostró un pH óptimo igual a 7.6 y un valor de K_M de 0,05-0,1 μ M para Copro'gen. Fueron detectados 2 átomos de Fe por mol de proteína nativa y un grupo sulfhídrico fué necesario para la actividad catalítica.

La enzima fué activa sólo cuando el Oxígeno molecular

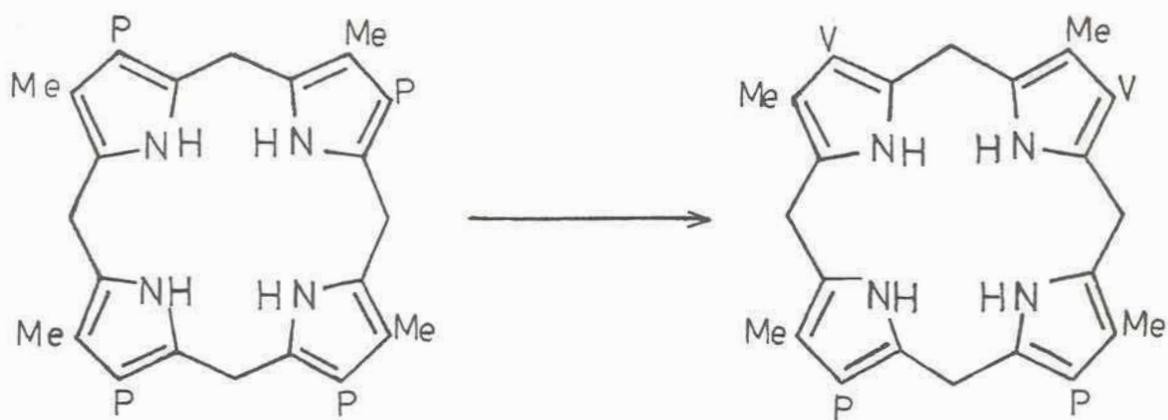


Figura 18: Transformación de Copro'gen III en Proto'gen IX catalizado por Copro-0.

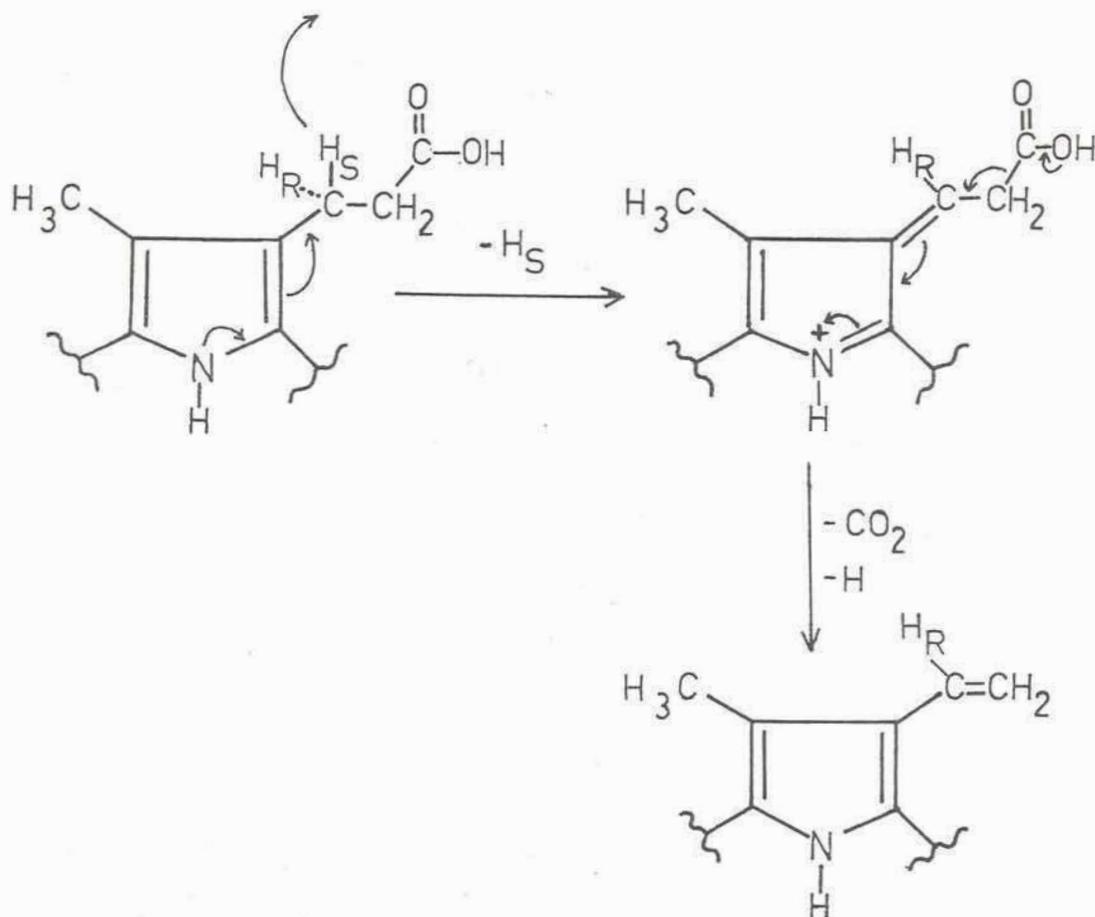


Figura 19: Mecanismo de decarboxilación de Copro'gen catalizado por Copro-0 propuesto por Zaman y Akhtar (207).

fué usado como aceptor de electrones y al igual que la enzima de hígado bovino (194), fué activada por fosfolípidos o detergentes neutros.

La principal diferencia entre Copro-O de levadura e hígado bovino fué la localización intracelular, el número de subunidades y el contenido de metales.

Se ha determinado que la enzima de mamíferos, aves y plantas tienen un requerimiento absoluto por Oxígeno molecular. Sin embargo, los microorganismos que crecen bajo condiciones estrictamente anaeróbicas deben ser capaces de utilizar un aceptor de hidrógenos distinto del oxígeno. Una actividad de Copro-O anaeróbica fué reportada primero en una especie de *Pseudomonas* (199) y luego demostrada en *Rhodopseudomonas spheroides* junto con una actividad aeróbica de la enzima (200, 201).

Sano (202), trabajando con la enzima de hígado bovino y teniendo en cuenta el requerimiento de Oxígeno, sugirió la participación de un intermediario hidroxilado en la transformación de Copro'gen III a Proto'gen IX.

En animales y plantas, se ha demostrado que las cadenas propionato de los anillos A y B del Copro'gen III son decarboxilados secuencialmente a los correspondientes grupos vinílicos del Proto'gen IX (203-205).

Yoshinaga y Sano (206), trabajando con la enzima purificada de hígado bovino confirmaron estos antecedentes y propusieron que la conversión enzimática de los grupos propionato de Copro'gen III a los correspondientes grupos vinílicos de

Proto'gen IX ocurre en 2 etapas comenzando por la posición 2 y luego 4 através del β -hidroxipropionato porfirinógeno como intermediario. Además, determinaron que al menos un residuo tirosina está involucrado en el sitio activo de la enzima y aparentemente es esencial para la formación del β -hidroxipro_pionato.

Estudiando la esteroquímica de la reacción catalizada por la enzima de animales y plantas (207-209) como también la aeróbica y anaeróbica *Rhodopseudomonas spheroides* (201), se ha demostrado que el átomo de Hidrógeno pro-S de la posición β de la cadena propiónico es eliminado durante la reac_ción (Figura 19).

I.6. Transformación de Protoporfirinógeno IX en Protoporfirina IX.

Protoporfirinógeno IX oxidasa (Proto-O), la penúltima enzima en la biosíntesis del hemo, cataliza la oxidación de Proto'gen IX a Proto IX, por eliminación de 6 átomos de hidrógeno del núcleo porfirínico (Figura 20).

La actividad de Proto-O ha sido detectada en varios tejidos como hígado de rata (210), fibroblastos, eritrocitos y leucocitos humanos y en los microorganismos *Saccharomyces ce_rvisiae* (211) y *Escherichia coli* (212, 213).

La enzima de hígado de rata (210) y levadura (211) ha sido parcialmente purificada y caracterizada. El PM de la Proto-O purificada de hígado determinado por filtración molecular fué de 33.000 que difiere del valor 180.000 obtenido para

la enzima de levadura (211), aunque existe la posibilidad que esta última esté en forma de agregados. El pH óptimo para la enzima de hígado fué 8.6-8.8, en tanto que para la de levadura fué 7.4. Los K_M para el sustrato fueron 11 y 4.8 μM para Proto-O de hígado de rata y levadura respectivamente.

La enzima tiene un alto grado de especificidad hacia el sustrato, no cataliza la oxidación de Copro'gen ni Uro'gen. No se han obtenido evidencias acerca de la presencia del algún grupo prostético y el Oxígeno fué esencial, no habiéndose encontrado un aceptor de electrones alternativo.

La enzima de hígado de rata fué inhibida por p-cloromercuribenzoato pero GSH o Proto'gen IX protegieron parcialmente la enzima de la inactivación sugiriendo que uno o ambos viníloos del Proto'gen podrían unirse directamente con grupos sulfhidrilos esenciales de Proto-O (210).

La enzima está estrechamente asociada a la membrana interna de la mitocondria (214) y anclada dentro de la bicapa lipídica. Así, Copro-O en el espacio intermembrana (192, 193) actúa como una lanzadera para la transferencia de Proto'gen IX a la membrana interna.

Se ha sugerido que Proto-O de levadura es sintetizada en mitocrondrrias (215), por el contrario, se ha determinado que la enzima de hígado de rata no es sintetizada en los ribosomas mitocondriales y por lo tanto debe ser sintetizada en el citoplasma (216).

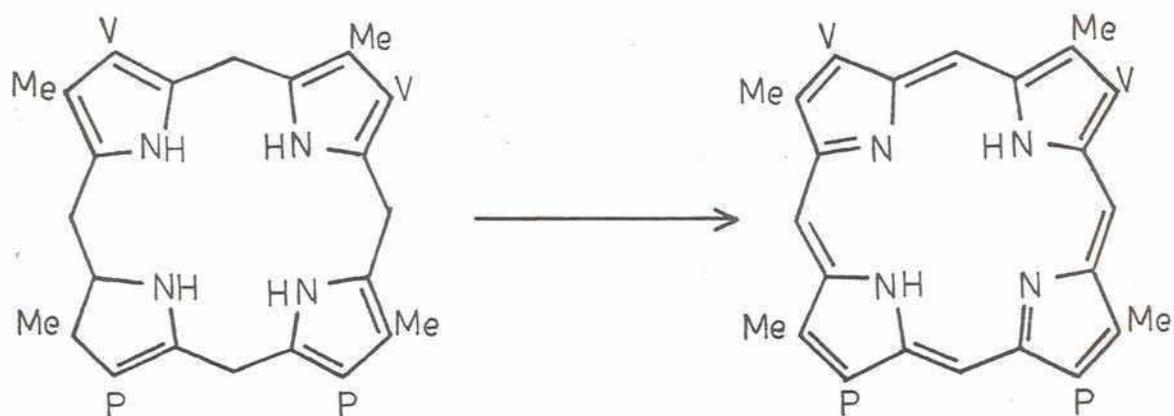


Figura 20: Transformación de Proto'gen IX en Proto IX catalizado por Proto-0.

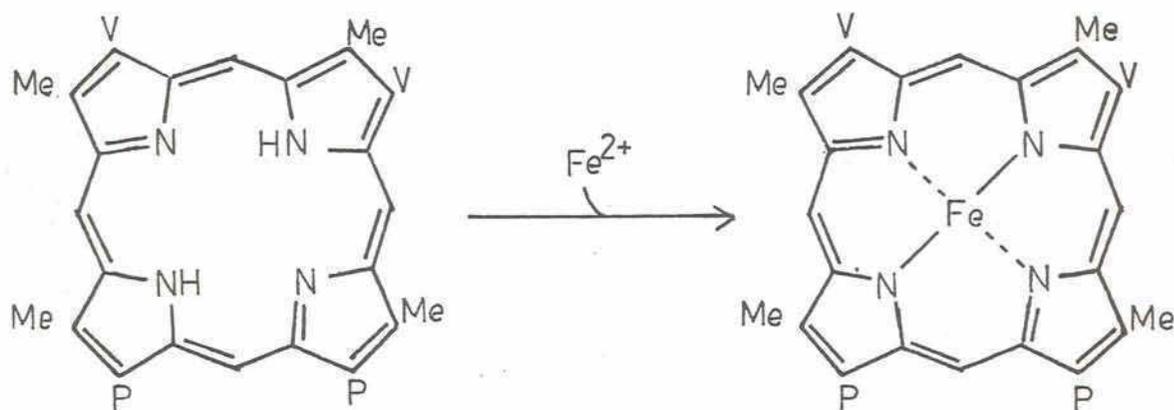


Figura 21: Reacción de formación de hemo a partir de Proto IX y Fe^{2+} catalizado por FeQ.

I.7. Biosíntesis del hemo.

La Ferroquelatasa (FeQ), la última enzima del camino biosintético del hemo, cataliza la incorporación de hierro ferroso en el núcleo tetrapirrólico de Proto IX dando protohemo más dos protones (Figura 21).

El protohemo es el grupo prostético de citocromos b, catalasa, peroxidasa, hemoglobina, mioglobina.

La FeQ ha sido descripta como una enzima fuertemente unida a membranas tanto en organismos eucariontes como en procariontes. Así, en mamíferos se halla en mitocondrias (217), contenida en la bicapa lipídica de la membrana interna (218, 219), con el sitio activo orientado hacia la matriz mitocondrial (220). En plantas la actividad de FeQ se encontró en cloroplastos (221) y en bacterias está unida a la membrana citoplasmática (222, 223).

La FeQ ha sido recientemente purificada a partir de mitocondrias de hígado bovino (224, 225) y de rata (226) y de eritrocitos de pollo (227). La enzima de todas estas fuentes tienen muchas características comunes, pero difieren sustancialmente de la purificada a partir de la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas spheroides* (228).

Se ha reportado un PM de aproximadamente 40.000, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS para la enzima de animales (224-227). Sin embargo, no hay acuerdo respecto al PM de la enzima nativa. Taketani y Tokunaga, reportaron un PM de 200.000 y 240.000 para la enzima de hígado bovino (224) y de rata (226), respectivamente, estimados

por filtración molecular, sugiriendo que la enzima es un multímero. Pero, por otro lado, Dailey y Fleming encontraron un PM de 40.000 para la enzima de hígado bovino (225) por la misma técnica. Una posible explicación para esta diferencia es que la diálisis utilizada en algunas preparaciones (224, 226) pueden ocasionar agregación de las proteínas de membrana. Por otra parte, la FeQ de *Rhodopseudomonas spheroides* es un monómero de PM 115.000 (228).

El pH óptimo y los parámetros cinéticos de la enzima de las distintas fuentes están resumidos en la Tabla I.

La FeQ de distintas fuentes fué inhibida por iones metálicos divalentes, tales como Co^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} (225-229). Co^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , actúan como inhibidores competitivos, ya que además del Fe^{2+} , esta enzima es capaz de incorporar a dichos metales en distintas porfirinas dicarboxílicas (218, 224, 229-231).

La actividad de la enzima de mamíferos y pollos se vió estimulada por ácidos grasos de cadena larga y fosfolípidos (224-227, 232, 233).

La FeQ de distintas fuentes fue sensible a reactivos de grupos tioles (223, 226-228, 234, 235) indicando que hay grupos sulfhidrilos involucrados en la catálisis. Dailey (235) en base a sus trabajos con la enzima de hígado bovino reportó la existencia de grupos sulfhidrilos vecinales, localizados en una zona hidrofóbica de la enzima, cuya función sería unir el hierro durante la catálisis de la reacción.

La FeQ es altamente selectiva con respecto al sustrato

Tabla I: pH óptimo y parámetros cinéticos de FeQ de mamíferos, aves y bacterias.

Fuente de la enzima	pH óptimo	K _M (μM)			
		Fe ²⁺	Proto	Meso	Deutero
Hígado bovino (224)	8.0	46	54	46	--
Hígado bovino (225)	--	80	11	34	47
Hígado rata (226)	7.8	33	28.5	26.7	--
Eritrocitos de pollo (227)	8.25	166	37	51	80
Rhodopseudomonas spheroides (228)	7.6	22	18	20	95

En todos los casos el pH óptimo está referido a la incorporación de Fe²⁺ en Proto IX.

porfirínico. Utiliza sólo porfirinas decarboxílicas de la serie isómerica IX y no utiliza los correspondientes metil ésteres(236, 237). El cambio de una sola cadena propiónico produce una disminución en su utilización como sustrato (237) y además hay selectividad hacia los sustituyentes en los otros dos anillos pirrólicos. Así, la enzima inserta Fe^{2+} en las siguientes porfirinas dicarboxílicas, en orden decreciente: meso-, deuterio-, hemato- y protoporfirina IX (Figura 22)(224-228, 236). Sustituyentes cargados o de gran tamaño en las posiciones 2 y 4 resultan en una pérdida de la reactividad (224, 225, 227, 236).

El hecho de que utilice sólo porfirinas di carboxílicas como sustrato, sugieren que residuos de aminoácidos catiónicos deben estar involucrados en la orientación y unión de la porfirina a la enzima. Se ha demostrado que al menos uno de ellos es un residuo Arginina (238).

Ha sido mostrado que la enzima de hígado bovino purificada utiliza un mecanismo de reacción Bi-Bi secuencial ordenado (225), uniéndose primero el Fe^{2+} a la enzima, a través de dos grupos sulfhídricos vecinales (235) y luego la porfirina. La liberación del hemo es previa a la liberación de los dos protones (Figura 23).

Es de destacar que esta enzima es inhibida por hemo (223, 225, 228) y por N-metilprotoporfirina (225, 239-241), un pigmento verde aislado del hígado de animales tratados con DDC (242).



	R	
Proto	-CH=CH ₂	
Meso	-CH ₂ -CH ₃	M:CH ₃
Deutero	-H	P:-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Hemato	-CH(OH)-CH ₃	

Figura 22: Estructura de distintas porfirinas dicarboxílicas de la serie isomérica IX.

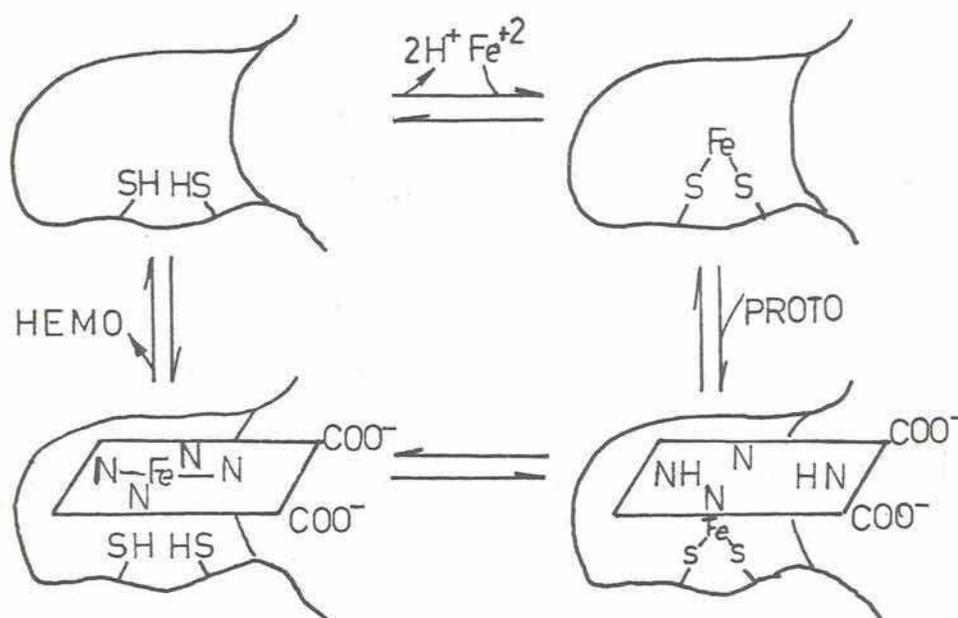


Figura 23: Mecanismo de reacción de FeQ propuesto por Dailey (235).

II. REGULACION DE LA BIOSINTEIS DE HEMOHEPATICO.

Animales, plantas y bacterias tienen la capacidad de aumentar o disminuir la biosíntesis de porfirinas de acuerdo a las necesidades fisiológicas. La compleja regulación de la biosíntesis de porfirinas y hemo está basada primariamente en el control de la formación de ALA, catalizado por la enzima mitocondrial ALA-S, la etapa limitante en la producción de hemo (25-27, 243). Las demás enzimas del camino están presentes en cantidades no limitantes.

La regulación de la biosíntesis del hemo ha sido explorada, principalmente, a través del estudio de porfiria hepática experimental que puede ser inducida fácilmente en animales por la administración de varias drogas, especialmente AIA y DDC.

Han sido propuestos tres mecanismos por los cuales el hemo, producto final, puede regular la actividad de ALA-S hepática (Figura 24).

- 1) Represión de la síntesis de enzima.
- 2) Impedimento de la transferencia de nueva enzima sintetizada del citosol a la mitocondria.
- 3) Inhibición "feed back" de la actividad de ALA-S.

II.1. Represión de la síntesis de ALA-S por hemo.

Como ya se dijo, el nivel de ALA-S hepático es muy bajo en condiciones normales pero se puede incrementar varias veces por efecto de diversas drogas. Estudios "in vivo" (244) y en cultivo (27) han mostrado que el proceso de inducción

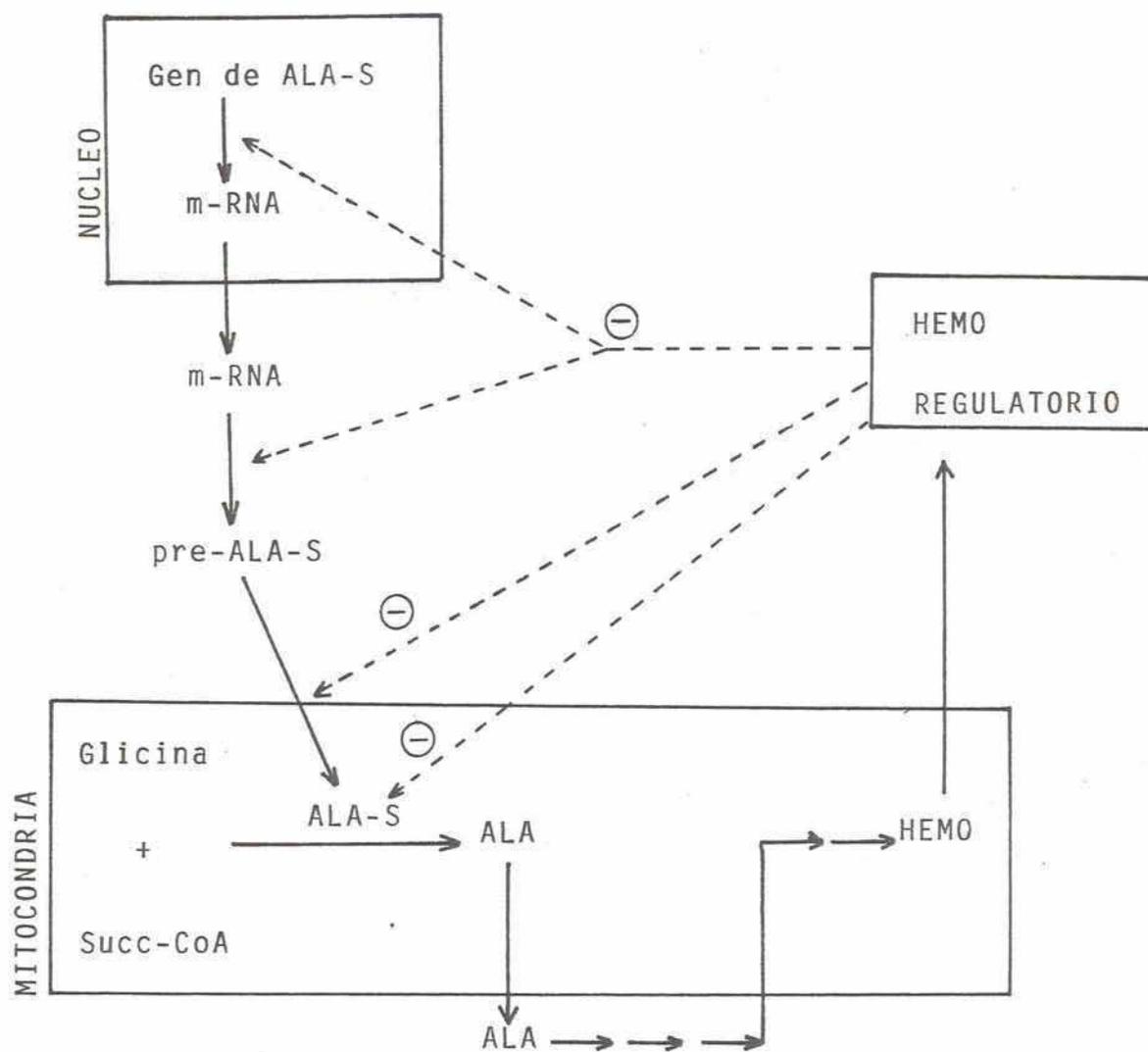


Figura 24: Mecanismos de regulación de ALA-S por hemo.

química es sensible a inhibidores de síntesis de proteínas y está sujeto a represión feedback por hemo.

Utilizando un anticuerpo específico contra ALA-S mitocondrial, Whiting y Granick (245) han mostrado que los aumentos en la actividad enzimática producidos por AIA ó DDC, en hígado de embrión de pollo son acompañados por cambios proporcionales en la cantidad de enzima y que la hemina fue capaz de bloquear, específicamente, la síntesis de ALA-S sin cambiar significativamente la síntesis general de proteínas.

Granick (27), trabajando con cultivos primarios de células de hígado de embrión de pollo, propuso que el hemo actúa a nivel transcripcional actuando como co-represor. Según el mecanismo de represión "feed back", o represión por producto final de Jacob y Monod (246), una molécula represora bloquea el gen operador y por consiguiente no se puede transcribir el operón en el mRNA impidiendo así la síntesis de nueva enzima. Según la propuesta de Granick, una proteína, el apo-represor se une al hemo, el co-represor, dando el represor efectivo.

Apoyando esta teoría, Hayashi y col. (247) y Whiting (57), sugieren que en hígado de rata y de embrión de pollo, respectivamente, la hemina reprime la síntesis de ALA-S por inhibir la síntesis del mRNA.

Contrariamente a esta hipótesis de inhibición transcripcional, varios autores, a través del estudio cinético de la disminución de la actividad de ALA-S observada en cultivos de células de hígado de embrión de pollo, luego de la adición

de hemina o inhibidores de síntesis de proteínas, sugieren que el hemo inhibe la síntesis de ALA-S a nivel de traducción (50, 51, 248, 249).

Posteriormente, se encontró que en este sistema, una concentración de hemo de 10^{-7} a 10^{-8} M es suficiente para reprimir la síntesis de ALA-S. (250, 251).

La hipótesis que se postula para explicar la represión por hemo a nivel post-transcripcional es que el hemo se combina con alguna apoproteína que modula la traducción de ALA-S (250).

Trabajando con hepatocitos aislados, obtenidos a partir de embrión de pollo, Srivastava y col. (252) hallaron que la hemina tiene dos efectos dependiendo de la concentración: a bajas concentraciones, menores a 200 nM, inhibe la síntesis del mRNA y a concentraciones mayores que 1 uM inhibe la traducción del mRNA para ALA-S. Estos autores concluyen entonces, que el efecto del hemo en la síntesis de ALA-S es a nivel de transcripción.

En ratas, se ha informado que la inyección intraperitoneal o intravenosa de hemina suprime el incremento de actividad total de ALA-S en el hígado de animales tratados con AIA ó DDC (253, 254) debido a una inhibición de la síntesis de la enzima, a nivel transcripcional (256-257). La acción regulatoria de hemina es de significancia fisiológica ya que es capaz de inhibir pos-transcripcionalmente la síntesis de ALA-S en ratas normales (256).

Más tarde, Yamamoto y col. (55) mostraron que la adminis

tración de hemina a ratas tratadas con AIA fue seguido por una reducción de la capacidad de los polisomas libres para dirigir la síntesis de ALA-S. La vida media aparente de ALA-S fue de aproximadamente 60 minutos, valor comparable a la vida media del m-RNA para ALA-S que fue estimado en 65-75 minutos en el hígado de ratas tratadas con AIA (24), sugiriendo que el hemo inhibe la síntesis "de novo" del mRNA para ALA-S.

En un estudio posterior, estos mismos autores hallaron que la adición de hemina, a un sistema de síntesis de proteínas libre de células de lisado de reticulocitos de conejo, reduce la síntesis de ALA-S sin afectar la síntesis total de proteínas a partir de polisomas totales aislados de hígado de ratas tratadas con AIA (258).

Es conocido que la traducción de mRNA, para la síntesis de proteínas en general, en un sistema libre de células de reticulocitos de conejo, es controlado por hemina (259) y RNA de doble cadena (260). Además de este control general, los autores demuestran que la traducción del mRNA para ALA-S, es específicamente inhibido por hemina y los resultados sugieren que el hemo inhibe la etapa de elongación de la cadena peptídica durante la síntesis de la enzima, aunque no se descarta que el hemo también inhiba la etapa de iniciación (258). Este es el primer ejemplo de un control específico a nivel de traducción de la síntesis de una enzima velocidad limitante por el producto final de un camino biosintético, demostrado en sistema libre de células.

En trabajos más recientes, utilizando la técnica de hi-

bridización cDNA-RNA, se ha mostrado que el agregado de hemina al medio de cultivo de hepatocitos de embrión de pollo inhibe el aumento de los niveles de mRNA para ALA-S producido por testosterona (261), alcohol isoamílico (262) y AIA (261, 263). Este hecho sugiere que el hemo inhibe la producción de ALA-S a nivel de transcripción, aunque los autores no descartan la posibilidad que la hemina pueda además incrementar la velocidad de degradación de mRNA o su precursor nuclear (261).

De acuerdo a todos estos informes, la síntesis de ALA-S en hígado, es regulado por hemo a ambos niveles, transcripción y traducción.

II.2. Inhibición por hemo de la translocación de ALA-S del citosol a la mitocondria.

Como ya se dijo en la Sección I.1., ALA-S es una enzima mitocondrial pero se sintetiza en el citosol como un precursor mayor, que es procesado durante la transferencia a la mitocondria. Por lo tanto, otro punto de regulación por hemo puede ser la inhibición de la transferencia de ALA-S del citosol a la mitocondria (264).

Quienes primero propusieron este mecanismo de regulación fueron Kikuchi y col. (255, 265). Ellos observaron que en hígado de rata, cuando se administraba hemina algunas horas luego de AIA, se producía una marcada reducción en la actividad de ALA-S mitocondrial con un concomitante incremento en la actividad de la fracción soluble, tal que la actividad to-

tal no era apreciablemente afectada por la administración de hemina. Estos autores sugieren que la hemina actúa estabilizando de alguna manera ALA-S en la fracción soluble, ya que la vida media de ALA-S extramitocondrial fue mayor en ratas tratadas con hemina que en las no tratadas (255).

Ohashi y Kikuchi (38) observaron que en hígado de pollo, también la hemina inhibe la conversión de ALA-S citosólica en mitocondrial.

Este grupo de trabajo, presentó evidencias concluyentes de la inhibición de la translocación intracelular de ALA-S por hemo, estudiando la cinética de incorporación de ^3H -Leucina en ALA-S, mitocondrial y citosólica. Observaron que en ratas tratadas con hemina luego de AIA ó DDC, la incorporación de ^3H -Leucina en ALA-S mitocondrial estuvo muy reducida, mientras la incorporación de radioactividad en ALA-S citosólica estuvo marcadamente incrementada (257, 266), es decir que efectivamente la hemina fue capaz de inhibir la transferencia de ALA-S del citosol a la mitocondria.

Yamamoto y col. (256) hallaron que en hígado de rata, el grado de inhibición de la translocación de ALA-S como también el grado de inhibición de la síntesis de la enzima, mostraron una buena correlación con las variaciones en el grado de saturación de triptofano pirrolasa.

Hallaron que, tanto la translocación como la síntesis de ALA-S, parecen ser inhibidas por hemo intracelular a concentraciones menores que las necesarias para alcanzar una total saturación de dicha enzima.

Entre las hemoproteínas del hígado, la triptofano pirro_lasa ha sido sugerida como un marcador muy sensible para evaluar cambios muy pequeños en la concentración intracelular de hemo hepático (267, 268), designado como "pool" de hemo-regulatorio (243, 250) cuya concentración ha sido estimada indirectamente en 10^{-7} , 10^{-8} M (250, 251).

Este "pool" de hemo regulatorio, considerado como hemo libre o débilmente unido a proteínas representa una mínima cantidad (0,1%) del total de hemo de las hemoproteínas del hígado, pero las variaciones de su concentración son las responsables de la regulación de los niveles de ALA-S.

En un trabajo posterior, se ha hallado que la máxima reducción de la capacidad de los polisomas para dirigir la síntesis de ALA-S fue alcanzado a una dosis de hemina (2mg/kg) muy cercana a la dosis (1,6 mg/kg) requerida para la máxima inhibición de la translocación intracelular de la enzima (55). Esto sugiere que la inhibición transcripcional por hemo también puede tener significancia fisiológica.

En hígado de rata, entonces, las variaciones del "pool" de hemo parecen ser responsables de la regulación feedback de ALA-S, a nivel de síntesis transcripcional y post-transcripcional, a nivel de translocación de la enzima.

Por otra parte, en cultivos primarios de hepatocitos de embrión de pollo expuestos a AIA, Ades (269, 270) mostró que la hemina produce una disminución de la actividad de ALA-S por disminución de cantidad de enzima inmunoreactiva. Además hubo inhibición del procesamiento del precursor de ALA-S, ya

que en las células tratadas con hemina se produce una acumulación de pre-ALA-S y no se detecta la forma madura.

Estos resultados indican que la hemina es capaz de bloquear la maduración de ALA-S. Pero como muchas pre-proteínas mitocondriales son procesados inmediatamente después de la translocación a la mitocondria, es probable que la hemina bloquee la transferencia de pre-ALA-S.

Esto último fue probado por Hayashi y col. (60). Ellos demostraron que la hemina inhibe la transferencia y el concomitante procesamiento de pre-ALA-S sintetizada "in vitro", en un sistema de traducción libre de células de lisado de reticulocitos, con polisomas de hígado de pollos tratados con AIA + DDC, cuando se la incubaba con mitocondrias aisladas de pollos no tratados.

Srivastava y col. (271) trabajando con embrión de pollo "in vivo", confirmaron la inhibición por hemina de la translocación de pre ALA-S. Haciendo un pulso con ³⁵S-Metionina, hallaron que la administración de hemina a embriones de pollo, pretratados con AIA + DDC, fue capaz de inhibir la transferencia de la forma precursora de ALA-S a la mitocondria produciéndose la acumulación de pre-ALA-S en el citosol.

Es posible que el efecto de hemina resulte de una alteración general de la función de transporte de la membrana mitocondrial y no tenga entonces significancia fisiológica. Para evaluar esta posibilidad, se examinó el efecto de hemina sobre el transporte hacia la mitocondria de una enzima no relacionada al metabolismo del hemo.

Se encontró que la hemina no afecta la transferencia a la mitocondria de piruvato carboxilasa, una enzima de matriz que es sintetizada en el citosol como proteína precursora.

Esto elimina un efecto tóxico general o inespecífico de la hemina sobre la transferencia de proteínas mitocondriales y sugiere que altera específicamente la translocación de pre-ALA-S.

Entre las inhibiciones de las transferencias post-traduccionales de los precursores extramitocondriales, el caso de hemina es el único en que el producto final de un camino biosintético bloquea la translocación intracelular de la enzima velocidad limitante de ese camino.

Una posible explicación, es que la hemina se una o interactúe específicamente con pre-ALA-S de modo de interferir en su interacción con el componente (o los componentes) de la maquinaria de transporte (60).

II.3. Inhibición "feedback" de la actividad de ALA-S.

Con preparaciones parcialmente purificadas de ALA-S de citosol de hígado de rata (36, 52) y mitocondria de hígado de pollo (47) se ha demostrado que la hemina es capaz de inhibir la actividad de ALA-S.

Además de hemina, otras porfirinas, Fe-porfirinas y bilirrubina son también inhibidores efectivos de ALA-S (52).

La hemina mostró un K_I aparente para ALA-S de $2 \times 10^{-5}M$, valor que es 200 veces mayor que la concentración de hemina

requerida para producir represión de la síntesis de la enzima en cultivos de hepatocitos (10^{-8} - 10^{-7} M) (250, 251). Esto hace dudar acerca de la importancia fisiológica de la inhibición feedback como mecanismo de control de biosíntesis del hemo hepático.

Sin embargo, teniendo en cuenta que tanto ALA-S como FeQ parecen estar localizadas en la membrana interna mitocondrial, la generación de hemo dentro de la mitocondria puede proveer una concentración local suficiente como para inhibir ALA-S.

Wolfson y col. (272) estudiaron esta posibilidad haciendo una medición simultánea de las actividades de ALA-S y FeQ en mitocondrias intactas aisladas de hígado de rata. Hallaron que, aún a una velocidad de generación de hemo 75 veces mayor que la que ocurre "in vivo", la actividad de ALA-S no se vió afectada.

Por otra parte, Pirola y col. (273) informaron que ni el hemo (ferroprotoporfirina IX) ni la hemina (ferriprotoporfirina IX) tienen efecto sobre ALA-S, purificada a partir de mitocondrias de hígado de embrión de pollo, hasta concentraciones del orden de 10^{-3} M. Este valor es probablemente mucho mayor que los niveles de hemo en la mitocondria. Por lo tanto la inhibición por producto final no es un mecanismo de control fisiológico para la regulación de la biosíntesis de hemo hepático.

III. PORFIRIAS.

III.1. Porfirias humanas.

Las porfirias ya sean hereditarias o adquiridas son el resultado de alteraciones en el camino biosintético del hemo, en las cuales se produce una excesiva acumulación y excreción de porfirinas y/o precursores, que son los responsables de las características clínicas y bioquímicas de las mismas.

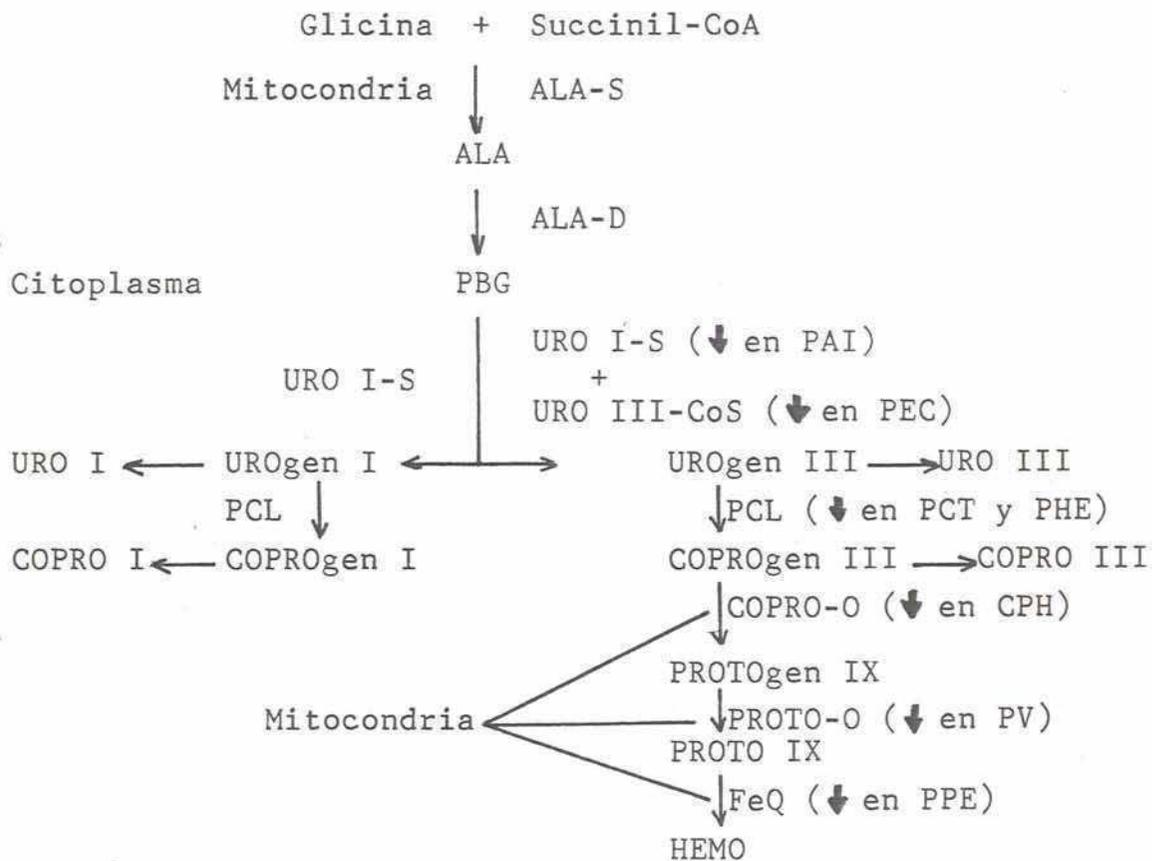
Estos desórdenes metabólicos ocurren primariamente en el hígado o médula ósea y en base a ello, las porfirias se clasifican en hepáticas o eritropoyéticas (274).

Cada uno de los diferentes tipos de porfiria presenta un patrón de excreción característico y ocurren como resultado de un defecto específico a nivel de alguna enzima del camino del hemo (Figura 25).

La velocidad de biosíntesis de hemo está determinado primariamente por la actividad de ALA-S. En las porfirias, al haber una parcial deficiencia de una enzima distal a ALA-S, a través del mecanismo regulatorio, se produce un incremento en la formación de intermediarios hasta el defecto enzimático. Estos intermediarios, que no son convertidos a hemo, al no existir rutas alternativas, se acumulan en el tejido y se excretan.

La acumulación de los intermediarios está asociada con los dos tipos de síndromes clínicos.

Cuando la deficiencia enzimática lleva a una augmentada formación de Proto IX o porfirinógenos, los cuales se



PAI: Porfiria Aguda Intermitente

PEC: Porfiria Eritropoyética Congénita

CPH: Coproporfiria Hereditaria

PPE: Protoporfiria Eritropoyética

PCT: Porfiria Cutánea Tarda

PHE: Porfiria Hepatoeritropoyética

PV: Porfiria Variegata

Figura 25: Camino metabólico del hemo y defecto enzimático asociado a cada porfiria humana.

autooxidan a porfirinas, aparecen lesiones en la piel debido a la fotosensibilización.

Por otro lado, una masiva sobreproducción de precursores, ALA y PBG, es la causa del otro tipo de síndrome clínico, los ataques neuropsiquiátricos y dolores abdominales agudos.

Todas las porfirias hereditarias, excepto la autosómica recesiva Congénita Eritropoyética, son transmitidas con carácter autosómico dominante.

III.2. Porfirias experimentales.

Muchas drogas liposolubles, no relacionadas, químicamente, pueden desencadenar los cuadros clínicos y bioquímicos de las porfirias hepáticas, en pacientes que son portadores del defecto genético en forma latente (275).

Estas drogas que, en hígado de animales de experimentación o en hepatocitos cultivados, son capaces de estimular la formación de porfirinas y aumentar la actividad de la enzima regulatoria, ALA-S, son llamadas drogas porfirinogénicas (25, 27, 276). Las porfirias así inducidas, se denominan porfirias experimentales, por su semejanza a los diferentes tipos de porfirias hepáticas humanas (Figura 26).

Del estudio de estas porfirias experimentales se ha obtenido valiosa información acerca de las porfirias humanas y del mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo.

Entre las diversas drogas porfirinogénicas, que incluye a los barbituratos, las colidinas, las hormonas sexuales

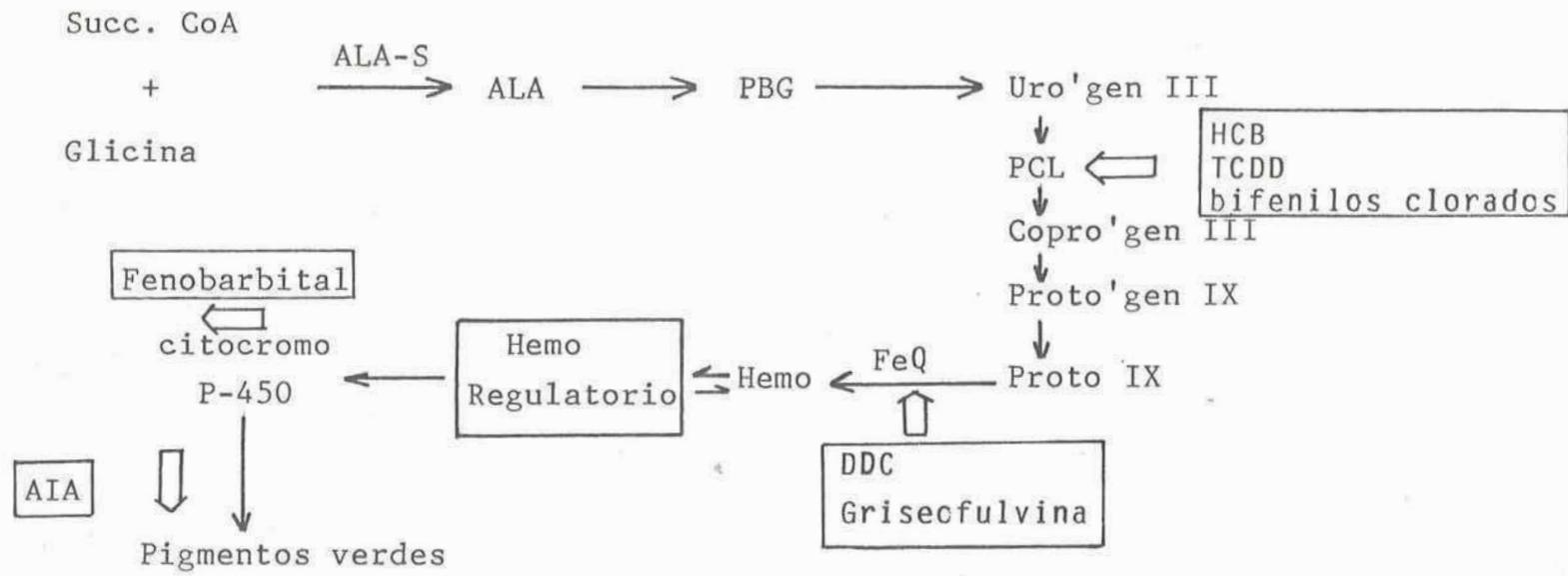


Figura 26: Camino metabólico del hemo y bloqueos producidos por las principales drogas porfirinogénicas.

y sus metabolitos y los hidrocarburos policlorados, las más estudiadas son: alilisopropilacetamida (AIA), 3,5-dietoxycarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) y hexaclorobenceno (HCB), cuyas estructuras químicas pueden verse en la Figura 27.

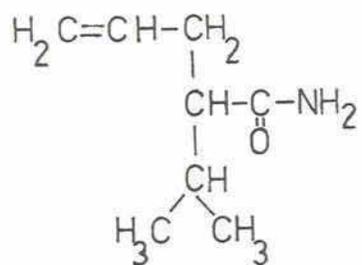
III.2.a. Porfiria experimental inducida por AIA.

Este potente agente porfirinogénico cuyo nombre correcto según IUPAC es 2 isopropil-4-pentenamida, ampliamente usado para estudiar el mecanismo de biosíntesis, regulación y degradación del hemo, ha jugado un rol clave en la elucidación de las porfirias hereditarias (274, 275).

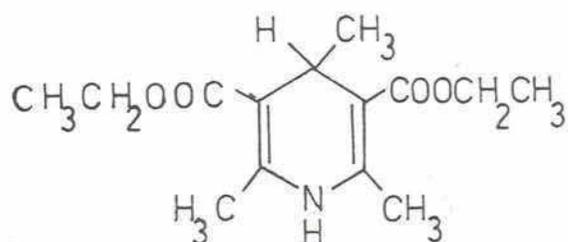
La administración de AIA, a ratas y embriones de pollo, promueve eventos bioquímicos que semejan los de las porfirias hepáticas agudas, con un gran incremento de la actividad de ALA-S y acumulación de precursores del hemo.

Estudios "in vivo" en hígado de embrión de pollo (244) ó de rata (247, 255) e "in vitro" en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo (27, 50, 51, 248) han mostrado que el proceso de inducción de ALA-S por AIA es sensible a inhibidores de síntesis de RNA y proteínas.

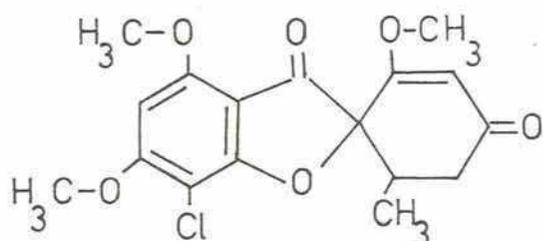
Patton y Beattie (33), sin embargo, informaron no haber hallado incremento en la cantidad de ALA-S durante el desarrollo de porfiria experimental y sugieren que los inductores causan una activación de enzima preformada. Algunos años después, Simpson y Beattie (277) reportaron la purificación, a partir de mitocondria de hígado de rata, de una proteína capaz de activar específicamente ALA-S, aunque



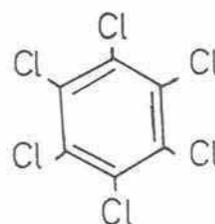
Alilisopropilacetamida
(AIA)



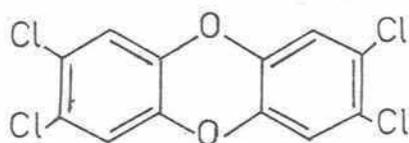
3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC).



Griseofulvina



Hexaclorobenceno
(HCB)



2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

Figura 27: Estructura química de las drogas porfirinogénicas más importantes.

la significancia fisiológica de la proteína activadora durante la inducción de porfiria experimental no ha sido aún aclarado.

Whiting y Granick (245) utilizando un anticuerpo específico contra ALA-S mitocondrial, han mostrado que el incremento en la actividad enzimática involucra un incremento en la cantidad de proteína enzimática debido a una mayor síntesis de la misma (57).

Con respecto al sitio de acción de AIA en la inducción de ALA-S hay varios reportes.

Granick (27) en su esquema de regulación de ALA-S, propone que los inductores químicos desplazan al hemo del ap represor liberándose la síntesis del mRNA.

Por otra parte, Sassa y Granick (50) encontraron que en cultivos de hígado de embrión de pollo la velocidad de decaimiento de ALA-S inducida por AIA, luego del agregado de Actinomicina D(Act D) (inhibidor de la transcripción) se vió reducida a la mitad cuando AIA estaba presente. Este hecho indica que AIA incrementó la síntesis de la enzima a partir de mRNA preformado sugiriendo que actúa a nivel de traducción.

Tyrrell y Marks (249) observaron que cuando cultivos de células de hígado de embrión de pollo que han sido incubados con AIA en presencia de cicloheximida (CX) y luego lavados y reincubados en medio fresco sin drogas, la actividad de ALA-S se incrementa rápidamente luego del cambio de medio, sugiriendo que AIA estimula la síntesis del mRNA pa

ra ALA-S. La cicloheximida es un inhibidor específico de síntesis de proteínas a nivel de traducción (278).

Tomita y col. (51) trabajando con cultivos de hígado de embrión de pollo, hallaron resultados similares a los de Tyrrell y Marks y en contraste a lo observado por Sassa y Granick vieron que la velocidad de decaimiento de ALA-S luego de la adición de Act D fué la misma ya sea que el medio contenga o no AIA. Estos autores sugieren de acuerdo a estos resultados, que AIA actúa a nivel de transcripción.

Esto fue corroborado por Brooker y col. (61) que hallaron que la inducción de ALA-S en porfiria hepática inducida en embriones de pollo por administración de AIA junto con DDC, se correlaciona con un incremento en los niveles del mRNA para ALA-S.

La inducción de ALA-S por AIA está sujeta a control feed-back por hemo (243, 245, 264) y además es suprimido por administración de glucosa (24, 26, 279, 281). La glucosa al igual que la hemina parece interferir tanto en la inducción como en la conversión de ALA-S citosólica a mitocondrial (281), el mecanismo por el cual produce estos efectos no está claro aún.

En su acción porfirinogénica, AIA no actúa por inhibición específica de algún paso de la biosíntesis del hemo como ha sido demostrado para otras drogas. Estudios isotópicos han indicado que se produce una incrementada destrucción del hemo del citocromo P-450 preexistente (282) con

formación de pigmentos verdes (283, 284) como consecuencia de la administración de AIA a ratas. La caída en el contenido de citocromo P-450 es acompañada por una pérdida del hemo microsomal y por una característica coloración verde de hígado y más particularmente de los microsomas.

La pérdida de citocromo P-450 y hemo se vieron influenciados por tratamiento con compuestos que alteran la actividad de las enzimas microsomales metabolizantes de drogas. El pretratamiento de las ratas con Fenobarbital (FB), estimulador del metabolismo de drogas, aumenta la pérdida de citocromo P-450 y hemo y el grado de coloración, mientras SKF-525 A, un inhibidor de las enzimas metabolizantes de drogas, ofrece protección contra esos cambios (282, 285). Así, AIA necesita ser metabolizado para producir sus efectos en el hígado. Ortiz de Montellano y col. (286) han mostrado que Proto IX, el grupo prostético libre de hierro del citocromo P-450 es transformado en una porfirina anormal verde a la cual AIA está covalentemente unido. Estudios posteriores han revelado que el pigmento verde es un aducto 1:1 entre la porfirina y AIA a través de su grupo alilo (287). Este aducto es formado durante el proceso de "metabolización suicida" del agente porfirinogénico (288).

Más tarde, se obtuvieron evidencias por técnicas espectroscópicas, que la porfirina anormal es Proto IX N-alquilada (289). El grupo N-alquilo deriva de la droga por agregado de un grupo OH al C interno y de N de la porfirina al C terminal de una unión π .

A diferencia de lo que sucede en ratas, hay reportes que indican que en hígado de embrión de pollo en cultivo, los compuestos como AIA no son rápidamente metabolizados pero son potentes inductores de ALA-S (290, 291).

Por otra parte, análogos de AIA que no promueven destrucción del hemo del citocromo P-450, como por ejemplo propilisopropil acetamida, son igualmente capaces de incrementar ALA-S y acumulación de porfirinas (292-394). Rifkind y col. (295) han informado que AIA causa una temprana disminución en el contenido de P-450 hepático en el embrión, pero a las pocas horas retorna a valores normales y el grado de destrucción del mismo es menor que el hallado en ratas.

Aparentemente, en embrión de pollo, la destrucción del hemo del citocromo P-450 con la consecuente disminución de los niveles del mismo no es un prerequisite para la acción porfirinogénica de AIA.

III.2.b. Porfiria experimental inducida por DDC.

Las propiedades porfirinogénicas del DDC fueron descubiertas por Solomon y Figge en 1959 (296), quienes demostraron que en ratones y cobayos, esta droga produce un disturbio en el metabolismo de porfirinas caracterizado por un incremento en el contenido hepático de Proto y Copro (297).

Así, la administración de DDC a animales experimentales produce una porfiria hepática que semeja la porfiria

variegata humana (298), con una excesiva formación de Proto en el hígado que es entonces excretado en cantidades anormales. Más aún, cuando la dosis de droga administrada es relativamente pequeña, los cambios bioquímicos producidos se asemejan a la porfiria variegata en fase latente (299).

La acumulación de porfirinas y el aumento de ALA-S en respuesta al tratamiento con DDC, ha sido hallado en hígado de ratas (276, 299, 300), de embriones de pollo en cultivo (27, 50) e "in vivo" (301-305), y de ratones (306-308).

Al igual que en el caso de AIA, el aumento de actividad de ALA-S producido por DDC fue debido a un incremento de proteína enzimática (245) y todos los reportes sugieren que esta droga, actúa a nivel de transcripción en el proceso de síntesis proteica (50, 51, 249). Whiting (57) ha demostrado que los polirribosomas aislados de hígado de embriones de pollo tratados con DDC son capaces de sintetizar un polipéptido identificado como ALA-S y Brooker y col. (61) han confirmado el aumento de mRNA para ALA-S luego de la administración de DDC conjuntamente con AIA.

En cultivos de hepatocitos de embrión de pollo, se ha calculado una vida media de 4-5 horas para ALA-S inducido por DDC. Este valor es mayor que el calculado para la enzima inducida por AIA (2 horas) en condiciones similares y sugieren que DDC puede estabilizar ALA-S o disminuir la velocidad de degradación de la misma (51).

Respecto a su mecanismo de acción porfirinogénica, de todas las drogas descritas, solamente DDC y griseoful-

vina ejercen su efecto al menos en parte, por inhibición de FeQ.

Los primeros en describir esta capacidad inhibitoria fueron Onisawa y Labbé (306), quienes encontraron en ratones tratados con DDC una inhibición de la síntesis de hemo hepático que se correlaciona con la acumulación de ALA, PBG y porfirinas, especialmente Proto IX.

Posteriormente, la inhibición de actividad de Feq ha sido observada también en hígado de ratas (309, 310), de embriones de pollo "in vivo" (303-305) y en cultivo (311, 312).

La posibilidad de que DDC disminuye la actividad de FeQ por deprimir su síntesis, fué descartada en experimentos con cicloheximida en ratas (310) y embriones de pollo (304). Se vió que dosis de Cicloheximida suficientes como para inhibir la inducción de ALA-S no tuvieron efecto sobre la actividad de FeQ. Este hecho conjuntamente con la rápida inhibición de la enzima luego de la administración de DDC (1 hora), sugieren que esta droga no deprime FeQ por inhibición de su síntesis. Más aún, descartan la posibilidad que DDC induzca la síntesis de una proteína inhibidora de la enzima.

Por otra parte, DDC no ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de FeQ, ya que la adición de DDC a homogenatos de hígado o preparaciones mitocondriales no producen inhibición de la enzima (304, 306, 307).

Aparentemente, el DDC necesita ser convertido "in vi

vo" en un metabolito activo para inhibir FeQ. Tephly y col. (239) y De Matteis y col. (240) han aislado del hígado de roedores tratados con DDC, un pigmento verde o porfirina modificada, que es un fuerte inhibidor de FeQ. El pigmento verde ha sido identificado como una mezcla de los 4 isómeros de N-metil Proto IX (242, 313, 314).

Por otra parte, los 4 isómeros de N-metil Proto IX obtenidos por síntesis química fueron igualmente potentes como inhibidores de FeQ de hígado de rata y de embrión de pollo en cultivo (241) y de enzima purificada de hígado bovino (225).

Cole y col. (312) informaron que el 4-alquil sustituyente del DDC es esencial para la inhibición de FeQ. Por otra parte, se encontró que la administración del 4-etil análogo de DDC a ratones, produce la acumulación de N-etil Proto IX que también posee marcada actividad inhibitoria de FeQ (315). Todas las evidencias indican que la fuente de grupo N-metilo de la N-metil Proto IX es el grupo 4-metil del DDC (312, 315-317) (Figura 27).

Respecto del origen de la Proto IX, Tephly y col. (318) han sugerido que la sustancia inhibidora de FeQ es derivada del catabolismo del hemo. Por otra parte, se ha informado que el DDC como también 4-etil y 4-propil análogo del DDC son sustratos suicidas para citocromo P-450 (316, 319-321) con la consecuente destrucción del citocromo P-450 preexistente. Además, se encontró que en cultivos de embrión de pollo, la capacidad para reducir la actividad de FeQ de

análogos de DDC se corresponde con la capacidad para causar pérdida de citocromo P-450 y destrucción del hemo (322,323).

Todos estos resultados apoyan la idea de que la Proto IX de las N-alquil Proto derivan de la mitad hémica del citocromo P-450.

Del estudio "in vitro" del efecto inhibitorio de distintas N-alquil porfirinas sobre FeQ, ha sido sugerido que la capacidad de las mismas para producir dicho efecto, depende del tamaño y localización del grupo N-alquilo en el anillo porfirínico (324-327).

Se ha informado que los isómeros de N-etil Proto con el grupo N-etilo sobre los anillos A y B inhiben FeQ tan efectivamente como los 4 isómeros de N-metil Proto, en tanto que los isómeros con el grupo N-etilo sobre los anillos C y D fueron mucho menos efectivos (325).

Ortiz de Montellano y col. (328) han sugerido el siguiente modelo para la unión de porfirinas al sitio activo de FeQ. Las porfirinas son atraídas, por sus grupos carboxílicos, hacia el sitio activo por uniones H o atracciones electrostáticas a través de ciertos residuos de la enzima.

La mitad de la molécula, incluyendo los anillos pirrólicos C y D están unidos a una región estéricamente forzada que sólo tolera pequeñas sustituciones en los N pirrólicos. La otra mitad de la molécula permanece en una región relativamente abierta del sitio activo y así está sujeta a menores limitaciones estéricas sobre el tamaño del grupo alquilo unido a los anillos A y B.

Varios autores han reportado que, las dosis de DDC necesarias para inhibir FeQ son mucho menores que las requeridas para producir aumento de ALA-S (303, 304, 310) y que análogos de DDC que tienen actividad porfirinogénica no inhiben sin embargo la FeQ (312, 322, 327).

Por lo tanto, ha sido sugerido que la acción porfirinogénica del DDC se debe a la combinación de dos efectos; por un lado la inhibición de FeQ a través de la formación de N-metil Proto IX y quizás también una acción directa sobre el mecanismo de síntesis de ALA-S, como podría ser el aumento del m-RNA para ALA-S (61).

La griseofulvina es otro agente porfirinogénico cuya acción en roedores se debe a la inhibición de FeQ (300).

Por el contrario, esta droga no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de FeQ hepática en embriones de pollo (311) y no causa acumulación de porfirinas (302). Sin embargo, en cultivos de células de hígado de embrión de pollo, Griseofulvina es un potente agente porfirinogénico (27) a pesar de que en este sistema tampoco se encontró inhibición de FeQ (311). Además, en respuesta a esta droga, la principal porfirina acumulada fue Copro y no Proto. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual griseofulvina produce porfiria experimental en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo es diferente al de roedores.

III.2.c. Porfiria experimental inducida por HCB y otros compuestos halogenados.

Ha sido estimado que durante 1955-1959, aproximadamente 4000 personas, en el sudeste de Turquía, desarrollaron porfiria debido a la ingestión de semillas de trigo tratadas con hexaclorobenceno (HCB) (329) (Figura 27).

Desde entonces, numerosos estudios experimentales han demostrado la capacidad del HCB para producir porfiria en varias especies de animales (330-336) que semeja la porfiria hepática cutánea tarda humana (333, 337), en la cual el hecho químico más importantes es la incrementada excreción urinaria de porfirinas con alto número de carboxilos (338). Además de las distintas especies animales, HCB produce acumulación de porfirinas en cultivos primarios de células de hígado de embrión de pollo (27, 339).

La porfiria experimental por HCB en ratas está caracterizada por una notable acumulación y excreción de Uro y Hepta, esencialmente de tipo isomérico III (186, 333, 340).

Estos efectos, tanto en ratas como en porfiria cutánea tarda humana, son una consecuencia de la marcada inhibición de PCL hepática (185, 333, 341, 343), con un concomitante incremento de las actividades de ALA-S además de ALA-D, Uro I-S y Fe Q (187).

La actividad de PCL también está disminuída como respuesta al tratamiento con 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-

-dioxina (TCDD) (180, 188, 344) algunos bifenilos polibromados (190, 345) y polihalogenados, (190) y esta disminución está asociada con la acumulación hepática de Uro y Heptaporfirina. TCDD ha mostrado ser además un potente inductor de ALA-S (346).

Tanto la porfiria cutánea tarda humana (347-349) como la porfiria experimental inducida por hidrocarburos clorados parecen estar asociada a la siderosis hepática. Así, se ha informado que el contenido de hierro hepático se vió incrementado en ratas por tratamiento con HCB (173, 350, 351), bifenilos policlorados (352) o TCDD (353).

Por otra parte, en roedores la sobrecarga de hierro acelera y exacerba la porfiria inducida por HCB (170, 354) y la inhibición de PCL en respuesta a esta droga es más rápida y más pronunciada en presencia de incrementadas cantidades de hierro no hémico (355). Además, ha sido reportado que una cepa de ratas marcadamente susceptible al HCB tiene un contenido de hierro no hémico hepático mayor que el de las cepas menos susceptibles (356).

También se ha informado que la porfiria inducida por TCDD no se desarrolla en ratones deficientes en hierro (357) y que la Desferrioxamina, un específico quelante de hierro mejora el cuadro bioquímico, de la porfiria inducida en ratas por HCB (358).

Por otra parte, Sinclair y Granick (359) han informado que los quelantes de hierro previenen la acumulación

de Uro producida por compuestos cíclicos halogenados en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo.

El mecanismo por el cual se producen el bloqueo de PCL, en la porfiria causada por HCB y otros compuestos polihalogenados es aún desconocido.

En roedores, se ha informado que aunque la actividad catalítica de PCL hepática está muy disminuída por efecto de HCB ó TCDD, la concentración de enzima inmuno-reactiva no está alterada (360).

Esto sugiere la presencia de un inhibidor o modificaciones covalentes de la enzima con la consecuente inactivación de la misma. Así, la presencia de un inhibidor parcialmente estable ha sido reportado en preparación de ratas tratadas con HCB (361) y ratones tratados con TCDD (189). Aunque un efecto inhibitorio directo a relativamente altas concentraciones de bifenilos policlorados sobre PCL ha sido reportado por Kawanishi y col. (167); muchos estudios sugieren que a concentraciones efectivas "in vivo", los compuestos porfirinogénicos no son inhibitorios por sí mismos y necesitan interactuar con sistemas enzimáticos metabolizantes de drogas para generar un inhibidor activo.

Así, se ha informado que en hepatocitos de pollo cultivados (363, 364) y en codornices (365), el pretratamiento con β -naftoflavona o 3-Metilcolantreno, inductores de la isoenzima P-448 del citocromo P-450, potencia la porfiria causada por HCB y la misma es bloqueada por

piperonil butóxido, un inhibidor del metabolismo de drogas (364).

El pretratamiento con fenobarbital, otro inductor de enzimas metabolizantes de drogas dependientes de citocromo P-450, incrementa la inhibición de PCL causada por HCB en ratas (187) y en cultivos de hepatocitos de pollo tratados con TCDD (366).

Sinclair y col. (190) han mostrado que la acumulación de Uro causada por bifenilos policlorados y polibromados en cultivos de hepatocitos de pollo es dependiente de la isoenzima de P-450 inducida por 3-Metil colantreno y que la administración previa o simultánea de inhibidores de esta isoenzima, tales como piperonil butóxido o elipticina, previenen dicha acumulación.

Todos estos resultados sugieren que la acumulación de Uro causada por los compuestos halogenado es dependiente del metabolismo de estos por las isoenzimas de P-450 dando metabolitos o intermediarios reactivos que inhiben la enzima PCL.

Hasta el momento, no se ha obtenido evidencias directas de unión de metabolitos a la enzima. Por otro lado, los principales metabolitos del HCB han mostrado no inducir porfiria (367) aunque se ha informado que algunos son capaces de inhibir PCL "in vitro" (191).

Contrariamente a esta hipótesis de la unión covalente de algún metabolito de los compuestos halogenados a

PCL, con la consecuente inhibición irreversible de la enzima, Sinclair y col. (368) han informado que la acumulación de Uro causado por bifenilos policlorados puede ser rápidamente revertida por piperonil butóxido y otros inhibidores de P-450 y que la recuperación de la síntesis de hemo no es debida a síntesis de novo de enzima.

Una hipótesis alternativa que ha sido sugerida es que los compuestos halogenados pueden causar el bloqueo metabólico indirectamente, por estimulación de la producción de especies reactivas, peróxidos o radicales libres (369-371).

El rol de las isoenzimas de P-450, sería unirse a las drogas y generar una forma de Oxígeno activado.

Esta especie de Oxígeno activado podría atacar reversiblemente la PCL ó más probablemente, oxidar los porfirinógenos sustratos a porfirinas (367).

Si esto fuera así, el rol sinérgico del hierro en la inducción de porfiria por HCB puede provenir de la capacidad del ión Fe^{2+} en participar en las reacciones de peroxidación y de radicales libres.

IV. LINDANO Y HEPTACLOR.

IV.1. Estructuras químicas, usos y efectos generales.

Entre los años 1940 y 1960, los insecticidas organoclorados tuvieron un amplio uso en agricultura, para el control de insectos plagas y en salud pública, en progra-

mas de control de insectos vectores de enfermedades (372). Entre estos compuestos se encuentran el lindano, el isómero γ de hexaclorociclohexano, y el heptaclor, un ciclodieno. Las estructuras químicas de ambos se muestran en la Figura 28a.

El lindano, es importante, debido a su amplio espectro de acción biológica, alta eficacia al estado de vapor, bajo costo y fácil manufactura. Actualmente en nuestro país, es utilizado para proteger las viviendas contra el vector del mal de chagas, el *Triatoma infestans*. También es un componente activo de productos farmacéuticos para el tratamiento de pediculosis y escabiosis.

Los compuestos organoclorados tienen la desventaja de ser muy persistentes y como resultado de su alta estabilidad, liposolubilidad y propensión a la bioacumulación pueden entrar a la cadena alimentaria en cantidades significativas, constituyendo un alto riesgo para la salud humana.

La respuesta primaria de exposición a lindano es una estimulación del sistema nervioso central resultando en hiperexcitabilidad y convulsiones. El mecanismo de su acción neurotóxica aún no ha sido aclarado (372). El lindano puede ser absorbido a partir del tracto gastrointestinal, a partir de pulmón o a través de la piel (373). Utilizando ^{14}C -lindano por vía intravenosa o intraperitoneal se ha demostrado que en ratas, el tejido adiposo es el sitio más efectivo para la fijación del mismo (374).

El lindano ha sido implicado como responsable de algunos casos de discrasias sanguíneas. El análisis clínico de un grupo de trabajadores ocupacionalmente expuestos a lindano reveló un aumento de leucocitos polimorfonucleares y reticulocitos y disminución de linfocitos, protrombina y menor concentración sanguínea de creatinina y ácido úrico (375).

Se ha determinado en conejos, que la administración crónica de lindano condujo al desarrollo de anemia y a un proceso autoinmune, con aumento del título de anticuerpos contra los propios eritrocitos y contra nucleoproteínas del hígado. Se observó también un desbalance en el nivel de aminoácidos sanguíneos con deficiencia de valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, aspártico y glicina (376).

Estudios experimentales han demostrado que lindano incremento ácidos grasos libres en suero y triptofano libre y total en cerebro, (377), glucosa en sangre y niveles de GSH hepático (378).

En base a la naturaleza de los metabolitos urinarios aislados a partir de ratas alimentadas con lindano, Grover y Sims (379) propusieron un camino de detoxificación que involucra principalmente reacciones de dehidroclorinación dando compuestos aromáticos clorados.

En concordancia con lo anterior, se ha visto que en la orina de personas ocupacionalmente expuestas a lindano

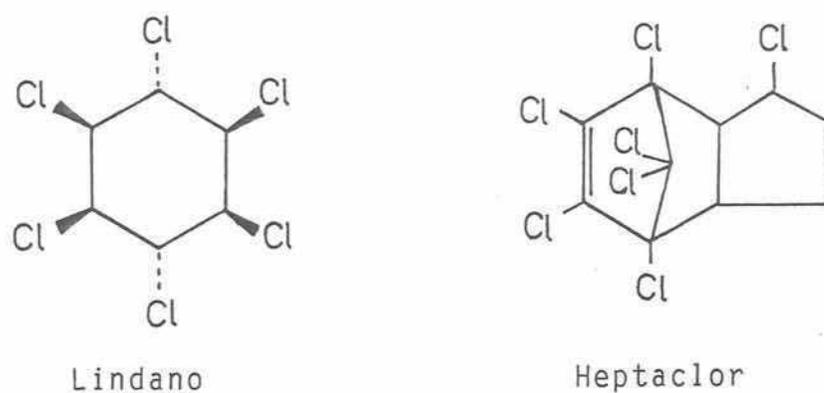


Figura 28a: Estructuras químicas de lindano y heptaclor.

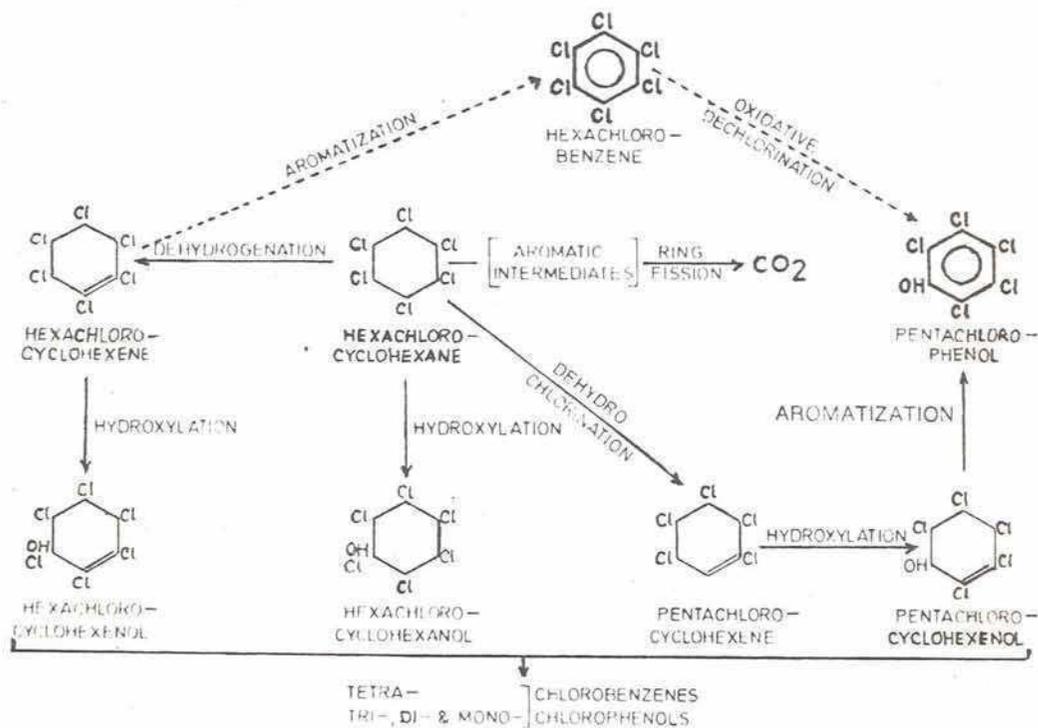


Figura 28b: Metabolismo de lindano en mamíferos (384).

los principales metabolitos excretados fueren di-, tri- y tetraclorofenoles (373). Además, se ha encontrado en hígado de pollo una actividad dehidroclorinasa que es capaz de metabolizar este pesticida "in vitro" dando, benceenos y fenoles di y triclorados (380).

En hígado de ratas (381-384) y también de humanos (382) la metabolización del lindano tiene lugar en microsomas hepáticos por reacciones de dehidroclorinación, dehidrogenación y declorinación (Figura 28 b), y las mismas se ven afectadas por agentes inductores o inhibidores de enzimas microsomales (381, 383). Un hallazgo notable es que en hígado de ratas (384) como también en microorganismos y plantas (385), el HCB ha sido identificado como un metabolito de lindano y se ha informado que la sangre de personas expuestas a hexaclorociclohexano contienen HCB además de otros metabolitos (386). Este hecho es de particular interés ya que el HCB es un activo agente porfirinogénico.

El heptaclor también tiene acción neurotóxica. La intoxicación aguda por heptaclor lleva a una estimulación del sistema nervioso central produciendo convulsiones. El sitio preciso y el mecanismo de su acción no se conocen (372).

Los estudios bioquímicos han mostrado que hay una alteración en la relación de aminoácidos de cerebro y un aumento en el nivel de NH_3 . Esta acción podría explicar el efecto sobre el sistema nervioso central.

Estudios de toxicidad crónica en animales experimentales mostraron incremento en la relación peso hígado/peso corporal y cambios histológicos en el hígado.

El heptaclor es metabolizado por las enzimas microsomas al correspondiente epóxido. El epóxido es también tóxico, es liposoluble y es almacenado en el tejido adiposo del hombre y otros animales. Las evidencias de que la epoxidación ocurre rápidamente en una variedad de especies, derivan del hecho que el análisis de residuos en animales que han sido expuestos a heptaclor revelan sólo almacenamiento del epóxido (387).

El epóxido posteriormente puede ser metabolizado a sustancias más hidrofílicas conjugado y excretado.

IV.2. Efecto sobre el metabolismo del hemo.

Respecto a la acción de estos compuestos, sobre el metabolismo del hemo, se ha reportado que lindano produce acumulación de porfirinas en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo (276). Sinclair y Granick (359) han informado que la porfirina acumulada es principalmente Uro III y este efecto es dependiente de síntesis de proteínas, hierro endógeno y citocromo P-450.

En un trabajo más reciente, Sinclair y col. (368) han informado que la acumulación de Uro producida por lindano es revertida por piperonil butóxido, un inhibidor del sistema metabolizante de drogas.

Por otra parte, Simon y Siklosi (388, 389) han infor

mado que como resultado de la administración de lindano a ratas, se produce un aumento en la excreción de porfirinas.

Paralelamente a los estudios de la presente Tesis, se ha estudiado en nuestro laboratorio el efecto de lindano en ratas (390).

Se halló que el pesticida aumentó la excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina y porfirinas en heces. Los aumentos en la excreción de porfirinas corroboran los resultados obtenidos por Simon y Siklosi, pero ellos no detectaron aumentos en la excreción urinaria de ALA y PBG.

De Matteis (299) encontró que en ratas, la administración de una única dosis de lindano, no incrementó la actividad de ALA-S hepática en forma significativa pero potenció la estimulación causada por AIA o DDC. La actividad de la enzima reguladora, ALA-S, tampoco se vió afectada por tratamiento prolongado con lindano (388, 390).

Respecto al heptaclor, hasta el momento, no hay ningún informe sobre su efecto sobre el metabolismo del hemo.

OBJETIVO DEL TRABAJO.

El embrión de pollo ha demostrado ser un sistema experimental muy útil para el estudio de la capacidad porfirinogénica de muchas drogas ya sea trabajando en cultivo (27) como con el embrión entero (302, 391).

Hay varios reportes que indican que el hígado del embrión de pollo es más sensible al efecto de drogas porfirinogénicas que el hígado de los mamíferos (276, 302, 303), siendo el orden de sensibilidad el siguiente: embriones de 17 días > pollos > ratas (392).

Por otra parte, haciendo un estudio comparativo de la conversión de ALA en hemo por homogenato de hígado humano (393) y de ratas y embrión de pollo (394), se ha informado que el hígado humano se asemeja al de los embriones de pollo.

La máxima conversión de ALA en hemo por homogenato de hígado humano (393), es aproximadamente igual que el de embriones de pollo (394); en cambio la velocidad de esta conversión por homogenato de hígado de rata es 5 veces mayor (394). Además, los homogenatos de hígado humano y de embrión de pollo acumulan Proto y hemo en cantidades similares, en tanto que el de rata acumula el doble de hemo que de Proto.

Así, como modelo experimental para el estudio del metabolismo del hemo, el embrión de pollo se asemeja al hígado humano más que el hígado de roedores. A pesar de ello, no es el modelo ideal, ya que el paso limitante de la síntesis de hemo a partir de ALA en embrión de pollo es la FeQ más que PBG-D como ocurre en ratas y humanos (393, 394).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y en base a lo expuesto en la Introducción, resultó de interés estudiar, el efecto de lindano y heptaclor sobre el metabolismo del hemo en embriones de pollo.

Con este fin, dichos pesticidas se administraron al embrión de pollo "in ovo" y se evaluó:

- 1) La capacidad porfirinogénica de lindano y heptaclor.
- 2) El efecto de dichos plaguicidas sobre tres enzimas claves del camino metabólico del hemo: ALA-S, PCL y FeQ

El efecto sobre FeQ, enzima que forma el producto final y regulatorio del camino, evaluará si la acumulación de porfirinas que se produce es debido al bloqueo de esta enzima y si el aumento de ALA-S es consecuencia o no de esa posible inhibición. En cuanto a la acción sobre PCL, permitirá ver si lindano y heptaclor, a semejanza de otros compuestos clorados son capaces de bloquear esta enzima y conocer además, si en estos efectos está involucrado un metabolito de la droga.

Por otra parte es interesante estudiar el mecanismo íntimo de la inducción de ALA-S por los pesticidas para establecer si es dependiente de síntesis de proteínas, si puede ser anulado por hemina y si está afectada la translocación celular de la enzima.

Para cumplimentar el objetivo enunciado, se realizaron los siguientes estudios:

I. Efectos globales sobre el camino del hemo.

- 1) Se analizó el contenido de porfirinas en el hígado de los embriones tratados con los pesticidas.
- 2) Se estudió la naturaleza de las porfirinas acumuladas.

II. Efecto sobre ALA-S.

Para ver el efecto de lindano y heptaclor sobre ALA-S

se estudió:

- 1) La actividad de esta enzima en función de la dosis de droga administrada y del tiempo de tratamiento.
- 2) La respuesta de la enzima a estos compuestos en función de los días de desarrollo del embrión.

Con el objeto de aclarar el mecanismo por el que se produce el aumento de ALA-S por los pesticidas, se investigó:

- 1) El efecto "in vitro" de lindano y heptaclor sobre la actividad de enzima normal.
- 2) El efecto de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la respuesta de ALA-S a los pesticidas.
- 3) El efecto de hemina sobre el aumento de ALA-S producido por lindano y heptaclor.
- 4) La distribución subcelular de la enzima en embriones tratados con estos compuestos clorados.

III. Estudios sobre PCL.

- 1) En primer lugar se puso a punto el método de determinación de PCL en hígado de embriones.
Para ello se estudió el efecto de la concentración de sustrato, enzima, pH, curva de reacción, efecto de GSH, EDTA, temperatura de incubación, oxígeno y acción de diversos compuestos tales como protectores de grupos sulfhidrilos, quelantes, sales halogenadas e hierro.
- 2) Se estudió el efecto de los pesticidas sobre las dos etapas de decarboxilación del Uro'gen III en dos cepas

de embriones de 17 días y en pollos de 1 día.

- 3) Se investigó el efecto del pretratamiento de los embriones con fenobarbital y SKF-525A, sobre la respuesta de la enzima a los compuestos clorados.

IV. Estudios sobre Ferroquelatasa.

- 1) Se adecuaron las condiciones de medición de esta enzima en base a los métodos publicados para embriones de pollo (303, 304).
- 2) Se estudió el efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad hepática de esta enzima.

Estos estudios permitirán así estudiar la capacidad porfirinogénica de estos dos pesticidas ampliamente usados en agricultura y conocer a nivel molecular los mecanismos involucrados en la desregulación de este camino, llevando como consecuencia de los mismos a la porfiria.

Conocimientos, que como se ha documentado en la Introducción, son carentes para heptaclor e incompletos para lindano.

El presente estudio se encara con la idea de tener un mejor conocimiento de la acción biológica de estos pesticidas, sobre todo en lo que concierne al camino metabólico del hemo.

Esto último es importante ya que se sabe que aún pequeñas dosis de drogas porfirinogénicas son capaces de desencadenar o exacerbar cuadros de porfiria en personas con el rasgo hereditario latente (395).

Así mismo, con la idea de inferir la posibilidad de que el represor natural del camino biosintético del hemo pudiese atenuar la porfiria producida por estos pesticidas y desde un punto de vista básico, de ampliar el espectro de conocimiento sobre la regulación del mencionado camino.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S .

MATERIALES.DROGAS.

Lindano: de Compañía Química S.A., Buenos Aires, Argentina,
por gentileza del Dr. Turk. Grado técnico.

Heptaclor: de Chemotécnica Sintyal S.A., Buenos Aires, Ar-
gentina por gentileza del Dr. Sade. Grado Técnico.

Fenobarbital: de Bayer Argentina S.A., Buenos Aires, Argen-
tina, por cortesía del Dr. Méndez.

SKF-525 A: de Smith, Kline & French International Co.,
Philadelphia P.A. por gentileza del Dr. Prieto de
SKF-Argentina.

Cicloheximida: de Sigma Chemical Co.

Actinomicina D: de Sigma Chemical Co.

Hemina: de Porphyrin Products, Logan, Utah.

SUSTRATOS.

Glicina: de Sigma Chemical Co.

Uro III: Aislada de turacina como describen San Martín de
Viale y col. (333) o adquirida a Porphyrin Products,
Logan, Utah.

Meso IX: de Porphyrin Products, Logan, Utah.

Succinato de sodio: de Sigma Chemical Co.

Coenzima A: de Sigma Chemical Co.

$SO_4Fe.7H_2O$: May and Baker.

INT: de Sigma Chemical Co.

SOLVENTES.

Acetato de etilo: Douglas o Atanor p.a.

Acido acético glacial: Douglas p.a.

Acido perclórico: Mallinckrodt o Merck p.a.

Benceno: Carlo Erba RP.

Cloroformo: Carlo Erba RP y FU, Merck o Sintorgan p.a.

DMSO: Sigma Chemical Co.

Dioxano: Lowens, o Merck p.a.

Kerosene: Fracción 190-240°C. Se obtuvo a partir de kerosene comercial por el método de Falk y Benson (396).

Este fue lavado varias veces con agua, secado 48 horas sobre Cl_2Ca granulado y destilado en columna rectificadora. Se hizo una primera destilación entre 180-250°C y esta fracción se volvió a destilar recogiendo la fracción 190-240°C.

Metanol: Carlo Erba RP.

OTRAS DROGAS.

P.Pal: de Sigma Chemical Co.

EDIA: Mallinckrodt.

GSH: de Sigma Chemical Co.

p-DMAB: Mallinckrodt o Merck.

ATP: Sigma Chemical Co.

Piridina: Carlo Erba RP.

Tween 80: de Atlas cedida gentilmente por el Dr. Celotto.

Reactivo de Folin-Ciocalteu: Merck p.a.

MATERIAL AUXILIAR.

Jeringas: Becton-Dickinson de tuberculina de 0,5 ml.

Agujas: descartables estériles calibre 22 y 1 1/2 pulgadas.

Cromatoplasmas: Merck de Sílica Gel 60 F₂₅₄ de 5 por 20 cm y 0,25 mm. de espesor.

Papel de filtro: Whatman N° 1 para cromatografía.

Escherichia coli B: cedida gentilmente por el Dr. Alberto A. Viale de la Cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Química Biológica.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Embriones de pollo de 17 ó 18 días de las cepas White Leghorn o New Hampshire que se adquieren a las edades correspondientes en un comercio (Alonso S.R.L.). Se mantienen en incubadora a 36-39°C.

Pollitos de 1 día de la Cepa White Leghorn.

Para los estudios de contenido de porfirinas, ALA-S y Ferroquelatasa se emplearon embriones White Leghorn.

Para estudiar el efecto de lindano y heptaclor sobre PCL se emplearon embriones White Leghorn y New Hampshire.

METODOS.

I. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

I.1. Inoculación de embriones.

Se marca con un lápiz de grafito la cámara de aire, mirando el huevo a través del ovoscopio. Como se muestra en la Figura 29, se desinfecta la cáscara por encima de la cámara de aire con un algodón embebido en alcohol, se hace un pequeño orificio con un punzón y luego se corta con tijera un disco de aproximadamente 1 cm. de diámetro. Con pipeta Pasteur estéril se colocan 2 ó 3 gotas de solución fisiológica estéril, con el objeto de transparentar la membrana corioalantoica.

Las drogas se inyectan a través de esta membrana en los fluidos que rodean al embrión, como se muestra en la Figura 29, utilizando una jeringa de 0,5 ml provista de una aguja descartable estéril calibre 22 de 1,5 pulgadas.

Lindano y heptaclor se inyectan disueltos en 0,2 ml de DMSO, lo mismo que la hemina. Fenobarbital, SKF-525 A, Cicloheximida y Actinomicina D se inyectan disueltos en 0,2 ml de solución fisiológica estéril.

La abertura de la cámara de aire se sella con cinta adhesiva y los embriones se colocan en cámara húmeda a 36-39°C.

I.2. Inoculación de pollitos.

Los pollitos se inyectan intraperitonealmente utilizando una jeringa y aguja estéril similar a la empleada

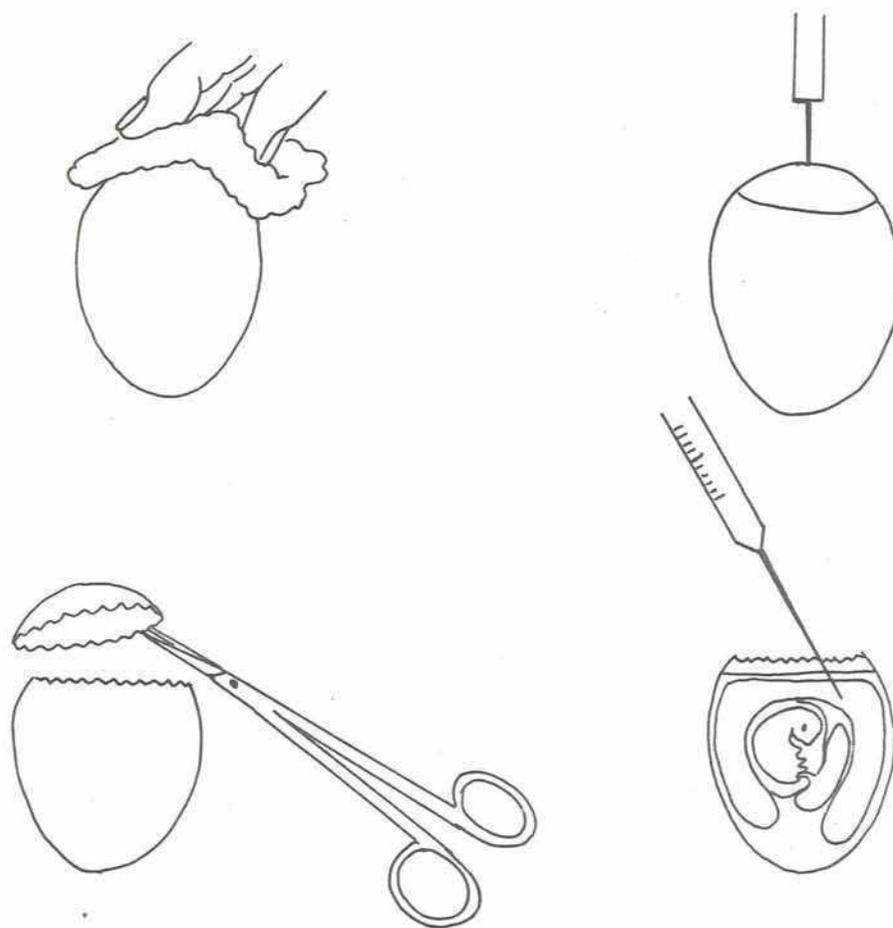


Figura 29. Esquema del procedimiento de Inoculación de los embriones.

para embriones. Luego de la inyección se los mantiene a temperatura ambiente hasta el momento del sacrificio.

I.3. Obtención del hígado.

Luego de los tiempos de incubación indicados en cada caso se sacan los huevos de la incubadora. Los embriones se matan por decapitación, sacándolos previamente del huevo a través del orificio practicado en la cámara de aire. Inmediatamente se les extrae el hígado, tratando de no romper la vesícula biliar y se colocan en solución fisiológica fría.

Los hígados se secan, se pesan y se homogeneizan en el medio correspondiente de acuerdo a lo que se desea analizar, contenido y naturaleza de porfirinas acumuladas o actividades enzimáticas.

Los pollitos se matan por decapitación y luego los hígados se procesan como se acaba de describir.

II. ANALISIS DE PORFIRINAS.

II. 1. Determinación del contenido hepático de porfirinas.

Para evaluar la acumulación de porfirinas en el hígado de los embriones, éstas fueron extraídas según el método descrito por Racz y Marks (302).

El hígado seco y pesado (0,3-0,5 g) se homogeneiza en un potter de vidrio con émbolo de teflón con 5 ml de la mezcla acetato de etilo: ácido acético (4:1; v/v). El homogenato obtenido se centrifuga y el sobrenadante se coloca

en una ampolla de decantación que contiene 10-12 ml de acetato de sodio 3% (p/v). El precipitado se macera con una varilla de vidrio más 5 ml de la mezcla acetato de etilo: ácido acético y se vuelve a centrifugar. El sobrenadante último se reúne con el primero en la ampolla. Esta operación se repite hasta llegar a fluorescencia negativa en el sobrenadante, al observarlo bajo luz ultravioleta. El precipitado finalmente se descarta. Se tienen entonces todos los sobrenadantes reunidos en la ampolla, se agita suavemente por rotación y se separa la fase acuosa inferior. La fase superior se lava dos veces con 10 ml de acetato de sodio 3% reuniendo las fases acuosas de los lavados.

La fase orgánica se pasa a un erlenmeyer. A la fase acuosa se le extraen las porfirinas con acetato de etilo hasta fluorescencia negativa. Los extractos orgánicos de estos lavados se reúnen en una ampolla de decantación y se lavan con 10 ml de acetato de sodio 3% para eliminar el posible ácido acético que pudiera haber quedado en esta fase.

Todos los extractos acetato de etilo se reúnen en una ampolla de decantación y se extraen las porfirinas con HCl 5%. Se colocan pequeños volúmenes de HCl 5% y se agita vigorosamente. La fase clorhídrica se filtra a través de papel de filtro doble (Whatman Nº 42) embebido en HCl 5%. Se repite la extracción hasta llegar a fluorescencia negativa. Se lee el volumen recogido, se homogeneiza y se realizan las lecturas fluorimétricas utilizando como standard una

solución de Copro III en HCl 5%, de aproximadamente 0,7-0,8 ug/ml.

Los ug de porfirinas totales se calculan como:

$$\text{ug de porfirinas} = \text{Lectura} \times \text{Volumen} \times f.$$

donde f es el factor de calibración.

Los resultados se expresan como : ug porfirinas/g de hígado.

II.2. Análisis de la naturaleza de las porfirinas acumuladas.

Para analizar la naturaleza de las porfirinas acumuladas, éstas fueron esterificadas para obtener los metil ésteres correspondientes y luego se realizó la separación de los mismos por cromatografía en capa delgada o cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en algunos casos.

II.2.a. Esterificación de las porfirinas.

Luego de realizadas las lecturas fluorimétricas, los extractos clorhídricos conteniendo las porfirinas se secan en un desecador bajo vacío y una vez secos, se les agregan 20 ml de la mezcla metanol: SO_4H_2 , (19:1, v/v) y se las deja en la oscuridad 15 horas. Al cabo de ese tiempo se realiza el pasaje a cloroformo de las porfirinas esterificadas.

II.2.b. Pasaje a cloroformo.

A la solución de porfirinas en la mezcla esterificante se le agregan 10 ml de cloroformo y luego se lleva a pH 4,5 con solución saturada de acetato de sodio. Se vuelca la

mezcla en una ampolla de decantación que contiene 10-12 ml de agua destilada y se agita suavemente. Se separa la fase clorofórmica inferior que contiene las porfirinas esterificadas. A la fase acuosa remanente se le siguen extrayendo las porfirinas con pequeños volúmenes de cloroformo hasta fluorescencia negativa bajo luz ultravioleta.

Los extractos clorofórmicos se reúnen en la ampolla y se lavan con agua destilada. Como la fase clorofórmica luego de todo este proceso queda emulsionada, se la agita en ampolla de decantación con igual volumen de solución de NaCl 7% y luego se recoge la fase clorofórmica límpida, filtrándola por papel de filtro doble embebido en cloroformo.

El extracto clorofórmico luego se concentra a baño María al vacío y se guardan las porfirinas esterificadas secas para su análisis cromatográfico.

II.2.c. Identificación de porfirinas por cromatografía en placa delgada.

Para la separación cromatográfica de las porfirinas, se utilizaron placas de Sílica Gel 60 F 254 de 5 x 20 cm y 0,25 mm de espesor, de acuerdo al método descrito por Doss (398).

Primero se realiza la limpieza de las placas haciendo dos corridas sucesivas, primero en cloroformo:metanol (2 + 1, v + v) y luego en cloroformo:metanol (1 + 2, v + v). Luego de secadas, las placas se reactivan a 80°C durante 30 minutos.

Se carga el tanque de desarrollo con la mezcla benceno:acetato de etilo:metanol (85 + 13,5 + 1,5, v + v + v) y se satura durante 30-45 minutos.

Las porfirinas esterificadas se disuelven en un pequeño volumen de cloroformo y se siembran en la placa en forma de línea. Se corren testigos de Uro, Hepta, Hexa, Penta y Coproporfirina metil ésteres.

La placa se desarrolla por la técnica ascendente y luego se revela bajo lámpara ultravioleta de Wood, rápidamente, evitando que se seque para que las manchas no pierdan nitidez.

Las porfirinas se separan por este método según el número de carboxilos, siendo el orden de movilidad inverso al número de carboxilos presentes.

Se identifica el lugar donde aparece la mancha de cada porfirina en la placa marcando con un punzón. Con una espátula se raspa el gel recogiéndola en un tubo de centrifuga, luego se procede a la elución con pequeños volúmenes de cloroformo, separando el eluido por centrifugación. Se miden los volúmenes recogidos y las porfirinas se cuantifican espectrofotométricamente.

II.2.d. Determinación cuantitativa de porfirinas metil éster.

Para la determinación cuantitativa de cada una de las porfirinas eluidas del cromatograma, se determina la absorbancia en la región de la banda Soret comprendida entre 400 y 410 nm, en el máximo correspondiente a cada una. Se cal-

culan los nmoles utilizando la recíproca de los coeficientes de extinción dados por Salum y col. (399).

La recíproca de los coeficientes de extinción en cloroformo de las porfirinas de 5- y 6-COOH fueron interpolados entre los valores correspondientes a las porfirinas de 7- y 4-COOH, suponiendo una función lineal entre el número de COOH y la recíproca del coeficiente de extinción.

Con estos resultados, se pueden calcular los porcentajes relativos en que aparecen cada una de las porfirinas en la cromatografía.

II.2.e. Separación de porfirinas metil ésteres por HPLC.

La separación de las porfirinas por HPLC se realizó según la técnica descrita por Gray y col. (400).

Se utiliza un detector de absorbancia 440 usado a 404 nm y una bomba 6000 A con un inyector UGK. Se utilizan Columnas de u Porasil de 30 x 4 cm y el sistema de solventes es n-heptano:acetato de etilo (3:2, v/v), a un flujo de 1,5 ml y 700 psi.

La mezcla de porfirinas metil ésteres se disuelven en un pequeño volumen de cloroformo y se inyectan 20-25 ul. Las porfirinas se cuantifican usando curvas de calibración preparadas para cada una de ellas ya que hay una relación lineal entre el área bajo el pico y la cantidad de porfirinas. Los coeficientes de proporcionalidad (Area/nmoles) fueron 24 y 12,2 para Uro metil éster; 19 y 9,9 para Hepta; 17 y 8,7 para Hexa; 26 y 12,2 para Penta y 23 y 10,5 para

Copro metil éster, usando 0,05 y 0,1 unidades de absorban-
cia respectivamente para la escala total (358).

III. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S.

Los hígados se homogeneizan en 4 volúmenes (v/p) de una solución que contiene EDTA 0,5 mM; Tris-HCl 8,35 mM y Tris base 1,6 mM (pH: 7,4).

La actividad de ALA-S se determina en el homogenato de acuerdo al método de Rifkind y col. (391) que a su vez es una modificación del método de Marver y col. (401).

La mezcla de incubación contiene en un volumen de 2 ml: 0,06 M de buffer Tris-HCl (pH: 7,2); 0,075 M de Glicina; 0,01 M de EDTA; 0,15 mM de PPal y 0,5 ml de homogenato que contiene 0,125 g de hígado. Las incubaciones se realizan en tubos de ensayo, a 37°C, con agitación mecánica, durante 1 hora. Finalizada la misma, los tubos se colocan en hielo y se agregan 0,5 ml de TCA 25% (p/v). Los blancos de incubación llevan los mismos reactivos que los ensayos y no se incuban.

Las incubaciones desproteinizadas se dejan por lo menos 1 hora en frío o en muchas ocasiones se guardan hasta el día siguiente en heladera.

Para la determinación colorimétrica del ALA formado, se separa el sobrenadante por centrifugación y se lleva a pH: 4-4,5 con NaOH 5 N. Luego se transfiere a otro tubo una alícuota de 1 ml, se le agrega 1 ml de buffer acetato de so

dio 0,1 M (pH: 4,6) y 0,05 ml de acetyl acetona (2,4-pentanonodiona). Se calienta a 100°C durante 10 minutos para convertir el ALA a ALA pirrol por condensación con acetyl acetona (402). Una vez frío, se le agrega igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado y luego de 15 minutos se determina la absorbancia a 550 nm.

Para preparar el reactivo de Ehrlich modificado se disuelve 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 30 ml de ácido acético glacial, se añaden 8 ml de ácido perclórico 70% y se lleva a 50 ml con ácido acético glacial. Este reactivo es estable durante 6-8 horas a temperatura ambiente.

En base a la diferencia de absorbancia entre el ensayo y el blanco, se determinan los nmoles de ALA formado utilizando un $\epsilon_{mM}^{555} = 62$ (187).

La actividad de ALA-S se expresa como:

nmoles de ALA/g de hígado/hora.

IV. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S.

IV.1. Obtención de las fracciones subcelulares.

Los hígados provenientes de 4 embriones se homogeneizan en 4 volúmenes (v/p) de Sacarosa 0,25 M (pH: 7,2).

El homogenato se centrifuga a 600 x g durante 10 minutos para separar los núcleos. El precipitado de núcleos se lava 3 veces con la solución de homogeneización y los sobrenadantes, reunidos con el original. Para separar las mitocondrias, el sobrenadante de 600 x g se centrifuga a

11.000 x g, 20 minutos y las mitocondrias precipitadas se lavan una vez con Sacarosa 0,25 M. El sobrenadante total resultante se centrifuga a 105.000 x g por 60 minutos y se obtienen así los microsomas precipitados y el citosol.

Para la determinación de actividades enzimáticas, los núcleos, mitocondrias y microsomas se resuspenden en la solución de Sacarosa 0,25 M llevándolos a un volumen de 3,5 ml y el soluble se usa como tal.

En cada fracción se mide la actividad de ALA-S y como marcador mitocondrial, Succínico deshidrogenasa (SDH). En estas experiencias, la actividad de ALA-S se mide con agregado de Succinil-CoA Sintetasa (Succ-CoA-S) para asegurar que en todas las fracciones haya suficiente Succinil CoA, ya que ésta es una enzima mitocondrial.

IV.2. Medición de la actividad de ALA-S con agregado de Succ-CoA-S.

El medio de incubación contiene en un volumen final de 2 ml = 0,05 M de buffer Tris -HCl (pH: 7,2); 0,10 M de Glicina; 0,01 M de EDTA; 0,15 mM de PPal; 0,05 M de ATP 0,1 mM de CoASH; 0,02 M de $MgCl_2$; 0,005 M de Succinato de Sodio; 0,05 unidades de Succ.CoA-S (obtenida de *Escherichia coli* (38) y medida por el método de Kaufman (403)) y 0,5 ml de homogenato o de fracciones subcelulares. Las incubaciones se llevan a cabo en tubos de ensayo, a 37°C, durante 1 hora y con agitación mecánica. Se desproteinizan con 0,5 ml de TCA 25% (p/v). La colorimetría se realiza de la

misma manera que se describió anteriormente en la medición de ALA-S sin agregado de Succ.CoA-S, sección III.

La actividad de cada fracción se expresa como:

nmoles ALA/g. hígado/ hora

IV.3.a. Obtención de Succinil-CoA Sintetasa.

Esta enzima fue obtenida, a partir de *Escherichia coli* B como describen Ohashi y Kikuchi (38). Las bacterias cedidas por el Dr. Alberto A. Viale de la Cátedra de Microbiología se hicieron crecer aeróbicamente en un medio conteniendo Succinato como única fuente de Carbono (Gibson y col. (404)).

El medio de cultivo tiene la siguiente composición: KH_2PO_4 0,02 M; K_2HPO_4 0,02 M; NH_4Cl 0,3%; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04%; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,001%; extracto de levadura (Oxoid) 0,005%; Succinato disódico. $6\text{H}_2\text{O}$ 2,2%. Cada litro de medio se inoculó con 30 ml de un cultivo de *Escherichia coli* crecidas durante 10 horas en igual medio y se incubaron a 37°C con agitación durante 30 horas.

Las bacterias se precipitan por centrifugación a 6000 x g, 15 minutos luego se suspenden en buffer fosfato 0,02 M (pH: 7,2) conteniendo MgCl_2 0,02 M. Las células se sonicán con 2 pulsos de 30 segundos (130 vatios/cm² dl) con un intervalo de 30 segundos y luego se centrifugan a 10.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se fracciona con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y la fracción de proteínas precipitadas entre 50 y 65% de saturación se pasa a través de una co-

lumna de Sephadex G-25 eluidas con buffer Tris-ClH 0,1 M (pH: 7.2). La fracción proteica libre de sulfatos se utiliza como fuente de Succ.CoA-S. Esta preparación no presenta actividad de ALA-S y es estable por meses guardada en congeladora.

IV.3.b. Medición de la actividad de Succinil CoA-Sintetasa.

Esta enzima cataliza la formación de Succ.CoA a partir de Succinato y CoASH en presencia de ATP. En presencia de hidroxil amina, el Succinil CoA formado reacciona dando ácido succinohidroxámico que se determina con el reactivo de FeCl_3 de Lipmann y Tuttle (405).

La actividad de esta enzima se mide como ya se dijo por el método de Kaufman (403). A 0,4 ml de NH_2OH 2.4 M neutralizado con KOH se le agregan 0,1 ml de cada uno de los siguientes reactivos: buffer Tris-ClH 1 M (pH; 7,4); Succinato de potasio 1 M; ATP 0,1 M; CoASH 0,0013 M; GSH 0,2 M; MgCl_2 0,1 M; se adiciona la enzima y se completa a 2 ml de volumen final con agua destilada. Los ensayos se incuban a 37°C durante 30 minutos. La reacción se para por la adición de 1 ml de una solución fresca conteniendo volúmenes iguales de Cl_3Fe 5%; HCl 3 N y TCA 12%. La proteína precipitada se remueve por centrifugación y se determina la absorbancia del sobrenadante a 504 nm.

La curva de calibración se realizó con anhídrido succínico ya que éste forma el ácido succínico hidroxámico, obteniéndose un valor de recíproca de pendiente de 2,4 umoles.

Una unidad de SuccCoA-S se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 umol de ácido succinohidroxámico en 1 minuto a 37°C.

IV.4. Medición de la actividad de Succínico deshidrogenasa.

La actividad de SDH, enzima localizada en la membrana interna mitocondrial y utilizada por ello como marcador mitocondrial, se midió de acuerdo al método de Pennington (406) como Succinato-2-p-Iodofenil-3-(p-nitrofenil)5-fenil tetrazolio reductasa.

El medio de incubación contiene en un volumen final de 1 ml: 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH: 7,4); 0,1% de cloruro de 2-(p-Iodofenil)-3-(p-nitrofenil) 5-fenil tetrazolio (INT); 50 mM de Succinato de sodio; 25 mM de Sacarosa y la enzima. Los ensayos se incubaron 15 minutos a 37°C y se agrega 1 ml de TCA 10%. El formazán formado, producto de la reducción del INT, se extrae con 4 ml de acetato de etilo y se mide la absorbancia de la fase orgánica a 490 nm.

Se define una unidad de SDH como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de INT produciendo un aumento de absorbancia de 1 leído a 490 nm, en las condiciones de ensayo utilizadas (281).

La actividad de SDH se expresa como:

Unidades de enzima/g. hígado/ 15 minutos

V. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PORFIRINOGENO CARBOXILIASA.

V.a. Preparación de Uroporfirinógeno III.

El sustrato, Uro³gen III se prepara de acuerdo al método de Mauzerall y Granick (150), que consiste en la reducción de Uro III con amalgama de sodio en medio básico.

A una solución de Uro III en NaOH 25 mM se le agrega amalgama de sodio al 3% recientemente pulverizada en mortero, aproximadamente en relación 0,2 - 1,0 g de amalgama/ml de solución de Uro. Se agita vigorosamente en tubo cerrado. Luego de 10-20 minutos, se produce la reducción de la porfirina, lo que se comprueba por la pérdida de fluorescencia roja al observar la solución a la lámpara ultravioleta de Wood.

Para separar la amalgama sobrante, se filtra al vacío, a través de una pequeña plaquita filtrante de poro fino, provisto de un disco de papel. El filtrado se lleva a pH 7-7,2 con H_3PO_4 40% (p/v) y se mantiene constantemente bajo Nitrógeno hasta el momento de ser usado. Estas operaciones deben ser realizadas lo más rápidamente posible para evitar la oxidación del porfirinógeno.

La preparación, así como también el pipeteo del porfirinógeno se realiza en cuarto oscuro y bajo una tenue luz roja.

V.b. Preparación de la amalgama de sodio.

Aproximadamente 30 g de mercurio se calientan a 30-40°C, en cápsula de porcelana y se introducen en la masa

fundida trozos pequeños de sodio recientemente cortados (407). Esta operación se realiza bajo campana y con sumo cuidado. Se deja enfriar, con lo cual la amalgama se endurece y se puede guardar en frasco seco y bien cerrado en un desecador.

V.c. Ensayo de actividad.

La actividad de PCL fue medida como detallan San Martín de Viale y col. (186).

Los hígados de 2 ó 3 embriones se homogeneizan en 5 volúmenes (v/p) de KCl 0,154 M. Los homogenatos se centrifugan a 11.000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante resultante se utiliza como preparación enzimática.

La mezcla de incubación contiene en un volumen final de 4 ml: 0,5 ml de preparación enzimática que contiene entre 8,5-10 mg de proteínas; 0,067 M de buffer fosfato de potasio (pH: 6,8) y 2 uM de Uro'gen III. En los primeros ensayos se agregó además, 0,1 mM de EDTA y 1 mM de GSH, estos reactivos luego fueron omitidos porque, como se verá en Resultados no son necesarios. Las incubaciones se realizan en tubos de Thunberg, anaeróbicamente, en la oscuridad y con agitación mecánica, a 37°C, durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo, los tubos se colocan en hielo y se detienen las incubaciones por la entrada de Oxígeno y el agregado de 0,4 ml de HCl conc. Los incubados se dejan expuestos al aire y la luz para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. Estas son luego extraídas filtrando

la mezcla de incubación a través de papel de filtro. Las porfirinas extraídas se secan en desecador bajo vacío y una vez secos, se esterifican por agregado de la mezcla metanol-SO₄H₂ (19:1, v:v) durante 36 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Al cabo de ese tiempo, las porfirinas metil ésteres se extraen en cloroformo como se describe en la sección II.2.b.

La separación de las porfirinas se lleva a cabo por cromatografía en papel, cada una de las porfirinas presentes se eluye del papel con cloroformo y se cuantifican espectrofotométricamente.

La actividad de la primer etapa de decarboxilación del Urogen, es decir el pasaje de Uro'gen a Hepta'gen se expresa como:

$$\text{nmoles de porfirinas de } 7\text{-} + 6\text{-} + 5\text{-} + 4\text{-COOH/mg proteína/} \\ 30\text{min.}$$

La actividad de la segunda etapa de decarboxilación o sea el pasaje de Hepta'gen a Copro'gen, se expresa como:

$$\text{nmoles de } 4\text{-COOH porfirina / mg proteína / } 30\text{min.}$$

V.d. Separación de porfirinas metil éster por cromatografía en papel.

La mezcla de las porfirinas esterificadas proveniente de las incubaciones, se disuelven en un pequeño volumen de cloroformo y se aplican en forma de una línea angosta de 4-4,5 cm de longitud sobre una tira de papel Whatman N°1

y la cromatografía se desarrolla en forma ascendente por el sistema de Falk y Benson (396). Se siembran además tes tigos de las distintas porfirinas metil éster.

Se realizan dos corridas cromatográficas sucesivas. La primer corrida se hace en cuba cromatográfica saturada con cloroformo y el solvente de desarrollo es cloroformo; kerosene (2:1, v/v). Se deja correr la cromatografía 15 minutos, se saca el papel y revelando bajo lámpara ultravioleta se descarta la zona de siembra, donde quedan las impurezas.

La segunda corrida se hace en una cuba saturada con dioxano y el solvente de desarrollo es kerosene:dioxano (2,5:1, v/v). En esta corrida las porfirinas esterificadas se separan de acuerdo al número de cadenas laterales COOH que posee la molécula, siendo las de mayor movilidad las de menor número de COOH. Desde el frente hacia la línea de siembra el orden en que aparecerán las distintas porfirinas es: Copro, Penta, Hexa, Hepta y Uro. En este segundo solvente se deja desarrollar la cromatografía durante 2,5 horas, se revela entonces mirando la fluorescencia a la lámpara ultravioleta y se marca con lápiz de grafito la zona del papel que corresponde a cada porfirina.

Luego, el papel se seca, se corta y cada banda se eluye separadamente con cloroformo. Las porfirinas se cuantifican espectrofotométricamente como ya ha sido descrito, sección II.2.d.

Teniendo los porcentajes relativos de las diferentes porfirinas presentes al final de la incubación y sabiendo los nmoles del sustrato (Uro'gen) incubados, se pueden calcular los nmoles de intermediarios (Hepta, Hexa y Penta) y producto (Copro).

V.e. Determinación de proteínas.

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y col. (408). Las muestras se diluyen convenientemente con agua destilada de modo de utilizar una alícuota de 0,1 a 0,4 ml por ensayo. A esta alícuota se le agregan 2 ml de solución alcalina de cobre, que se prepara mezclando 1 ml de solución de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en tartrato de sodio y potasio al 0,5% con 50 ml de solución de CO_3Na_2 2% en NaOH 0,1 N. Luego de 10 minutos se agregan 0,2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y al cabo de 30 minutos se determina la absorbancia a 660 nm.

Para realizar la curva de calibración se utiliza una solución testigo de albúmina bovina (0,5 mg/ml).

VI. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FERROQUELATASA.

VI.a. Preparación de la solución de Mesoporfirina IX.

La solución de Mesoporfirina IX que se utiliza como sustrato de FeQ, se prepara como describen Porra y col.(234).

La porfirina se disuelve en un pequeño volumen de NH_3 2 N, la solución obtenida se diluye 10-20 veces, se neutraliza a pH: 8,2 con HCl 1 N y se lo hace 0,01 M respecto a buffer Tris-ClH, pH: 8,2.

Se le agregan 0,2 volúmenes de Tween 80 al 1 ‰ (p/v).

Para valorar esta solución, una pequeña alícuota se diluye aproximadamente 1000 veces con ClH 0,1 N y se determina la absorbancia a 399 nm.

La concentración de Meso se calcula utilizando un valor de $\epsilon_{\text{mM}}^{399}$: 445 (409).

VI.b. Ensayo de la actividad.

La actividad de FeQ se mide según una modificación del método descrito por Cole y col. (303), utilizando Meso IX y SO_4Fe como sustratos.

Los hígados se homogeneizan en 5 volúmenes de Sacarosa 0,25 M, pH: 7,5. Las mitocondrias se precipitan por centrifugación a 11.000 x g durante 20 minutos y luego se lavan 2 veces con buffer Tris-HCl 0,2 M, pH: 8,2 recentrifugando a 11.000 x g cada vez. El precipitado obtenido se congela 24 ó 48 horas a -20°C, luego se descongela y se resuspende en buffer Tris-HCl 0,2 M, pH: 8,2, tal que 1 ml de suspensión contenga las mitocondrias provenientes de 0,5 g de hígado.

El medio de incubación contiene en un volumen total de 3,4 ml: 120 nmoles de Meso IX; 0,3 ml de Tween 80 al 1% (p/v); 0,3 ml de etanol; 12 umoles de ditiotreitól; 0,15 M de Buffer Tris-HCl (pH: 8,2); 120 nmoles de SO_4Fe y 0,5 ml de la suspensión mitocondrial. Las incubaciones se llevan a cabo en frasquitos de vidrio cerrados con tapa de goma.

Se les evacúa el aire por medio de una aguja (calibre 22) insertada en la tapa de goma y conectada a una bomba de vacío, durante 5 minutos. Luego se les inyecta Nitrógeno de la misma manera durante 1 minuto, para asegurar una atmósfera anaeróbica en la incubación.

Se retira la aguja y los ensayos se colocan en baño a 37°C y se incuban 1 hora, con agitación mecánica.

En forma paralela se hace el blanco que no contiene Meso.

Al finalizar la incubación, los tubos se colocan en hielo y rápidamente se les inyecta 0,5 ml de Iodoacetamida 0,4 M utilizando una jeringa y aguja hipodérmica para minimizar la entrada de Oxígeno. Los tubos se agitan y se dejan cerrados en frío durante 20 minutos. Este tratamiento se hace para prevenir la destrucción aeróbica del mesohemoformado que ocurre, en presencia de tioles, según informan Porra y col. (234).

La determinación cuantitativa de hemo formado se hace por el método del piridín hemocromógeno (410). Los tubos se abren y el contenido de los mismos se vuelca en tubos de ensayo conteniendo 1 ml de piridina y 0,5 ml de NaOH 1 N se agitan y se dejan 30 minutos a temperatura ambiente. Luego el contenido de cada incubado se separa en dos cubetas, a una de ellas se le agrega 0,05 ml de Ferricianuro de potasio 3 mM y a la otra una punta de espátula de ditio nito de sodio y rápidamente se determina el espectro dife-

rencial entre el piridín hemocromógeno reducido y oxidado.

Los nmoles de mesohemo formado se calculan a partir de la diferencia de absorbancia a 547 y 531 nm utilizando un $\Delta \epsilon_{\text{mM}} = \epsilon_{\text{mM}}^{547} - \epsilon_{\text{mM}}^{534} = 21,7$.

Para calcular la actividad de FeQ el hemo preformado medido en el tubo blanco se descuenta del hemo formado en presencia de Meso exógeno.

La actividad de FeQ se expresa como:

nmoles de Mesohemo / g. hígado/ hora.

VII. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error standard (E.S.).

Las medias fueron comparadas por el test de Student. Para obtener el valor de p se utiliza un grado de libertad de $n_1 + n_2 - 2$. El nivel de significancia se fija en $p \leq 0,05$.

R E S U L T A D O S .

I. EFEECTO DE LINDANO Y HEPTACLOR SOBRE EL CONTENIDO Y LA NATURALEZA DE PORFIRINAS EN HIGADO.

I.1. Efecto de lindano y heptaclor sobre el contenido hepático de porfirinas en embriones de pollo de la cepa White Leghorn.

Con el objeto de investigar la capacidad porfirinogénica de lindano y heptaclor, embriones de 17 días de la cepa White Leghorn fueron inyectados con distintas dosis de los pesticidas y luego de 24 horas de tratamiento, fué analizado el contenido de porfirinas en hígado.

En forma paralela, se analizó el contenido de porfirinas de embriones tratados con AIA como patrón, ya que se sabe éste es un potente agente porfirinogénico.

Como puede verse en la Figura 30, hubo una gran variabilidad en la respuesta individual al tratamiento con los pesticidas como también para AIA. Tanto lindano como heptaclor a las dosis probadas fueron capaces de incrementar el contenido hepático de porfirinas. Los aumentos observados fueron de 2.5, 3.6 y 7.7 veces para dosis de 1, 2 y 5 mg/huevo de lindano y 3, 4.6 y 4.9 veces para heptaclor 10, 15 y 20 mg/huevo respecto de los controles DMSO.

Los incrementos producidos por los pesticidas fueron estadísticamente significativos, aunque no llegaron a ser del orden del aumento producido por AIA, y la respuesta fue dependiente de la dosis de droga, en ambos casos.

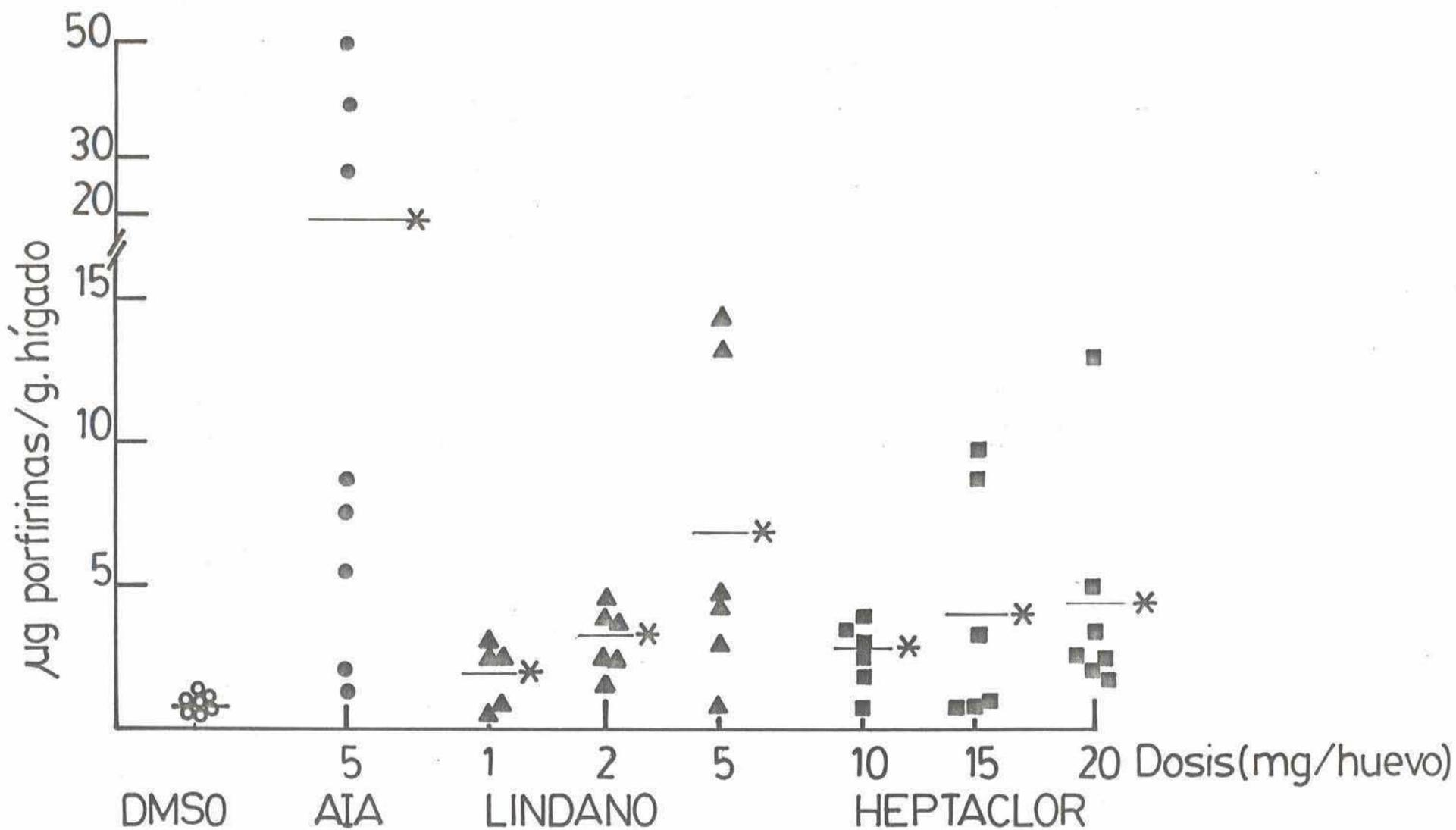


Figura 30: Efecto de lindano, heptaclor y AIA sobre el contenido hepático de porfirinas en embriones White Leghorn.

Los embriones de 17 días de desarrollo fueron tratados con las drogas 24 horas. Cada punto representa un valor individual y las líneas los valores medios. * $p \leq 0.05$.

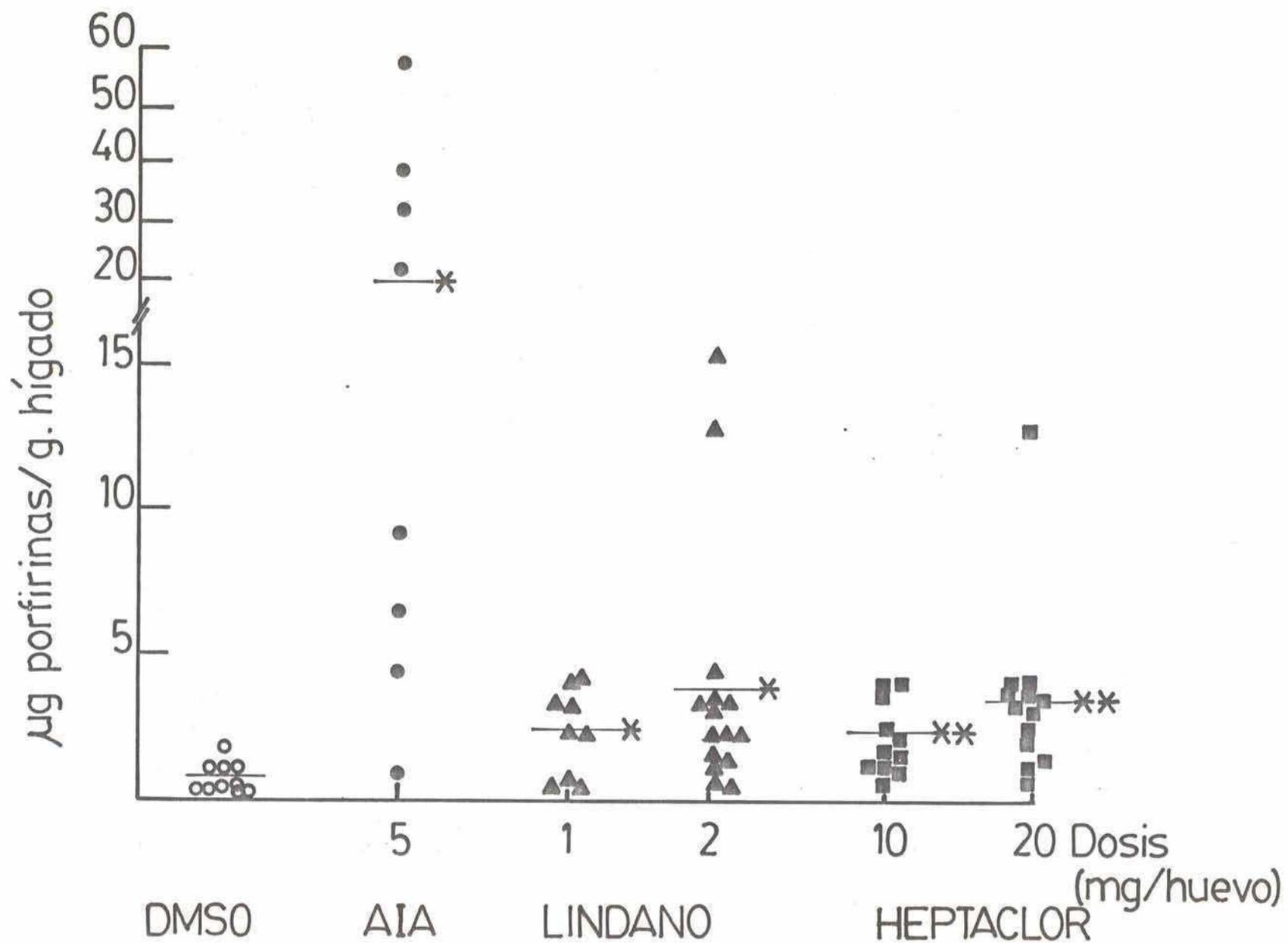


Figura 31: Efecto de lindano, heptaclor y AIA sobre el contenido hepático de porfirinas en embriones New Hampshire.

Los detalles se indican en la Figura 30. *p ≤ 0.005; **p ≤ 0.002.

I.2. Efecto de lindano y heptaclor sobre el contenido de porfirinas en hígado de embriones New Hampshire.

La capacidad porfirinogénica de estos pesticidas clorados fue investigada en otra cepa de embriones, New Hampshire. También se analizó AIA como droga porfirinogénica patrón y como se observa en la Figura 31, la respuesta fue similar a la de los embriones White Leghorn. Hubo variaciones en la respuesta entre embriones individuales, los aumentos fueron dosis dependiente y aunque significativos no alcanzaron los valores promedio de AIA.

Los incrementos producidos por lindano fueron de 3 y 4.8 veces el valor de los controles, para las dosis de 1 y 2 mg/huevo respectivamente y para heptaclor de 3 y 4.2 veces.

I.3. Naturaleza de las porfirinas acumuladas en el hígado.

Con el objeto de visualizar alguna posible alteración en el camino biosintético del hemo, fue analizada la naturaleza de las porfirinas acumuladas en el hígado de los embriones tratados con los pesticidas y fue comparada con el patrón de porfirinas hepáticas de los controles con solventes DMSO.

Cuando la cantidad de porfirinas hepáticas individuales era insuficiente para su análisis cromatográfico, se combinaron los contenidos extraídos de varios embriones como está indicado en las Tablas II, III y IV.

Los resultados mostrados en las Tablas II y III indi

can que los embriones tratados tanto con lindano como con heptaclor a la dosis indicada, acumularon una pequeña cantidad de Uro, Hepta, Hexa y Penta y las porfirinas predominantes fueron Copro y Proto, ambas en porcentajes similares o en algunos casos con mayor cantidad de Copro.

Los embriones controles presentaron un contenido muy bajo de porfirinas y por ese motivo el análisis no pudo hacerse por cromatografía en capa delgada sino por HPLC. Como se puede observar en la Tabla IV, éstos sólo mostraron Copro y Proto, siendo el contenido de Copro 8 a 9 veces mayor que Proto y en ningún caso se detectó porfirinas con mayor número de carboxilos.

Si bien la técnica utilizada para los embriones con DMSO no fue la misma que para los tratados, considerando que el HPLC es más sensible que la cromatografía en capa delgada, la diferencia más importante es que los tratados con los pesticidas presentaron toda la serie de porfirinas, desde Uro hasta Proto, en tanto que en los controles solo se detectaron Copro y Proto.

Además, el porcentaje de Proto en los tratados fué siempre superior al hallado para embriones con DMSO. Así mientras que los controles presentaron una relación Proto/Copro de 1/9 es decir que la porfirina mayoritaria es Copro, en los tratados la relación varió entre 1/2 a 1/1.

Tabla II: Naturaleza de las porfirinas hepáticas acumuladas en embriones tratados con lindano

Cromatograma	P o r f i r i n a s (%)						
	Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Proto	
1 (3)	11	7	9	12	41	20	
2 (1)	3	7	5	9	39	37	
3 (1)	2	2	4,5	4,5	44	43	
4 (2)	3	3	6	12	40	36	
5 (2)	6	12	3	3	50	26	

Embriones de 17 días de la cepa New Hampshire fueron tratados con 2 mg/huevo de Lindano durante 24 horas. Las porfirinas fueron extraídas como se detalla en Métodos y separadas por cromatografía en placa delgada. Entre paréntesis se indica el número de contenidos hepáticos combinados para cada cromatograma.

Tabla III: Naturaleza de las porfirinas hepáticas acumuladas en embriones tratados con heptaclor.

Cromatograma	P o r f i r i n a s (%)						
	Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Proto	
1 (3)	6	5	2	2	52	33	
2 (2)	2	5	4	14	36	39	
3 (1)	5	7	9	11	45	23	

Embriones de 17 días de la cepa New Hampshire fueron tratados con 10 mg/huevo de heptaclor durante 24 horas. Los demás detalles son los indicados en la Tabla I.

Tabla IV: Naturaleza de las porfirinas hepáticas de los embriones con DMSO.

Cromatograma	P o r f i r i n a s %	
	Copro	Proto
1 (8)	88	11
2 (8)	84	16
3 (7)	90	10
4 (7)	86	4

Embriones de 17 días de la cepa New Hampshire fueron inyectados con 0,2 ml de DMSO y luego de 24 horas las porfirinas hepáticas fueron extraídas como se describe en Métodos y analizadas por HPLC. Entre paréntesis se indica el número de contenidos combinados en cada caso.

II. EFEECTO DE LINDANO Y HEPTACLOR SOBRE ALA-SINTEIASA.

II.1. Efecto de lindano sobre la actividad de ALA-Sintetasa.

Con el objeto de ver si lindano afecta la enzima reguladora del camino del hemo, se midió la actividad de ALA-S en hígado de embriones de 17 días de la cepa White Leghorn, luego del tratamiento con este pesticida durante 5 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32: se puede ver que a todas las dosis probadas hay aumento de actividad enzimática. Con las dosis menores, 0.1 y 0.2 mg/huevo, se obtuvieron aumentos de 2.4 y 2.8 veces en la actividad de ALA-S respecto del control con DMSO ($3,8 \pm 0,3$ nmoles ALA/g.hígado/hora). Los mayores incrementos se obtuvieron para 0.5 y 2.5 mg/huevo siendo la actividad obtenida en estos casos 6 veces mayor que los controles. Los aumentos observados para las otras dosis también fueron importantes y oscilaron entre 4 a 5 veces el valor del control. En todos los casos los aumentos fueron estadísticamente significativos.

Para los estudios posteriores de ALA-S en embriones tratados con lindano, se eligió la dosis de 0.5 mg ya que produjo el mayor incremento de la actividad enzimática y la mortalidad a esta dosis fué muy baja.

II.2. Efecto de heptaclor sobre la actividad de ALA-Sintetasa.

Embriones de 17 días White Leghorn fueron tratados durante 5 horas con distintas dosis de heptaclor y luego

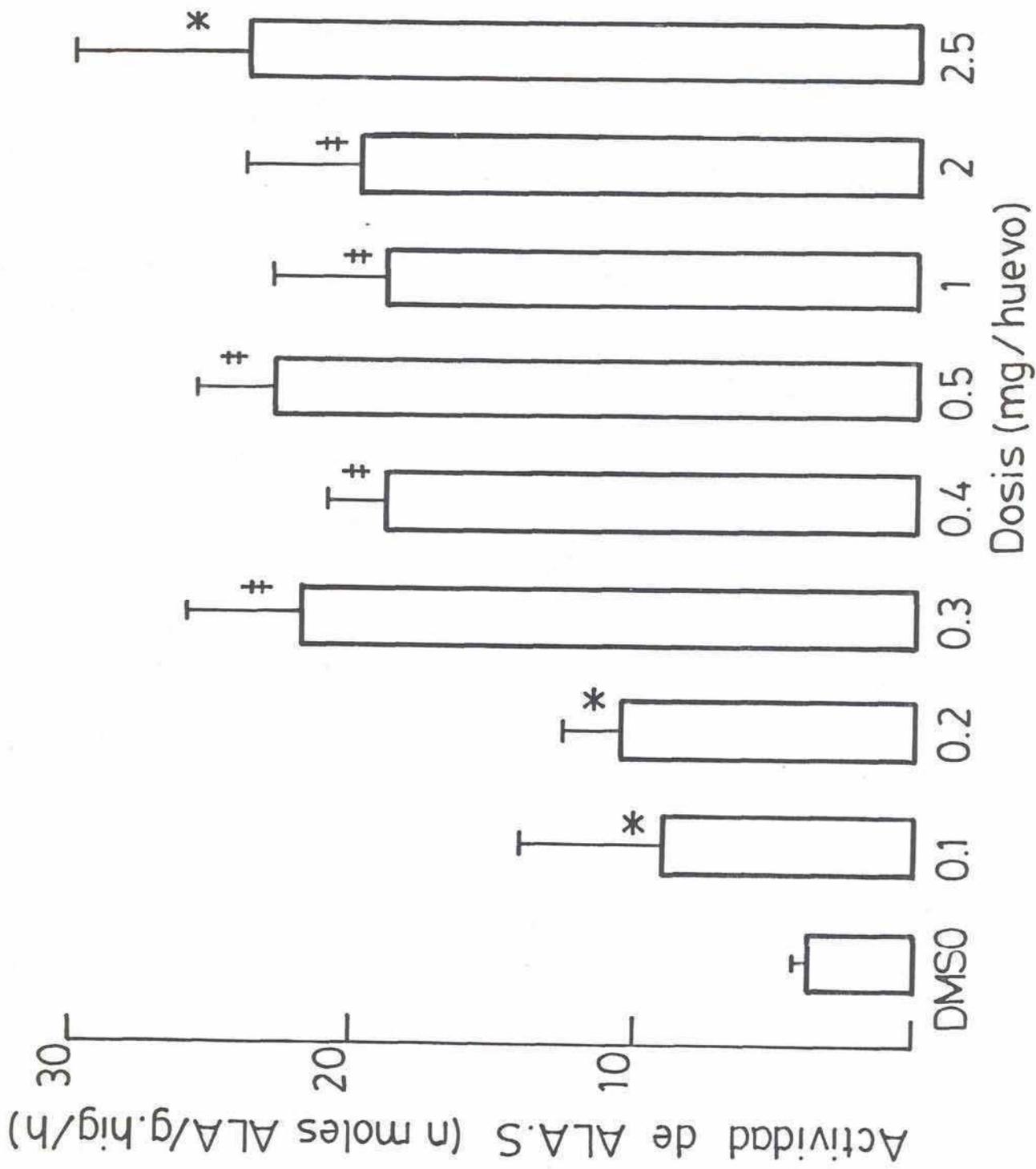


Figura 32: Efecto de lindano sobre la actividad de ALA-S hepática.

Embriones White Leghorn de 17 días fueron tratados con distintas dosis de lindano durante 5 horas. Cada barra representa la media de 5 a 12 determinaciones \pm E.S.M. * $p \leq 0.05$; # $p \leq 0.0005$.

se midió la actividad de ALA-S para ver si la misma fue modificada por el tratamiento.

Como se puede observar en la Figura 33, heptaclor a las dosis ensayadas produjo un aumento de la actividad de la enzima regulatoria.

Con la dosis menor probada (0.5 mg/huevo) la actividad de ALA-S se incrementó 2 veces respecto del control con DMSO, pero este aumento no fue estadísticamente significativo. A partir de la dosis de 1 mg/huevo los incrementos de actividad de ALA-S fueron estadísticamente significativos y oscilaron entre 3.5 y 4.5 veces respecto del DMSO.

A partir de estos resultados fue elegida para los trabajos siguientes la dosis 5 ó 10 mg/huevo ya que producen un importante aumento de ALA-S con baja mortalidad de los embriones.

II.3. Efecto de la variación del tiempo de tratamiento con lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S.

En las Figuras 32 y 33 se mostró que el tratamiento con los pesticidas durante 5 horas produjo un incremento en la actividad de ALA-S.

Con el objeto de ver cual era el tiempo mínimo de tratamiento al cual se podía ver algún efecto sobre la actividad enzimática y por otro lado ver la variación del aumento con el tiempo, se midió la actividad de ALA-S luego de distintas horas de intoxicación con 0.5 mg/huevo de

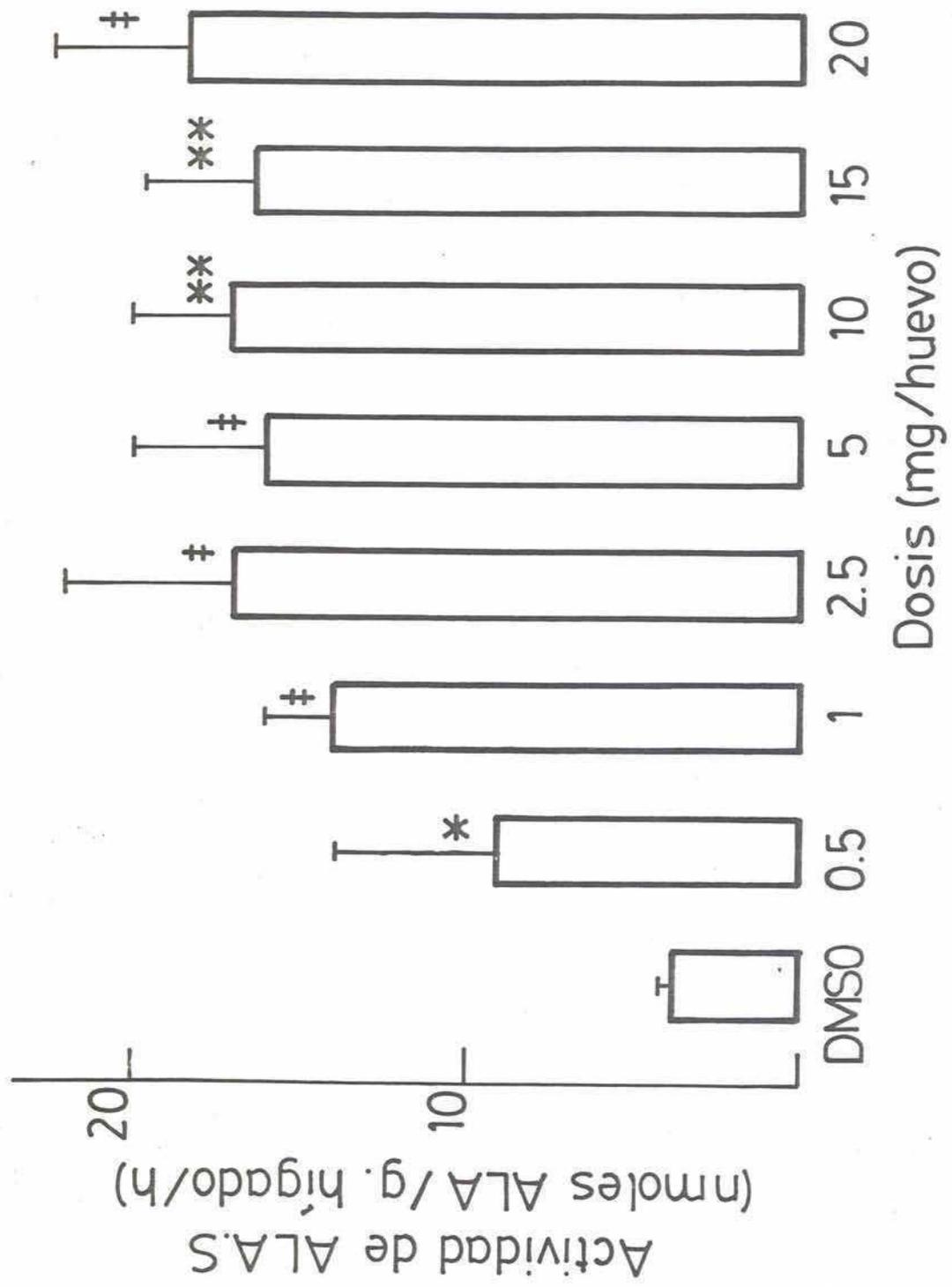


Figura 33: Efecto de heptaclor sobre la actividad de ALA-S hepática.

Embriones White Leghorn de 17 días de desarrollo fueron tratados con las dosis de heptaclor indicadas durante 5 horas. Demás detalles están indicados en la Figura 32. * $p \leq 0,10$; # $p \leq 0,001$ y ** $p \leq 0.0005$.

lindano ó 5 mg/huevo de heptaclor hasta las 24 horas luego de la inyección.

Los resultados mostrados en la Figura 34 indican que para lindano a la 1 1/2 hora de tratamiento ya hay aumento de actividad enzimática. Al prolongar el tiempo de tratamiento el incremento es cada vez mayor alcanzándose un máximo aproximadamente a las 20 horas.

En el caso de heptaclor se requiere un período de tratamiento mayor para detectar efectos sobre la actividad de ALA-S, recién a partir de las 4 horas se observa aumento de la actividad enzimática que se incrementa con el tiempo hasta las 12 horas y luego decae manteniéndose a niveles superiores a los controles por lo menos hasta las 24 horas luego de la inyección.

La actividad de los controles DMSO se mantuvo constante a lo largo del tiempo estudiado.

II.4. Relación entre el desarrollo del embrión y el efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S.

Con el objeto de investigar la posibilidad de alguna relación entre el desarrollo del embrión y el aumento de ALA-S, se estudió el efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad de esta enzima en embriones de 11, 14; 17 y 20 días de edad y en pollitos de 2 días.

La dosis de droga administrada en cada caso fue la equivalente a alguna de las que producen un gran aumento de actividad en embriones de 17 días. Así, para lindano se administró 0.025 mg/g de peso del embrión que equivale

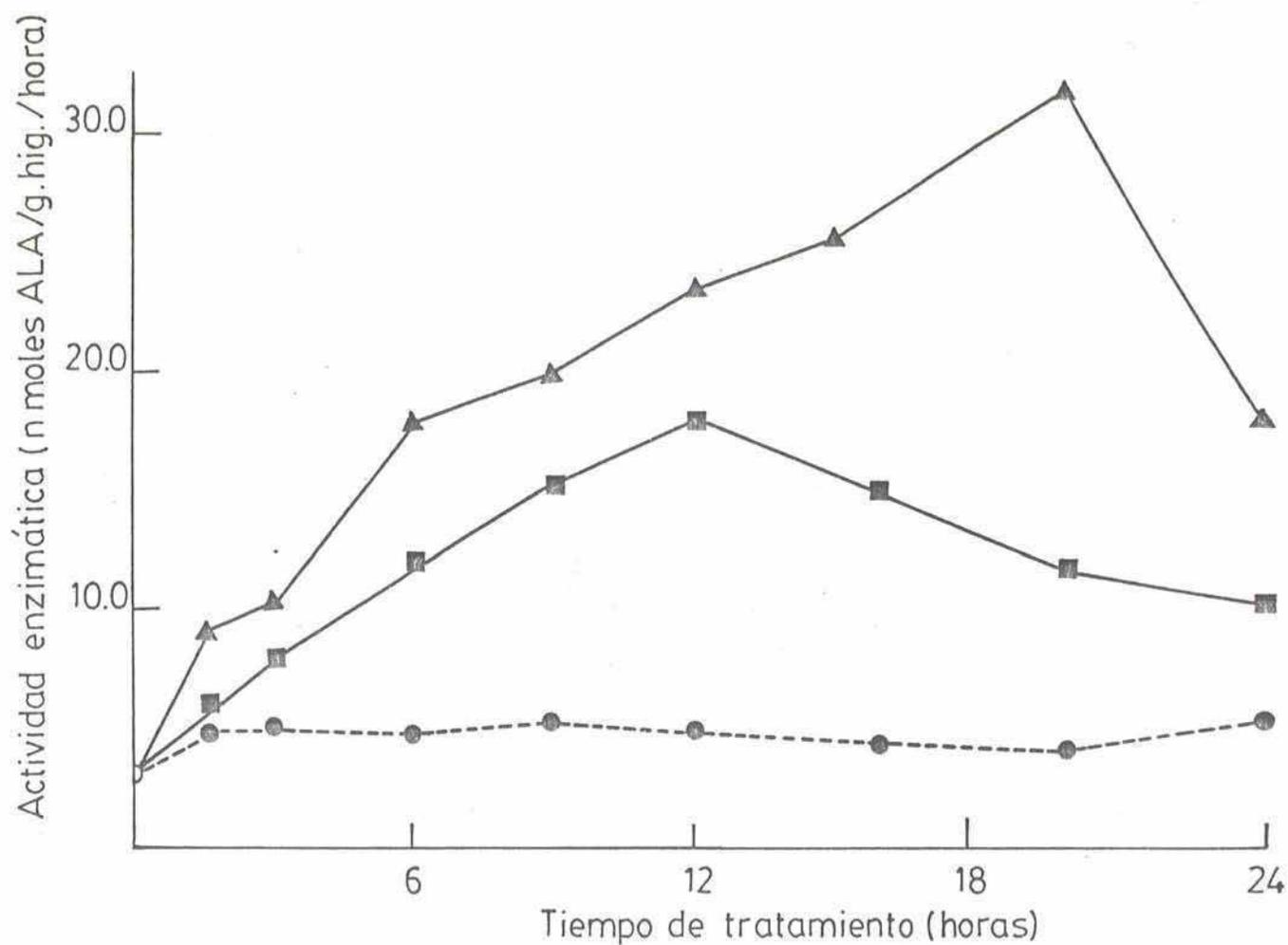


Figura 34: Cinética del aumento de ALA-S luego de la administración de lindano o heptaclor.

Los embriones fueron tratados con 0,5 mg/huevo de lindano (▲) o 5 mg/huevo de heptaclor (■). Los controles recibieron DMSO (●). Los puntos representan el promedio de 3 determinaciones y para cada determinación se juntaron los hígados de 2 embriones.

a 0.5 mg/huevo para embriones de 17 días y en el caso de heptaclor, los embriones fueron tratados con 0.44 mg/huevo correspondiente a 10 mg/huevo para embriones de 17 días.

El número de embriones utilizados en estas experiencias, varió de acuerdo al día de desarrollo estudiado, debido a la diferencia de tamaño de los hígados. Así, 6 a 7 hígados fueron combinados para hacer cada determinación de actividad al día 11, 3 a 4 hígados para el día 14; 2 para los días 17 y 20 y animales individuales para el caso de los pollitos.

Los resultados mostrados en la Figura 35 corresponden al promedio de 2 experiencias. Como se observa, la actividad de ALA-S en embriones normales y tratados con el solvente DMSO no presentaron variaciones significativas con la edad del animal. Las dos drogas fueron capaces de incrementar los niveles de ALA-S en cualquier etapa del desarrollo obteniéndose mayor incremento de actividad a mayor edad del embrión, encontrándose un máximo de aumento para embriones de 20 días o sea justo antes del nacimiento.

En los pollitos, a pesar de estar aumentada la actividad de la enzima respecto a los controles y normales, hay una disminución de la respuesta a las drogas, respecto a embriones de 17 y 20 días.

II.5. Efecto "in vitro" de lindano y heptaclor sobre la actividad de ALA-S de hígado de embrión normal.

Para ver si las drogas mismas eran las responsables del aumento de ALA-S hallado "in vivo", se probó el efecto

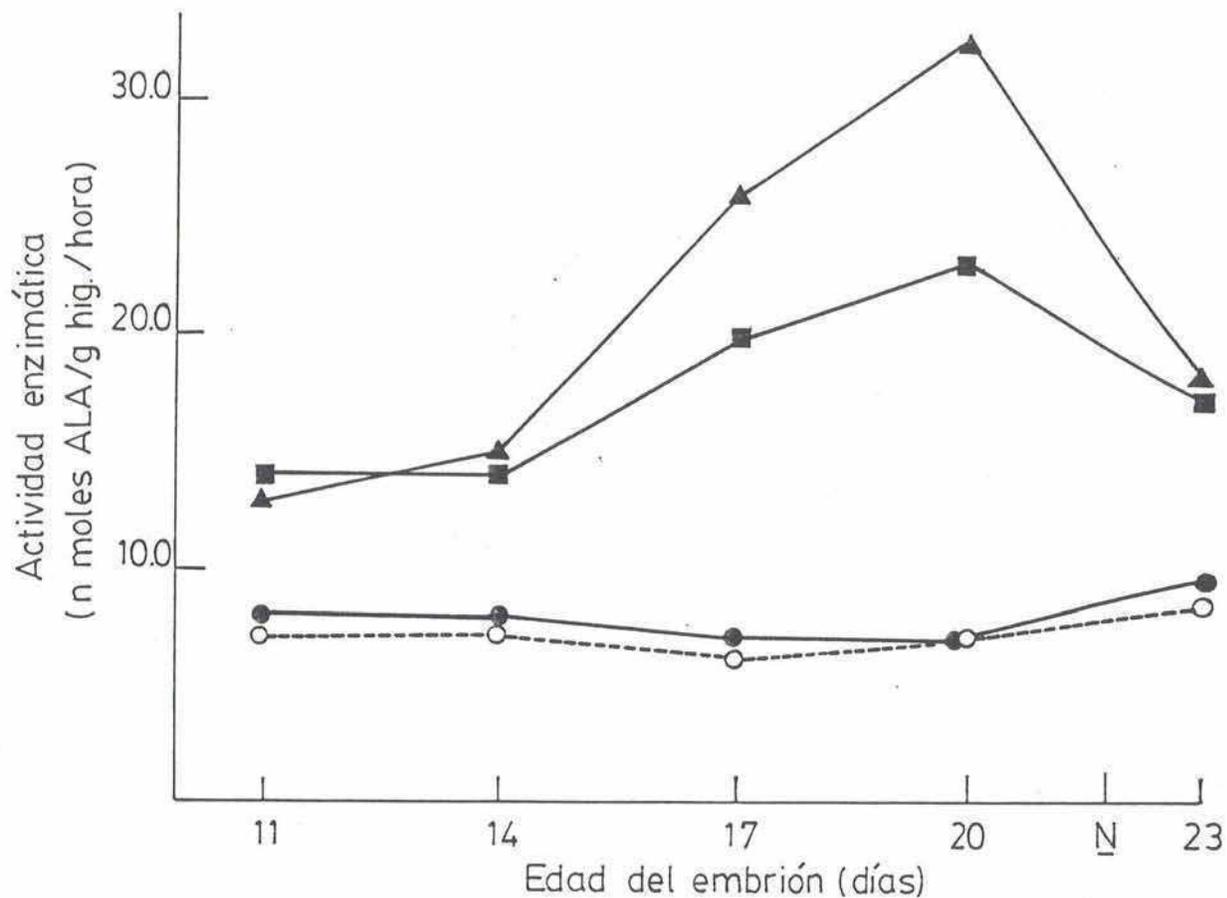


Figura 35: Relación entre la respuesta de ALA-S a lindano o heptaclor y el desarrollo del embrión de pollo.

Los embriones fueron tratados con 0,025 mg/g peso de lindano (▲) o 0,44 mg/g peso de heptaclor (■), durante 5 horas. (●) DMSO y (○) normales. Los resultados corresponden al promedio de 2 experiencias en las cuales para cada punto se hicieron 3 determinaciones con 6-7 hígados en el día 11; 3-4, día 14; 2, días 17 y 20 e individuales día 23. N: nacimiento.

del agregado de lindano y heptaclor en un ensayo de actividad de enzima de hígado proveniente de un embrión normal.

Se trató de que una de las cantidades de droga ensayada fuera alguna de las que "in vivo" produjeron un gran aumento de actividad. En el caso de lindano eso fue posible, pero con heptaclor debido a su insolubilidad en el medio de incubación se debieron utilizar cantidades menores. Así, para lindano se probó una cantidad igual y otra 10 veces menor y para heptaclor cantidades 10 y 100 veces menores a las correspondientes a la inyectada al embrión.

Como puede observarse en la Tabla V, ninguno de los dos compuestos fueron capaces, por lo menos a las cantidades probadas, de incrementar la actividad de la enzima normal.

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados y teniendo en cuenta además, que la cantidad de droga que efectivamente llega al hígado del embrión debe ser mucho menor que la inyectada, se concluye que las drogas "per se" no son las responsables del aumento de actividad de ALA-S hallado "in vivo".

II.6. Efecto del pretratamiento con Fenobarbital sobre el aumento de actividad de ALA-S producido por lindano.

Fue interesante tratar de dilucidar si el aumento de actividad de ALA-S producido por lindano "in vivo", estaba mediado por algún metabolito.

Para ello, los embriones fueron pretratados durante 1 hora con Fenobarbital (FB) (5 mg/huevo), un inductor de

Tabla V. Efecto "in vitro" de lindano y heptaclor sobre
ALA-S de hígado de embrión de pollo normal.

D R O G A	CONCENTRACION (10^{-6} M)	ACTIVIDAD DE ALA-S (nmoles ALA/g.hígado/hora)
-	-	5,51
LINDANO	1,72	4,5
	0,17	5,6
HEPTACLOR	2,7	5,0
	0,27	3,3

En el medio de incubación de ALA-S de homogenato de hígado de embrión normal de 17 días fue agregada la cantidad de pesticida indicada disuelta en 0,1 ml de DMSO. Al control se agregó 0,1 ml de DMSO. Los datos corresponden al promedio de 3 determinaciones.

las enzimas microsomales metabolizantes de drogas dependiente del citocromo P₄₅₀ y luego se les administró lindano en dosis de 1 y 2 mg/huevo. Al cabo de 5 horas de tratamiento luego de la inyección del pesticida se determinó la actividad de ALA-S.

Como se puede observar en la Figura 36, los controles que recibieron DMSO luego del pretratamiento con FB, muestran una alta actividad de ALA-S. Ello se debe a que el FB es de por sí un inductor de ALA-S.

Los embriones que fueron tratados con lindano mostraron un aumento de la actividad enzimática. Aquellos que fueron pretratados con el inductor, a pesar de presentar mayor actividad que los tratados con el pesticida solamente, éstas no superan el valor del control pretratado de la manera que se esperaría si el FB potenciara la acción porfirinogénica del lindano.

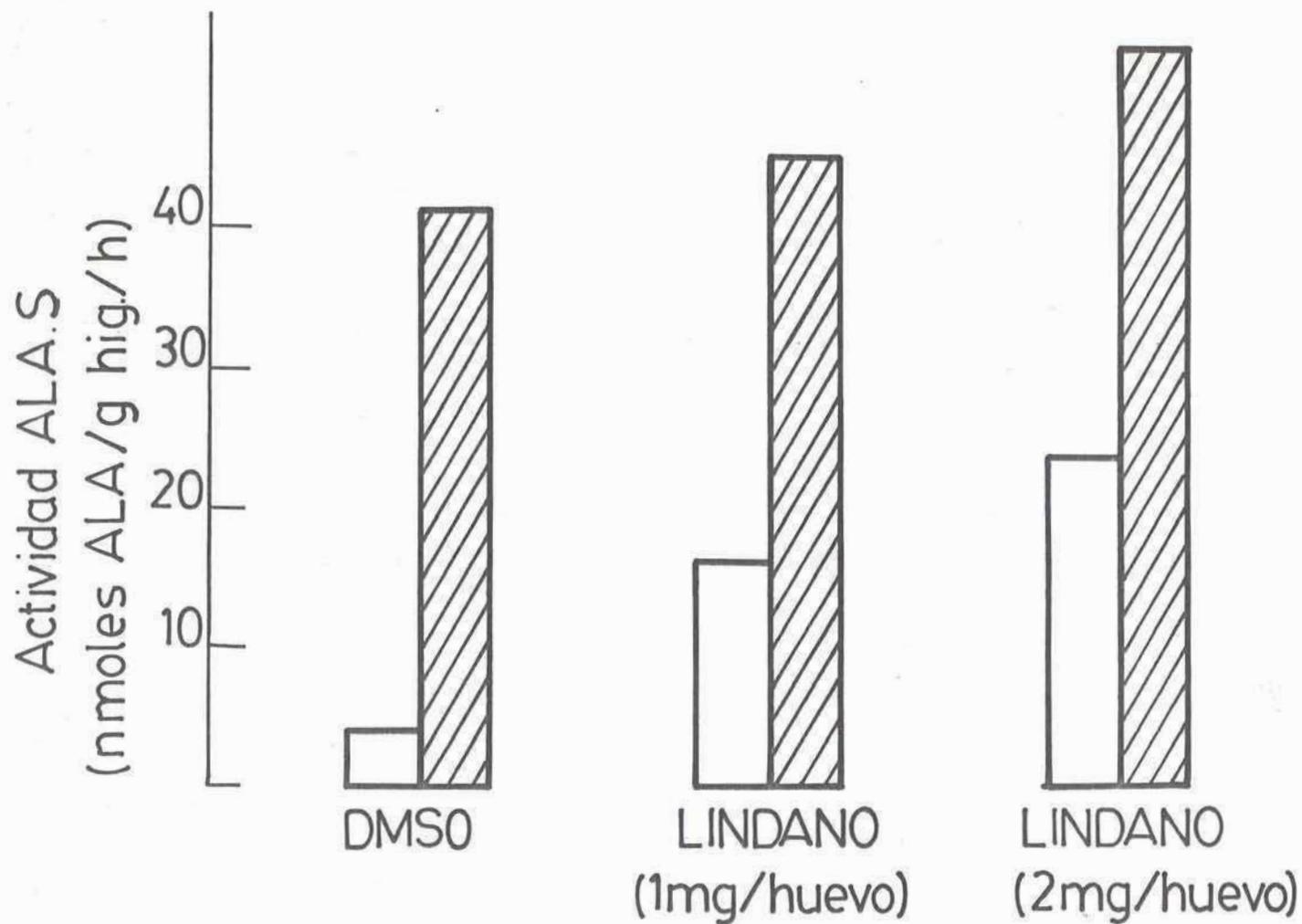


Figura 36: Efecto del pretratamiento con FB sobre el aumento de ALA-S producido por Lindano.

Las barras blancas corresponden a los embriones tratados con DMSO o lindano y las barras rayadas a los embriones pretratados con FB (5 mg/huevo). Son datos representativos de 2 experiencias en las cuales se hicieron 2 determinaciones para cada lote.

II.7. Efecto del pretratamiento con Fenobarbital sobre el aumento de actividad de ALA-S producido por heptaclor.

Por las mismas razones que las expuestas para lindano, se probó el efecto del pretratamiento con FB, en dosis de 5 mg/huevo durante 1 hora, sobre el aumento de ALA-S producido por heptaclor.

Como se observa en la Figura 37, los valores de actividad enzimática de los embriones pretratados con FB y tratados luego con heptaclor, en dosis de 10 y 20 mg/huevo, son similares a los controles DMSO pretratados con el inductor. En estos últimos, la actividad enzimática observada es mucho mayor que la de controles sin pretratamiento con inductor.

II.8. Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la respuesta de ALA-S a lindano.

Con el objeto de investigar si en la respuesta de ALA-S a lindano estaba involucrada la síntesis de proteínas, se hicieron experimentos con inhibidores de este proceso, tales como cicloheximida (CX) que inhibe específicamente la traducción en ribosomas de eucariontes y Actinomicina D (Act D), un inhibidor de la transcripción que interfiere en la elongación de las cadenas de RNAs por unión al templado de DNA.

Con el objeto de ver si se producía el aumento de actividad de ALA-S cuando la síntesis de proteínas estaba inhibida, se hicieron los experimentos de inyección simul-

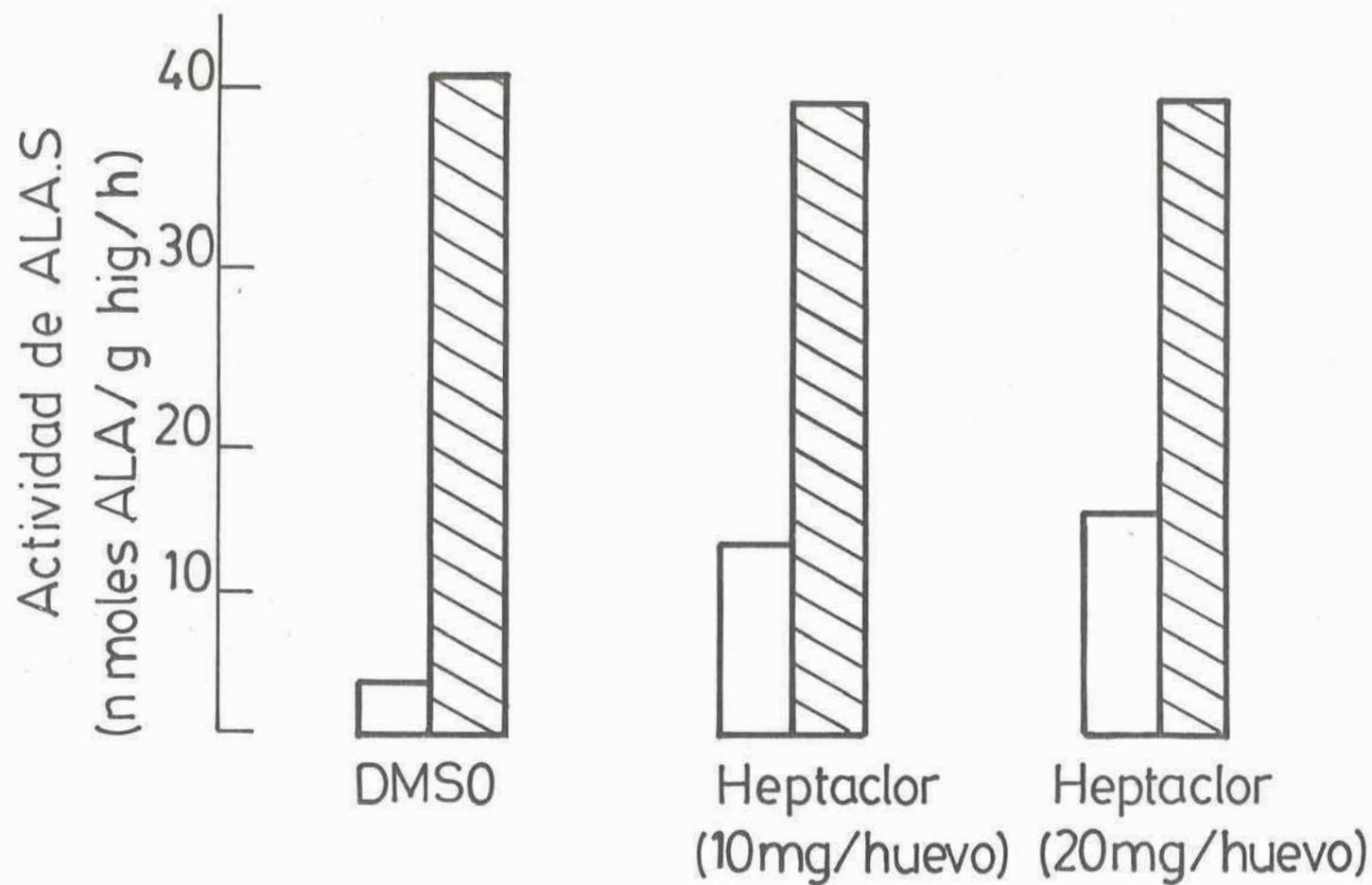


Figura 37: Efecto del pretratamiento con FB sobre el aumento de ALA-S producido por heptaclor.

Las barras blancas corresponden a embriones tratados con DMSO ó heptaclor y las barras rayadas a embriones pretratados con FB (5 mg/huevo). Son datos representativos de 2 experiencias en las cuales fueron hechas 2 determinaciones para cada lote.

tánea con CX en dosis de 1,2 y 5 ug/huevo.

Como se puede observar en la Figura 38, cuando se midió la actividad enzimática al cabo de 2,5 y 5 horas del tratamiento conjunto se encontró que mientras la dosis de 1 ug/huevo del inhibidor produjo un ligero decremento de la respuesta, las dosis de 2 y 5 ug/huevo fueron capaces de bloquear el efecto de lindano sobre ALA-S. Cabe señalar que Rifkind (304) informa que una dosis de 3 ug/huevo de CX deprime la inducción de ALA-S por DDC en un 87% y Rifkind y col. (391) hallaron que una dosis de 5 ug/huevo de CX es suficiente para inhibir en un 84 y 58%, los incrementos de ALA-S producidos por meprobamato y secobarbital, respectivamente, 4 horas luego de la inyección.

Los resultados se pueden ver en la Figura 39. Cicloheximida rápidamente revirtió el aumento de actividad enzimática producido por lindano. Mientras la actividad de los embriones no inyectados con CX se mantuvo elevada, aquellos que recibieron el inhibidor al cabo de 2 horas presentaron valores del orden de los controles y se mantuvieron en esos niveles hasta 4 horas luego de su administración.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que CX bloquea y revierte el aumento de actividad de ALA-S producido por lindano, se puede inferir que la misma es dependiente de sintesis de nueva proteína.

Si bien, los resultados obtenidos con CX indican que la respuesta de ALA-S al pesticida está involucrada la sintesis de proteínas no indican a qué nivel del mismo, trans-

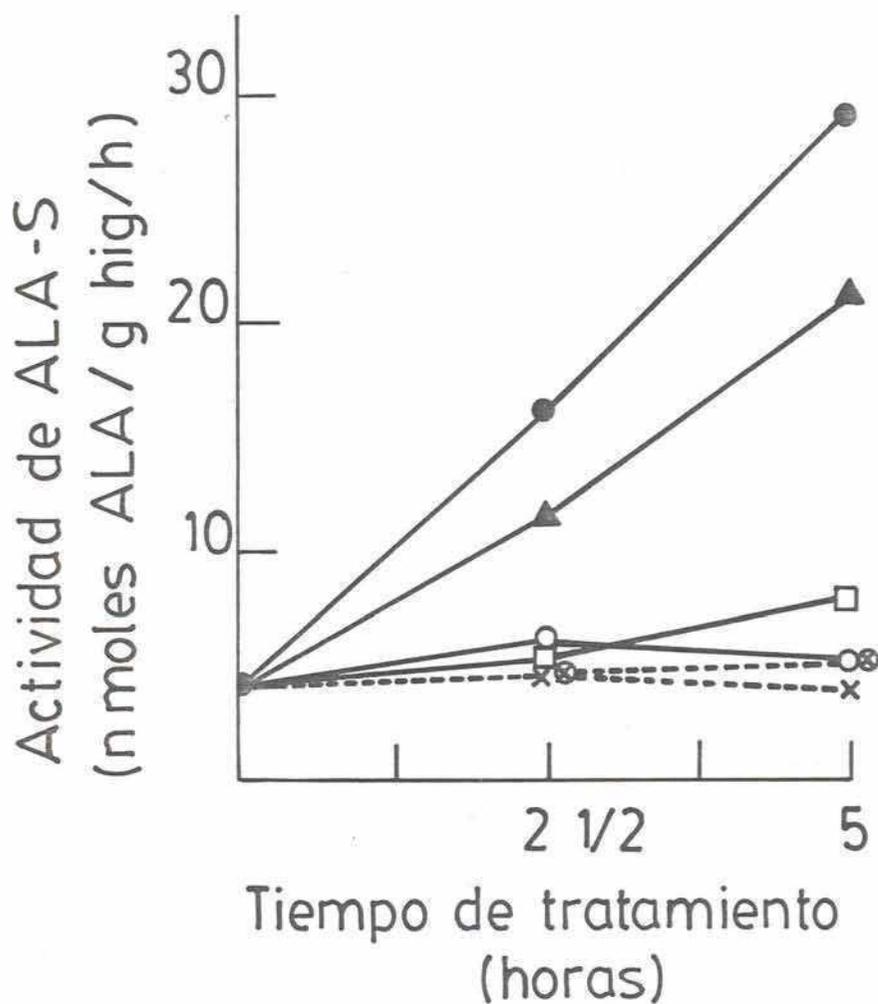


Figura 38: Efecto de la administración conjunta de cicloheximida y lindano sobre ALA-S.

Los embriones fueron tratados con 0,5 mg/huevo de lindano solo (●) o junto con CX en dosis de 1(▲), 2(□) y 5 ug/huevo (○). Los controles recibieron DMSO (×) y DMSO con 2 ug/huevo de CX (⊗).

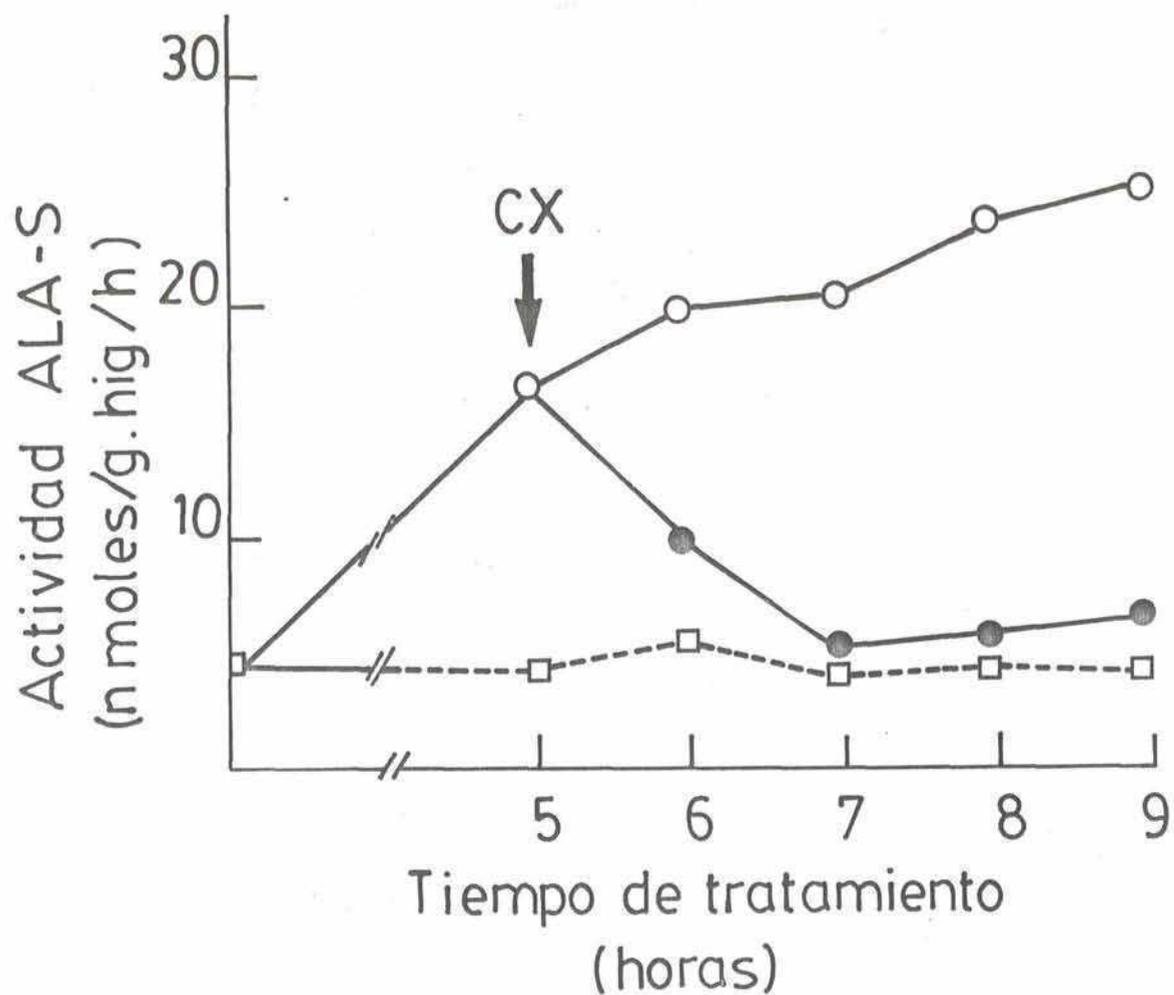


Figura 39: Efecto de cicloheximida sobre el aumento de ALA-S producido por lindano.

Los embriones fueron tratados con lindano (0,5 mg/huevo) (O) y luego de 5 horas se les administró cicloheximida (5 ug/huevo) (●). (□) controles DMSO.

cripción o traducción, actúa el compuesto clorado en estudio. Para tratar de dilucidar esto se hicieron los experimentos con Act D, inhibidor de la transcripción.

En primer lugar se vió que sucedía cuando se inyectaba el inhibidor junto con lindano. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 40. Actinomicina D en dosis de 100 y 200 ug/huevo no produjeron ningún efecto sobre la respuesta de ALA-S a lindano ya que las actividades obtenidas en los embriones con el tratamiento conjunto fueron del orden de las presentadas por embriones tratados con lindano solo. Con la dosis de 300 ug de Act D se obtuvo disminución en la respuesta de ALA-S a lindano pero no tan neta como la que produjo CX.

Act D no alteró la actividad enzimática de los embriones controles.

En un siguiente experimento, se estudió el efecto de Act D luego de producido el aumento de ALA-S por lindano. Para ello, los embriones se trataron con lindano y al cabo de 4 horas se les administró 300 ug de Act D. Como se observa en la Figura 41, luego de la inyección del inhibidor, la actividad de ALA-S aumenta durante las 2 horas siguientes a la administración y al cabo de ese tiempo comienza a decaer ligeramente.

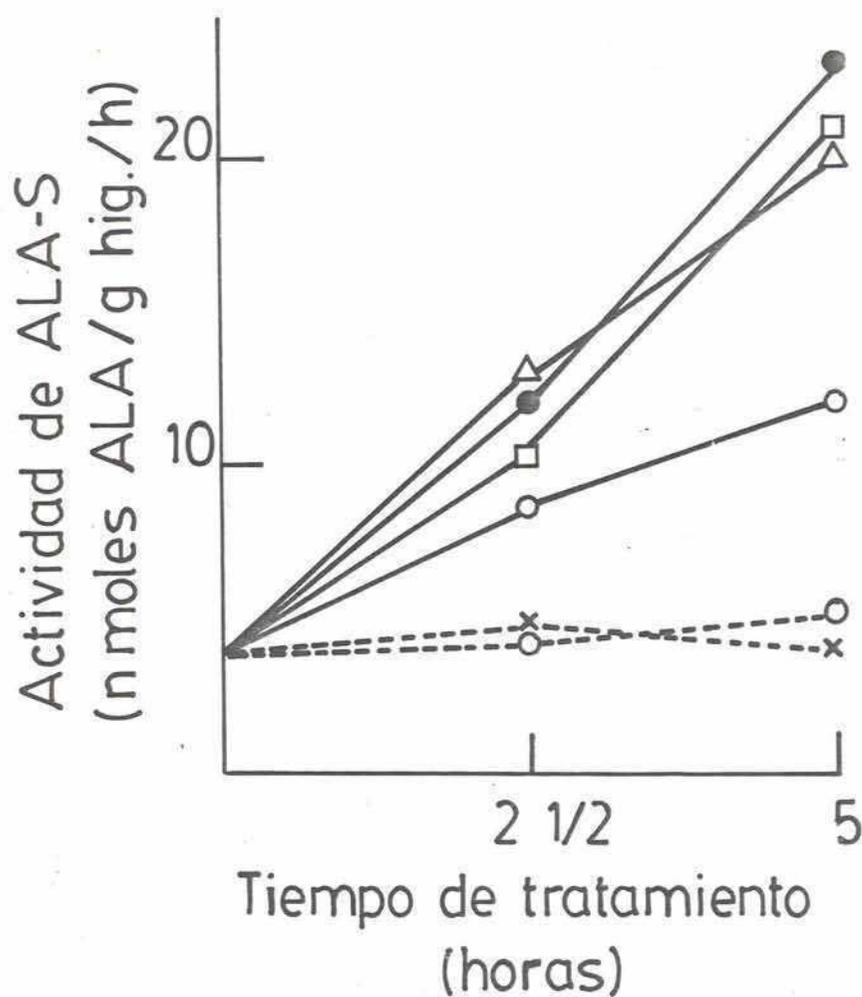


Figura 40: Efecto de la administración conjunta de Actinomicina D y lindano sobre ALA-S.

Los embriones fueron tratados con 0,5 mg/huevo de lindano solo (●) ó junto con Act. D en dosis de 100 (Δ), 200 (□) y 300 ug/huevo (○). Los controles recibieron DMSO (x) y DMSO con 300 ug/huevo de ActD (⊗).

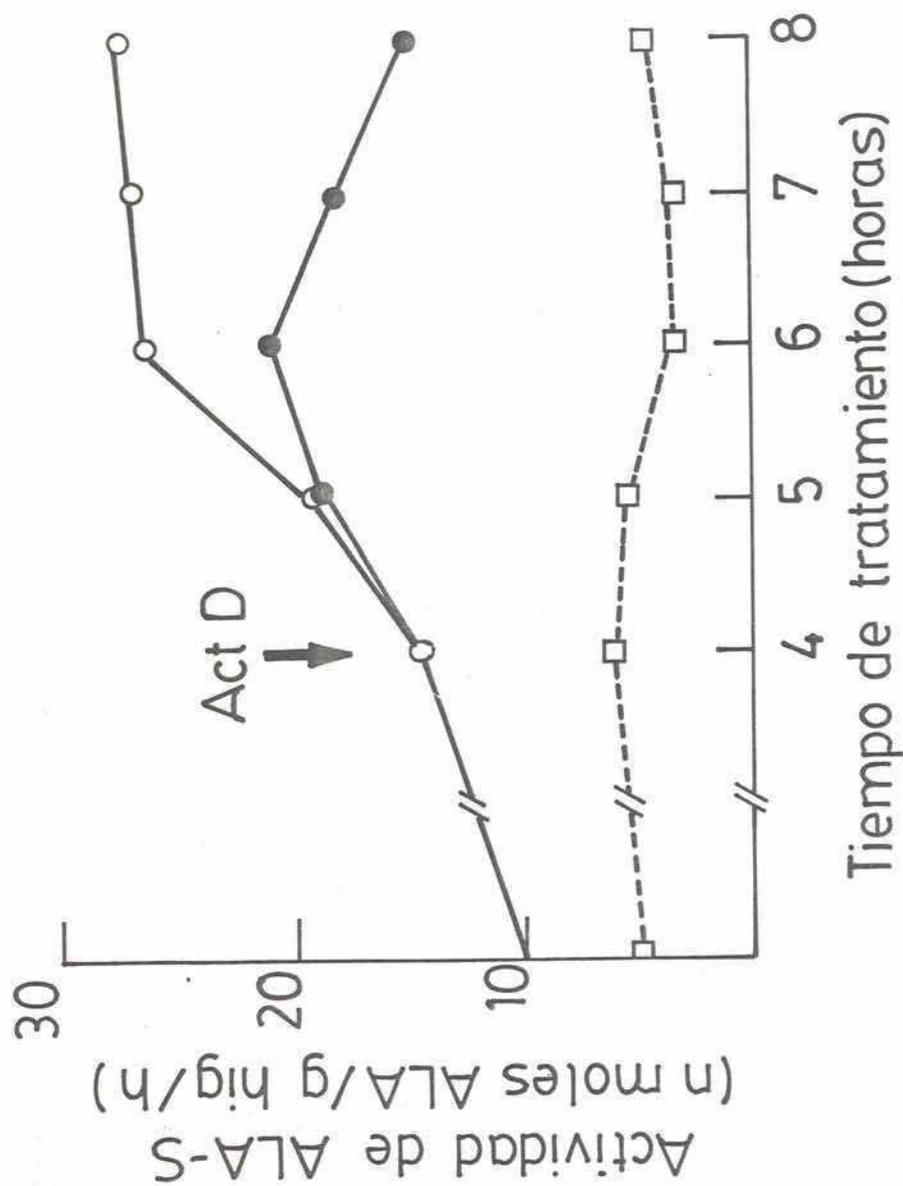


Figura 41: Efecto de Actinomicina D sobre el aumento de ALA-S producido por Lindano.

Los embriones fueron tratados con 0,5 mg/huevo de Lindano (O) y luego de 4 horas recibieron 300 ug/huevo de Act. D (●). (□) controles DMSO.

II. 9. Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas sobre la respuesta de ALA-S a heptaclor.

Con la idea de tratar de dilucidar el mecanismo de acción del heptaclor sobre ALA-S se hicieron experimentos con inhibidores de síntesis de proteínas semejantes a los realizados con lindano.

En primer lugar se hizo la experiencia de inyección conjunta de CX y heptaclor. Los resultados se pueden observar en la Figura 42.

La dosis menor de CX (1 ug/huevo) produjo una ligera disminución de la respuesta de ALA-S a heptaclor pero a dosis mayores del inhibidor (2 y 5 ug/huevo) se produjo un bloqueo del aumento de la actividad enzimática.

Estos resultados indican que la respuesta de ALA-S a heptaclor es dependiente de síntesis de proteínas.

Los resultados obtenidos al administrar CX (5 ug/huevo) luego de 15 horas de tratamiento con heptaclor (Figura 43) confirmarían este hallazgo. El inhibidor revirtió el aumento producido por el pesticida, al cabo de 1 hora de la administración de CX los valores de actividad enzimática decrecieron a valores del orden de los embriones controles y se mantuvieron en esos niveles hasta 4 horas después de la inyección del mismo.

Para tratar de dilucidar si la acción de heptaclor es a nivel de transcripción o no, se hicieron los experimentos de inyección conjunta de Act D y el pesticida.

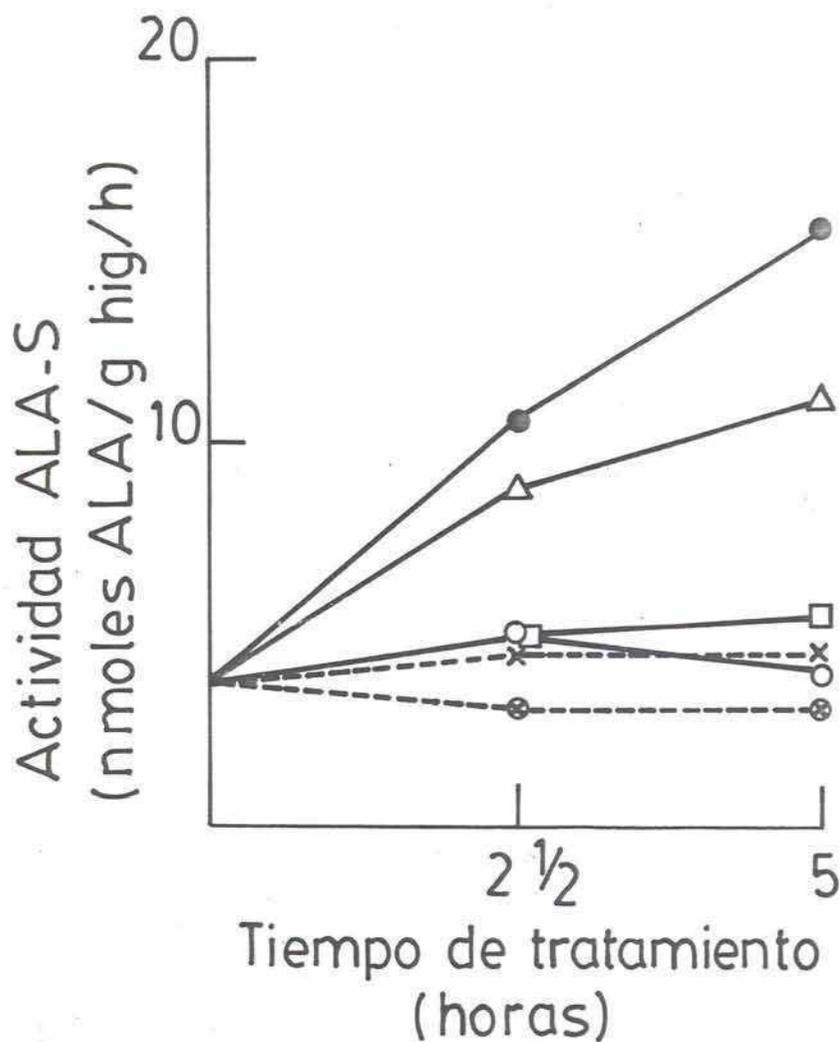


Figura 42: Efecto de la administración conjunta de cicloheximida y heptaclor sobre ALA-S.

Los embriones fueron inyectados con 10 mg/huevo de heptaclor solo (●) ó junto con CX 1(Δ), 2(□) y 5 ug/huevo (○). Los controles fueron tratados con DMSO (x) o DMSO con CX (5 ug/huevo. (⊗)).

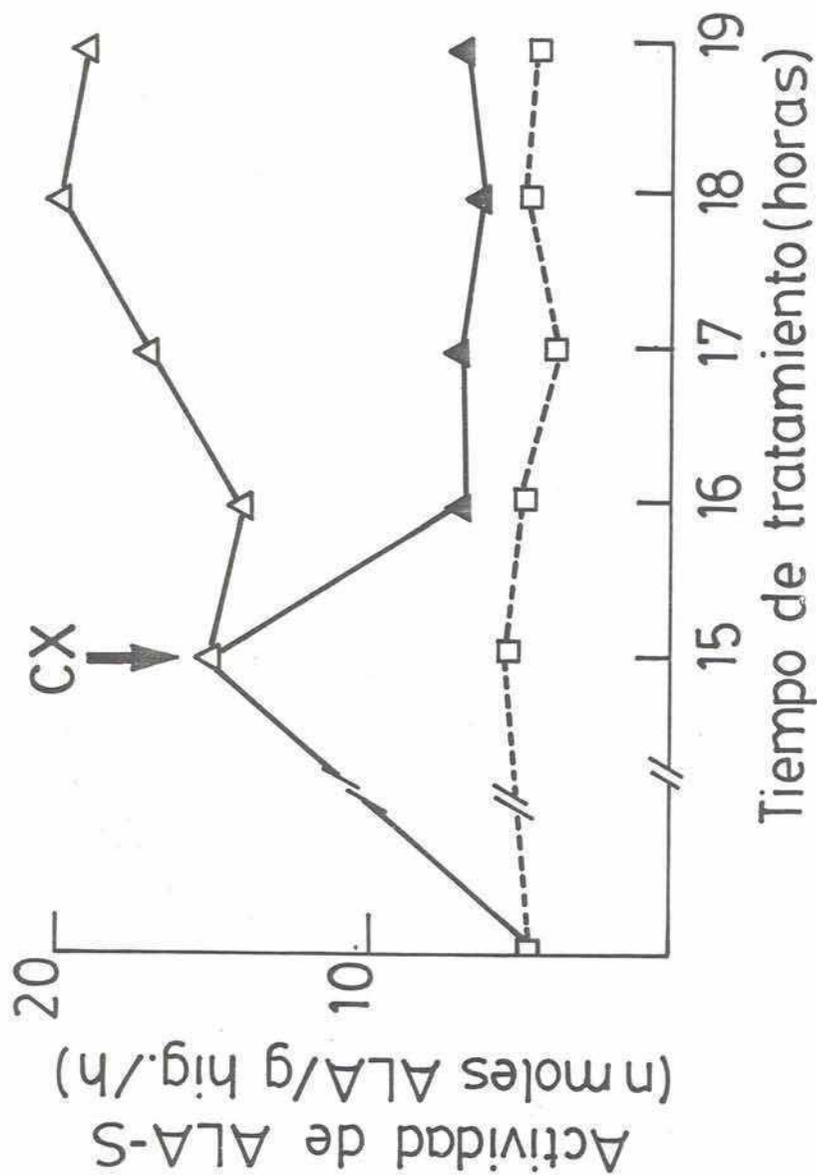


Figura 43: Efecto de cicloheximida sobre el aumento de ALA-S producido por heptaclor.

Los embriones recibieron CX (5 ug/huevo) (▲) luego de 15 horas de tratamiento con heptaclor (10 mg/huevo) (Δ). (□) controles DMSO.

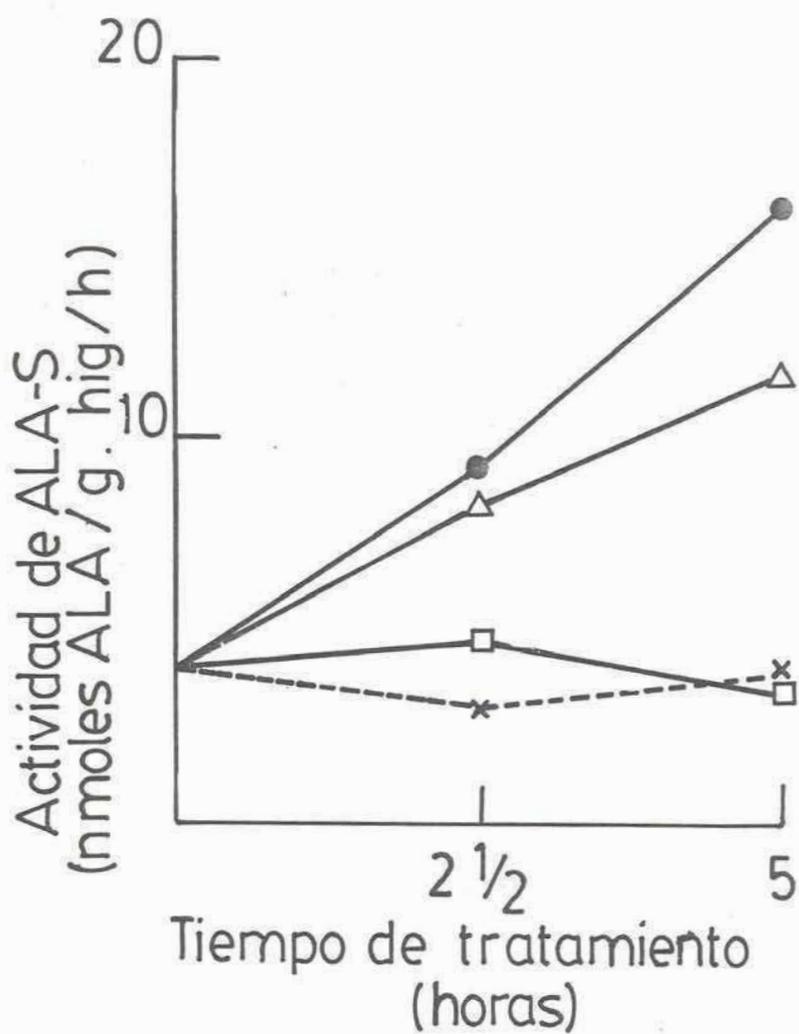


Figura 44: Efecto de la administración conjunta de Actinomicina D y heptaclor.

Los embriones fueron tratados con 15 mg/huevo de heptaclor solo (●) ó junto con Act. D 200 (Δ) ó 300 ug/huevo (□). Los controles recibieron DMSO (x).

Como se puede observar en la Figura 44, Act D a dosis de 200 ug/huevo produjo un ligero decremento de la respuesta de ALA-S a heptaclor pero la misma fue totalmente bloqueada por 300 ug/huevo del inhibidor.

II. 10. Distribución subcelular de ALA-S.

Como se ha señalado en la Introducción de este trabajo, ALA-S es una enzima mitocondrial que es sintetizada en el citosol de la célula, más exactamente en los poliribosomas libres, en forma de un precursor de mayor tamaño molecular. Este precursor sufre un procesamiento proteolítico durante la translocación a la mitocondria.

En condiciones de gran inducción, la actividad de ALA-S ha sido detectada en el citosol de las células de hígado de ratas y pollos, pero no en el hígado de embrión de pollo.

Con el objeto de ver si luego del tratamiento con lindano y heptaclor, la actividad de ALA-S estaba incrementada en las mitocondrias solamente o en mitocondrias y citosol, se hicieron los experimentos de distribución subcelular. Con este fin, se separaron las distintas fracciones subcelulares del hígado y se midió la actividad de ALA-S en dichas fracciones. Simultáneamente se midió la actividad de Succínico deshidrogenasa (SDH) como marcador mitocondrial.

Como la Succinil-CoA sintetasa es una enzima mitocondrial, para asegurar que en todas las fracciones haya sufi-

ciente provisión de sustrato, en estas experiencias, la actividad de ALA-S se midió con agregado de Succinil-CoA sintetasa obtenida de *Escherichia coli* como se describió en Métodos.

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla VI, a pesar de cuidadosos y repetidos lavados, en todos los casos, una parte importante de la actividad tanto de ALA-S como de SDH apareció en núcleos. Al respecto, cabe señalar que hay varios reportes con resultados similares. Gross y Hutton (307), estudiando la distribución subcelular de ALA-S en el hígado de ratones porfíricos, han hallado que la mayor parte de la actividad aparece en el precipitado de 600 xg y según los autores, esta actividad se debe a células no rotas o parcialmente rotas.

En ratas, Kim y Kikuchi (281) han informado que la actividad total obtenida en el homogenato entero del hígado fue aproximadamente 30% mayor que la obtenida en el sobrenadante de 600 xg del mismo homogenato, debido a la cosedimentación de las mitocondrias con núcleos y debris celular, y Patton y Beattie (33) hallaron que sólo el 40% del total de actividad de ALA-S del homogenato fué recuperada en mitocondrias, microsomas y sobrenadante. Correia y Meyer (411) han confirmado por microscopía electrónica que complejos de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso son uno de los principales componentes del precipitado 600 xg.

Petersons y Allred (412) han reportado que el agregado de buffer al medio de homogeneización del hígado con-

TABLA VI. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S EN EMBRIONES CONTROLES Y TRATADOS CON LINDANO O HEPTACLOR.

FRACCION	DMSO		LINDANO		HEPTACLOR	
	Actividad de ALA-S	Actividad de SDH	Actividad de ALA-S	Actividad de SDH	Actividad de ALA-S	Actividad de SDH
Homogenato	5,8	190	29,5	150	15	186
Núcleos	3,1	91	15,3	62	5,6	97
Mitocondrias	1,4	40	7,6	39	5,7	54
Microsomas	---	30	---	8	---	2
Citosol	---	12	---	13	---	8

La actividad de ALA-S se expresa como nmoles ALA/g.hígado/hora y la actividad de SDH como Unidades de enzima/g hígado/15 min como se describe en Métodos.

Los embriones fueron inyectados con 0,5 mg/huevo de lindano ó 15 mg/huevo de heptaclor y tratados con las drogas durante 5 horaS. Las fracciones subcelulares fueron obtenidas como se describe en Métodos.

duce a la precipitación de las mitocondrias a 800 xg por agregación de las mismas. La preparación del homogenato en Sacarosa 0,25 M sin agregado de buffer mejora este aspecto, pero aún así han hallado un tercio de la actividad de enzimas mitocondriales en la fracción nuclear.

Como a los fines del presente trabajo, interesaba ver si luego del tratamiento con los pesticidas la actividad estaba incrementada en mitocondrias solamente o en mitocondrias y citosol, se compararon las actividades correspondientes a estas fracciones.

Como se puede observar en la tabla, en todos los casos la mayor actividad enzimática estuvo presente en núcleos y mitocondrias. Ni en microsomas ni en el citosol pudo medirse actividad de ALA-S. Como la actividad medida en núcleos muy probablemente se deba a mitocondrias coprecipitadas, se concluye, por estos resultados que la actividad enzimática está incrementada solamente en mitocondrias.

II. 11. Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a lindano.

El hemo es el regulador normal de la actividad de ALA-S. Con el objeto de investigar si la enzima inducida por lindano responde a la regulación por hemo, se hicieron los experimentos con hemina inyectada simultáneamente y posteriormente al pesticida.

En primer término se llevaron a cabo las experiencias

de la inyección simultánea de lindano y hemina (3 y 6 mg/huevo), para ver si estando presente el represor fisiológico aún se obtenía respuesta.

Como se puede observar en la Figura 45, luego de 2,5 horas, los embriones que recibieron tanto 3 como 6 mg/huevo de hemina presentaron una actividad inferior a los tratados con lindano solo. A las 5 horas del tratamiento conjunto, se puede ver que mientras los embriones tratados con 6 mg de hemina presentaron una actividad casi del orden de los controles, aquellos que fueron inyectados con 3 mg también tuvieron una actividad enzimática menor que los tratados con lindano.

La actividad enzimática de los controles DMSO y de los controles tratados con hemina no presentaron diferencias.

Parecería que el sistema responde a la regulación por hemo y la respuesta obtenida a las 5 horas con la dosis menor de hemina se deba quizás a que la misma no fue suficiente para mantener reprimida la enzima por largos tiempos.

En un experimento siguiente, los embriones fueron tratados con lindano, un tiempo suficiente como para permitir que se produzca la inducción de ALA-S, y luego se inyectó la hemina.

Como se puede observar en la Figura 46, en estas condiciones la hemina revirtió parcialmente el aumento de actividad enzimática causado por el pesticida, ya que luego de 2 horas de su administración la actividad fue menor que

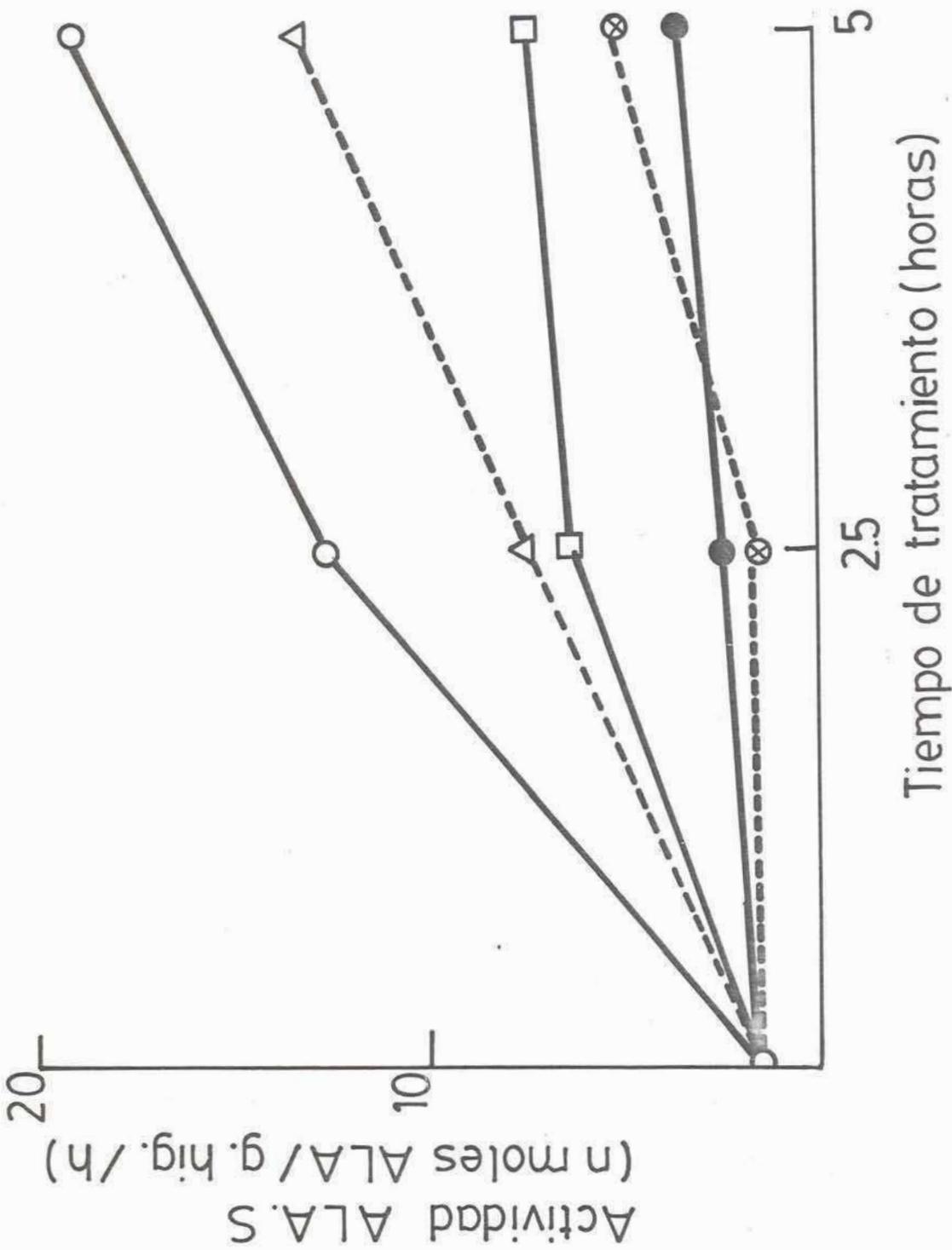


Figura 45: Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a lindano.

Los embriones fueron tratados con Lindano (0,5 mg/huevo) solo (O) ó conjuntamente con hemina (3 mg/huevo) (Δ) ó (6 mg/huevo) (□). Los controles recibieron DMSO (⊗) y DMSO + hemina (6 mg/huevo) (●).

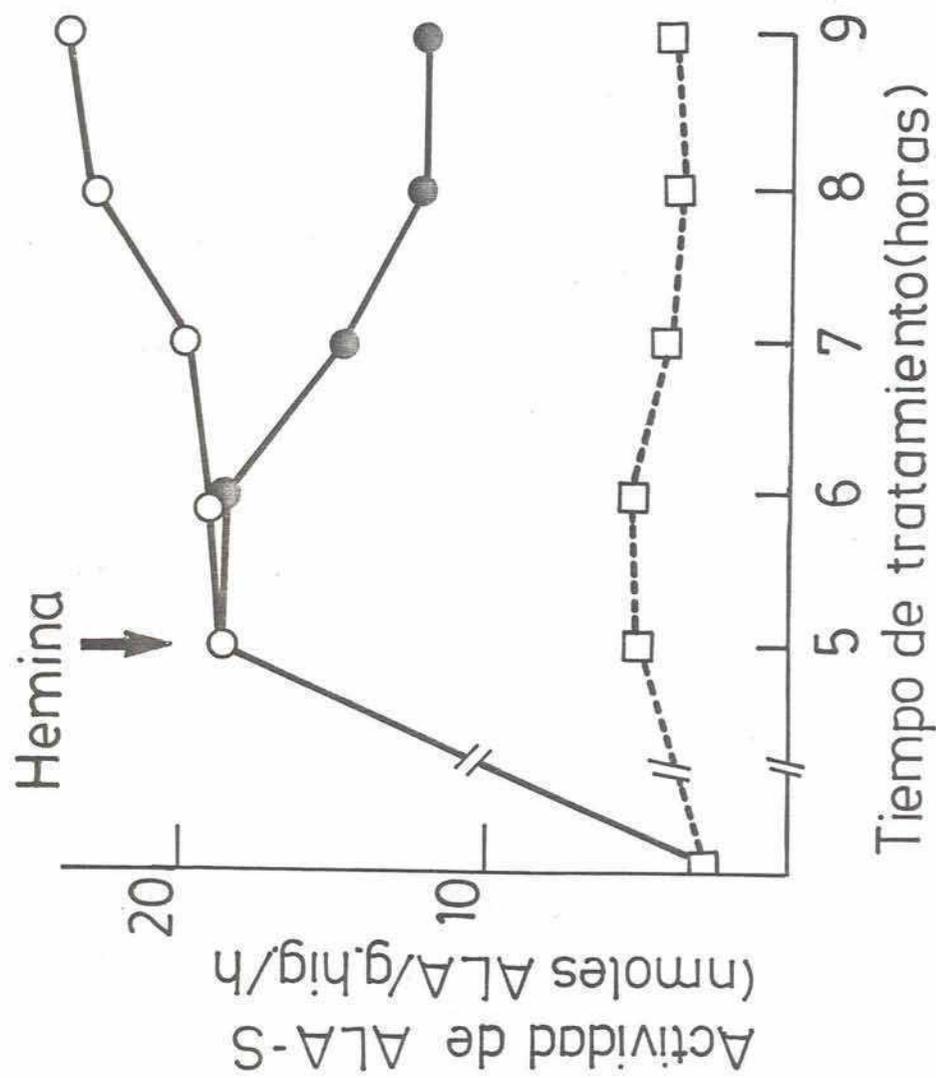


Figura 46: Efecto de hemina sobre el aumento de ALA-S producido por lindano.

Los embriones fueron tratados con 0,5 mg/huevo de lindano (O) durante 5 horas y a ese tiempo se les administró 6 mg/huevo de hemina (●). Los controles DMSO recibieron 6 mg/huevo de hemina (□).

la presentada por los embriones no inyectados y la misma se mantuvo en estos niveles hasta luego de 4 horas después de la inyección, y a diferencia de la respuesta obtenida con Act D no hay aumento de actividad luego de la inyección de hemina.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que estando presente la hemina no se obtiene respuesta y que una vez producida la inducción la misma es parcialmente revertida, se concluye que el hemo ejerce su efecto regulatorio en este sistema.

II. 12. Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a heptaclor.

Con el objeto de investigar si los embriones tratados con heptaclor también respondían a la regulación por hemo, se hicieron experimentos semejantes a los descritos anteriormente para lindano.

Cuando los embriones fueron inyectados con 6 mg/huevo de hemina junto con la inyección de 10 mg/huevo de heptaclor, como se puede ver en la Figura 47, la actividad enzimática obtenida a las 3 horas fue del orden del control en tanto que a las 6 horas fue mayor que los de DMSO aunque menores que los valores de actividad de los embriones tratados con heptaclor solo.

Por otra parte si luego de producido el aumento de la actividad enzimática, se administra la hemina, la actividad decrece y se mantiene en niveles bajos aún 3 horas

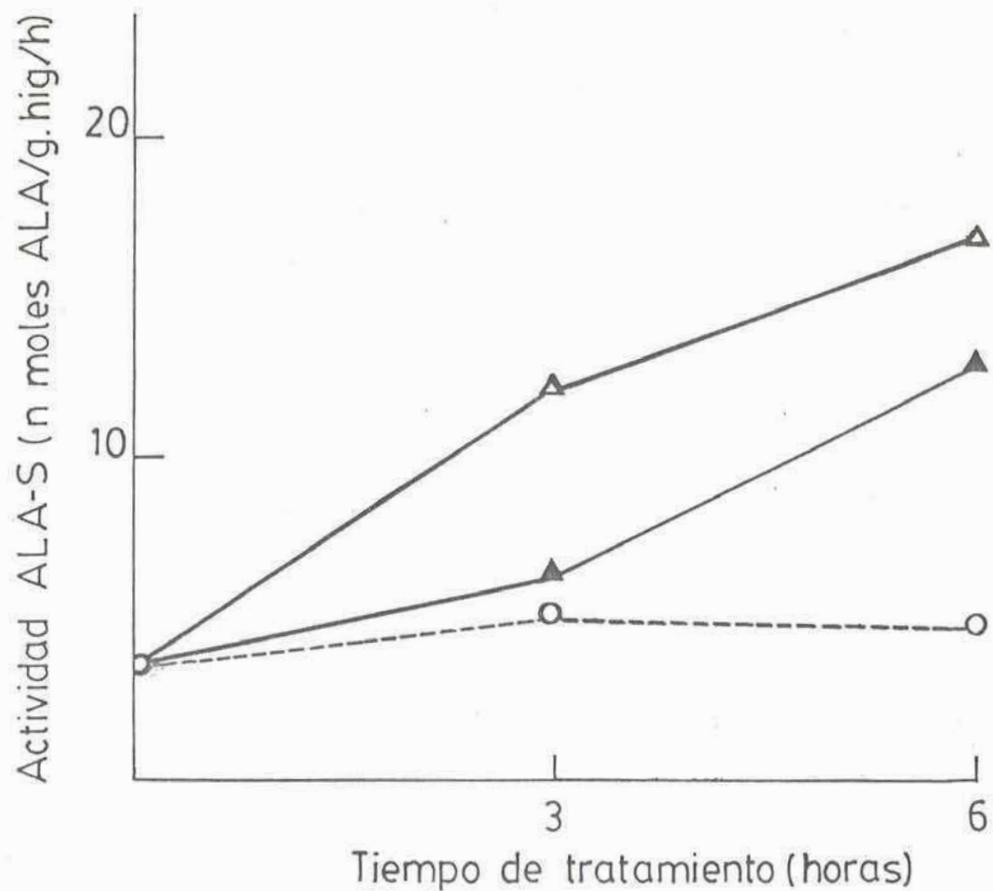


Figura 47: Efecto de hemina sobre la respuesta de ALA-S a heptaclor.

Los embriones fueron tratados con heptaclor (10 mg/huevo) sólo (Δ) ó junto con hemina (6 mg/huevo) (▲). Los controles recibieron DMSO + hemina (6 mg/huevo) (○).

después de la inyección de la misma. Estos resultados pueden verse en la Figura 48.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las mismas consideraciones que las dichas para lidano, se concluye que la inducción de ALA-S por tratamiento con heptaclor es susceptible a la regulación por el producto final, hemo.

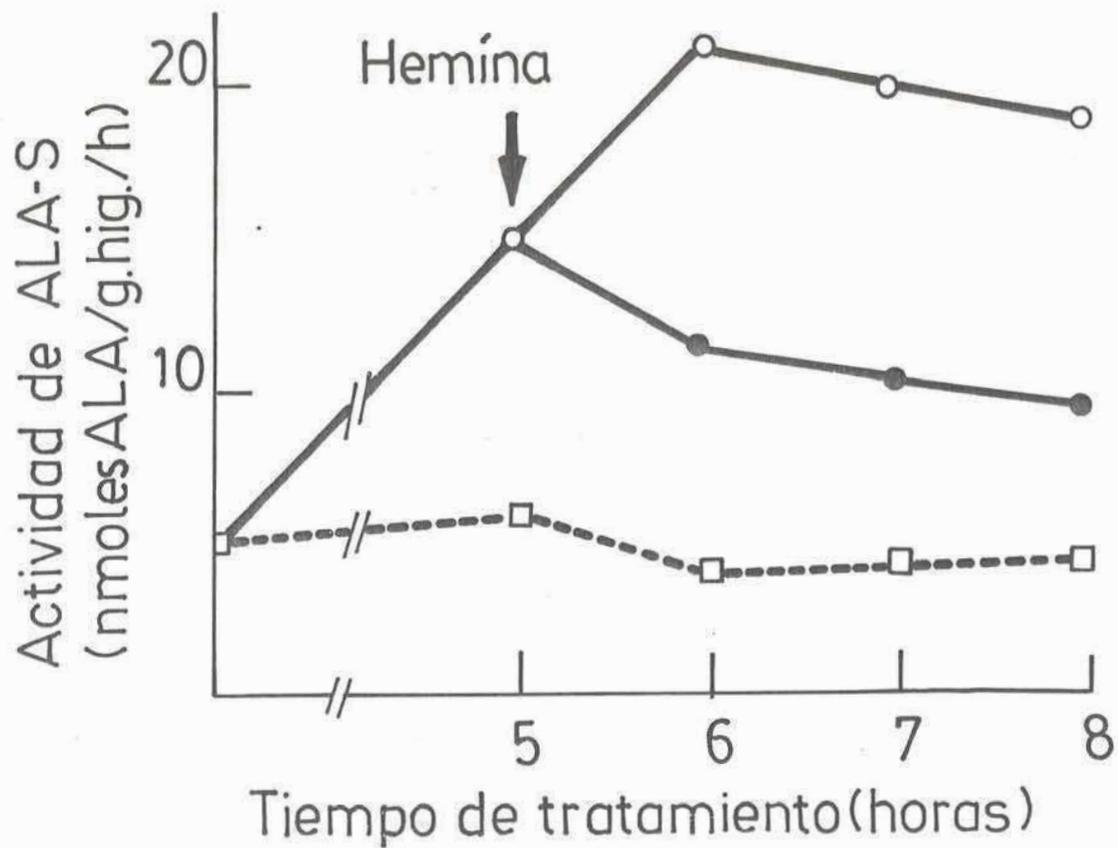


Figura 48: Efecto de hemina sobre el aumento de ALA-S producido por heptaclor.

Los embriones fueron tratados con 10 mg/huevo de heptaclor (○) durante 5 horas y a ese tiempo se les administró 6 mg/huevo de hemina (●). Los controles DMSO recibieron 6 mg/huevo de hemina (□).

III. ESTUDIOS SOBRE PORFIRINOGENO CARBOXILIASA.

Como se ha señalado en la Introducción, PCL es una enzima clave en la porfiria inducida por compuestos clorados. Por otra parte, según los resultados aquí obtenidos al analizar la naturaleza de las porfirinas acumuladas en el hígado de los embriones tratados con lindano y heptaclor se vió acumulación de Uro, Hepta, Hexa y Penta sugiriendo quizás una posible alteración a nivel de PCL.

En base a ello, pareció de interés ver el efecto "in vivo" de dichos compuestos clorados sobre la actividad de PCL en el hígado de embriones de pollo.

En primer lugar y dada la no existencia de ningún reporte sobre las condiciones de ensayo y medición de esta enzima en esta fuente, se trató de caracterizarla. Para ello, se estudió el efecto de concentración de enzima y Uro'gen III, curso de reacción, pH y temperatura de incubación, aerobiosis, quelantes, tioles, sales halogenadas, hierro y PPal.

III.1. Estudios tendientes a la caracterización de PCL de hígado de embrión de pollo.

III.1.a. Efecto de la concentración de enzima.

Entre las variables testeadas para determinar las condiciones óptimas de medición de actividad de PCL, está la concentración de proteínas. Cuando se estudió su influencia sobre la velocidad de decarboxilación del sustrato Uro'gen III, (Figura 49(A)) esta fue lineal hasta una

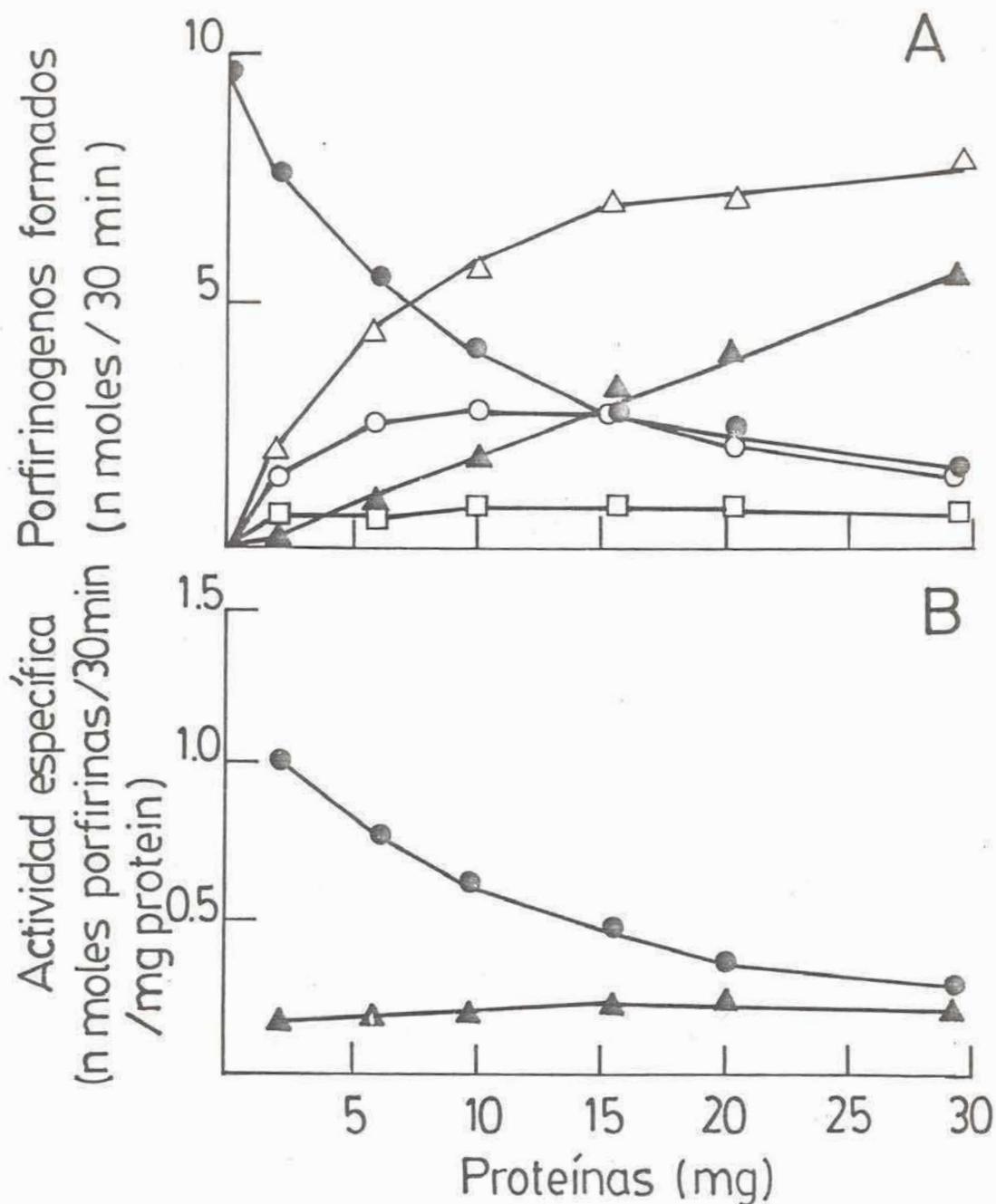


Figura 49: Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad de PCL.

Las condiciones de incubación son las indicadas en Métodos, excepto la cantidad de proteína. En (A) se representa la velocidad de desaparición de Uro'gen (●) y aparición de Hepta'gen (○); Hexa'gen o Penta'gen (□); Copro'gen (▲) y productos totales de decarboxilación (Δ). En (B), la velocidad de formación de producto total (●) y de Copro'gen (▲) expresados como actividad específica.

concentración de proteínas de aproximadamente 15 mg y luego fué disminuyendo. Coincidentemente, la formación de productos totales (porfirinógenos de 7- + 6- + 5- + 4-COOH) aumentó en forma casi lineal hasta esa cantidad de proteínas y luego permaneció constante.

Si se analiza la formación de los distintos porfirinógenos productos de la decarboxilación del Uro'gen, se puede ver que Hepta'gen es el que aparece en mayor porcentaje cuando la cantidad de enzima es baja. Su formación fué proporcional a la cantidad de proteína presente hasta 5 mg, luego permaneció constante entre 5 a 15 mg y finalmente mostró un ligero decremto.

En todo el rango estudiado, los niveles de Hexa y Penta'gen fueron bajos y casi constantes. Si se analiza la velocidad de formación del producto final (Copro'gen), se puede ver que aumentó en todo el rango en forma proporcional a la cantidad de enzima incubada. A partir de una concentración de proteínas de aproximadamente 15 mg, donde más del 70% del Uro'gen fue consumido, el producto principal de decarboxilación fué Copro'gen .

Si se analiza la Figura 49 (B), se puede ver que mientras la actividad específica para la formación de Copro'gen se mantuvo constante en todo el rango, indicando que la misma se halla a saturación, la actividad para la decarboxilación del Uro'gen fué decayendo a mayor cantidad de proteína. Es por ello importante trabajar a relativamente bajas cantidades de enzima.

III.1.b. Efecto de la concentración de Uro'gen III.

Cuando se estudió el efecto de la variación de la concentración de sustrato, Uro'gen III (entre 0,5 y 8,4 μM), sobre la distribución de los productos de reacción se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 50(A).

Se puede ver que a bajas concentraciones de sustrato (menores a 2 μM), Copro'gen fue el porfirinógeno predominante. La formación de Copro'gen aumentó en forma proporcional a la concentración del sustrato hasta 1 μM de Uro'gen, entre 1-2 μM alcanzó los valores máximos, luego entre 2 y 4 μM sufrió un decremento y finalmente se mantuvo constante.

Hexa y Penta'gen se formaron en cantidades relativamente bajas y constantes, aunque a altas concentraciones de Uro'gen (mayores de 5 μM) tendieron a aumentar ligeramente llegando casi a igual cantidad que Copro'gen.

Por otra parte, Hepta'gen apareció en muy poca cantidad cuando la concentración del sustrato fué baja, pero fué aumentando progresivamente y a partir de 2 μM de Uro'gen fué el principal producto de decarboxilación.

Si analizamos la Figura 50 (B), donde se representan las actividades específicas, vemos que la curva de formación de Copro'gen sufrió un decremento a partir de 2 μM de Uro'gen. En tanto que, la formación de productos totales se fué incrementando como reflejo de la producción de Hepta'gen.

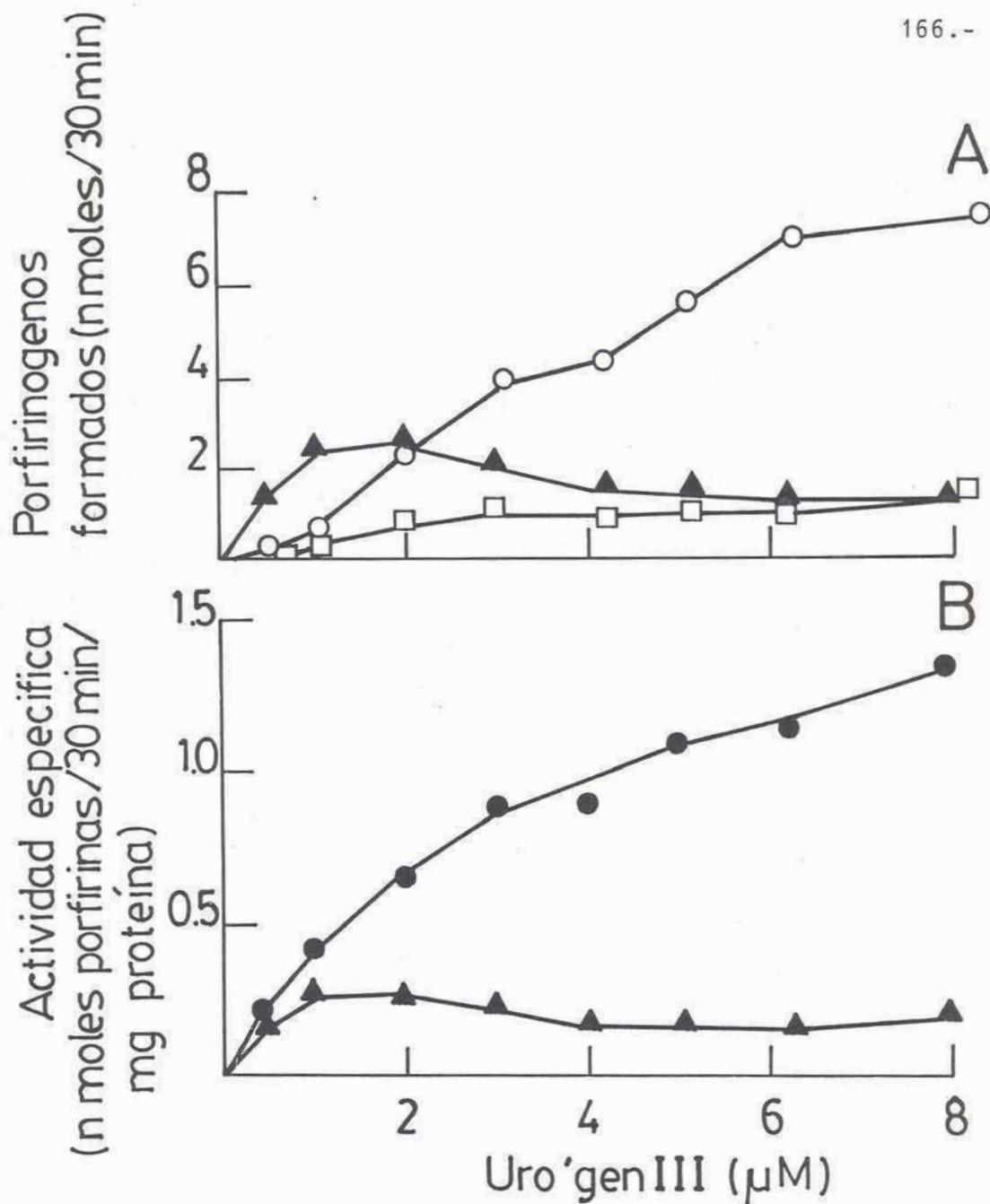


Figura 50: Efecto de la concentración de Uro'gen III sobre la actividad de PCL.

Las condiciones de incubación son las indicadas en Métodos excepto la concentración de Uro'gen III. En (A) están representados los productos de decarboxilación Hepta'gen (O); Hexa'gen + Penta'gen (\square) y Copro'gen (\blacktriangle). En (B) la velocidad de formación de Hepta + Hexa + Penta + Copro'gen (\bullet) y de Copro'gen (\blacktriangle) expresados como actividad específica.

III. 1.c. Curso de la reacción.

La decarboxilación de Uro'gen III fue estudiada en función del tiempo, durante un período de 60 minutos. Como se puede observar en la Figura 51, el consumo de Uro'gen fue rápido durante los primeros 30 minutos y luego fué disminuyendo con el tiempo. La curva de desaparición de Uro'gen fué acorde con la curva de formación de productos totales de decarboxilación, donde se vió un rápido incremento durante los primeros 30 minutos y luego un decaimiento.

Mientras la velocidad de formación de Copro'gen fue lineal hasta los 60 minutos, Hepta'gen se formó muy rápidamente durante los primeros 15 minutos, luego permaneció constante. Los porfirinógenos de 5- y 6-COOH aparecieron en cantidades pequeñas y constantes durante la reacción.

Así, al principio de la reacción hubo una rápida acumulación de Hepta'gen en cantidades mayores que los otros intermediarios y luego permaneció constante mientras la reacción procedió.

III.1.d. Determinación del pH óptimo.

La decarboxilación de Uro'gen III y la formación de Copro'gen III fueron medidas a diferentes valores de pH entre 6,2 y 7,3, en buffer fosfato. Los resultados mostrados en la Figura 52 (A) indican que el pH al cual se obtuvo máxima actividad fue 6,8 para ambas etapas de la reacción.

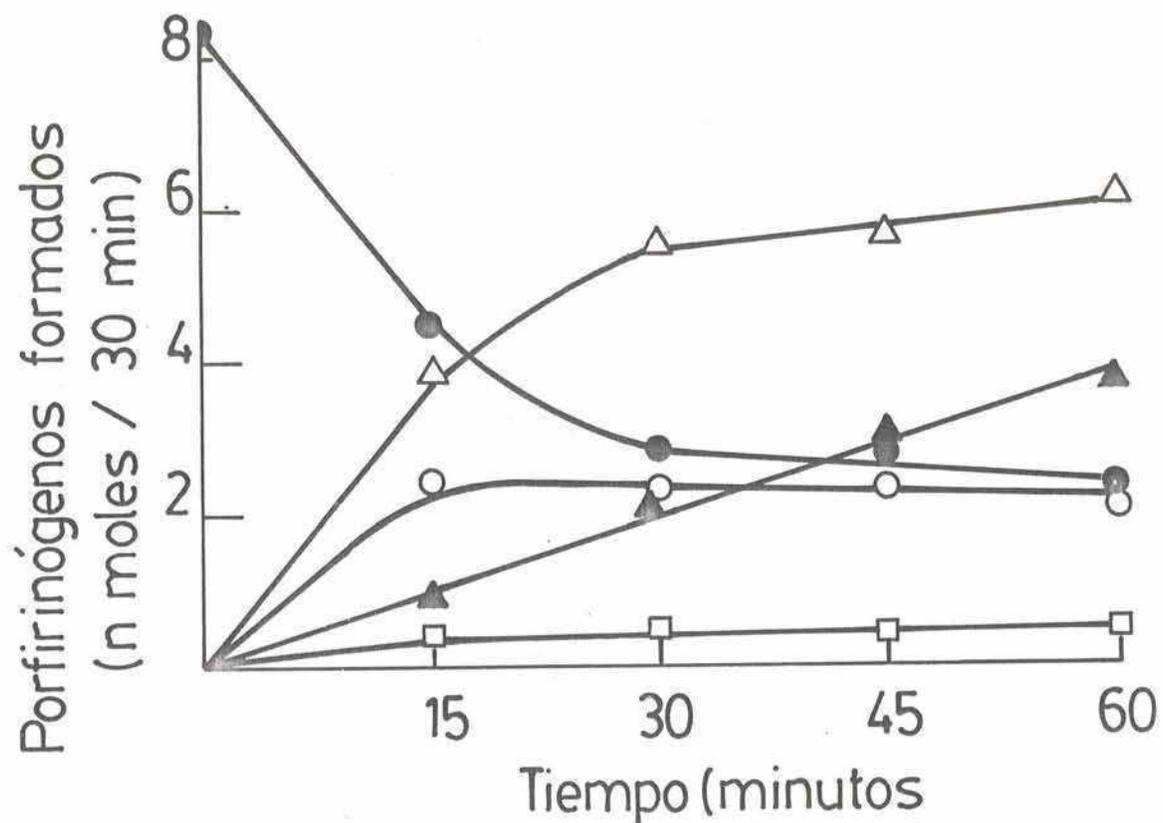


Figura 51: Distribución de los productos de decarboxilación en función del tiempo.

Las condiciones de incubación son las indicadas en Métodos. Se representa la velocidad de desaparición de Uro'gen (●) y de aparición de Hepta'gen (○); Hexa ó Penta'gen (□); Copro'gen (▲) y productos totales (△).

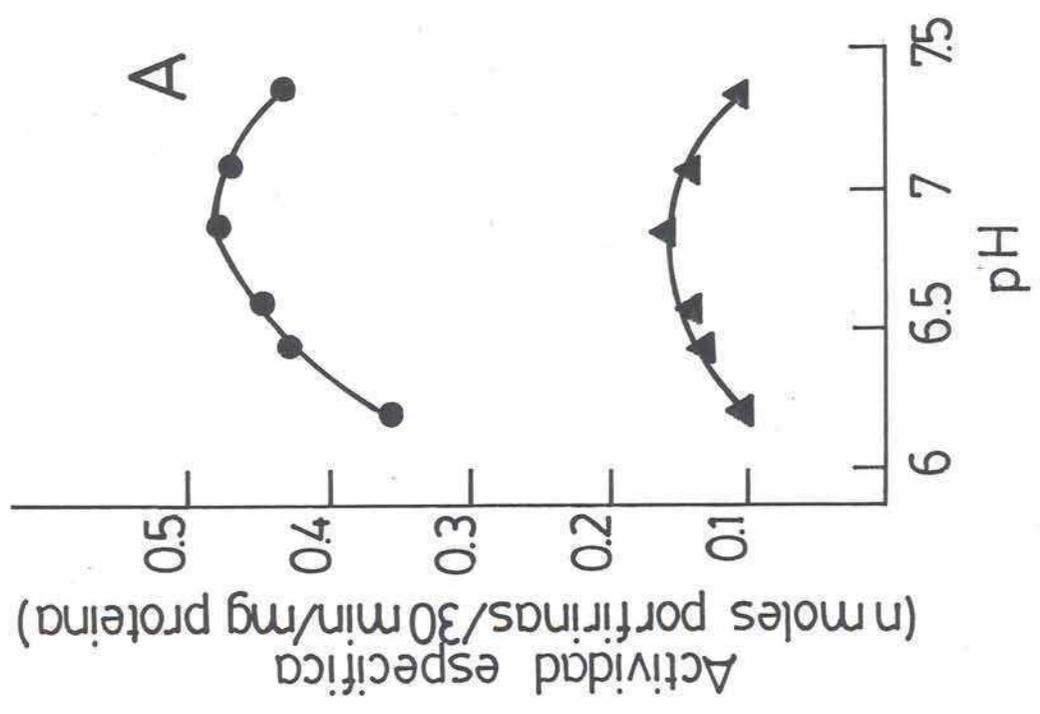
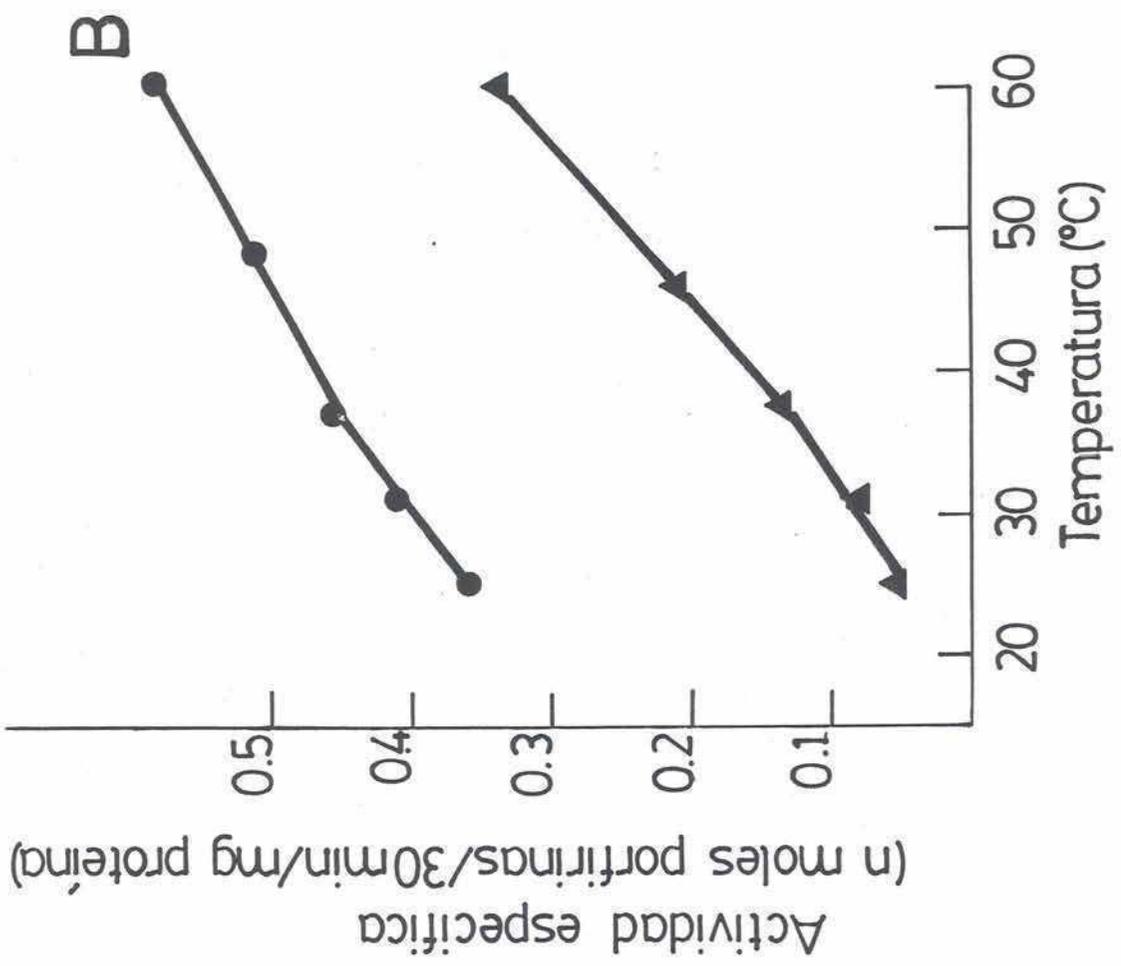


Figura 52: Efecto del pH (A) y temperatura (B) sobre la actividad de PCL.

Se representa la velocidad de formación de Hepta + Hexa + Penta + Copro'gen (●) y de Copro'gen (▲).

III.1.e. Efecto de la temperatura de incubación.

La actividad de PCL de hígado de embrión de pollo fue medida haciendo incubaciones a distintas temperaturas entre 25 y 60°C. En la Figura 52 (B) se puede observar que, mientras la formación de Copro'gen (segunda etapa) se incrementó muy notablemente con el aumento de la temperatura el incremento relativo en la velocidad de decarboxilación de Uro'gen (primera etapa) mostró ser ligeramente menor a mayores temperaturas.

Así, cuando la reacción fué llevada a cabo a 60°C, la actividad enzimática de la segunda etapa se incrementó 2,4 veces respecto a la obtenida a 37°C, mientras que para la primer etapa el aumento fué de 1,2 veces. Ambas etapas de la decarboxilación pueden ser medidas aún a 25°C.

III.1.f. Efecto del precalentamiento sobre la actividad de PCL.

Con el objeto de ver si la gran actividad obtenida, a altas temperaturas de incubación, sobre todo en la segunda etapa se debía a una decarboxilación no enzimática o a la acción de un activador fueron realizadas incubaciones sin enzima y ensayos cruzados con la enzima precalentada.

Los resultados obtenidos con los blancos sin enzima incubados en las mismas condiciones que los ensayos de actividad descartan la posibilidad de una decarboxilación

no enzimática por lo menos a 60°C ya que no dieron ningún producto detectable.

Por otro lado, los resultados del ensayo cruzado en el cual una preparación enzimática precalentada a 60°C fue agregada a una preparación no tratada y luego incubada en condiciones standard (37°C), descartan la posible presencia de un activador natural cuya acción se ponga de manifiesto a alta temperatura como puede observarse en la Tabla VII, la enzima precalentada a 60°C aún conservó cierta capacidad para decarboxilar Uro'gen pero no Copro'gen (ensayo 2).

Cuando esa enzima precalentada fue adicionada a una enzima normal (ensayo 3), la actividad obtenida fué ligeramente inferior (para la primer etapa) y mucho menor (para la segunda etapa) al valor teórico obtenido como promedio de los ensayos 1 y 2 y no mayor como debiera esperar si

hubiera efecto activador. Es mejor ver el comportamiento de la segunda etapa (formación de Copro'gen) ya que ésta es la que sufre un mayor efecto de activación por temperatura (Figura 52 B) y además, su actividad es lineal con la cantidad de proteína agregada. Por otra parte, la inactivación obtenida luego de la preincubación a 60°C indican que es una enzima termolábil

III.1.g. Efecto de GSH, EDTA y aerobiosis.

Con el objeto de ver si la enzima de embrión de pollo requería GSH y EDTA en el medio y una incubación en condi-

TABLA VII. EFECTO DEL PRECALENTAMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PCL.

ENSAYO	E n z i m a (ml)		Desaparición de Uro'gen (Porfirinas de 7-+6-+5+4-COOH)		Formación de Copro'gen (Porfirina de 4-COOH)	
	No tratada	Calentada 60°C, 30min	Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)	Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)
1	0.5	---	0.74	100	0.24	100
2	---	0.5	0.13	18	0.00	0
3	0.25	0.25	0.50	68	0.08	33
Valor teórico de 3.			0.44	59	0.12	50

Las condiciones de ensayo fueron los detallados en Métodos. La preparación enzimática tiene una concentración de proteínas de 18.5 mg/ml. El valor teórico de 3 es el valor promedio obtenido entre los ensayos 1 y 2.

ciones anaeróbicos, la actividad fue medida en ausencia de esos reactivos y por incubación en atmósfera de Oxígeno. Los resultados obtenidos fueron comparados al control que contiene todos los componentes e incubado en anaerobiosis.

Como puede verse en la Tabla VIII, la anaerobiosis fué necesaria pero la enzima no requirió GSH ni EDTA.

El mayor efecto inhibitorio del oxígeno fue a nivel de la segunda etapa, donde el grado de inhibición fue casi de un 30%, en tanto que la primer etapa no se vió afectado.

III.1.h. Efecto de Fosfato de Piridoxal, Cisteína y Ditiotreitól y reactivo quelantes de metales.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla IX, el PPal no parece ser un cofactor necesario para PCL de embrión de pollo ya que la actividad enzimática no se vió favorecida por su adición al medio.

Reactivos protectores de grupos sulfhidrilos, como cisteína y Ditiotreitól no mejoraron la actividad enzimática, en concordancia al no requerimiento de GSH ya visualizado. Por otra parte, quelantes tales como Dietilditiocarbamato, α , α' -bipiridilo y Pirofosfato de sodio, además del EDTA (Tabla VIII), no tuvieron acción sobre la actividad enzimática sugiriendo que la PCL de embrión de pollo parece no ser afectada por metales.

III.1.i. Efecto de haluros de metales alcalinos.

Como en literatura existen informes que dicen que sales halogenados de metales alcalinos inhiben PCL de eritro

TABLA VIII. EFECTO DE GSH, EDTA Y AEROBIOSIS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PCL.

E n s a y o	Desaparición de Uro'gen (Porfirinas de 7--+6--+5--+4-COOH)		Formación de Copro'gen (Porfirina de 4-COOH)	
	Act.específica (nmoles de porfirinas 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)	Act. específica (nmoles de porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)
Control	0.45	100	0.14	100
GSH	0.46	102	0.14	100
EDTA	0.47	104	0.15	107
Aerobiosis	0.44	98	0.095	68

El sistema de incubación fue el detallado en Métodos excepto que GSH o EDTA fueron omitidos en cada caso o la incubación se llevó a cabo aeróbicamente.

TABLA IX. EFECTO DE FOSFATO DE PIRIDOXAL, CISTEINA, DITIOTREITOL Y QUELANTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE PCL.

Reactivo agregado	Concentración (mM)	Desaparición de Uro'gen (Porfirinas de 7-+6-+5-+4-COOH)		Aparición de Copro'gen (Porfirina de 4-COOH)	
		Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)	Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Act. relativa (%)
Control	---	0.57	100	0.22	100
Fosfato de Piridoxal	0.5 0.15	0.55 0.55	96 96	0.20 0.20	91 91
Cisteína	1	0.56	98	0.22	100
Ditiotreitól	1	0.55	96	0.21	95
Dietilditiocarbamato	0.1	0.55	96	0.21	95
α, α' -Bipiridilo	0.1	0.56	98	0.21	95
Pirofosfato de Na	0.1	0.56	98	0.22	100

Las condiciones de incubación fueron las detalladas en Métodos, excepto de GSH y EDTA fueron omitidos y los reactivos indicados fueron adicionados en la concentración final indicado.

citós de ave (153, 156), hojas de tabaco (158) e hígado bovino (164), pareció de interés investigar el efecto de las mismas sobre PCL de hígado de embrión de pollo.

Como se puede observar en la Tabla X, la primer etapa, en general, estuvo poco afectada pero la segunda presentó un mayor grado de inhibición. Así, una inhibición del 59% fue encontrada para la formación de Copro'gen tanto para NaCl como KCl, mientras que a la misma concentración NaF y KF exhibieron un efecto inhibitorio menor, 18 y 27% respectivamente. Para la primer etapa, las inhibiciones halladas fueron 32 y 28% para NaCl y KCl, respectivamente, y 9 y 12% para NaF y KF.

Los resultados indican así que la enzima es inhibida por sales de potasio o sodio, conteniendo fluoruro o cloruro como anión, estando más afectada por cloruros. Como el grado de inhibición producido por cloruro de sodio o potasio fué el mismo, parece probable que el efecto inhibitorio de los haluros de metales alcalinos se deba al anión más que al catión.

III.1.j. Efecto de SO_4Fe sobre PCL.

Como ha sido señalado en la Introducción de este trabajo (Capítulo I. Sección 4) hay muchos informes contrapuestos respecto al efecto del ión Fe^{2+} sobre PCL y pareció así de interés estudiar su efecto sobre la enzima de embrión de pollo.

Las incubaciones fueron realizadas con el agregado de

TABLA X. EFECTO DE HALUROS DE METALES ALCALINOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PCL.

Ensayo	Concentración (M)	Desaparición de Uro'gen (Porfirinas de 7-+6-+5-+4-COOH)		Aparición de Copro'gen (Porfirina de 4-COOH)	
		Act. específica (nmoles de porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Inhibición (%)	Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Inhibición (%)
Control	---	0.57	0	0.22	0
NaCl	0.25	0.39	32	0.09	59
KCl	0.25	0.41	28	0.09	59
NaF	0.25	0.52	9	0.18	18
KF	0.25	0.50	12	0.16	27

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en Métodos excepto que GSH y EDTA fueron omitidos y las sales fueron adicionadas en cada caso en la concentración final indicada.

TABLA XI. EFECTO DE Fe SOBRE LA ACTIVIDAD DE PCL.

Ensayo	Concentración (mM)	Desaparición de Uro'gen (Porfirinas de 7--6--5--4-COOH)		Formación de Copro'gen (Porfirina de 4-COOH)	
		Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Inhibición (%)	Act. específica (nmoles porfirinas/ 30 min/mg proteína)	Inhibición (%)
Control	---	0.56	0	0.22	0
FeSO ₄	0.05	0.56	0	0.18	18
	0.15	0.56	0	0.18	18
	0.3	0.45	20	0.06	73

La mezcla de incubación contiene los reactivos indicados en Métodos excepto GSH y EDTA. Todos los ensayos fueron realizados con el agregado de cisteína en concentración 1 mM.

cisteína en concentración 1 mM. Como se muestra en la Tabla XI, el Fe^{2+} a bajas concentraciones (0,05 y 0,15 mM) solo afectó la segunda etapa de la decarboxilación. Mientras que a la mayor concentración probada (0,3 mM) tanto la primera como la segunda etapa, se vieron significativamente disminuídas, 20 y 73% respectivamente.

Realizando los ensayos sin cisteína, se obtuvieron similares resultados, pero no se observó ninguna inhibición a 0,5 mM de Fe^{2+} .

El hecho de que los agentes quelantes probados (especialmente α , α' -bipiridilo) no hayan mejorado la actividad obtenida, sugieren que la concentración de Fe^{2+} introducida en la mezcla de incubación por la preparación enzimática o los reactivos debe ser más pequeña que la menor concentración de SO_4Fe ensayada aquí.

III.2. Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL de hígado de embrión de pollo.

III.2.a. Respuesta de la enzima en embriones New Hampshire.

Embriones de 17 días de la cepa New Hampshire fueron inyectados con 0.5, 1, 2 y 3 mg de lindano y 10 y 20 mg de heptaclor y fueron incubados diferentes tiempos con el objeto de ver si estas drogas que incrementan los niveles de porfirinas hepáticas y ALA-S, afectan la enzima que decarboxila el Uro'gen.

Los resultados para la primera y la segunda etapa de la decarboxilación del Uro'gen III para 1 y 2 mg de lindano

y para ambas dosis de heptaclor son mostrados en la Figura 53.

En la parte superior de la figura se representan los resultados para la primer etapa de la decarboxilación expresada como nmoles de porfirinas de 7- + 6- + 5- + 4-COOH/mg proteína/30 min. En la parte inferior, se muestran los resultados obtenidos para la segunda etapa (formación de Copro'gen) expresado como nmoles de porfirinógeno de 4-COOH/mg de proteínas/30 min.

El tratamiento con DMSO durante 6, 14, 18 y 24 horas no modifica significativamente la actividad de PCL respecto a los embriones normales. Los valores representados corresponden a 24 horas de tratamiento con el solvente.

Los embriones que recibieron lindano o heptaclor mostraron una actividad igual o ligeramente mayor que los controles DMSO, tanto para la primera como para la segunda etapa de la decarboxilación del Uro'gen III. Los incrementos fueron de grado variable de acuerdo al tiempo de intoxicación pero en general el mayor aumento se obtuvo a mayor tiempo de tratamiento con las drogas. Teniendo en cuenta estas máximas respuestas la actividad de PCL se vió incrementadas en ambas etapas en 25% por lindano 1 y 2 mg y 15 y 20% por heptaclor 10 y 20 mg, respectivamente.

En los embriones tratados con 0.5 y 3 mg/huevo de lindano, durante 6 y 24 horas tampoco se observó disminución de la actividad de PCL, ellos también mostraron una

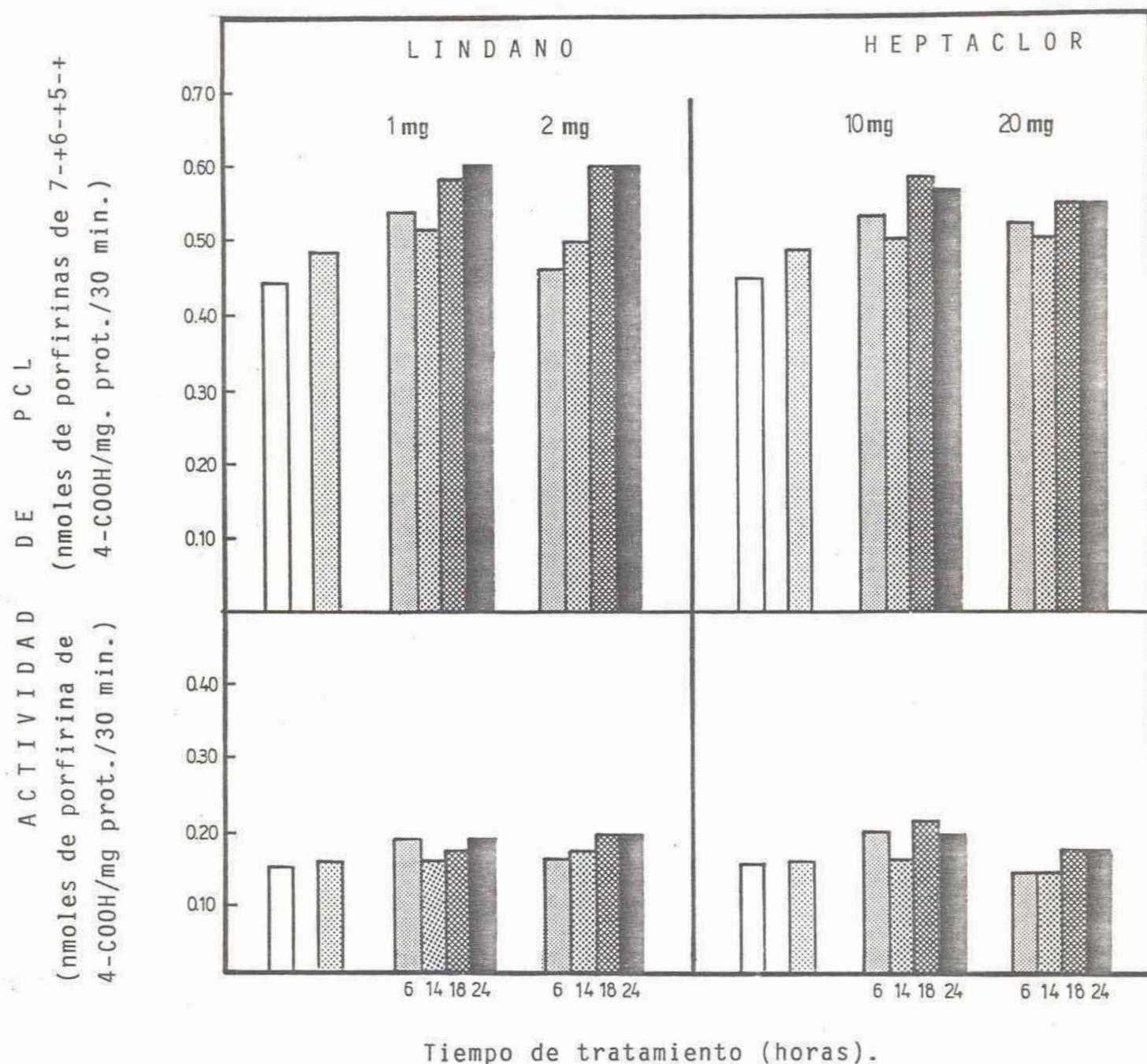


Figura 53: Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL de hígado de embriones New Hampshire.

Los resultados para 6, 14 y 18 horas de tratamiento fueron los obtenidos en un experimento donde se juntaron 3 hígados para cada caso. Los valores de normales (□), DMSO (▨) y 24 horas son la media de 5 experimentos en el cual se juntaron 3 hígados en cada caso.

actividad enzimática mayor que la de los controles.

III.2.b. Respuesta de la enzima en embriones White Leghorn.

Con el objeto de estudiar la respuesta de PCL hepática en otra cepa, embriones de 17 días White Leghorn fueren inyectados con las drogas a las mismas dosis que las utilizadas en embriones New Hampshire y fueron incubados 18 y 24 horas.

Los resultados se pueden ver en la Figura 54. En esta cepa, los embriones que recibieron el solvente DMSO presentaron una actividad enzimática algo menor que la correspondiente a los normales. En tanto que los embriones que fueren tratados ya sea con lindano o heptaclor mostraron una actividad aún menor que los controles DMSO, para ambas etapas de la decarboxilación.

La actividad enzimática decrece como una función del tiempo de intoxicación, ya que el efecto fué mayor a las 24 que a las 18 horas de tratamiento tanto para lindano como para heptaclor. Estos resultados obtenidos con lindano serían concordantes con lo que sucede en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo donde la acumulación de Uro a las 25 hs. de tratamiento es mayor que a las 18 horas (357).

A las 24 horas de tratamiento, una disminución de 15% y 25% para la primer etapa y 18% y 28% para la segunda etapa fue obtenida con lindano en dosis de 1 y 2 mg respectivamente. El decremento observado con heptaclor fué de 10% y 15% para la primer etapa y 28 y 40% para la segunda

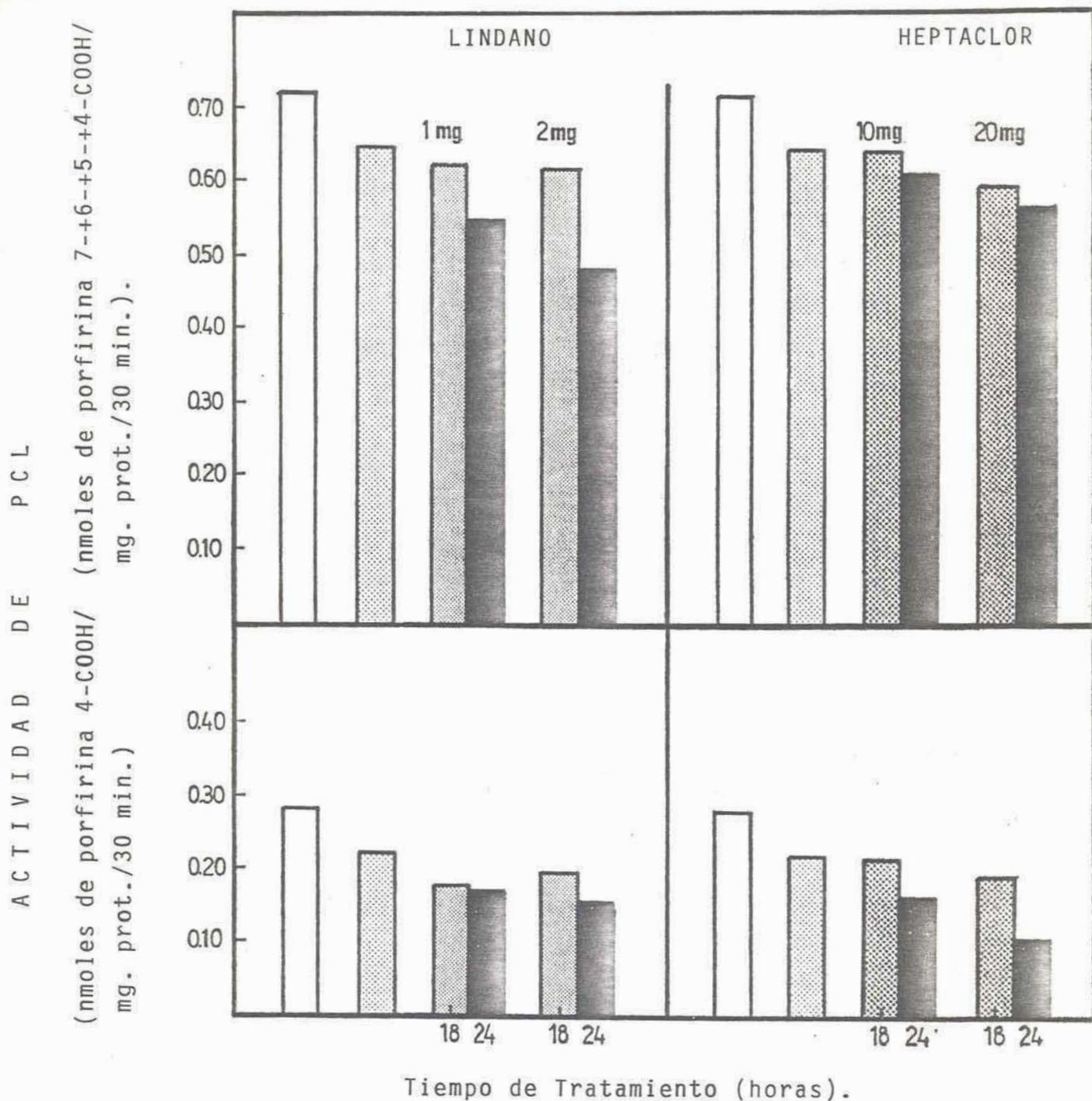


Figura 54: Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL de hígado de embriones White Leghorn.

Los resultados son la media de 3 experimentos en los cuales se juntaron 2-3 hígados para cada determinación. (□) Normal. (▨) DMSO.

para las dosis de 10 y 20 mg. respectivamente.

Parecería, por lo tanto, que la PCL hepática de embriones White Leghorn es susceptible a inhibición por los pesticidas aquí probados.

III.2.c. Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL hepática en pollo.

Con el objeto de ver si el desarrollo del animal tenía influencias sobre la respuesta de PCL a lindano y heptaclor, se estudió el efecto de estas drogas sobre dicha actividad enzimática en embriones de 1 día de la cepa New Hampshire.

En este caso, las drogas a igual dosis que las utilizadas en embriones fueron administradas por inyección intraperitoneal disueltas en 0,2 ml de DMSO. Los pollos fueron tratados durante 16 horas con las drogas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 55. Como se puede ver, los pollos controles tratados sólo con DMSO presentaron una actividad ligeramente superior a los normales, semejante a la respuesta obtenida en embriones de 17 días. Por el contrario, los pollos tratados con lindano ó heptaclor, mostraron una actividad menor que los controles.

Este decremento depende de la dosis de droga administrada y el efecto parece ser mayor para lindano que para heptaclor en las condiciones testadas. Así, la disminución de actividad enzimática observada para 20 mg de heptaclor fueron de 20 y 10% y para 3 mg de lindano fueron de 30 y

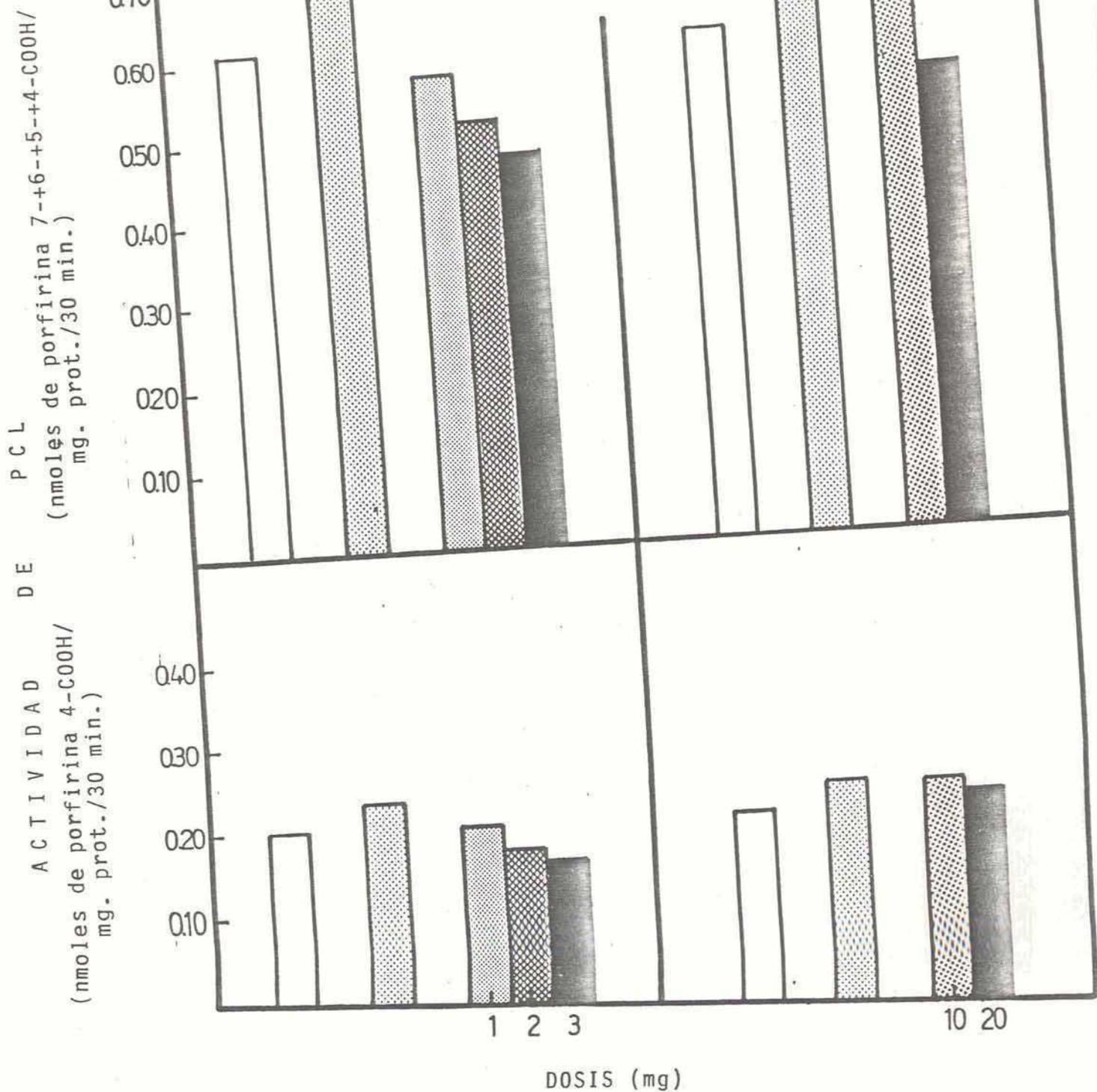


Figura 55: Efecto de lindano y heptaclor sobre PCL de hígado de pollos New Hampshire.

Pollos de 1 día de edad fueron tratados con las drogas durante 16 horas. Los resultados son los obtenidos en un experimento donde 3 hígados se juntaron para cada determinación. (□) Normal. (▨) DMSO.

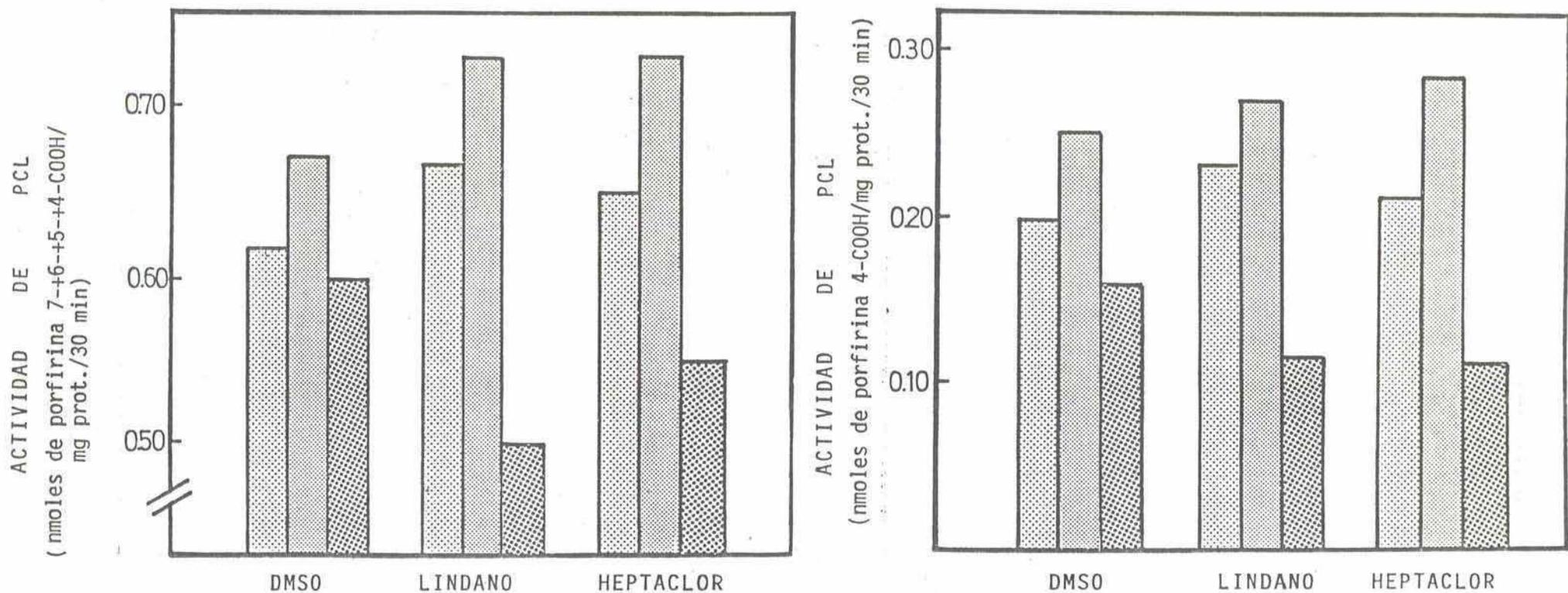


Figura 56: Influencia del pretratamiento con SKF-525 A y FB sobre la respuesta de PCL a lindano y heptaclor.

Embriones New Hampshire fueron pretratados durante 1 hora con SKF-525A (0,5 mg/huevo) (■) ó FB (5 mg/huevo) (▣). Luego se les administró DMSO, lindano o heptaclor (▤) y fueron tratados durante 24 horas. Los resultados mostrados son los representativos de 3 experimentos en los que 2-3 hígados se juntaron para cada determinación.

el pretratamiento con SKF produjo un incremento en la actividad mientras que con FB se obtuvo una actividad ligeramente menor que sin pretratamiento.

Para el caso de lindano, sin pretratamiento, la actividad enzimática obtenida fue superior que los controles DMSO. Cuando antes de la administración de este pesticida, se realizó pretratamiento durante 1 hora con SKF y luego de 24 horas del tratamiento con el compuesto clorado se midió PCL la actividad obtenida fue mayor que las correspondientes a lindano sin pretratamiento y al control SKF.

Por otra parte, como respuesta al pretratamiento con FB, la actividad obtenida luego de 24 horas de incubación con lindano fue mucho menor que la obtenida con lindano sin tratamiento previo o con el control FB. Este esquema de respuesta se observa tanto para la primera como para la segunda etapa de decarboxilación del Uro'gen III.

La respuesta obtenida con heptaclor fue similar, pretratamiento con SKF produce un aumento de actividad y con FB se obtiene una menor actividad enzimática que la droga sola o los controles correspondientes.

IV. ESTUDIOS SOBRE FERROQUELATASA.

El hemo es formado por la inserción del ión Fe^{2+} en el anillo de Proto IX, esta reacción esta catalizada por la FeQ. Si bien ALA-S es la enzima velocidad limitante, la FeQ como enzima terminal del camino biosintético del

hemo, es un potencial sitio regulador secundario. Por lo tanto resultó interesante estudiar el efecto de lindano y heptaclor sobre esta enzima.

En primer lugar se debía evaluar si el método del piridín hemocromógeno era adecuado para la medición de la actividad o si era necesario emplear un método radioactivo, para ello se probaron varios métodos descritos para embrión de pollo.

IV.1. Ajuste de las condiciones de medición de FeQ.

Con el objeto de evaluar las condiciones de ensayo de esta enzima en el hígado de embrión de pollo, se probó en primer lugar el método descrito por Rifkind (304). Para este sistema de medición las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial a partir de un homogenato de hígado realizado en buffer fosfato de potasio 0,1 M (pH: 7,4). La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 2,5 ml: 30 nmol de Proto IX, 100 nmoles de SO_4Fe , 10 umoles de GSH, 0,1 ml de Tween 80 1% (v/v), 0,1 ml de Etanol, pellet de 9.000 xg equivalente a 0,1 g de hígado y buffer Tris-ClH 0,1 M (pH: 8,8).

Las incubaciones se realizaron durante 2 horas a 37°C en tubos de Thunberg. Como con el sistema así descrito no pudo medirse la actividad, se repitió aumentando 4 y 5 veces la cantidad de mitocondrias, Proto y SO_4Fe y usando Succinato como reductor en lugar de GSH pero todos los ensayos fueron infructuosos.

Luego se probaron los métodos para la medición de FeQ de hígado de rata y cerdo descrito por Porra y Jones (410) y el utilizado en nuestro laboratorio para medir la enzima de hígado de rata (413). El medio de incubación del primero contenía 200 nmoles de Meso, 400 nmoles de SO_4Fe , 40 nmoles de GSH, 200 umoles de buffer fosfato (pH: 7,8) y mitocondrias provenientes de 0,25 y 0,5 g de hígado, realizándose anaeróbicamente la incubación a 37°C durante 1 hora. Para el segundo método, el homogenato fue hecho en CLK 0,154 M. El medio de incubación contenía 100 nmoles de Proto, 200 nmoles de SO_4Fe , 200 nmoles de Succinato, buffer Tris-ClH 0,2 M (pH: 8.2) y mitocondrias provenientes de 0,57 g de hígado. Las incubaciones se hicieron en aerobiosis durante 1 hora a 37°C. Por ninguno de estos dos métodos pudo medirse satisfactoriamente la actividad de FeQ de hígado de embrión de pollo.

Por último se decidió probar el método descrito por Cole y col. (303) para la medición de FeQ de hígado de embrión de pollo en cultivo y hacer sobre el mismo las modificaciones que se creyeron necesarias. El medio de incubación descrito contenía 120 nmoles de Meso, 0,3 ml de Tween 80 al 1% (p/v), 0,3 ml de Etanol, 12 umoles de Ditioeritritol, 120 nmoles de SO_4Fe , buffer Tris 0,2 M (pH: 8.2) y enzima equivalente a 1,25 mg de proteína. En nuestro caso utilizamos como fuente enzimática el precipitado de 11.000 xg como se describió en Métodos.

Se probaron como reductores Ditiotretitol y GSH. Los

resultados indicaron que Ditiotreitól fue más efectivo que GSH.

Según el método original, las incubaciones se hacen en tubos de Thunberg a los cuales se les hace vacío y flujo de N_2 10 veces en forma alternada. Debido a la dificultad del manipuleo de un gran número de ensayos por este sistema, en lugar de utilizar tubos de Thunberg se probó hacer la incubación en frasquitos pequeños de vidrio cerrados con tapas de goma. A través de una aguja insertada en la tapa se les hace vacío durante 5 minutos y flujo de N_2 , 1 minuto. Los resultados obtenidos así fueron satisfactorios. Cuando las incubaciones se hicieron con vacío pero sin flujo de N_2 , la actividad disminuyó en 60%.

Se probó también la actividad en función de distintas cantidades de proteínas, desde mitocondrias provenientes de 0,25 g de hígado hasta 1 g. Como se puede observar en la Figura 57 a, se obtuvo una respuesta lineal pudiéndose determinar una buena actividad ya desde la menor concentración de proteína ensayado.

Respecto al tiempo de incubación, se hicieron ensayos a 30, 60, 90 y 120 minutos (Figura 57 b). La respuesta fue bastante lineal observándose un ligero decremento en tiempos largos de incubación. Por ello el mejor resultado se obtuvo a 60 minutos.

Por todo lo expuesto, la medición de FeQ se realizará según el Método de Cole (303) utilizando DTT como

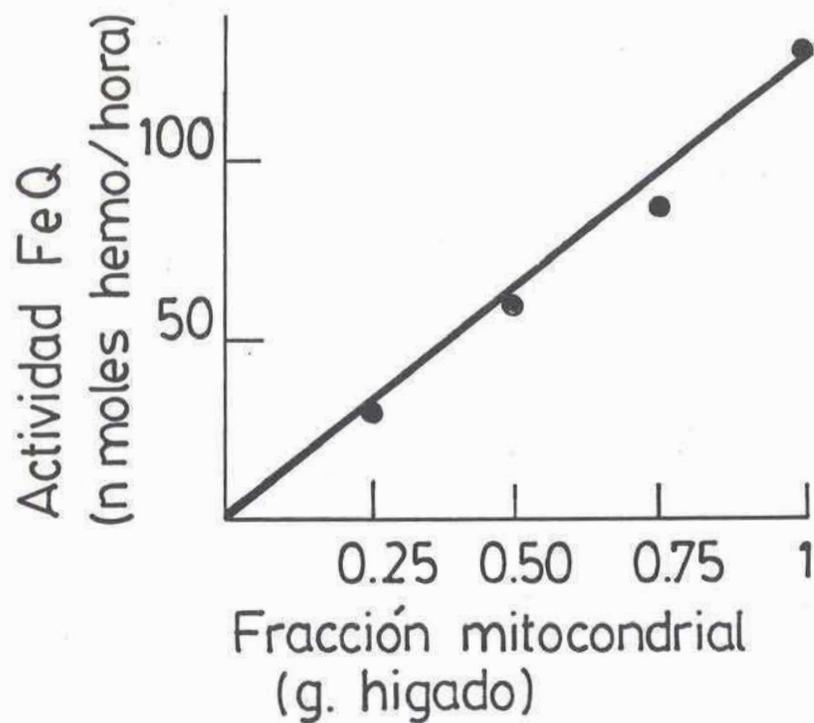


Figura 57a: Actividad de FeQ en función de proteína agregada.

Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos excepto la cantidad de suspensión mitocondrial.

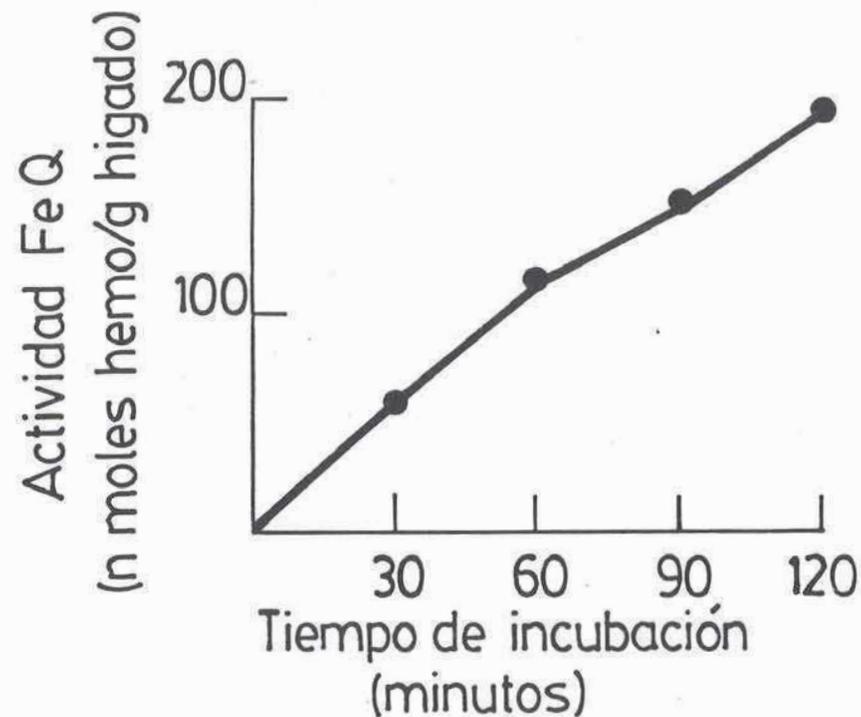


Figura 57b: Actividad de FeQ en función del tiempo de incubación.

Las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos salvo el tiempo de incubación.

reductor, incubando mitocondrias provenientes de 0,25 g de hígado, en frasquitos cerrados con tapas de goma a las cuales se les hizo vacío y luego flujo de N_2 e incubando durante 1 hora a $37^\circ C$.

IV.3. Efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad de FeQ.

Con el objeto de evaluar si el aumento de actividad de ALA-S era consecuencia de una disminución de la actividad de FeQ, por efecto de lindano y heptaclor, llevando así a una menor formación de hemo, se midió la actividad de esta última enzima luego de tratamiento con los pesticidas.

Los resultados obtenidos pueden verse en la Figura 58. Lindano, a la dosis y a los tiempos probados prácticamente no afectó la actividad de FeQ.

Por otra parte, el tratamiento con heptaclor produjo un decremento significativo en esta actividad enzimática. Este decremento de actividad de FeQ por tratamiento con heptaclor podría contribuir en parte al aumento de ALA-S.

D I S C U S S I O N .

Lindano y heptaclor fueron capaces de incrementar el contenido hepático de porfirinas en embriones de 17 días de dos cepas distintas, White Leghorn y New Hampshire. Si bien los incrementos en los niveles de porfirinas hepáticas fueron menores que los incrementos producidos por el potente agente porfirinogénico AIA, fueron estadísticamente superiores a los contenidos de los embriones controles.

Los resultados obtenidos con lindano están de acuerdo con lo reportado por De Matteis quien encontró que en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo (276) este compuesto es activo como inductor de porfiria y corroboran en parte los hallazgos de Simon y Siklósi (388) y Vila y col. (390) quienes en ratas observaron que lindano produce alteraciones en algunos parámetros del metabolismo de porfirinas.

El análisis de la naturaleza de las porfirinas acumuladas en el hígado reveló que los embriones tratados tanto con lindano como con heptaclor presentaron una mayor relación Proto/Copro que los embriones controles.

Otra diferencia importante, es que en los controles no se detectaron porfirinas distintas de Copro y Proto, en tanto que en los tratados con los pesticidas siempre aparecieron, aunque en bajo porcentaje, porfirinas con mayor números de carboxilos desde Penta hasta Uro.

Si bien la técnica empleada para el análisis de porfirinas de los embriones tratados no fué la misma que la utilizada para los controles, para los primeros fué utili-

zada la cromatografía en placa delgada y para los últimos la cromatografía líquida de alta presión, debido a la baja cantidad de porfirinas presentes, hay que tener en cuenta que esta última técnica es de mayor sensibilidad y sin embargo en ningún caso se pudieron detectar las porfirinas más carboxiladas para embriones DMSO.

Los resultados indicarían que: a) podría haber una alteración en el proceso de transformación de Proto en hemo, lo cual produciría la consiguiente acumulación de Proto y el aumento de la relación Proto/Copro y b) el hecho de hallarse porfirinas tales como Uro y Hepta podría deberse a una falla en la etapa de decarboxilación del Uro'gen o simplemente como consecuencia de lo postulado en a) (162).

Respecto a los resultados obtenidos con lindano, serían acordes en parte a lo reportado por Sinclair y Granick (359) quienes reportaron que lindano produjo acumulación de Uro cuando se adicionó a un cultivo de hepatocitos de embrión de pollo, sugiriendo una inhibición en la actividad de PCL.

Respecto a la enzima regulatoria ALA-S, en ratas, Simony Siklósi (388) y Vila y col. (390) no vieron alteración de la actividad por efecto de lindano. En cambio, De Matteis (299) informó que lindano estimula ligeramente la actividad de ALA-S, sin causar acumulación de los intermediarios del camino, pero este pesticida potencia la porfiria causada en ratas por DDC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo in-

La actividad de ALA-S en los distintos estadios del crecimiento no presentaron variaciones significativas en embriones normales y controles en el período estudiado desde 11 días de desarrollo hasta 2 días luego del nacimiento.

A pesar de no ser significativa la variación, se vislumbra un pequeño incremento luego del nacimiento en concordancia con lo informado por Aragonés y col. (414), quienes utilizando un método radioquímico pudieron observar mayores diferencias e inclusive un descenso en el día 15 del desarrollo.

Por otra parte, los resultados aquí obtenidos durante el período prenatal son acordes a los hallados por Rifkind y col. (391). Cabe señalar que otra enzima del camino del hemo, la FeQ, tampoco presenta variaciones en su actividad durante el desarrollo del embrión de pollo (304).

Este comportamiento de ALA-S hepática durante el desarrollo embrionario del pollo es similar al de otras enzimas implicadas en distintas vías metabólicas, tales como γ -glutamil transferasa (415), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (416), tirosina aminotransferasa (417), uridina quinasa (418), lisilhidroxilasa (419) y piruvato carboxilasa (420).

Además se ha encontrado que hay relación entre el desarrollo del embrión y el aumento de actividad de ALA-S como respuesta al tratamiento con los pesticidas. El máximo efecto de lindano y heptaclor se obtuvo con el embrión

más desarrollado. Estos resultados concuerdan con lo informado por Rifkind y col. (391) quienes también hallaron que la actividad de ALA-S fue estimulable por diversas drogas desde 8 días antes del nacimiento con un marcado incremento justo antes de la eclosión.

Respecto a este incremento en la capacidad de estimulación de ALA-S por drogas, previo al nacimiento, el comportamiento de la enzima de los embriones de pollo serían distintos al comportamiento de la enzima de ratas, conejos y cobayos, en éstos últimos es refractaria a la estimulación durante el desarrollo embrionario (421).

La diferencia entre el pollo y otras especies podría estar relacionada al hecho de que el embrión de pollo se desarrolla en un medio libre de las influencias maternas.

El mayor incremento en la inducibilidad de ALA-S previo al nacimiento podría deberse a una mayor capacidad de respuesta del hígado a las drogas o a una mayor y/o más rápida acumulación de las drogas en el hígado del embrión más desarrollado.

Este hecho podría estar relacionado a la acción de algún metabolito activo de los pesticidas ya que la actividad de las enzimas metabolizantes de drogas parece estar correlacionada al desarrollo del embrión (422). Aunque no explicaría la menor respuesta obtenida en los pollos de 2 días de edad, quizás luego del nacimiento el animal contaría con algún otro mecanismo de detoxificación.

El pretratamiento de los embriones con FB, inductor

de oxidasa microsomales dependientes de citocromos P-450 (422-426), sugerirían que la acción de ambos pesticidas sobre ALA-S no es mediada por metabolitos, por lo menos de metabolitos cuya generación dependa de las isoenzimas de citocromo P-450 inducibles por FB.

Sin embargo, esta hipótesis no podría descartarse totalmente por que el FB es de por sí un inductor de la actividad de ALA-S (391, 424) resultados que aquí fueron corroborados, y por otra parte según lo reportado por Lim y col. (426), el FB inicialmente hasta 3 horas luego de la administración causa una caída en los niveles del citocromo P-450 en hígado de embrión de pollo. Una posibilidad es que no haya ocurrido la suficiente metabolización de los compuestos clorados y que la pequeña estimulación de ALA-S causada por una mínima cantidad de metabolito de ambos pesticidas no se haya podido medir en las condiciones experimentales de este trabajo, debido al aumento de actividad de ALA-S causado por el FB mismo.

Por otra parte, los resultados de los ensayos "in vitro" indican que las drogas "per se" no causan activación de la enzima.

En cambio, los inhibidores de síntesis de proteínas actuando tanto a nivel de traducción como de transcripción, afectaron la respuesta de ALA-S a lindano y heptaclor, indicando que el aumento de actividad enzimática es resultado de una inducción de la enzima.

Cicloheximida fue capaz de bloquear y además revertir

rápidamente el efecto de lindano sobre la actividad de ALA-S. Por otra parte Act D a una dosis de 300 ug/huevo inyectado junto con lindano, bloqueó en forma parcial la respuesta de ALA-S al pesticida.

Administrado luego de producida la inducción enzimática, fue capaz de causar un ligero decremento recién luego de 2 horas sin poder anular totalmente el efecto de lindano por lo menos durante los tiempos ensayados.

Estos resultados serían más compatibles con una acción de lindano a nivel de traducción, concordante a los hallazgos de Sassa y Granick (50) quienes trabajando en cultivos de hígado de embrión de pollo habían clasificado a este compuesto clorado dentro de los que actúan primariamente a nivel de traducción.

Avalaría esta hipótesis el hecho de que el incremento de actividad de ALA-S en respuesta a lindano se obtuvo a tiempos de tratamiento relativamente cortos (1 1/2 hora) que quizá no sea suficiente si se necesitara de síntesis de nuevos m-RNA.

Por otra parte, el hecho de que Act D produzca un decremento en la respuesta de ALA-S a lindano, sugeriría que este pesticida también tendría acción a nivel de transcripción. Según Tomita y col. (51) el tiempo de vida del m-RNA para ALA-S inducida por AIA ó DDC es de 2-3 horas en cultivo de hígado de embrión de pollo. Asumiendo que el tiempo de vida del m-RNA fuera semejante en el embrión "in ovo", si lindano actuara solo a nivel de traducción, la actividad

de ALA-S debería ser similar en presencia o ausencia de Act D ya que el nivel de los m-RNA preexistentes serían del mismo orden. Esto no ocurrió así, los embriones tratados con Act D y lindano en forma simultánea presentaron una actividad menor que los tratados con lindano.

Otras razones por las cuales no podría descartarse totalmente la posibilidad de una acción de lindano a nivel de transcripción son: a) que Act D tardara algún tiempo en ejercer su efecto, y durante ese lapso podría haber síntesis de nuevos m-RNAs, b) o que la dosis de inhibidor no sea la óptima para la inhibición total de esta etapa, lo cual sería poco probable ya que la misma dosis (300 ug/huevo) bloqueó totalmente la respuesta a heptaclor y c) la similitud entre las curvas de decaimiento por efecto de Act D de ALA-S inducida por lindano, aquí obtenida, y las inducidas por AIA ó DDC en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo (248), teniendo en cuenta que estos últimos inductores actúan fundamentalmente en la etapa de transcripción (61).

En conclusión, de acuerdo a las evidencias aquí obtenidas, lindano parece actuar fundamentalmente a nivel de síntesis de la proteína enzimática es decir en la etapa de traducción aunque no podría descartarse una posible acción a nivel de síntesis del m-RNA. Cabe señalar, que concordante a esta hipótesis, Sinclair y Granick (251) también habían señalado dos efectos de lindano en el proceso de inducción de ALA-S, un efecto principal en la etapa de traduc-

ción y uno menor a nivel de la transcripción.

De todos modos, para poder aclarar en forma fehaciente cual es el punto de acción de lindano en la maquinaria de síntesis de ALA-S sería necesario aislar y cuantificar la proteína enzimática y el mRNA correspondiente.

Respecto a heptaclor, los estudios con inhibidores de síntesis de proteínas indicarían que heptaclor actúa a nivel de transcripción, ya que estando inhibida la síntesis de nuevos mRNA no se obtiene respuesta.

El hecho de que con la dosis menor de Act D (200 ug), la actividad obtenida en presencia de heptaclor sea mayor que los valores controles podría indicar que heptaclor además tiene acción a nivel de traducción. Pero si esto fuera cierto, con la dosis de 300 ug también debería obtenerse la misma respuesta ya que también habría mensajeros pre-existentes que pueden ser traducidos a nueva proteína. Como lo que se obtuvo fue un bloqueo de la respuesta de ALA-S, queda descartada la posibilidad de una acción del heptaclor a nivel de traducción y la respuesta obtenida con la dosis de 200 ug probablemente se deba a que la misma no fue suficiente como para inhibir totalmente la síntesis de nuevos mRNA.

Así pues, la respuesta de la enzima regulatoria a heptaclor es dependiente de la síntesis de nuevos mensajeros, es decir que en el proceso de síntesis de nueva ALA-S actúa fundamentalmente a nivel de transcripción. Aunque, lo mismo que se dijo para lindano, habría que aislar y cuan-

tificar el m-RNA correspondiente para confirmar esta hipótesis.

El estudio de la distribución subcelular de ALA-S inducida por lindano o heptaclor indica que la enzima no se acumula en el citosol, por lo menos en forma detectable por el método empleado.

Esto es acorde a lo informado por Tomita y col. (51) quienes hallaron que a diferencia de lo que ocurra en ratas (35, 36), cobayos (37) y pollos adultos (38), en embrión de pollo no se detecta ALA-S citosólica, aún en condiciones de gran inducción por AIA ó DDC.

Se sabe que la enzima es sintetizada en el citosol en forma de un precursor de mayor tamaño molecular (57, 58), el hecho de que en embrión de pollo esta forma no sea detectable por método colorimétricos, sugeriría que es rápida y eficientemente incorporada a la mitocondria o que no es enzimáticamente activa. Esto último es poco probable, teniendo en cuenta que las formas citosólicas de pollos (38, 64) y ratas (35-37) son catalíticamente activas y según recientes reportes hay un alto grado de homología entre el cDNA de la enzima de embrión de pollo y de rata (73). Aunque, hasta el momento no está aclarado si la forma precursora del hígado de embrión de pollo es activa y si la proteína enzimática del pollo adulto es la misma que la del embrión.

ALA-S inducida tanto por lindano como por heptaclor responde a regulación por hemo ya que se ha visto que la

administración simultánea de hemina fué capaz de bloquear la respuesta a los inductores. Por otra parte, cuando la hemina fue administrada luego de producido el incremento de la actividad enzimática hubo reversión de la respuesta. A las dosis utilizadas, el efecto inhibitorio de hemina parece ser mayor que el de Act D pero no tan pronunciado ni persistente como el de CX.

Whiting y Granick (245) habían reportado que una dosis de hemina de 3 mg/huevo administrado a embriones de pollo que habían sido tratados con AIA ó DDC durante 9 horas, produjo reducción parcial del incremento de actividad. Estos autores han comprobado que esa reducción está correlacionada con disminución de síntesis de la enzima.

Por los estudios del efecto de hemina sobre ALA-S hepática inducida por AIA en ratas (255) y pollos adultos (38) se ha propuesto que una de las formas de regulación de hemo es inhibiendo la conversión de la forma soluble a la mitocondrial. Así, la reducción observada, luego de la administración de hemina, en la actividad de ALA-S mitocondrial estuvo balanceada por un incremento de actividad enzimática en la fracción soluble, de tal modo que la actividad total no se vió disminuída apreciablemente.

Como ya se ha señalado, en hígado de embriones de pollo no se ha podido detectar actividad de ALA-S por métodos colorimétricos (51) ó por inmunoprecipitación (245) en la fracción citosol del hígado de embriones controles, tratados con AIA ó DDC ni en los tratados con las drogas

y hemina. De acuerdo a éstas consideraciones, si bien en las experiencias realizadas aquí, la actividad de ALA-S se midió sin sistema generador de Succ-CoA y por ende sólo se midió la actividad de la enzima mitocondrial, sería equivalente a la actividad total. Por lo tanto el efecto inhibitorio de hemina sobre ALA-S inducida por lindano y heptaclor parecería deberse a inhibición de la síntesis.

La enzima inducida por heptaclor parece ser más sensible al efecto inhibitorio de hemina.

Así, cuando la hemina fué administrada simultáneamente con los pesticidas, a tiempos cortos (2,5-3 horas de tratamiento) no se detectó prácticamente aumento de ALA-S en embriones tratados con heptaclor. En tanto que para lindano el bloqueo fue algo menor. Por otra parte, cuando la hemina fué administrada luego de 5 horas de tratamiento con los compuestos clorados, la actividad de ALA-S inducida por lindano se mantuvo durante 1 hora antes de comenzar a decaer en tanto que la respuesta de la enzima de los embriones tratados con heptaclor fué casi inmediata.

Estos hallazgos avalarían que lindano actúa fundamentalmente a nivel de traducción y heptaclor a nivel de transcripción. Teniendo en cuenta que en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo, muchos informes sugieren que el hemo en su acción regulatoria sobre el camino inhibe la síntesis de ALA-S actuando primariamente sobre la síntesis del m-RNA (57, 252, 261-263) si un inductor actúa al mismo nivel, como sería el caso de heptaclor, habrá una más rápida inhi-

bición por hemo que si actuara en una etapa distinta como en el caso de lindano, ya que los m-RNA presentes hasta el momento^{de} la administración de hemina podrían seguir traduciendo.

En cuanto al estudio sobre PCL de hígado de embrión de pollo, los resultados obtenidos indican que la misma presenta características similares a los hallados para la enzima proveniente de otras fuentes.

Así, el pH óptimo fué 6,8, tanto para la decarboxilación del Uro'gen como para la formación de Copro'gen. Este valor de pH es coincidente con el reportado para la enzima de eritrocitos de conejo (150) y las enzimas purificadas de eritrocitos de pollo (167) y eritrocitos humanos (165), pero ligeramente diferente de los valores reportados para la enzima de hojas de tabaco y eritrocitos de ave que fueron 6,5 (158) y 7,0 (153) respectivamente.

Chen y Miller (158) habían informado que la actividad de PCL de hojas de tabaco medida como velocidad de formación de Copro'gen III fue lineal entre 20 y 160 ug de proteínas, similar al comportamiento de la enzima aquí estudiada para la cual, la formación de Copro'gen fue lineal hasta los 30 mg de proteínas.

Las características cinéticas de PCL de hígado de embrión de pollo son acordes a las reportadas para la enzima proveniente de otras fuentes (155, 164-167, 170, 178, 180, 182) cuando la concentración de Uro'gen es baja o bajo condiciones en las cuales la relación enzima a sustrato

es alta, los resultados muestran que el producto principal de la reacción es Copro'gen siendo muy bajo la formación de los porfirinógenos intermediarios.

Esto es lo que ocurre "in vivo" en una célula normal, en la cual la concentración de sustrato está muy por debajo de los niveles saturantes y el producto predominante es Copro'gen . Muy pequeñas cantidades de los porfirinógenos intermediarios se acumulan o son excretados por organismos normales.

Por otra parte, cuando la concentración de Uro'gen III es muy alta, se acumula Hepta'gen disminuyendo la formación de Copro'gen, sugiriendo que Hepta'gen inhibe su posterior decarboxilación (182).

Este sería el caso de los pacientes con Porfiria Cutánea Tarda los que al tener disminuída la actividad de PCL tendrán una relación enzima-sustrato baja y el principal producto de la reacción será Hepta'gen. Se producirá entonces acumulación de Uro'gen y Hepta'gen que luego serán excretados. De hecho, éste es el rasgo clínico en estos pacientes.

Los resultados del estudio del proceso de decarboxilación en función del tiempo indicaron que en los primeros estadios de la reacción, Hepta'gen fué el único producto acumulado similarmente a lo obtenido para PCL de eritrocitos de pollo (182) e hígado de rata (178) y son acordes con la hipótesis que la decarboxilación total del Uro'gen III transcurre en dos etapas Uro'gen III $\xrightarrow{v_1}$ Hepta'gen III

$\xrightarrow{v_2}$ Copro'gen III, como ha sido señalado por Tomio y col. (153), siendo v_1 la etapa rápida y no limitante de la reacción total (182).

Por otra parte, v_2 parece ser más susceptible a la acción de agentes químicos y físicos, ya que fué la más afectada por aerobiosis, precalentamiento, sales halogenadas y hierro. Estos resultados concuerdan con lo informado anteriormente para la enzima de eritrocitos de ave (153, 156).

A pesar de que el aumento de temperatura favorece el proceso de decarboxilación, la inactivación observada luego de la preincubación a 60°C indica que es una enzima termolábil. Al respecto se ha informado que la enzima de eritrocitos de ave (153, 156) y de hojas de tabaco (158) fueron inactivadas por calentamiento a 60°C durante 5 minutos. La de bazo de ratón (157) que inactivada a 50°C y la de hígado bovino puede ser preincubada a 45°C hasta 30 minutos con sólo una ligera pérdida de actividad pero luego de calentamiento a 60°C durante 10 minutos fue totalmente inactivada (164).

San Martín de Viale y col. (156), hallaron que el agregado de un extracto de hígado de rata calentado a 100°C activa la enzima de eritrocitos de pollo, en cambio, en este trabajo no se ha visto efecto similar al agregar enzima precalentada a la enzima normal. Un efecto semejante han reportado Romeo y Levin (157) quienes tampoco hallaron estimulación de PCL de bazo de ratón por adición de so-

brenadante de homogenato calentado a 60°C durante 10 minutos.

La enzima de hígado de pollo parece no requerir GSH ni EDTA pero sí la incubación en condiciones anaeróbicas. El efecto inhibitorio del oxígeno también ha sido observado para reticulocitos de conejo (150), eritrocitos de pollo (153, 156) e hígado de rata (161).

En concordancia al no requerimiento de GSH, se ha visto que otros protectores de tioles, como Cisteína y Ditiotreitól, no mejoraron la actividad de PCL del embrión de pollo. Este comportamiento es acorde a lo informado por Chen y Miller (158) y Koopmann y Batlle (168) para las enzimas de hojas de tabaco y *Rhodopseudomonas palustris*, respectivamente, las cuales tampoco vieron mejorada su actividad por GSH y cisteína. En cambio, PCL de eritrocitos de pollo (153, 156) fue activada por GSH 1 mM aunque inhibida por cisteína (0,1-1 mM) y PCL de reticulocitos de conejos (150) vió incrementada su actividad por GSH (5 mM).

Por otra parte, reactivos quelantes de metales tales como Dietilditiocarbamato, α, α' -bipiridilo, pirofosfato de sodio y EDTA, no tuvieron efecto sobre la actividad enzimática sugiriendo que PCL de embrión de pollo no parece ser afectada por metales. Al respecto, Mauzerall y Granick (150) trabajando con PCL de reticulocitos de conejo, habían arribado a resultados similares usando EDTA y α, α' -bipiridilo. Distinto fué el comportamiento reportado para la enzima de hojas de tabaco (158), cuya actividad se vió no-

tablemente incrementada por Dietilditiocarbamato, α, α' -bipiridilo y pirofosfato de sodio aunque sólo ligeramente por EDTA. Kawanishi y col. (167), han informado que PCL purificada a partir de eritrocitos de pollo no fue inhibida por EDTA ni o-fenantrolina sugiriendo que la enzima purificada no contiene metales. Igual comportamiento mostró la enzima de *Rhodopseudomonas palustris* (168).

En concordancia con los resultados hallados, se ha mostrado que la enzima de hígado de rata no fue afectada por α, α' -bipiridilo (427) ni pirofosfato de sodio (428) aunque sí ligeramente inhibida por Dietilditiocarbamato(428).

Por otra parte, PPal no parece ser un cofactor necesario en el proceso de decarboxilación del Uro'gen III, ya que la actividad enzimática de la enzima de embrión de pollo no se vió mejorada por la adición de este reactivo. Esta falta de requerimiento de cofactores coincide con lo hallado para la enzima de eritrocitos de ave (153) y de bazo de ratón (157), ambas no fueron afectadas por agregado de PPal. Distinta fué la respuesta hallada para la enzima de *Rhodopseudomonas palustris* (168), que se vió inhibida por la adición de este reactivo en concentración 1 y 25 mM.

Como se ha señalado en la Introducción, el hierro parece jugar un rol clave en la patogénesis de la Porfiria Cutánea Tarda (347-349) y de la porfiria inducida por compuestos clorados (170, 354-359). En este trabajo se ha encontrado que el ión Fe^{2+} a concentración 0,3 mM inhibió

73% la segunda etapa de la decarboxilación y 20% la primera. Las menores concentraciones (0,05 y 0.15 mM) afectaron sólo la segunda etapa. Estos ensayos han sido hechos en buffer fosfato, que podría complejar el ión Fe^{2+} . Sin embargo, Mukerji y Pimstone (429) no han hallado diferencias en el efecto inhibitorio del Fe^{2+} sobre PCL de hígado de rata empleando distintos buffers, la misma fué inhibida 45-55% por Fe^{2+} , 0.45 mM, independientemente del buffer utilizado.

Por otra parte, no se han observado diferencias en el efecto del Fe^{2+} en ausencia o presencia de cisteína, a diferencia de lo reportado para la enzima parcialmente purificada de hígado de rata (174) que ensayada bajo condiciones estrictamente anaeróbicas fue protegida por cisteína.

Los resultados obtenidos contrastarían con los distintos informes respecto a que el hierro no tiene efecto (172, 173), o produce una ligera inhibición (165, 168) o requiere preincubación con cisteína (169) o incluso que activa PCL (171).

Straka y Kushner (164) han reportado una inhibición del 50% para la enzima purificada a partir de hígado bovino pero a una concentración de Fe^{2+} mucho mayor (2-10 mM) que la utilizada aquí. Las razones por las cuales hay tanta disparidad de resultados no están claras pero hay que tener en cuenta que las enzimas provinieron de distintas fuentes y las condiciones de medición y las metodologías empleadas no fueron las mismas en todos los casos.

Los sustratos de PCL, son aniones multivalentes con 5 a 8 grupos carboxilos cargados negativamente alrededor de un núcleo tetrapirrólico relativamente hidrofóbico. El hecho de que los cloruros y fluoruros de sodio y potasio disminuyeran la actividad enzimática y que el efecto pareciera depender del anión más que del catión, sugieren que el o los sitios catalíticos o zonas cercanas a los mismos, pueden contener residuos cargados positivamente requeridos para una adecuada orientación de los sustratos. La unión del fluoruro o del cloruro a esos sitios catiónicos de la enzima cambiarían la carga alrededor del sitio activo y de ese modo disminuirían la actividad catalítica.

Chen y Miller (158) también habían informado que cloruros y fluoruros de sodio y potasio inhibieron PCL de hojas de tabaco, pero a diferencia de lo hallado aquí, ellos habían encontrado un grado de inhibición similar para cloruros y fluoruros (90% de inhibición a concentración 0.25 M de las sales de sodio y potasio).

Cabe señalar que la carga positiva sobre la enzima ya había sido sugerida por Ríos de Molina y col. (163) a consecuencia de estudios de inhibición por compuestos fenólicos negativamente cargados. Por otra parte, apoyando esta hipótesis, Billi y col. (430) trabajando con dietilpirocarbamato, fenilglioxal, 2,3-butanodiona y por experimentos de fotooxidación en presencia de azul de metileno sugieren que el sitio activo de PCL de hígado de rata tiene un entorno cargado positivamente y que en dicho entorno se

hallan arginina e histidina. Koopman y Batlle (168), por experimentos similares con enzima proveniente de *Rhodopseudomonas palustris*, han sugerido que esta enzima requiere uno o dos residuos histidina y probablemente lisina para la actividad catalítica.

El efecto diferencial de la temperatura de incubación, precalentamiento, aerobiosis, hierro, cloruros y fluoruros sobre las dos etapas de la decarboxilación observado en el presente trabajo, sugerirían la existencia de al menos dos sitios catalíticos, que por las consideraciones que luego se harán, estarían ubicados sobre una sola proteína enzimática.

En relación a la hipótesis que PCL tiene más de un sitio activo, Tomio y col. (153) en base al comportamiento de la enzima de eritrocitos de ave hacia diferentes agentes físicos y químicos, sugieren la existencia de al menos dos sitios catalíticos diferentes. Estudios posteriores realizados con enzima^{de} eritrocitos humanos parecerían indicar que la decarboxilación secuencial del Uro'gen a Copro'gen ocurre en cuatro diferentes centros activos (175).

Por otra parte, las siguientes observaciones de literatura, sugerirían la existencia de una sola proteína enzimática que catalizaría los cuatro pasos de la decarboxilación del Uro'gen:

- 1) La relación entre las actividades enzimáticas correspondientes a la primera y segunda etapa de la decarboxilación, desaparición de Uro'gen y formación de Copro'gen respecti-

vamente, se mantuvo constante a través de las distintas etapas de la purificación de PCL de eritrocitos de ave (153).

2) La actividad enzimática hacia Uro'gen I y III y Penta'gen I y III fué copurificada a partir de eritrocitos humanos (159, 165).

3) Usando Uro'gen III y Penta'gen III como sustratos, la relación de actividad decarboxilasa permanece constante a medida que la enzima se desnaturaliza por calentamiento y las curvas de inmunotitulación con ambos sustratos fueron idénticas para la enzima purificada de eritrocitos humanos (165).

4) El mismo grado de disminución de actividad de PCL fue observado usando como sustratos porfirinógenos de 8-, 7-, 6- ó 5-COOH para la enzima eritrocitaria de personas portadoras del defecto genético de porfiria cutánea tarda (50% de disminución) (342), como también para la enzima hepática de ratas con porfiria inducida por HCB (181).

Respecto a la respuesta de PCL a lindano y heptaclor, los resultados indican que la misma es dependiente de la cepa utilizada y del desarrollo del animal.

Así, mientras que en embriones White Leghorn y en pollos New Hampshire se observó decremento de la actividad de PCL, en embriones New Hampshire no hubo disminución de la actividad enzimática.

La diferencia de susceptibilidad entre las cepas podría ser consecuencia de diferencias en las características

fenotípicas del hígado. Teniendo en cuenta que: a) Smith y col. (356) han informado que la susceptibilidad a la acción porfirinogénica del HCB se correlaciona con el contenido de hierro hepático en ratas y b) Sinclair y Granick (359), trabajando en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo, hallaron que desferrioxamina revierte la acumulación de Uro causada por lindano, una posible causa de la diferente respuesta de la PCL entre las dos cepas de embriones aquí utilizadas podría ser diferencias en el contenido hepático de hierro.

La respuesta diferencial de PCL de embriones y pollos es acorde a lo hallado con clorobencenos. Mono, di y triclorobencenos producen incremento en el contenido hepático de porfirinas en pollos de 1 día pero no en embriones (431).

Teniendo en cuenta que: a) un decremento en la actividad de PCL ha sido observado en pollos de 1 día, mientras que en los embriones correspondientes no, y b) al pretratar los embriones con FB, la actividad enzimática decrece, es posible pensar que: 1) el sistema metabolizante de drogas, regulado por el desarrollo del animal (421, 422), está involucrado en esta respuesta, y 2) la disminución de actividad de PCL parece estar asociado a la formación de un metabolito.

La hipótesis de que lindano actúa vía metabolito ya había sido sugerida por los trabajos de Sinclair y col., en base a la inhibición, causada por SKF-525 A (359) y piperonil butóxido (359, 368), sobre la acumulación de Uro

producida por efecto del pesticida en cultivos de hepatocitos de embrión de pollo.

El hecho de que en embriones New Hampshire, no haya decremento de PCL en tanto que ALA-S sí está aumentada, sugerirían que la inhibición de PCL no es la causa primaria del incremento de ALA-S por efecto de lindano y heptaclor. Los resultados de los pretratamientos con FB corroboran esta hipótesis ya que este inductor incrementó la respuesta de PCL sin alterar la de ALA-S.

La diferente respuesta de PCL y ALA-S luego del pretratamiento con FB podría deberse a que los tiempos a los cuales fueron medidas cada una de esas actividades enzimáticas fueron distintas, PCL luego de 24 horas y ALA-S, al cabo de 5 horas de tratamiento. Esto además sugeriría que si bien el decremento de PCL, producido por algún metabolito de los pesticidas no es la causa primaria del aumento de la enzima reguladora, ALA-S, a largo plazo podría contribuir en parte.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, la FeQ, la enzima terminal del camino, no parece ser el punto primario desencadenante de la desregulación del camino del hemo, por efecto de ya sea de lindano o heptaclor. Si bien, como respuesta al tratamiento con heptaclor se visualizó un decremento en la actividad de esta enzima, la magnitud de la misma no es lo suficientemente importante como para ser la causa primaria de esta desregulación.

Como se ha señalado en la Introducción de este traba-

jo, la mayor parte del hemo sintetizado en hígado es utilizado para la síntesis de citocromo P-450. La inducción de porfiria experimental es consecuencia de la interacción de las drogas porfirinogénicas con las isoenzimas del citocromo P-450. Como resultado de esa interacción puede haber aumento de la destrucción de hemo y/o inhibición de la biosíntesis del hemo, produciéndose en ambos casos una disminución del hemo libre regulatorio. Otro mecanismo por el cual también se produce las disminuciones del nivel de hemo es por continua remoción del mismo. Es el caso de las drogas que inducen la síntesis de la apoproteína del citocromo P-450 y el hemo sintetizado es utilizado entonces para la síntesis del citocromo P-450.

En todos los casos, la disminución en el nivel del hemo libre trae como consecuencia el aumento en la actividad de ALA-S y una mayor síntesis de porfirinas.

Una característica común en todos los compuestos inductores de porfiria experimental es su naturaleza lipofílica.

Según Kószó y col. (432), estos compuestos lipofílicos alteran el metabolismo lipídico, produciendo fluidificación de la membrana de las organelas y como consecuencia de ello una mayor permeabilidad con la consecuente pérdida de los intermediarios del camino. En concordancia con esta hipótesis, Neilson y col. (433) proponen que hay una correlación entre la capacidad fluidificante de membrana y la capacidad inductora de porfiria y postulan que la membrana mitocondrial sería el principal lugar de acción de estos compuestos.

En el curso de la biosíntesis del hemo, Copro III pasa de citoplasma a mitocondria. Es posible que por la acción fluidificante de membrana mitocondrial se vea alterado el correcto transporte de Copro III a mitocondria, con la consecuente disminución de la síntesis de hemo.

Teniendo en cuenta estas teorías sobre la acción de los compuestos porfirinogénicos, se podría pensar que lindano y heptaclor inducen la porfiria experimental por:

a) interacción con el citocromo P-450 y/o b) alteración de la permeabilidad de la membrana debido a la alta liposolubilidad de los mismos.

A esta acción primaria de los pesticidas se sumaría, para el mantenimiento continuado de la síntesis de ALA-S, el decremento de actividad de PCL para el caso de lindano y el decremento de PCL y FeQ en el caso de heptaclor.

El decremento de la actividad de PCL podría atribuirse a una forma de oxígeno activado, generado por interacción de los pesticidas clorados con el citocromo P-450, como ha sido sugerido por Sinclair y col. (368).

En apoyo de esta hipótesis, se ha informado que en ratas la administración de lindano produjo un incremento dosis dependiente en el contenido de citocromo P-450 microsomal hepático y en la generación de anión superóxido (O_2^{\ominus}). Este incremento de anión superóxido fué paralelado por un incremento de la peroxidación de lípidos, uno de los principales mecanismos de injuria tisular (434).

En la Figura 59 se esquematiza la posible acción de lindano y heptaclor sobre el camino del hemo. Estos insecticidas incrementarían los niveles de citocromo P-450 con la subsecuente disminución del nivel de hemo libre, lo cual llevaría a un aumento de ALA-S por la desregulación del camino biosintético. Por otra parte, la interacción del insecticida con el citocromo P-450 podría generar O_2° y como consecuencia de ello se produciría inhibición de PCL y alteración de la permeabilidad de las membranas.

Por otra parte, para el caso de heptaclor, se produciría una inhibición de FeQ debido a la droga y/ó compuesto derivado de su metabolismo.

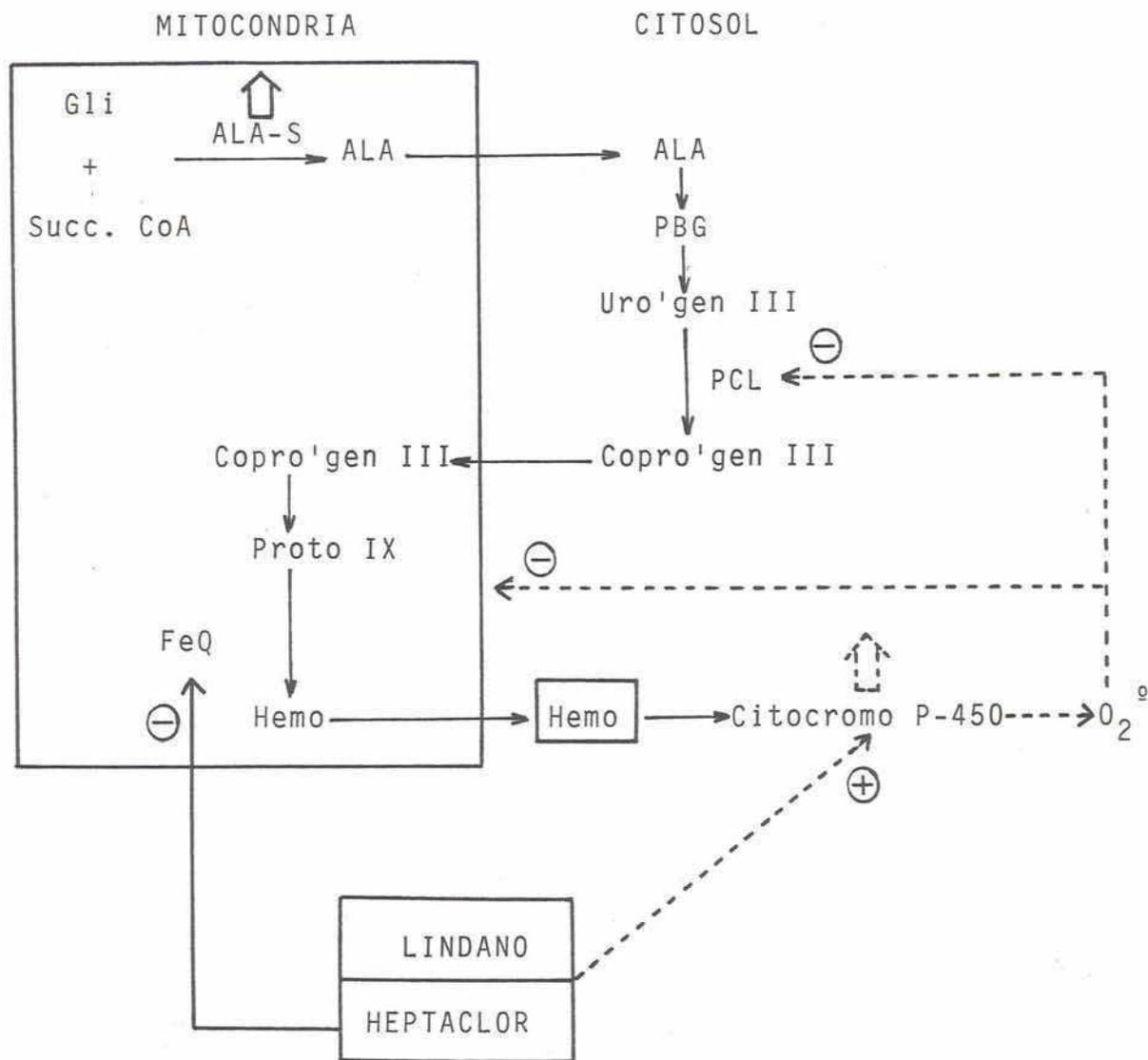


Figura 59: Posible acción de lindano y heptaclor sobre el camino metabólico del hemo.

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

G E N E R A L E S.

En el presente trabajo de Tesis se ha demostrado que los pesticidas clorados, lindano y heptaclor, son capaces de producir porfiria experimental en embrión de pollo "in vivo".

La administración de estos compuestos causó un aumento en el contenido hepático de porfirinas y un cambio en el patrón de acumulación, observándose que en el hígado de los animales tratados apreciaron Uro, Hepta, Hexa y Penta, además de Copro y Proto, a diferencia de los controles en los que sólo se vieron las dos últimas. Además, se vió un aumento en la relación Proto/Copro.

Asímismo, estos compuestos produjeron un aumento de actividad de ALA-S hepática. Dicho aumento se debió a una inducción de la enzima más que a una activación de la misma por las drogas "per se". Aunque resultados negativos, no podría descartarse que esta inducción fuera mediada por metabolitos de estos compuestos.

Los resultados sugieren que lindano actúa fundamentalmente a nivel de traducción y heptaclor a nivel de transcripción.

Esta inducción de ALA-S puede ser revertida por el represor natural de este camino, el hemo.

Por otra parte, se ha visto que el aumento de ALA-S es dependiente de la dosis de droga administrada, del tiempo de tratamiento y es observable a cualquier período del desarrollo del animal, siendo máxima la respuesta justo antes del nacimiento.

Estudiando el efecto de lindano y heptaclor sobre la actividad de PCL hepática en dos cepas distintas de embriones, se ha podido determinar que mientras en embriones White Leghorn se obtuvo decremento de actividad enzimática en respuesta al tratamiento con dichos compuestos, en embrión New Hampshire no. Pero estos últimos pretratados con FB sí presentaron disminución de PCL y pollos de 1 día de edad de esta misma cepa también mostraron decremento de actividad de esta enzima. Esto indicaría que la disminución de actividad de PCL no es la causa primaria de la desregulación del sistema ya que en ambas cepas hay aumento del contenido de porfirinas y además que en la acción de estos compuestos sobre esta enzima está involucrado el sistema metabolizante de drogas que está correlacionado con el desarrollo del animal.

Por otra parte, se han aportado algunos datos respecto a características de PCL de hígado de embrión de pollo, carentes en el momento de la realización de este trabajo. Así, se ha determinado que esta enzima no requiere GSH ni EDTA para su medición, que altas concentraciones del sustrato (Uro'gen III) producen inhibición de la actividad, que tiene un pH óptimo de 6.8, que el aumento de temperatura favorece la reacción (por lo menos hasta 60°C) y que al igual que la enzima de otras fuentes estudiadas, la primera decarboxilación del Uro'gen III para Hepta'gen III no es la etapa limitante de la reacción. Además, la enzima no requirió fosfato de piridoxal como cofactor y su actividad no se

vió alterada por distintos reactivos quelantes de metales ni reactivos para tioles. Oxígeno, fluoruro y cloruro de sodio y potasio, hierro y precalentamiento de la enzima, produjeron disminución de actividad siendo más afectada en todos los casos, la segunda etapa de la decarboxilación.

Los estudios sobre FeQ indican que heptaclor es capaz de producir un decremento de esta enzima, en tanto que lindano no, aunque la magnitud de este decremento no sería lo suficientemente importante como para ser la causa principal del aumento de ALA-S, aunque podría contribuir en parte.

La acción primaria de estos pesticidas, en el desarrollo de la porfiria podría implicar un aumento del consumo del hemo libre hepático y/o una alteración de la membrana mitocondrial con la pérdida de los intermediarios, ambos eventos juntos o separados llevarían a la desregulación del camino.

Si bien en la literatura, había algunos datos respecto a la acción de lindano sobre el metabolismo del hemo, con respecto a heptaclor no había ni hay hasta el momento ningún reporte, de allí la relevancia de los resultados aquí presentados.

Teniendo en cuenta que pequeñas dosis de drogas porfirinogénicas pueden desencadenar o exacerbar los cuadros de porfiria en personas con el rasgo hereditario de esta enfermedad, son importantes los resultados aquí hallados para prevenir dichos casos, sobre todo atendiendo a la

amplia utilización de estos plaguicidas.

Por otra parte, desde el punto de vista básico se amplían los conocimientos respecto a la acción biológica de lindano y heptaclor, sobre todo en lo que concierne al camino del hemo y se aportan datos sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la porfiria por los mismos.

L. Schubert *J. Camp*

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

- 1) Block, K. y Rittenberg, D. (1945). J. Biol. Chem. 159, 45.
- 2) Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946). J. Biol. Chem. 166, 621.
- 3) Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946). J. Biol. Chem. 166, 627.
- 4) Wittenberg, J. y Shemin, D. (1949). J. Biol. Chem. 178, 47.
- 5) Muir, H.M. y Neuberger, A. (1949). Biochem. J. 45, 163.
- 6) Muir, H.M. y Neuberger, A. (1950). Biochem. J. 47, 97.
- 7) Shemin, D.; London, I.M. y Rittenberg, D. (1950). J. Biol. Chem. 183, 757.
- 8) Radin, N.S.; Rittenberg, D. y Shemin, D. (1950) 184, 745.
- 9) Wittenberg, J. y Shemin, D. (1950). J. Biol. Chem. 185, 103.
- 10) Dresel, E.I.B. y Falk, J.E. (1954). Biochem. J. 56, 156.
- 11) Grinstein, M.; Kamen, M.D. y Moore, C.U. (1948). J. Biol. Chem. 174, 767.
- 12) Shemin, D. y Wittenberg, J. (1951). J. Biol. Chem. 192, 315.
- 13) Shemin, D. y Kumin, S. (1952). J. Biol. Chem. 198, 827.
- 14) Shemin, D. y Russell, C.S. (1953). J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- 15) Shemin, D.,; Russell, C.S. y Abramsky, T. (1955)). J. Biol. Chem. 215, 613.
- 16) Falk, J.E., Dresel, E.I.B. y Rimington, C. (1953). Nature 172, 292.
- 17) Neuberger, A. y Scott, J.J (1953). Nature 172, 1093.
- 18) Bogoroad, L. y Granick, S. (1953). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 39, 1176.

- 19) Schmid, R. y Shemin, D. (1955). J. Am. Chem. Soc. 77, 506.
- 20) Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. y Shemin, D. (1958). J. Biol. Chem. 233, 1214.
- 21) Lascelles, J. (1959). Biochem. J. 72, 508.
- 22) Burnham, B.F. y Lascelles, J. (1963). Biochem. J. 87, 462.
- 23) Aoki, Y.; Wada, O.; Urata, G.; Takaku, F. y Nakao, K. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 568.
- 24) Marver, H.S.; Collins, A.; Tschudy, D.P. y Rechcigl, N.Jr. (1966). J. Biol. Chem. 241, 4323.
- 25) Granick, S. y Urata, G. (1963). J. Biol. Chem. 238, 821.
- 26) Tschudy, D.P.; Welland, F.H.; Collins, A. y Hunter, G.Jr. (1964). Metabolism. 13, 396.
- 27) Granick, S. (1966). J. Biol. Chem. 241, 1359.
- 28) Marver, H.S.; Schmid, R. y Schützel, H. (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 969.
- 29) Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G.; Marver, H.S.; Collins, A.; Hunter, G. Jr. y Rechcigl, M. Jr. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53, 841.
- 30) Strand, L.J.; Felscher, B.F.; Redeker, A.G. y Marver, H.S. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1315.
- 31) McKay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. y Rabinowitz, M. (1969). Biochem. J. 114, 455.
- 32) Zuyderhoudt, I.M.; Rorst, P. y Huijing, F. (1969). Biochim. Biophys. Acta 178, 408.

- 33) Patton, G.M. y Beattie, D.S. (1973). J. Biol. Chem. 248,4467.
- 34) Scotto, A.W.; Chang, L.L. y Beattie, D.S. (1983) 258, 81.
- 35) Hayashi, N.; Yoda, B. y Kikuchi, G. (1969).Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
- 36) Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 65.
- 37) Whiting, M.J. y Elliot, W.H. (1972). J. Biol. Chem. 247,6818.
- 38) Ohashi, A. y Kikuchi, G. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 153, 34.
- 39) Warnick, G.R. y Burnham, B.F. (1971). J. Biol. Chem. 246,6880.
- 40) Fanica-Gaigner, M. y Clement-Metral, J. (1973). Eur. J. Biochem. 40, 13.
- 41) Nandi, D.L. y Shemin, D. (1977). J. Biol. Chem. 252, 2278.
- 42) Davies, R.C. y Neuberger, A. (1979). Biochem. J. 177, 649.
- 43) Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 109,305.
- 44) Paterniti, J.R. y Beattie, D.S. (1979). J. Biol. Chem. 254, 6112.
- 45) Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1972). J. Biol. Chem. 247, 4126.
- 46) Nakakuchi, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980). J. Biol. Chem. 255, 1378.
- 47) Whiting, M.J. y Granick, s. (1976). J. Biol. Chem. 251,1340.

- 48) Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Brooker, J.P.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1983). *Eur. J. Biochem.* 129, 615.
- 49) Volland, C. y Félix, F. (1984). *Eur. J. Biochem.* 142, 551.
- 50) Sassa, S. y Granick, S. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 517.
- 51) Tomita, Y.; Ohaski, A. y Kikuchi, G. (1974). *J. Biochem.* 75, 1007.
- 52) Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 4132.
- 53) Hayashi, N.; Yoda, B. y Kikuchi, G. (1970). *J. Biochem. (Tokyo)* 67, 859.
- 54) Ohashi, A. y Kikuchi, G. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607
- 55) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 985.
- 56) Yamauchi, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980) *FEBS Lett.* 115, 15.
- 57) Whiting, M.J. (1976). *Biochem. J.* 158, 391.
- 58) Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 23.
- 59) Ades, I.Z. y Harpe, K.G. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 9329.
- 60) Hayashi, N.; Watanabe, N. y Kikuchi, G. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 700.
- 61) Brooker, J.D., May, B.K. y Elliot, W.H. (1980). *Eur. J. Biochem.* 106, 17.

- 62) Ades, I.Z. y Harpe, K.G. (1982). *Biochem. J.* 205, 257.
- 63) Pirola, B.A.; Mayer, I.; Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1984). *Eur. J. Biochem.* 144, 577.
- 64) Watanabe, N.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 118.
- 65) Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Hobbs, A.A.; Pirola, B.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 95.
- 66) Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Day, A.R.; Pirola, B.A.; Snoswell, M.A.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1985). *Eur. J. Biochem.* 150, 481.
- 67) Urban-Grimal, D.; Volland, C.; Garnier, T.; Dehoux, P. y Labbé-Bois, R. (1986). *Eur. J. Biochem.* 156, 511.
- 68) Miura, S.; Mori, N.; Morita, T. y Tatibana, N. (1982). *Biochem. Int.* 4, 20.
- 69) Anderson, L. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2407.
- 70) Horwich, A.L.; Fenton, W.A.; Williams, K.R.; Kalousek, F.; Krauss, J.P.; Doolittle, R.F.; Kongisberg, W.J., Rosenberg, L.E. (1984). *Science (Wash, D.C.)* 224, 1068.
- 71) Hay, R.; Bohni, P. y Gasser, S. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 779, 65.
- 72) Maarse, A.C.; Van Loow, A.P.G.M.; Riezman, H.; Gregori, I.; Schatz, G. y Grivell, L.A. (1984) *EMBO J.* 3, 2831.
- 73) Maguire, D.J.; Day, A.R.; Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Wigley, P.L.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1986). *Nucl. Acids. Res.* 14, 1379.

- 74) Leong, S.A.; Williams, P.H. y Ditta, G.S. (1985). Nucl. Acids. Res. 13, 5965.
- 75) Bishop, D.F.; Kitchen, H. y Wood, W. A. (1981). Arch. Biochem. Biophys. 206, 380.
- 76) Watanabe, N.; Hayashi, H. y Kikuchi, G. (1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 377.
- 77) Yamamoto, M.; Yew, N.S.; Federspiel, M.; Dodgson, J.B.; Hayashi, N. y Engel, J.D. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3702.
- 78) Elferink, C.J.; Srivastava, G.; Maguire, D.J.; Borthwick, J.A.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1987). J. Biol. Chem. 262, 3988.
- 79) Schoenhaut, D.S. y Curtis, P.J. (1986). Gene 48, 55.
- 80) Akhtar, N.; Abboud, M.M.; Barnard, G.; Jordan, P. y Zaman, Z. (1976). Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273, 117.
- 81) Nandi, D.L. (1978). J. Biol. Chem. 253, 8872.
- 82) Davies, R.C. y Neuberger, A. (1979). Biochem. J. 177, 661.
- 83) Shemin, D. (1972) en The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) 7, pag. 323, Academic Press, New York.
- 84) Shemin, D. (1976). Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci. 273, 109.
- 85) Battersby, A.R. y McDonald, E. (1975) en Porphyrins and Metalloporphyrins (Smith, K.M., ed.) pag. 61, Elsevier, Amsterdam.

- 86) Akhtar, M. y Jordan, P.M. (1978) en *Coprehensive Organic Chemistry* (Ollis, W.D., ed.) 5, pag. 1121, Pergamon Press, London.
- 87) Gibson, K.D.; Neuberger, A. y Scott, J.J. (1955) *Biochem. J.* 61, 618.
- 88) Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. y Grinstein, M. (1967) *Biochem. J.* 104, 244.
- 89) Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. y Sano, S. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 294.
- 90) Coleman, D.L. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 5511.
- 91) Zeitler, H.J.; Kreutzer, M.; Andondonskaja, Rens, B. (1982) *Int. J. Biochem.* 14, 787.
- 92) Van Hayningen, S. y Shemin, D. (1971). *Biochemistry* 10, 4676.
- 93) Anderson, P.M. y Desnick, R.J. (1979). *J. Biol. Chem.* 255, 6924.
- 94) Despaux, N.; Comoy, E.; Bohuon, C.; Boudene, C. (1979) *Biochimie* 61, 1021.
- 95) Bustos, N.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. y Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 745.
- 96) Gibbs, P.N.B.; Chandry, A.G. y Jordan, P.M. (1985) *Biochem. J.* 230, 25.
- 97) Wu, W.H.; Shemin, D.; Richard, K.E. y Williams, R.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1767.
- 98) Gibbs, P.N.B. y Jordan, P.M. (1981) *Biochem. Soc. Trans.* 9, 232.

- 99) Barnard, G.F.; Itoh, R.; Hohberger, L.H. y Shemin, D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8965.
- 100) Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. y Sano, S. (1979). Biochim. Biophys. Acta 570, 167.
- 101) Seehra, J.S.; Gore, M.G.; Chaudry, A.G. y Jordan, P.M. (1981). Eur. J. Biochem. 114, 263.
- 102) Gibbs, P.N.B.; Gore, M.G. y Jordan, P.M. (1985). Biochem. J. 225, 573.
- 103) Gurba, P.E.; Sennett, R.E. y Kobes, R.D. (1972). Archs. Biochem. Biophys. 95, 130.
- 104) Cheh, A. y Neilands, J.B. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1060.
- 105) Bevan, D.R.; Bodlaender, P. y Shemin, D. (1980). J. Biol. Chem. 255, 2030.
- 106) Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980). Int. J. Biochem. 12, 751.
- 107) Hashain, S.S.; Wardell, E.M.; Garner, C.D.; Schlosser, M. y Beyersmann, D. (1985). Biochem. J. 230, 625.
- 108) Hernberg, S. y Nikkanen, J. (1970). Lancet i, 63.
- 109) Haerger-Aronsen, B.; Abdulla, M. y Fristedt, B.I. (1971). Arch. Envirom. Health 23, 440.
- 110) Wetmur, J.O.; Bishop, D.F.; Ostasiewicz, L.; Desnick, R.J. Gene (1986) 43, 123.
- 111) Nandi, D.L. y Shemin, D. (1968). J. Biol. Chem. 243, 1236.

- 112) Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E. y Sancovich, H.A. (1978). Int. J. Biochem. 9, 401.
- 113) Batlle, A.M. del C. y Stella, A.M. (1978). Int. J. Biochem. 9, 861.
- 114) Nandi, D.L. (1978). Z. Naturforsch. 33, 799.
- 115) Jordan, P.M. y Seehra, J.S. (1980). J. Chem. Soc. Chem. Commun., 240.
- 116) Jordan, P.M. y Seehra, J.S. (1980). FEBS Lett. 114, 283.
- 117) Jordan, P.M. y Gibbs, P.N.B. (1985). Biochem. J. 227, 1015.
- 118) Levin, E.Y. y Coleman, D.L. (1967). J. Biol. Chem. 242, 248.
- 119) Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1969). Biochim. Biophys. Acta 191, 130.
- 120) Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1971). Biochem. J. 121, 327.
- 121) Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1971). Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- 122) Davies, R.C. y Neuberger, A. (1973). Biochem. J. 133, 471.
- 123) Jordan, P. y Shemin, D. (1973). J. Biol. Chem. 248, 1019.
- 124) Frydman, R. y Feinstein, G. (1974). Biochim. Biophys. Acta 350, 358.
- 125) Higuchi, M. y Bogoroad, L. (1975). Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 401.

- 126) Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1976). *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 379.
- 127) Anderson, P.M. y Desnick, R.J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 1993.
- 128) Miyagi, K.; Petryka, Z.J.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; y Pierach, C.A. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 769.
- 129) Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnick, A.A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. y Batlle, A.M. del C. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- 130) Williams, D.C.; Morgan, G.S.; McDonald, E. y Battersby, A.R. (1981). *Biochem. J.* 193, 301.
- 131) Williams, D.C. (1984). *Biochem. J.* 217, 675.
- 132) Levin, E.Y. (1971). *Biochemistry* 10, 4669.
- 133) Battersby, A.R.; Fooks, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; McDonald, E. y Hollenstein, R. (1983). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 3031.
- 134) Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. y Piper, W.N. (1984) *Biochem. J.* 220, 755.
- 135) Hart, G.J. y Battersby, A.R. (1985). *Biochem. J.* 232, 151.
- 136) Tsai, S-F.; Bishop, D.F. y Desnick, R.J. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 1268.
- 137) Battersby, A.R. y McDonald, E. (1979). *Acc. Chem. Res.* 12, 14.
- 138) Berry, A. y Jordan, P.M. (1981). *Biochem. Soc. Trans.* 9, 231.
- 139) Hart, G.J.; Leeper, F.J. y Battersby, A.R. (1984) *Biochem. J.* 222, 93.

- 140) Berry, A.; Jordan, P.M. y Seehra, J.S. (1981). FEBS Lett, 129, 220.
- 141) Frydman, B.; Reil, S.; Valasinas, A.; Frydman, R.B. y Rapoport, H. (1971). J. Am. Chem. Soc. 93, 2738.
- 142) Frydman, R.B.; Valasinas, A. y Frydman, B. (1973). Biochemistry 12, 80.
- 143) Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Rapoport, H. y Frydman, B. (1972) FEBS Lett. 25, 309.
- 144) Scott, A.I.; Ho, K.S.; Kajiwarra, M. y Takakashi, T. (1976). J. Am. Chem. Soc. 98, 1589.
- 145) Battersby, A.R.; Evans, D.A.; Gibson, K.H.; McDonald, E.; Mander, L.N. y Moron, J. (1973). J. Chem. Soc. Chem. Commun. 768.
- 146) Battersby, A.R. y McDonald, E. (1976). Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, 273, 161.
- 147) Burton, G.; Nordlou, H.; Hosozawa, S.; Matsumoto, H.; Jordan, P.M.; Fagerness, P.E.; Pryde, L.M. y Scott, A. I. (1979). J. Am. Chem. Soc. 101, 3114.
- 148) Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; McDonald, E. y Matcham, G.W.J. (1982). J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I, 2413.
- 149) Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; McDonald, E. y Matcham, G.W.J. (1982). J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I, 2427.
- 150) Mauzerall, D. y Granick, S. (1958). J. Biol. Chem. 232, 1141.

- 151) Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1962). Biochim. Biophys. Acta 62, 197.
- 152) San Martín de Viale, L.C. Y Grinstein, M. (1968). Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- 153) Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1970). Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
- 154) Hoare, D.S. y Heath, H. (1959). Biochem. J. 73, 679.
- 155) Koopmann, G.E.; Juknat de Geralnik, A.A. y Batlle, A.M. del C. (1986). Int. J. Biochem. 18, 935.
- 156) San Martín de Viale, L.C.; García, R.C.; Kleiman de Pisarev, D.; Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1969). FEBS Lett. 5, 149.
- 157) Romeo, G. y Levin, E.Y. (1971). Biochim. Biophys. Acta 230, 330.
- 158) Chen, T.C. y Miller, G.W. (1974). Plant and Cell. Physiol. 15, 993.
- 159) Elder, G.H. y Tovey, J.A. (1977). Biochem. Soc. Trans. 5, 1470.
- 160) Elder, G.H.; Tovey, J.A. y Sheppard, D.M. (1983). Biochem. J. 215, 46.
- 161) Aragonés, A.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1972) Anales Asoc. Quím. Argentina 60, 239.
- 162) San Martín de Viale, L.C.; Aragonés, A. y Tomio, J.M. (1976) Acta Physiol. Latinoam. 26, 403.
- 163) Ríos de Molina, M. del C.; Billi, S.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1984) Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 34, 55.

- 164) Straka, J.G. y Kushner, J.P. (1983). *Biochemistry* 22, 4664.
- 165) de Verneuil, H.; Sassa, S. y Kappas, A. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 2454.
- 166) Sassa, S.; de Verneuil, H.; Anderson, K.E. y Kappas, A. (1983). *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 96, 65.
- 167) Kawanishi, S.; Seki, Y. y Sano, S. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 4285.
- 168) Koopmann, G.E. y Batlle, A.M. del C. (1987). *Int. J. Biochem.* 19, 373.
- 169) Kushner, J.P.; Steihumuller, D.P. y Lee, G.R. (1975). *J. Clin. Invest.* 56, 661.
- 170) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1983). *Biochem. J.* 214, 909.
- 171) Blekkenhorst, G.H.; Eales, L. y Pimstone, N.R. (1979) *S. Afr. Med. J.* 56, 918.
- 172) Woods, J.S.; Kardish, R. y Fauler, B.A. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 264.
- 173) Wainstok de Calmanovici, R.; Ríos de Molina, M. del C. y San Martín de Viale, L.C (1985). *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 35, 481.
- 174) Mukerji, S.K.; Pimstone, N.R. y Burns, M. (1984). *Gastroenterology* 87, 1248.
- 175) de Verneuil, H.; Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1980). *Biochem. Biophys. Acta* 611, 174.
- 176) Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. y Smith, S.G. (1976). *Philos. Trans. R. Ser. London Ser B* 273, 191.

- 177) Jackson, A.H.; Rao, K.R.N.; Supphayen, D.M. y Smith, S.G. (1977). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 696.
- 178) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1979). *Biochem. J.* 183, 455.
- 179) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1981). *Biochem. J.* 195, 241.
- 180) Cantoni, L.; Dal Fiume, D. y Ruggieri, R. (1984). *Int. J. Biochem.* 16, 561.
- 181) Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1987). *Int. J. Biochem.* 19, 365.
- 182) García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 209, 203.
- 183) Barnard, G.F. y Akhtar, M. (1979). *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2354.
- 184) Romeo, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beapin, D.; Pryor, N.; Kusher, J.; Cohen-Solar, M. y Goossens, M. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 9825.
- 185) Elder, G.H.; Evans, J.O. y Matlin, S. (1976). *Clin. Sci. Mol. Med.* 51, 71.
- 186) San Martín de Viale, L.C.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y Tomio, J.M. (1977). *Biochem. J.* 168, 393.
- 187) Wainstok de Calmanovici, R.; Ríos de Molina, M. del C.; Taira de Yamasato, M.C.; Tomio, J.M. y San Martín de Viale, L.C. (1984). *Biochem. J.* 218, 753.
- 188) Jones, K.G. y Sweeney, G.D. (1977). *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* 17, 631.

- 189) Cantoni, L.; Dalfiume, D.; Rizzardini, M. y Ruggieri, R. (1984). *Toxicol. Lett.* 20, 24.
- 190) Sinclair, P.R.; Bement, W.J.; Bonkovsky, H.L. Y Sinclair, J.F. (1984). *Biochem. J.* 222, 737.
- 191) Billi, S.C.; Koss, G. y San Martín de Viale, L.C (1986). *Res. Commun. in Chem. Pathol. and Pharmacology* 51, 325.
- 192) Elder, G.H. y Evans, J.O. (1978). *Biochem. J.* 172, 345.
- 193) Grandchamp, B.; Phung, N. y Nordmann, Y. (1978). *Biochem. J.* 176, 97.
- 194) Camadro, J.M.; Chambon, H.; Jolles, J. y Labbe, P. (1986). *Eur. J. Biochem.* 156, 579.
- 195) Batlle, A.M. del C.; Benson, A. y Rimington, C. (1965). *Biochem. J.* 97, 731.
- 196) Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1982). *Enzyme* 28, 196.
- 197) Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 4722.
- 198) Poulson, R. y Polglase, W.J. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 6367.
- 199) Ehteshamuddin, A.F.M. (1968). *Biochem. J.* 107, 446.
- 200) Tait, G.H. (1972). *Biochem. J.* 128, 1159.
- 201) Seehra, J.S.: Jordan, P.M. y Akhtar, M. (1983). *Biochem. J.* 209, 709.
- 202) Sano, S. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 5276.
- 203) Cavaleiro, J.A.S.; Kenner, G.W. Y Smith, K.M. (1974). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 1188.

- 204) Games, D.E.; Jackson, A.H.; Jackson, J.R.; Belcher, R.V. y Smith, S.G. (1976). *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 187.
- 205) Elder, G.H.; Evans, J.O.; Jackson, J.R. Y Jackson, A.H. (1978). *Biochem. J.* 169, 215.
- 206) Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 4727.
- 207) Zaman, Z. y Akhtar, M. (1976). *Eur. J. Biochem.* 61, 215.
- 208) Abboud, M.M. y Akhtar, M. (1978). *Nouv. J. Chim.* 2, 419.
- 209) Battersby, A.R. (1978). *Experientia* 34, 1.
- 210) Poulson, R. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 3730.
- 211) Poulson, R. y Polglase, W.J. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
- 212) Polglase, W.J.; Whitlow, W.J. y Poulson, R. (1975). *Fed. Proc.* 36, 692.
- 213) Jacobs, N.J. Y Jacobs, J.M. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.
- 214) Deybach, J.C.; Da Silva, V.; Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1985). *Eur. J. Biochem.* 149, 431.
- 215) Poulson, R. y Polglase, W.J. (1974). *FEBS Lett*, 40, 258.
- 216) Kolarov, J.; Nelson, B.D. y Kuzěla, S. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 116, 383.
- 217) Nishida, G. y Labbé, R.F. (1959). *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 519.
- 218) Jones, M.S. y Jones, O.T.G. (1969). *Biochem. J.* 113, 507.
- 219) McKay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. y Rabinowitz, M. (1969) *Biochem. J.* 114, 455.

- 220) Harbin, B.M. y Dailey, H.A. (1985). *Biochemistry*, 24, 366.
- 221) Jones, O.T.G. (1968). *Biochem. J.* 107, 113.
- 222) Dailey, H.A.Jr. y Lascelles, J. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 523.
- 223) Dailey, H.A. (1977). *J. Bacteriol.* 132, 302.
- 224) Taketani, S. y Tokunaga, R. (1982). *Eur. J. Biochem* 127, 443.
- 225) Dailey, H.A y Fleming, J.E. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 11453.
- 226) Taketani, S. y Tokunaga, R. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 127458.
- 227) Hanson, J.W. y Dailey, H.A. (1984). *Biochem. J.* 222, 695.
- 228) Dailey, H.A. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 14714.
- 229) Labbe, R.F. y Hubbard, N. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- 230) Bloomer, J.R.; Reuter, R.J.; Morton, K.O.; Wehner, F. (1983). *Gastroenterology* 85, 663.
- 231) Cánepa, E.T. y Llambías, E.B.C. (1981). *Enzyme*, 26, 228.
- 232) Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, Y. y Yoneyama, Y. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 178, 145.
- 233) Simpson, D.M. y Poulson, R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, 482, 461.
- 234) Porra, R.J.; Vitols, K.S.; Labbe, R.F. y Newton, N.A. (1967). *Biochem. J.* 104, 321.
- 235) Dailey, H.A. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 2711.
- 236) Dailey, H.A. y Smith, A. (1984). *Biochem. J.* 223, 441.

- 237) Honeybourne, C.L.; Jackson, J.T. y Jones, O.T.G. (1979).
FEBS Lett. 98, 207.
- 238) Dailey, H.A Y Fleming, J.E (1986). J. Biol. Chem. 261, 7902.
- 239) Tephly, T.R.: Gibbs, A.H. y De Matteis, F. (1979).
Biochem. J. 180, 241.
- 240) De Matteis, F.; Gibbs, A.H. y Tephly, T.R. (1980).
Biochem. J. 188, 145.
- 241) Ortiz de Montellano, P.R.; Kunze, K.I.; Cole, S.P.C. y
Marks, G.S. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1436.
- 242) Ortiz de Montellano, P.R.; Beilan, H.S. Y Kumze , K.L.
(1981). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1490.
- 243) Granick, S. y Beale, S.I. (1978). Adv. Enzymol. 46, 33.
- 244) Kappas, A.; Song, C.S.; Levere, R.D.; Sachson, R.A.y
Granick, S. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 61, 509.
- 245) Whiting, M.J. y Granick, S. (1976). J. Biol. Chem. 251, 1347.
- 246) Jacob, F. y Monod, J. (1961). J. Mol. Biol. 3, 318.
- 247) Hayashi, N.; Yoda, B. y Kikuchi, G. (1968). J. Biochem.
4, 446.
- 248) Strand, L.J.; Manning, J. y Marver, H.S. (1972). J. Biol.
Chem. 247, 2820.
- 249) Tyrell, D.L.J. y Marks, G.S. (1972). Biochem. Pharmacol.
21, 2077.
- 250) Granick, S.; Sinclair, P.; Sassa, S. y Grieringer, G.
(1975). J. Biol. Chem. 250, 9215.

- 251) Sinclair, P.R. y Granick, S. (1975). Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 509.
- 252) Srivastava, G.; Brooker, J.D.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1980). Biochem. J. 188, 781.
- 253) Padmanaban, G.; Satyanarayana Rao, M.R. y Malathi, K. (1973). Biochem. J. 134, 847.
- 254) Welch, A.N. y Badaway, A.A.B. (1980). Biochem. J. 192, 403.
- 255) Hayashi, N.; Kurashima, Y. y Kikuchi, G. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 148, 10.
- 256) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1981). Arch. Biochem. Biophys. 209, 451.
- 257) Hayashi, N.; Tersawa, M.; Yamauchi, K. y Kikuchi, G. (1980). J. Biochem. 88, 1537.
- 258) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 225.
- 259) Ranu, R.S. y London, I.M. (1979). Methods Enzymol. 60, 459.
- 260) Das, H.K.; Das, A.; Ghosh - Dastidar, P.; Ralston, R.O.; Yaghmai, B.; Roy, R. y Gupta, N.K. (1981). J. Biol. Chem. 256, 6491.
- 261) Drew, P.D. y Ades, I.Z. (1986). Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 81.
- 262) Zhang, D.W. y Ades, I.B. (1987). Med. Sci. Res. 15, 241.
- 263) Ades, I.Z.; Stevens, T.M. y Drew, P.D. (1987). Arch. Biochem. Biophys. 253, 297.

- 264) Kikuchi, G. y Hayashi, N. (1981). *Moll. Cell. Biochem.* 37, 27.
- 265) Kurashima, Y.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1970). *J. Biochem. (Tokyo)* 67, 863.
- 266) Yamauchi, K.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 1746.
- 267) Badaway, A.A.B. (1978). *Biochem. J.* 172, 487.
- 268) Badaway, A.A.B. (1979). *Biochem. Soc. Transaction* 7, 575.
- 269) Ades, I.Z (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 42.
- 270) Ades, I.Z.; Harpe, K.G. y Stevens, T. (1983). *Biochem. J.* 214, 967.
- 271) Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; Wallace, J.C.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 344.
- 272) Wolfson, S.J.; Bartczak, A. y Bloomer, J.R. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 3543.
- 273) Pirola, B.A.; Srivastava, G.; Borthwick, F.A.; Brooker, J.F.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1984). *FEBS Lett.* 166, 298.
- 274) Meyer, U.A. y Schmid, R. (1978). en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 4th. edn. (Standbury, J.B.; Wyngaarden, J.B. y Frederickson, D.S. editores) McGraw-Hill, New York, 1166.
- 275) De Matteis, F. (1978) en *Handbook of Experimental Pharmacology* (De Matteis, F. y Aldridge, W.N. eds.) Springer-Verlag, New York, 44, 129.

- 276) De Matteis, F. (1971). S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 17, 126.
- 277) Simpson, D.M. y Beattie, D.S. (1980). J. Biol. Chem. 255, 1630.
- 278) Young, C.W. y Robinson, P.F. (1963). Biochem. Pharmacol. 12, 855.
- 279) Hickman, R.; Saunders, S.J.; Dowdle, E. y Eales, L. (1968). Biochim. Biophys. Acta 161, 197.
- 280) Gajdos, A. y Gajdos- Török, M. (1970). Biochim. Biophys. Acta 215, 200.
- 281) Kim, H.J. y Kikuchi, G. (1974). Arch. Biochem. Biophys. 164, 293.
- 282) De Matteis, F. (1970). FEBS Lett. 6, 343.
- 283) De Matteis, F. (1971). Biochem. J. 124, 767.
- 284) Levin, W.; Jacobson, M.; Sernatinger, E. y Kuntzman, R. (1973). Drug. Metab. Dispos. 1, 275.
- 285) Smith, A. (1976). Biochem. Pharmacol. 25, 2429.
- 286) Ortiz de Montellano, P.R.; Mico, B.A. y Yost, G.S. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 132.
- 287) Ortiz de Montellano, P.R.; Yost, G.S.; Mico, B.A.; Dinizo, S.E.; Correia, M.A. Y Kumbara, H. (1979). Arch. Biochem. Biophys. 197, 524.
- 288) Ortiz de Montellano, P.R. Y Mico, B.A. (1981). Arch. Biochem. Biophys. 206, 43.
- 289) Ortiz de Montellano, P.R.; Stearns, R.A.; Langry, K.C. (1984). Mol. Pharmacol. 25, 310.

- 290) Creighton, J.M.; Racz, W.J.; Tyrrell, D.L.J.; Schneck, D.W. y Marks, G.S. (1971). S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 17, 79.
- 291) Shneck, D.W. y Marbs, G.S. (1972). Biochem. Pharmacol. 21, 2509.
- 292) Marks, G.S.; Krupka, V. y Roomi, M.V. (1973). Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 863.
- 293) Taub, H.; Krupka, V. y Marks, G.S. (1976). Biochem. Pharmacol. 28, 511.
- 294) Sinclair, P.R.; Healey, J.F.; Sinclair, J.F. Y Bonkovsky, H.L. (1981). Biochem. J. 200, 709.
- 295) Rifkind, A.B.; Troeger, M. y Muschik, H. (1982). J. Biol. Chem. 257, 11717.
- 296) Solomon, H.M. y Figge, F.H.J. (1959). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 583.
- 297) Figge, F.H.J. (1959). J. Histochem - Cytochem. 7, 257.
- 298) De Matteis, F. (1967). Pharmacol. Rev. 19, 523.
- 299) De Matteis, F. (1973). Enzyme 16, 266.
- 300) De Matteis, F. y Gibbs, A.H. (1975). Biochem. J. 146, 285.
- 301) Racz, W.J. y Marks, G.S. (1972). Biochem. Pharmacol. 21, 143.
- 302) Racz, W.J. y Marks, G.S. (1969). Biochem. Pharmacol. 18, 2009.
- 303) Cole, S.P.C.; Vavasour, E.J. y Marks, G.S. (1979). Biochem. Pharmacol. 28, 3533.
- 304) Rifkind, A.B. (1979). J. Biol. Chem. 254, 4636.
- 305) Anderson, K.E. (1978). Biochem. Biophys. Acta 543, 313.

- 306) Onisawa, J. y Labbé, R.F. (1963). J. Biol. Chem. 238, 724.
- 307) Gross, S.R. y Hutton, J.J. (1971). J. Biol. Chem. 246, 606.
- 308) Igarashi, J.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1976). J. Biochem. 80, 1091.
- 309) Tephly, T.R.; Hasegawa, E. y Baron, J. (1971). Metabolism. 20, 200.
- 310) De Matteis, F.; Abbritti, G. y Gibbs, A.H. (1973). Biochem. J. 134, 717.
- 311) Cole, S.P.C.; Zelt, D.T. Y Marks, G.S. (1981). Mol. Pharmacol. 19, 477.
- 312) Cole, S.P.C.; Whitney, R.A. y Marks, G.S. (1981). Mol. Pharmacol. 20, 395.
- 313) De Matteis, F.; Gibbs, A.H.; Jackson, A.H. y Weerasingle, S. (1980). FEBS Lett. 119, 109.
- 314) Kunze, K.L. y Ortiz de Montellano, P.R. (1981). J. Am. Chem. Soc. 103, 4225.
- 315) De Matteis, F.; Gibbs, A.H.; Farmer, P.B. y Lamb, J.H. (1981). FEBS Lett. 129, 328.
- 316) Ortiz de Montellano, P.R.; Beilan, H.S. y Kunze, K.L. (1981). J. Biol. Chem. 256, 6708.
- 317) De Matteis, F.; Gibbs, A.H. y Hollands, C. (1983). Biochem. J. 211, 455.
- 318) Tephly, T.R.; Gibbs, A.H.; Ingall, G. y De Matteis, F. (1980). Int. J. Biochem. 12, 993.

- 319) Augusto, O.; Beilan, H.S. y Ortiz de Montellano, P.R. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 11288.
- 320) De Matteis, F.; Hollands, C.; Gibbs, A.H.; de Sa, N. y Rizzardini, M. (1982). *FEBS Lett.* 145, 87.
- 321) Ortiz de Montellano, P.R. y Correia, M.A. (1983). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 481.
- 322) Marks, G.S.; Allen, D.T.; Johnston, C.T.; Sutherland, E.P.; Nakatsu, K. y Whitney, R.A. (1985). *Mol. Pharmacol.* 27, 459.
- 323) Marks, G.S.; Allen, D.T.; Sutherland, E.P.; McCluskey, S.A. y Whitney, R.A. (1986). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64, 483.
- 324) De Matteis, F.; Gibbs, A.H. y Smith, A. (1980). *Biochem. J.* 189, 645.
- 325) Ortiz de Montellano, P.R.; Kunze, K.L.; Colè, S.P.C. y Marks, G.S. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 581.
- 326) De Matteis, F.; Jakcosn, A.H.; Gibbs, A.H.; Rao, K.R.N. ; Atton, J.; Weerasinghe, S. y Hollands, C. (1982). *FEBS Lett.* 142, 44.
- 327) McCluskey, S.A.; Marks, G.S.; Sutherland, E.P.; Jacobsen, N. y Ortiz de Montellano, P.R. (1986). *Mol. Pharmacol.* 30, 352.
- 328) Ortiz de Montellano, P.R.; Costa, A.K.; Grab, L.A.; Sutherland, E.P. y Marks, G.S. (1986). en *Porphyriins and Porphyrias* (Y. Nordman, ed.) 134, 109.

- 329) Schmid, R. (1960). N. Engl. J. Med. 263, 397.
- 330) Ockner, R.K. y Schmid, R. (1961). Nature (London) 189, 499.
- 331) De Matteis, F.; Prior, B.E. y Rimington, C. (1961).
Nature (London) 191, 363.
- 332) Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1961). Lancet ii, 175.
- 333) San Martín de Viale, L.C.: Viale, A.A.; Nacht, S. y
Grinstein, M. (1970). Clin. Chim. Acta 28, 13.
- 334) Vos, J.G.: Van der Maas, H.C.: Mush, A. y Ram, R. (1971)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 944.
- 335) Strik, J.J.T.W.A. (1973). Enzyme 16, 211.
- 336) Strik, J.J.T.W.A. (1973). Enzyme 16, 224.
- 337) Cam, C. y Nigogosyan, G. (1963). J. Am. Med. Assoc. 183, 90.
- 338) Nacht, S.; San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M.
(1970). Clin. Chim. Acta 27, 445.
- 339) Debets, F.M.H.; Hamers, W.J.H.M.B. y Strik, J.J.T.W.A.
(1980). Int. J. Biochem. 12, 1019.
- 340) Taljaard, J.J.F.; Shandley, B.C.; Deppe, W.M. y Joubert,
S.M. (1972). Br. J. Haematol. 23, 513.
- 341) Blekkenhorst, G.H.; Pimstone, N.R.; Webber, B.L. y
Eales, L. (1976). Ann. Clin. Res. 8 (Suppl. 17) 108.
- 342) de Verneuil, H.; Aitkin, G. y Nordmann, Y. (1978). Hum.
Genet. 44, 145.
- 343) Magnus, I.A. (1980). Clin. Haematol. 9, 273.

- 344) Smith, A.G.; Francis, J.E.; Kay, S.J.E. y Greig, J.B. (1981). *Biochem. Pharmac.* 30, 2825.
- 345) Voorman, R.; Jensen, R.; Sleight, S. y Aust, S. (1983). *Toxicologist*, 3, 98.
- 346) Poland, A. y Glover, E. (1973). *Science* 179, 476.
- 347) Felsher, F.B. y Kushner, J.P. (1977). *Semin. Hemat.* 14, 243.
- 348) Welland, F.H. y Carlsen, R.A. (1969). *Archs. Derm.* 99, 451.
- 349) Pimstone, N. (1982). *Semin. Liver. Dis.* 2, 132.
- 350) Saunders, S.J.; Williams, J. y Levey, M. (1963). *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 9, 277.
- 351) Hanstein, W.G.; Heitman, T.D.; Sandly, A.; Biersterfelat, H.L.; Leim, H.H. y Müller-Eberhard, U. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 678, 293.
- 352) Kimbrough, R.D.; Linder, R.E. y Gaines, T.B. (1972). *Archs. Environ. Health.* 25, 354.
- 353) Goldstein, J.A.; Hickman, P.; Bergman, H. y Vos, J.G. (1973). *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* 6, 919.
- 354) Taljaard, J.J.F.; Shanley, B.C. y Joubert, S.M. (1971). *Life Sci.* 10, 887.
- 355) Louw, M.; Neething, A.C.; Percy, V.A.; Carstens, M. y Shanley, B.C. (1977). *Clin. Sci. Molec. Med.* 53, 111.
- 356) Smith, A.G.; Cabral, J.R.P. y De Matteis, F. (1979). *Chem. Biol. Interact.* 27, 353.
- 357) Sweeney, G.D.; Jones, K.G.; Cole, F.M.; Basford, D. y Krestynski, F. (1979). *Science* 204, 332.

- 358) Wainstok de Calmanovici, R.; Billi, S.C.; Aldonatti, C.A. y San Martín de Viale, L.C. (1986). *Biochem. Pharmac.* 35, 2399.
- 359) Sinclair, P.R. y Granick, S. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 124.
- 360) Elder, G.H. y Sheppard, D. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 113.
- 361) Rícs de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 1027.
- 362) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1987). *Biochem. J.* 246, 221.
- 363) Debets, F.M.H.; Hamers, W.J.H.M .B. y Strik, J.J.T.W.A. (1980)., *Int. J. Biochem.* 12, 1019.
- 364) Debets, F.M.H.; Reinders, J.H.; Debets, A.J.M.; Lössbroek, T.G.; Strik, J.J.T.W.A. y Koss, G. (1981). *Toxicology* 19, 185.
- 365) Carpenter, H.M.; Williams, D.E.; Henderson, M.C.; Bender, R.C. y Buhler, D.R. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3875.
- 366) de Verneuil, H.; Sassa, S. y Kappas, A. (1983). *Biochem. J.* 214, 145.
- 367) Koss, G.; Seubert, S.; Saubert, A.; Koransky, W.; Ippen, H. y Straub, M. (1979) en *Chemical Porphyrin in Man* (Strik, J.J.T.W.A. y Koeman, J.H., editorres) Elsevier/ North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 175.
- 368) Sinclair, P.R.; Bement, W.J.; Bonkovsky, H.L.; Lambrecht, R.W.; Frezza, J.E.; Sinclair, J.F.; Urquhart, A.J. y Elder, G.H. (1986). *Biochem. J.* 237, 63.

- 369) De Matteis, F. y Stonard, M.D. (1977). *Semin. Hematol.* 14, 187.
- 370) Sweeney, G.D. (1982). *Adv. Pharmacol. Ther.* II 5, 147.
- 371) Ferioli, A.; Harvey, C. y De Matteis, F. (1984). *Biochem. J.* 224, 769.
- 372) Casarett, L.J. y Doull, J. (1975). *Toxicology. The Basic Science of Poisons* (Casarett, L.J. y Doull, J., ed.). Macmillan Publishing Co, New York, 434.
- 373) Angerer, J., Maa, B.R. y Heinrich, R. (1983). *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 52, 59.
- 374) Lievremont, M.; Le Flohic, J.F.; Pascaud, M. (1981). *C.R. Seances. Acad. Sci, Ser. 3*, 292, 45.
- 375) Brason, H.L.; Baumann, K. y Lehnert, G. (1981). *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 48, 81.
- 376) Semencheva, E.M.; Gorbachevskaya, E.F.; Ousyahnikova, L.M. (1979). *Gig. Sanit.* 10, 76.
- 377) Aldegunde, M.; Parafita, M. y Fernández Otero, M. del P. (1980). *Rev. Esp. Fisiol.* 36, 307.
- 378) Agrawal, D.; Khanna, R.N.; Anand, M.; Gupta, G.S.D. y Ray, P.K. (1987). *Toxicol. Lett.* 38, 77.
- 379) Grover, P.L. y Sims, P. (1965). *Biochem. J.* 96, 521.
- 380) Foster, T.S. Y Saha, J.G. (1978). *J. Environ. Sci. Health.* 313, 25.
- 381) Chadwick, R.W.; Copeland, M.F.; Mole, M.L.; Nesnow, S. y Cooke, N. (1981). *Pesticide Biochem. and Physiol.* 15, 120.

- 382) Fitzloff, J.F.; Portig, J. y Stein, K. (1982). *Xenobiotica* 12, 197.
- 383) Yamamoto, T.; Igashira, T.; Yamanaka, Y.; Yoshida, T. y Kurowa, Y. (1983). *J. Pharmacobio-Dyn* 6, 721.
- 384) Gopaldaswamy, U.V. y Aiyar, A.S. (1986) en *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium* (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. editores) IARC Scientific Publications, Lyon, 77, 267.
- 385) Engst, R.; Macholz, R.M. y Kujawa, M. (1977). *Residue Rev.* 68, 59.
- 386) Engst, R.; Macholz, R.M. y Kujawa, M. (1978). *Pharmazie* 33, 109.
- 387) Blus, L.; Henny, C.J. y Krynitsky, A. (1985). *Sci. Total Environ.* 46, 73.
- 388) Simon, N. y Siklósi, C. (1974). *Z. Hautkr.* 49, 497.
- 389) Simon, N. y Siklósi, C. (1976). *Mykosen* 19, 98.
- 390) Vila, M. del C.; Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L.C. (1986). *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 36, 69.
- 391) Rifkind, A.B.; Gillette, P.N.; Song, C.S. y Kappas, A. (1973). *J. Pharmac. exp. Ther.* 185, 214.
- 392) Marks, G.S. (1978). en *Handbook of Experimental Pharmacology* (De Matteis, F. y Aldridge, W.N. editores) Springer, Berlin 44, 201.
- 393) Bonkovsky, H.L.; Healey, J.F.; Sinclair, P.R. y Sinclair, J.F. (1985). *Biochem. J.* 277, 893.

- 394) Healey, J.F.; Bronkovsky, H.L.; Sinclair, P.R. Y
Sinclair, J.F. (1981). *Biochem. J.* 198, 595.
- 395) Marks, G.S. (1969) en *Heme and Chlorophyll. Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, D. Van Nostrand Company Ltd., London, Capítulo 6, 163.
- 396) Falk, J.E. y Benson, A. (1953). *Biochem. J.* 55, 101.
- 397) Falk, J.E. (1964) en *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, New York.
- 398) Doss, M. (1970). *Z. klin. Chem. u Klin. Biochem.* 8, 197.
- 399) Salum, J.; Battle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1961). *Anales Asoc. Quím. Arg.* 49, 3.
- 400) Gray, C.H.; Lim, C.K. y Nicholson, D.C. (1977). *Clin. Chim. Acta*, 77, 167.
- 401) Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Pelroth, M.G. y Collins, A. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 2803.
- 402) Mauzerall, D. y Granick, S. (1956). *J. Biol. Chem.* 219, 435.
- 403) Kaufman, S. (1955). en *Methods in Enzymology* editado por Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., Academic Press, New York, Vol. 1, 718.
- 404) Gibson, J.; Upper, C.D. y Gunsalus, I.C. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 2474.
- 405) Lipmann, F. y Tuttle, C. (1945). *J. Biol. Chem.* 159, 21.
- 406) Pennington, R.J. (1961). *Biochem. J.* 80, 649.

- 407) San Martín de Viale, L.C. Biosíntesis del hemo. Purificación y caracterización de las porfirinas urinarias en porfiria humana y experimental. Porfirinógenos de 5- y 6-COOH (isómero III) como intermediarios normales en la síntesis del hemo. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A. 1970.
- 408) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 409) Falk, J.E. (1964). *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, New York. pag, 236.
- 410) Porra, R.J. y Jones, O.T.G. (1963). *Biochem. J.* 87, 181.
- 411) Correia, M.A. Y Meyer, U.A. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 400.
- 412) Petersons, M. y Allred, J.B. (1981). *Physiol. Chem. & Physics.* 13, 473.
- 413) Ríos de Molina, M. del C. Porfiria experimental por hexaclorobenceno. Estudios sobre Porfirinógeno carboxiliasa y Ferroquelatasa. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A. (1982), 124.
- 414) Aragonés, A.; González, C.B.; Lantos, C.P. y Sancovich, H.A. (1985). *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 35, 379.
- 415) Rudnick, D.; Mela, P. y Waelsch, H. (1954). *J. Exp. Zool.* 126, 297.
- 416) Wang, K.M. (1968). *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 33.

- 417) Knor, W.E. y Eppenberger, H.M. (1966). *Dev. Biol.* 13, 182.
- 418) Galofré, A. y Kretchmer, N. (1970). *Pediatr. Res.* 4, 55.
- 419) Rynähen, L. y Kivirikko, K.J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 343, 121.
- 420) Hendrick, D. y Moller, F. (1973). *Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.* 45, 197.
- 421) Song, C.S.; Moses, H.L.; Rosenthal, A.S.; Gelb, N.A. y Kappas, A. (1971). *J. Exp. Med.* 134, 1349.
- 422) Creighton, J.M. y Marks, G.S. (1969). *Biochem. Pharmacol.* 18, 2040.
- 423) Strittmatter, C.F. y Umberger, F.T. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 18.
- 424) Giger, U. y Meyer, U.A. (1981). *Biochem. J.* 198, 321.
- 425) Brooker, J.D.; Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1983). *Eur. J. Biochem.* 136, 327.
- 426) Lim, L.K.; Srivastava, G.; Brooker, J.D.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1980). *Biochem. J.* 190, 519.
- 427) Wainstok de Calmanovici, R.; Ríos de Molina, M. del C.; Vila, M. del C. y San Martín de Viale, L.C. (1986) en *Hexachlorobenzene Proc. of an Int. Symp.* (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. editores) IARC Scientific Publications, Lyon 77, 497.
- 428) Ríos de Molina, M. del C.; Billi, S.C. y San Martín de Viale, L.C. (1986) en *Hexachlorobenzene Proc. of an Int. Symp.* (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. editores) IARC Scientific Publications, Lyon, 77, 481.

- 429) Mukerji, S.K. y Pimstone, N.R. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 244, 619.
- 430) Billi, S.C.; Rics de Molina, M. del C. y San Martín de Viale, L.C. (1987). XXIII Reunión Anual de SAIB, Huerta Grande, Córdoba, 22-24 de octubre, 261.
- 431) Miranda, C.L.; Wang, J.L.; Henderson, M.C.; Nakane, H.S. Y Buhler, D.R. (1984). Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 46, 13.
- 432) Kószó, F.; Horvath, L.I.; Simon, N.; Siklósi, Cs. y Kiss, M. (1982). Biochem. Pharmac. 31, 11.
- 433) Neilson, I.R.; Chaykowski, F.T.; Singer, M.A. y Marks, G.S. (1979). Biochem. Pharmac. 28, 3589.
- 434) Junqueira, V.B.C.; Simizu, K.; Videla, L.A. y Barros, S.B. de M. (1986). Toxicology, 41, 193.

