

Tesis de Licenciatura

Catabolismo de los hidratos de carbono y estrés oxidativo en un modelo de porfiria aguda en ratas

Faut, Mónica

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Faut, Mónica. (2006). Catabolismo de los hidratos de carbono y estrés oxidativo en un modelo de porfiria aguda en ratas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001119_Faut

Cita tipo Chicago:

Faut, Mónica. "Catabolismo de los hidratos de carbono y estrés oxidativo en un modelo de porfiria aguda en ratas". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001119_Faut

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



***"CATABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO Y
ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO DE PORFIRIA
AGUDA EN RATAS"***

Autor: **Mónica Faut**

Directora: **Dra. Marta Blanca Mazzetti**

Tesis presentada para optar al título de Licenciada en Ciencias
Biológicas

Lugar de trabajo:

**Laboratorio de Disturbios Metabólicos por Xenobióticos y su
relación con Salud Humana y Medio Ambiente (DIMXSA)**
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

784221 -Diciembre 2006-

INDICE	Página
RESUMEN	4
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	
1.1. METABOLISMO DEL HEMO	
1.1.1. Generalidades	8
1.1.2. Metabolismo del hemo	9
1.1.2.1. Regulación	9
1.1.2.3. Alteraciones del metabolismo del hemo	10
1.1.4. Porfirias	10
1.1.4.1. Clasificación	11
1.1.4.2. Tipos de porfirias	11
1.1.4.3. Tratamientos	14
1.1.4.4. Inducción de porfirias	14
1.2. METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.	
1.2.1. Generalidades	16
1.2.2. Metabolismo de la Glucosa	17
1.2.2.1. Glucólisis	18
1.2.2.1.1. Regulación de la Glucoquinasa	21
1.2.2.1.2. Regulación de la Fosfofructoquinasa	22
1.2.2.1.3. Regulación de la Piruvato quinasa	23
1.2.2.2. Gluconeogénesis	23
1.2.2.3. Glucogenogénesis- Glucogenolisis	24
1.2.2.4. Camino de las pentosas	27
1.2.2.4.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	28
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO.	
1.3.1. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS)	29
1.3.2. Toxicidad de xenobióticos mediada por ROS	31
1.3.3. Reacciones con biomoléculas	32
1.3.3.1. Proteínas	33
1.3.3.2. Lípidos	34

1.3.3.3. Ácidos nucleicos	35
1.3.3.4. Hidratos de carbono	35
1.3.4. Antioxidantes	35
1.3.4.1. Sistema de defensa enzimático	36
1.3.4.2. Sistema de defensa no enzimático	37
1.3.4.2.1. Metabolitos	38
1.3.4.2.2. Antioxidantes derivados de la dieta	39
HIPOTESIS	41
<hr/>	
OBJETIVOS	
2.1. Objetivos generales	41
2.2. Objetivos Específicos	42
MATERIALES Y METODOS.	
3.1 Reactivos e instrumentos	43
3.2. Tratamiento de animales	43
3.3. Preparación del hígado	44
3.4. Determinación de actividades enzimáticas	45
3.5 Determinación de metabolitos	47
3.6. Parámetros del daño oxidativo a macromoléculas	51
3.7. Determinación de la cantidad de proteínas	51
3.8. Análisis estadístico	52
RESULTADOS	
4.1. Biosíntesis del hemo	53
4.2. Enzimas reguladoras de la glucólisis	53
4.2.1. Glucoquinasa	54
4.2.2. Fosfofructoquinasa	56
4.2.3. Piruvato quinasa	56
4.3. Enzima reguladora del camino de las pentosas	57
4.3.2. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	57
4.4. Indicadores de estrés oxidativo	58
4.4.1. Glutatión reductasa	58
4.4.2. Nucleótidos pirimidínicos	59
4.4.3. Contenido de glutatión	62
4.4.4. Parámetros de daño oxidativo a macromoléculas	63

4.4.4.1. Contenido de proteínas carboniladas	63
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	75
AGRADECIMIENTOS	76
REFERENCIAS	77

RESUMEN

Las porfirias agudas son enfermedades generadas por la depleción del pool de hemo hepático. Esta alteración del metabolismo del hemo genera una sobreproducción de ácido δ-aminolevulínico (ALA) causada por la derepresión de la enzima ALA sintetasa (ALA-S), la cual es regulada negativamente por el hemo. Esta acumulación de ALA deviene en especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen daño a nivel de macromoléculas biológicas y generan respuestas al estrés de tipo enzimática y no enzimática. Nuestro grupo ha demostrado, en un modelo experimental de porfuria aguda en ratas, que existe un bloqueo de la gluconeogénesis y de la glucogenolisis, y que el estrés oxidativo, entre otras causas, dañaría moléculas enzimáticas de estos caminos metabólicos. Así, pareció interesante estudiar en el modelo de porfuria desarrollado, las actividades de las enzimas relacionadas con el catabolismo de la glucosa como las reguladoras de la glucólisis: la glucoquinasa (GK), la fosfofructoquinasa (PFK) y la piruvato quinasa (PK), y también la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), clave en el camino de las pentosas y generadora de NADPH. Por otra parte, se evaluaron distintos parámetros de estrés, como la relación NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺, el contenido de glutatión reducido (GSH) y total y la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR). Para el modelo experimental se emplearon ratas Wistar, a las cuales se les administró 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA) en forma subcutánea en tres dosis diferentes y 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocoldidina (DDC) en forma intraperitoneal en una dosis constante (50 mg/kg peso corporal). Las ratas fueron así divididas en los siguientes grupos: grupo B (100 mg/kg peso corporal de AIA + 50 mg/kg peso corporal de DDC), grupo M (250 mg/kg peso corporal de AIA + 50 mg/kg peso corporal de DDC), grupo A (500 mg/kg peso corporal de AIA + 50 mg/kg peso corporal de DDC) y el grupo C (grupo control). La actividad de la enzima ALA-sintetasa (ALA-S) fue utilizada como parámetro indicador del grado de porfuria y de la acumulación hepática de ALA, los resultados obtenidos evidenciaron una respuesta dosis-dependiente, aumentando su actividad hasta un 500% para la dosis más alta de AIA/DDC. Tras la administración simultánea de AIA/DDC, la actividad de la GK disminuyó en forma dosis dependiente (75% en el grupo A respecto al grupo C) mientras que la actividad de PFK , disminuyó en los grupos M y A (65% en el grupo A respecto al

grupo C), por otra parte la PK disminuyó su actividad en forma significativa en el grupo A (65% respecto al grupo C). El comportamiento observado en la actividad de la enzima G6PDH, mostró que la misma respondió disminuyendo su actividad para los grupos B y M. Sin embargo, cuando se emplearon dosis más altas de AIA (500 mg/kg.peso corporal), la actividad de esta enzima aumentó (20% respecto del grupo C), produciendo así un aumento en el catabolismo de la glucosa por esa vía. Al analizar la relación NADPH/NADP⁺ observamos una disminución en todos los grupos al compararlos con el grupo C. Esto sugiere un aumento en el consumo de este nucleótido pirimidínico reducido debido probablemente al estrés oxidativo generado en el modelo. Sin embargo, al realizar comparaciones entre los grupos B, M y A, se observó un aumento del valor del cociente con la dosis de AIA/DDC, esto podría deberse al aporte de NADPH que procede de la actividad aumentada de la G6PDH y a la disminución de la actividad de la GR, la cual consume NADPH para regenerar el GSH. Así, la GR mostró un aumento de su actividad de más de 6 veces a las dosis más bajas de las drogas porfirinogénicas; en cambio, a dosis altas, cuando el estrés oxidativo aumenta, la inducción no se observó y la actividad de la enzima se mantuvo en los valores basales. Esto sugiere que la GR sufriría algún tipo de modificación oxidativa. Sin embargo, la actividad aumentada de la GR no provocó un aumento correlativo en el contenido de GSH. Esto podría deberse a que el mismo podría estar afectado por la actividad de enzimas tales como glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión trasferasa (GST), que mantendrían los niveles de GSH en valores menores a los del grupo C. Se observaron niveles de glutatión total (GSSG + GSH) menores al del grupo C para las tres dosis ensayadas, cuando se empleó para su medición la técnica de “recycling”. Por otra parte, cuando se determinó la relación NADH/NAD⁺ se observó un aumento de la misma en función de las dosis de AIA y DDC empleadas, estos resultados nos permiten especular que si bien las enzimas glucolíticas mostraron valores disminuidos en su actividad, la fuente regeneradora de NAD⁺, principalmente la cadena transportadora de electrones, podría estar afectada por el daño oxidativo a nivel de membrana mitocondrial, lo que impediría que el NADH sea oxidado a través de ella. Por otra parte, se analizó el contenido de grupo carbonilos en proteínas, como otro parámetro indicativo del estrés oxidativo producido en estas biomoléculas. Así, se observó un aumento de grupos carbonilos en proteínas en función de la dosis de las drogas AIA/DDC. A su vez, se analizaron las secuencias

de aminoácidos, presentes en los sitios catalíticos y de unión al sustrato o a cofactores de las distintas enzimas estudiadas. Los resultados obtenidos evidenciaron un porcentaje de 25-30% de aminoácidos blanco del daño oxidativo en las enzimas estudiadas. En el caso de la GR el sitio catalítico de la enzima está formado por aminoácidos susceptibles de ser carbonilados; para la G6PDH el daño oxidativo no sería tan importante, ya que ninguno de los cinco sitios de unión para el NADP⁺ posee aminoácidos susceptibles de ser alterados, y solo el 50% de los sitios de unión al sustrato podría estar afectado. En conclusión, teniendo en cuenta estos resultados, se puede especular que las alteraciones producidas en el catabolismo de la glucosa, en este modelo experimental, pueden estar relacionadas, en parte, con el daño oxidativo causado por las ROS sobre las estructuras de las proteínas enzimáticas y que esta situación podría asociarse al beneficio que la administración de hidratos de carbono produce en pacientes con porfiria hepática aguda.

ABREVIATURAS

AIA, 2-*alil-2-isopropil acetamida*; ALA, *ácido δ-aminolevulínico*; ALA-S, *ácido δ-aminolevulínico sintetasa*; CAT, *catalasa*; DDC, *3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidrocolidina*; DTNB, *ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico*; F6P, *fructosa 6-fosfato*; G6P, *glucosa 6-fosfato*; G6PDH, *glucosa 6-fosfato deshidrogenasa*; GK, *glucoquinasa*; GPx, *glutatióñ prexidasa*; GR, *glutatióñ reductasa*; GSH, *glutatióñ reducido*; GSSG, *glutatióñ oxidado*; GST, *glutatióñ S-transferasa*; HK, *hexoquinasa*; MTT, *bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio*; PAI, *porfiria aguda intermitente*; PBG, *porfobilinógeno*; Pes, *etosulfato de fenazina*; PFK, *fosfofructoquinasa*; PK, *piruvato quinasa*; PPP, *camino de las pentosas*; PV, *porfiria variegata*; ROS, *especies reactivas de oxígeno*; SOD, *superóxido dismutasa*.

INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo del hemo

1.1.1. Generalidades

El hemo lleva a cabo numerosas funciones vitales en la fisiología de los mamíferos, incluyendo la de ser grupo prostético de hemoproteínas mediando el transporte y reserva de oxígeno, la generación de energía celular, la biosíntesis de ciertas hormonas esteroideas, algunas reacciones de reducción y la detoxificación de xenobióticos. Además, el hemo está involucrado en la regulación de síntesis proteica y se ha demostrado su participación en la modulación del desarrollo celular (Bottomley y Müller Eberhard, 1988; Sassa, 1988).

En mamíferos, el grupo hemo se sintetiza principalmente en la médula ósea y en el hígado. Aproximadamente el 85% del hemo es sintetizado en células eritroides y se destina a la producción de hemoglobina. La regulación de la síntesis en estas células involucra a dos genes, uno específico de eritrocitos [δ -aminolevulinico sintetasa-2 (ALA-S 2), ubicado en el cromosoma X] y otro ubicuo [δ -aminolevulinico sintetasa-1 (ALA-S 1), ubicado en el cromosoma 3] (May y col., 1995), dado que todas las células nucleadas tienen la necesidad de sintetizar hemo para los citocromos respiratorios.

El 15% restante es sintetizado en hígado y es utilizado como grupo prostético de enzimas dependientes del citocromo P450 y de otras hemoproteínas. Cualquier deficiencia o exceso de hemo es tóxico para el hepatocito, por tanto la producción tiene que ser controlada finamente, sobre todo en su paso limitante, el catalizado la enzima δ -aminolevulínico sintetasa (ALA-S). Por consiguiente, el gen ALA-S 1 hepático se regula de diversas maneras para asegurar niveles adecuados de hemo intracelular (May y col., 1995).

1.1.2. Metabolismo del hemo

El camino biosintético del hemo en células de mamíferos involucra ocho pasos enzimáticos. La primera de las ocho enzimas involucradas, al igual que las últimas tres, están situadas en las mitocondrias, mientras que el resto están en el citoplasma. La vía se inicia con la condensación de la glicina y succinil-CoA en una reacción catalizada por la enzima ALA-S para formar ácido δ-aminolevulínico (ALA), actuando el fosfato de piridoxal como cofactor. Este paso ocurre dentro de la mitocondria, el ALA es transportado al citoplasma, y luego de tres pasos enzimáticos, el coproporfirinógeno ingresa a la matriz mitocondrial donde finaliza la formación del hemo. Este camino es regulado por retroalimentación negativa, ya que la acumulación de hemo inhibe a la enzima ALA-S (por lo que es considerada como reguladora del metabolismo) (Fig. 1).

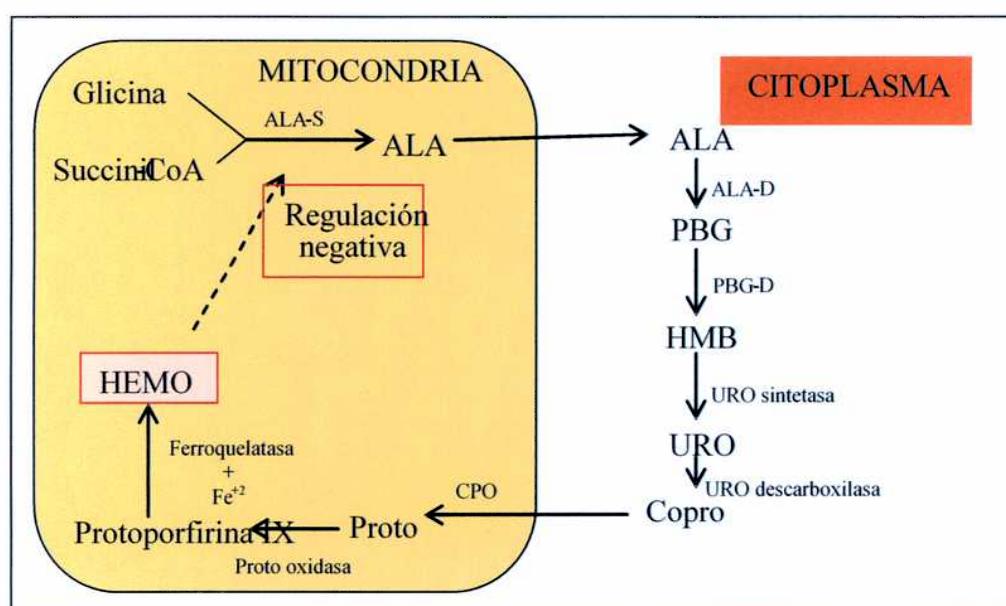


Fig. 1. Camino biosintético del Hemo. ALA: ácido δ-aminolevulínico; ALA-S: ALA-Sintetasa; ALA-D: ALA-Dehidrasa; PBG: porfobilinógeno; PBG-D: PBG deaminasa; HMB: hidroximetilbilano; URO: uroporfirinógeno; Copro: coproporfirinógeno; CPO: coproporfirinógeno oxidasa; Proto: protoporfirinógeno.

1.1.2.1. Regulación del metabolismo del hemo

Los mecanismos de regulación son diferentes según de tejido. Así, estos mecanismos muestran diferencias en la regulación transcripcional y el transporte de ALA en células de la médula ósea y del hígado.

En células eritrocitarias, el hemo es incorporado a la hemoglobina, luego de que éstos se diferencian. Cuando los eritrocitos maduran, tanto la síntesis de hemo como de hemoglobina cesa. La síntesis de las enzimas participantes en el metabolismo del hemo ocurre en condiciones de hipoxia bajo el control de eritropoyetina. En ausencia de hierro, el mRNA de ALAS-2 es bloqueado y el transporte de la enzima es inhibido (Ponka, 1999).

En el hígado, el hemo es incorporado a los citocromos, en particular al citocromo P450 importante en la detoxificación celular. Se han identificado tres potenciales puntos de regulación del hemo sobre el ALA-S hepática: (a) nivel transcripcional, (b) desestabilización del mRNA de ALA-S o (c) la modulación de la entrada de la enzima a la mitocondria (May y col., 1995).

1.1.3. Alteraciones del metabolismo del hemo

El metabolismo del hemo es blanco de diversos estudios dada la cantidad de deficiencias genéticas que alteran a las enzimas participantes del mismo. Algunos de estos desórdenes son diagnosticados fácilmente porque generan un aumento de ALA y otros metabolitos presentes en sangre, orina y otros tejidos (como los dientes y huesos). Uno de los desórdenes más conocidos son las porfirias. Esta patología presenta diversos patrones de acumulación, superproducción y excreción de intermediarios de la síntesis del hemo, dependiendo de que enzimas se vean alteradas genéticamente por mutaciones. En el gen ALA-S 1 no se han encontrado variaciones alélicas (Elder, 1998).

1.1.4. Porfirias

Las porfirias son un grupo de patologías asociadas con desórdenes en el metabolismo del hemo que conducen a la sobreproducción de precursores de hemo, los cuales son asociados con diversos cuadros clínicos. Cada tipo de porfuria está relacionada con la disminución de alguna de las enzimas del camino. Con la excepción de la primera enzima, la alteración de cualquiera de las siete restantes

porfirias

lleva a la acumulación y excesiva excreción de porfirias y/o sus precursores (Anderson y col., 2001).

1.1.4.1. Clasificación de las porfirias

Se han utilizado diversos criterios para clasificar las porfirias, como por ejemplo el tipo de tejido de origen (hígado o sistema hematopoyético). Otro tipo de clasificación es en primarias y secundarias. Las porfirias primarias son hereditarias, y las secundarias, aquellas que son adquiridas. Estas últimas son las más frecuentes.

Las porfirias primarias presentan manifestaciones neurológicas y/o cutáneas, como ataques neuropsiquiátricos o sensibilidad de la piel a la luz del sol. El síndrome neuropsiquiátrico ocurre solamente en porfirias en las cuales hay inducción de ALA-S hepática y consiguiente excreción urinaria aumentada de ALA. Los ataques característicos se pueden desencadenar por drogas tales como etanol, fármacos anticonvulsivos, barbitúricos, dietas hipocalóricas y alteraciones hormonales, resultando en dolor abdominal, taquicardia, neuropatías, psicosis y otros disturbios mentales, pudiendo sobrevenir la muerte. (Elder, 1998; Thadani y col., 2000; Thunell, 2000). Según los síntomas clínicos que presenten se las puede clasificar en neurológicas, cutáneas o mixtas.

Las porfirias secundarias (llamadas también hepáticas inducidas) son causadas por intoxicación con alcohol, éter, morfina, óxido nitroso o plomo y otros metales pesados.

Aunque no está definitivamente probado, personalidades históricas parecen haber sufrido de porfiria incluyendo al Rey George III (Macalpine y col., 1968), Friedrich Wilhelm I de Prussia (Macalpine y col., 1968; Pierach y Jennewein, 1999), y Vincent van Gogh (Bonkovsky y col., 1992; Loftus y Arnold, 1991).

1.1.1.4.2. Tipos de porfirias (Tabla 1)

en el gen ALA-Delishara

★ *Déficit de porfobilinógeno sintetasa (ALA-D)*: el patrón de herencia es autosómico recesivo. Los síntomas clínicos son neuropatías y dolor abdominal. Las

intoxicaciones con etanol, plomo o hierro pueden producir porfirias adquiridas por la inhibición de esta enzima.

- ★ *Porfiria aguda intermitente (PAI)*: su patrón de herencia es autosómico dominante y resulta del déficit de PBG-D. Es frecuente en mujeres y suele aparecer después de la pubertad. Se eliminan grandes cantidades de PBG y ALA por la orina. Se trata de un enfermedad ecogenética, porque en el caso de los heterocigotos, depende mucho de las condiciones del ambiente para que la enfermedad se manifieste o no. Para producir una recuperación más rápida se administra hemo intravenoso.
- ★ *Coproporfiria hereditaria (CH)*: la patología se da por la deficiencia de la enzima CPO, siendo el patrón de herencia autosómico dominante. Los pacientes presentan síntomas neuroviscerales y fotosensibilidad cutánea. Existen factores de riesgo, como algunos barbitúricos o anticonceptivos, así como también la gestación.
- ★ *Porfiria variegata (PV)*: provocada por el déficit de la actividad de la PPO y se hereda de forma autosómica dominante. Es común en Sudáfrica y los enfermos presentan síntomas neurológicos, fotosensibilidad o ambas situaciones.
- ★ *Porfiria cutánea tarda (PCT)*: es la forma más frecuente de porfiria, siendo más común en hombres que en mujeres. Aparece en la edad media o adulta. Puede clasificarse en tipo I, II y III, según sea el origen de la disminución de la actividad enzimática. El síntoma principal es la fotosensibilidad. El exceso de alcohol, estrógenos, hierro o la exposición a compuestos organoclorados son factores que contribuyen al desarrollo de esta patología.
- ★ *Porfiria hepatoeritropoyética (PHE)*: producida por un déficit de la uroporfirinogeno III descarboxilasa (URO-D). Su patrón es de tipo autosómico recesivo. Desde el punto de vista clínico es similar a la PEC, pero el exceso de porfirias se da, además, en la medula ósea y en el hígado.
- ★ *Porfiria eritropoyética congénita (PEC)*: conocida como enfermedad de Günter. Sigue un patrón autosómico recesivo y consiste en la deficiencia de uroporfirinogeno III co-sintetasa (URO-co-S). Los enfermos presentan anemia hemolítica y fotosensibilidad cutánea. Las porfirinas se depositan en los dientes y

en los huesos, por lo que estos aparecen de un color marrón rojizo y se observan fluorescentes a la luz UV.

★ *Protoporfiria Eritropoyética (PE)*: es una enfermedad autosómica dominante debido a la disminución de la actividad de la *ferroquelatasa* (E.C. 4.99.1.1). Es la forma más común de porfiria. La enzima puede utilizar sustratos alternativos, por lo que su valoración es importante frente a una posible intoxicación por metales pesados. El daño hepático es grave y progresivo.

Tabla 1: Resumen de las porfirias más comunes en humanos.

PORFIRIAS		
NOMBRE	HEREDABILIDAD	CLASIFICACIÓN
Porfiria por deficiencia de ALA-D (ADP)	Autosómica recesiva	Hepática
Porfiria aguda intermitente (PAI)	Autosómica dominante	Hepática
Coproporfiria hereditaria (CH)	Autosómica dominante	Hepática
Porfiria variegata (PV)	Autosómica dominante	Hepática
Porfiria cutánea tarda (PCT)	variable	Hepática
Porfiria hepatoeritropoyética (PHE)	Autosómica recesiva	Hepática/Eritropoyética
Porfiria Eritropoyética congénita (PEC)	Autosómica recesiva	Eritropoyética
Protoporfiria Eritropoyética	Autosómica dominante	Eritropoyética

1.1.4.3. Tratamientos

Antes de comenzar con tratamientos específicos, los cuales actúan a nivel del camino biosintético, se deben tener en cuenta algunos puntos generales. Los ataques de porfiria hepática aguda inducible se tratan generalmente discontinuando la exposición a los agentes de precipitación, especialmente drogas (como anticonceptivos), infecciones o dietas hipocalóricas. Algunas manifestaciones psiquiátricas son controladas con tranquilizantes como clorpromasina o drogas de la familia de la morfina (petidina o diamorfina).

Existen dos terapias específicas empleadas para reducir la sintomatología de las porfirias: administración de glucosa y hematina.

La hematina es administrada de forma intravenosa, ingresa al hepatocito en forma de hemo supliendo al endógeno disminuido, de esta forma la excreción de ALA y PBG en orina disminuye drásticamente dentro de los 2-3 días post-administración. Así, se recupera la regulación sobre el ALA-S. La administración semanal ayuda a mantener controlada esta patología (Mustajoki y Nordmann, 1993; Elder y Hift, 2001).

La administración de la glucosa lleva a la reducción de la excreción de precursores porfíricos en la orina a través de mecanismos no dilucidados aún. Sin embargo, se sabe que los ataques porfíricos se agravan frente a situaciones hipocalóricas, por lo que se propone que altas dosis de glucosa reprimirían al ALA-S. La glucosa se administra de forma intravenosa lentamente.

1.1.4.4. Inducción de porfirias

Desde hace ya medio siglo se sabe que el metabolismo del hemo es susceptible de interferencia por un gran número de sustancias químicas, como ciertas drogas que pueden alterar su regulación en el hígado de animales de laboratorio y humanos (Nielsen, 1953; Schmidt, 1963) causando una condición de porfiria hepática que se caracteriza por la acumulación de metabolitos de dicho camino, como son las porfirinas y sus precursores, ALA y PBG (Tschudy y Bonkowsky, 1972).

Un logro muy importante en la elucidación del mecanismo de inducción de porfirias por drogas fue el hallazgo de Granick y Urata (1963) quienes encontraron la actividad hepática de la enzima ALA-S francamente aumentada en una porfiria experimental causada por la administración a embriones de pollo de 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidrocololidina (DDC), hallazgo que luego se extendió a la porfiria experimental causada por 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA) (Marver y col., 1966) y por otras drogas (Nakao y col., 1967; De Matteis y Gibbs, 1972).

El ALA-S es el paso más limitante del camino y también el sitio donde el hemo, producto final de dicha vía, ejerce su control por un mecanismo de retroalimentación negativa (Sassa y Granick, 1970; Fig. 1).

El mecanismo por el cual cada una de las diferentes drogas estimula la actividad de la ALA-S hepática no es completamente claro. Existen diferentes tipos de drogas capaces de producir porfirias experimentales (De Matteis, 1972). Algunas drogas como el AIA, estimulan la degradación del citocromo P450 produciendo una disminución en el pool de hemo regulatorio que induce el aumento de la actividad de la enzima ALA-S. Otras drogas como el DDC o la griseofulvina, inhiben la actividad de la enzima ferroquelatasa inhibiendo, así, la síntesis de hemo, el cual es incapaz de regular la actividad de ALA-S (Fig. 2).

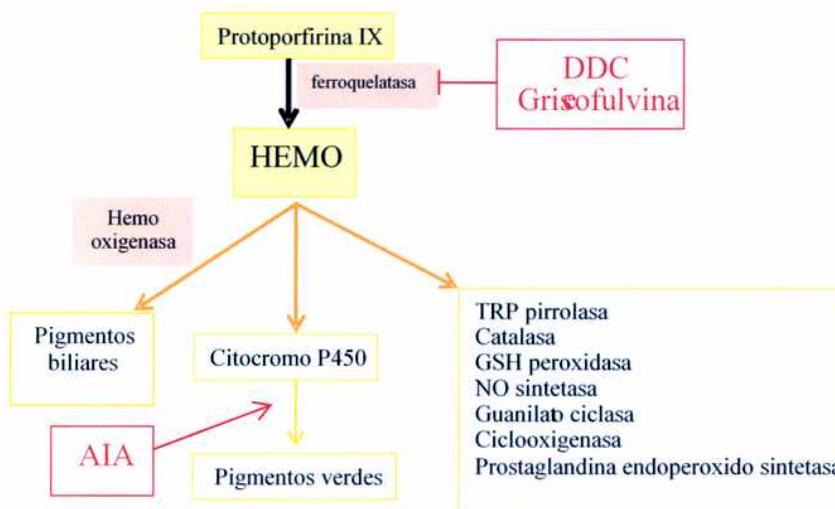


Fig. 2: Esquema de acción de las distintas drogas . Sitios de acción del AIA, DDC y griseofulvina.

El compuesto porfirinogénico AIA, produce una pérdida del hemo debida, por un lado, al aumento de su destrucción y por el otro, a la conversión del mismo en pigmentos verdes (De Matteis, 1971; Meyer y Marver, 1971). Aunque la fracción microsomal es el sitio donde se da la mayor destrucción del hemo, también ha sido observada su desaparición en fracción citosólica y mitocondrial, lo que concuerda con el hallazgo de inducción de la actividad de sintetasa por AIA en ambos sitios (Hayashi y col. 1969).

1.2. Metabolismo de los hidratos de carbono

1.2.1. Generalidades

Los hidratos de carbono, también llamados carbohidratos, forman un grupo de compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Las plantas verdes y las bacterias los producen en el proceso conocido como fotosíntesis, durante el cual absorben el dióxido de carbono del aire por acción de la energía solar para producir principalmente glucosa, necesaria para almacenar energía (en forma de trifosfato de adenosina, ATP). En las plantas la celulosa es el principal elemento estructural. En los animales invertebrados, el polisacárido quitina es el principal componente del exoesqueleto. En los animales vertebrados, las capas celulares de los tejidos conectivos contienen hidratos de carbono. Para almacenar la energía, las plantas usan almidón y los animales, glucógeno.

Los glúcidos más sencillos son denominados monosacáridos, y el más importante es la glucosa (Fig. 3). De fórmula $C_6H_{12}O_6$, es un sólido cristalino de color blanco. Se caracteriza por tener una función hidroxilo (-OH), característica de los alcoholes, en cada uno de los carbonos, excepto en el primero donde presenta una función aldehído. Es la fuente primordial para obtener energía a través de la respiración celular.

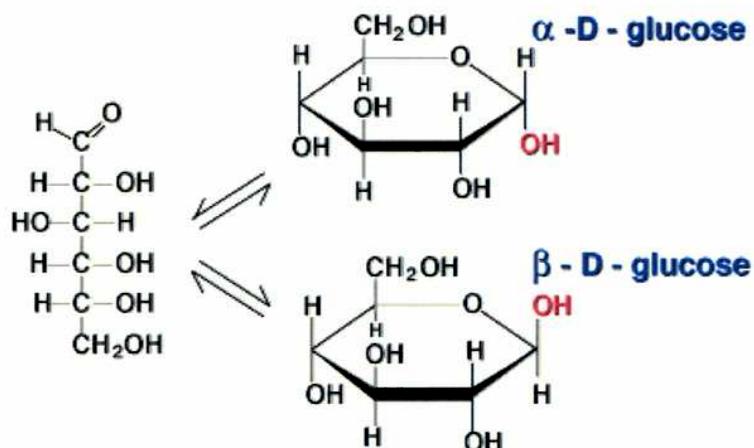


Fig. 3: Estructura de la glucosa. Según la conformación que adopte el OH del Carbono 5, se la denomina α y β D-glucosa.

Los hidratos de carbono son uno de los tres constituyentes principales del alimento y resultan mayoritarios en la dieta humana. El metabolismo de las grasas y ciertas proteínas a veces se dirige también a la producción de glucosa. Esta sustancia es el principal combustible de los músculos y otras partes del organismo que lo metabolizan para obtener energía. Está presente en las células, desde los microorganismos hasta el humano. La regulación de su concentración y distribución constituye uno de los procesos más importantes.

Los polisacáridos son moléculas formadas por uno o varios tipos de unidades de monosacáridos. Pueden o no tener el mismo tipo de monosacárido como eslabón en esas cadenas. El glucógeno es la forma principal en que se almacena la glucosa en los vertebrados. Su estructura es muy semejante a la amilopectina, salvo que es mucho más ramificado (una ramificación cada 8 o 10 unidades de glucosa). Se almacena en el hígado y tejido muscular.

1.2.2. Metabolismo de la glucosa

Varios grupos han demostrado que el hígado además de ser un órgano que genera glucosa, también es un órgano que la capta en respuesta a un aumento de la concentración del azúcar por sobre los niveles fisiológicos en el sistema porta.

Esto quiere decir que si un hombre consume 100 gramos de glucosa, luego de la absorción de la misma por diferentes tejidos, aproximadamente el 60% será almacenado por el hígado para su posterior utilización (Ferrannini y col., 1980).

Una vez que la glucosa es absorbida por el intestino, viaja a través de la sangre y es incorporada en el hígado o tejido muscular como glucosa 6-fosfato (G6P), este es el paso inicial en el metabolismo de la glucosa. La fosforilación para formar G6P (Fig. 4) está catalizada por la enzima hexoquinasa (HK, 2.7.1.1).

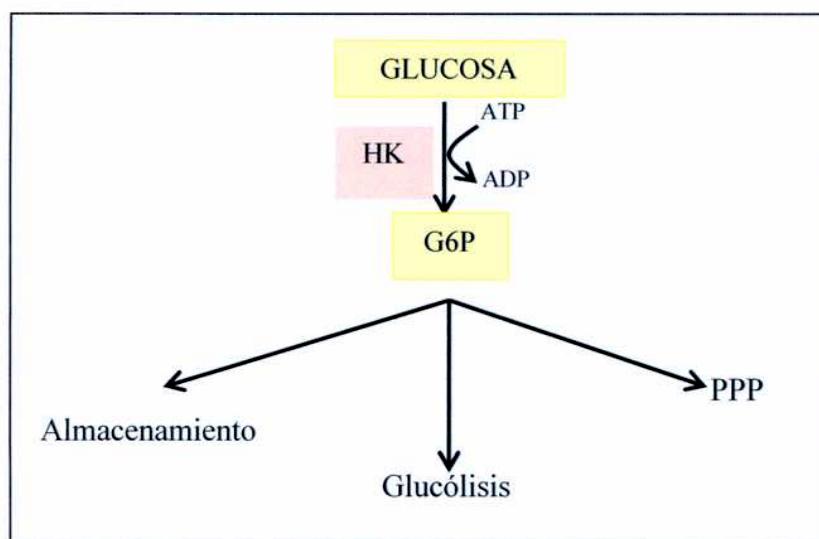


Fig. 4: Vías metabólicas de la (G6P). G6P, glucosa 6-fosfato; HK: hexoquinasa; PPP: camino de las pentosas.

La G6P puede metabolizarse siguiendo el camino de las pentosas, el cual es regulado por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, generando NADPH y precursores requeridos por una variedad de caminos anabólicos.

1.2.2.1. Glucólisis

También se lo conoce como ciclo de Embden-Meyerhof. Es el primer paso de la respiración celular, en el caso de que el oxígeno esté presente, o de la fermentación, cuando éste está ausente. Es una secuencia compleja de reacciones que se realizan en el citoplasma (Fig. 5), y por las cuales se desdobra una molécula de glucosa en dos de ácido pirúvico. Está catalizado por 11 enzimas que se encuentran en el citoplasma celular.

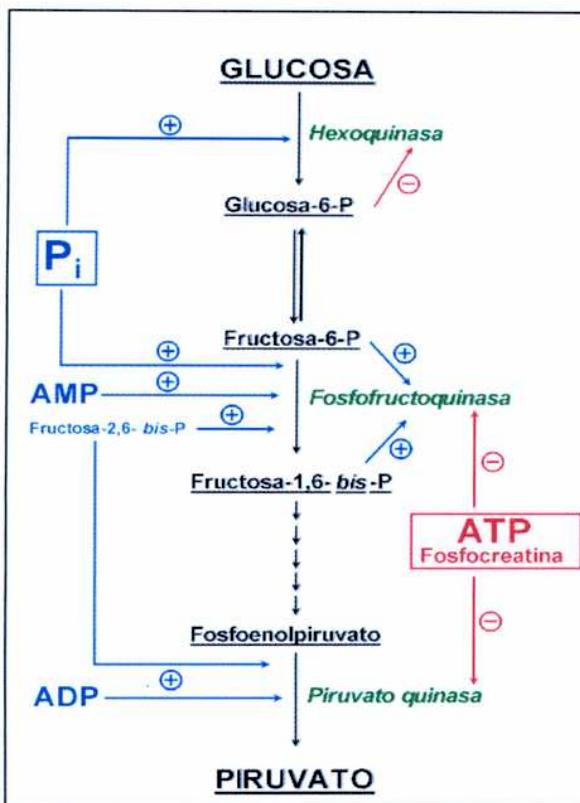


Fig. 5: Esquema de la regulación de la glucólisis. Se muestran los diferentes metabolitos que regulan los distintos pasos de la glucólisis. \oplus Estimulación; \ominus inhibición, P_i , fosfato inorgánico.

Las reacciones son catalizadas, cada una, por una enzima específica. En los primeros pasos se requiere del aporte de energía abastecido por el acoplamiento con el sistema ATP/ADP.

Primer paso: El ATP reacciona exergónicamente con la glucosa desprendiéndose un grupo fosfato que se ensambla con la glucosa para producir G6P y ADP. Esta reacción es catalizada por una enzima, la HK.

Segundo Paso: La molécula se reorganiza en un anillo pentagonal con ayuda de la enzima fosfoglucoisomerasa (FGI, E.C. 5.3.1.9), obteniéndose *fructosa 6 – fosfato* (F6P) (Fig. 6). La reacción puede seguir ambas direcciones, dependiente de las concentraciones de los intermediarios.

Tercer Paso: La F6P gana un segundo grupo fosfato mediante la intervención de una nueva molécula de ATP formándose una molécula de *fructosa 1,6 – bisfosfato* (F1,6bisP) (Fig. 6) en una reacción catalizada por una enzima

alostérica llamada fosfofructoquinasa (PFK, E.C. 2.7.1.11), donde el ATP actúa como efector alostérico inhibiéndola. La interacción entre la PFK y la F6P es el principal mecanismo regulador de la glucólisis. Si existe ATP en cantidades adecuadas para la vida normal de la célula, este inhibe la actividad de la enzima cesando la producción de ATP mientras que se conserva glucosa. Si la concentración de ATP es baja, la enzima se desinhibe y continúa la degradación de la glucosa.

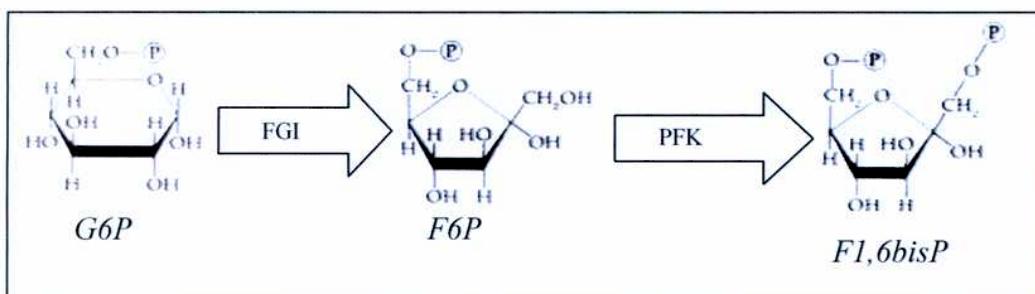


Fig. 6: Glucólisis. Esquema del 2º y 3º paso. G6P: glucosa 6-fosfato; F6P: Fructosa 6-fosfato; F1,6bisP: fructosa 1,6-bifosfato; FGI: fosfoglucoisomerasa; PFK: fosfofructoquinasa.

Cuarto paso: La F1,6bisP se escinde en dos moléculas de tres carbonos cada una: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído fosfato (GAP). Ambas son isómeros que pueden transformarse una en otra por acción de una enzima isomerasa (E.C. 5.3.1.9). Toda la DHAP se convierte eventualmente en GAP. A partir de este punto en las reacciones debemos multiplicar por dos los productos obtenidos para tener en cuenta el destino de una molécula de glucosa.

Quinto Paso: Cada GAP se oxida, con ayuda de la enzima triosafosfato deshidrogenasa (TPD, E.C. 1.2.1.9), la cual reduce el NAD⁺ en NADH. Esta es la primera reacción en la que la célula obtiene energía conservándose parte de ella en la unión de un grupo fosfato con GAP, el que se transforma en 1,3 difosfoglicerato (1,3diPG).

Sexto Paso: La enzima fosfoglicerato quinasa (PGK, E.C. 2.7.2.3) libera un fosfato del 1,3diPG, generando una molécula de ATP. Como esta reacción es muy exergónica impulsa a todas las reacciones previas para que avancen.

Séptimo paso: El grupo fosfato remanente se transfiere de la posición 3 a la 2 mediante la acción enzimática de la fosfogliceromutasa (PGM, E.C. 5.4.2.1).

Octavo paso: Se pierde una molécula de agua del compuesto. Mediante este reordenamiento interno, la molécula [y con ayuda de la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11)] concentra energía en la vecindad del grupo fosfato.

Noveno paso: El fosfato se transfiere a una molécula de ADP, obteniéndose una molécula de ATP y ácido pirúvico o piruvato. Esta reacción, catalizada por la *piruvato quinasa* (PK, E.C. 2.7.1.40), también es muy exergónica, de modo que impulsa a las dos reacciones precedentes.

Así, de una molécula de glucosa se obtiene de forma neta dos moléculas de ácido pirúvico, dos moléculas de ATP y cuatro moléculas de NADH.

1.2.2.1.1. *Glucoquinasa (GK)*

La HK posee cuatro isozimas (tipo I, II, III y IV), las cuales pueden ser diferenciadas por cromatografía de intercambio iónico o electroforesis (González y col., 1964). Las isozimas tipo I, II y III son fuertemente reguladas por la G6P, su afinidad por la glucosa es alta y su ubicación puede ser mitocondrial, perinuclear o citosólica (Wilson, 2003).

De las isozimas estudiadas, la hexoquinasa tipo IV, conocida como glucoquinasa (GK, E.C. 2.7.1.1) o hexoquinasa de alto Km, es la encargada de la fosforilación de la glucosa en los hepatocitos, en los islotes pancreáticos y en algunas neuronas neurosecretoras (Jetton y col., 1994). Es un componente clave de la maquinaria sensora de glucosa en mamíferos y juega un papel fundamental en la homeostasis celular. Tiene baja afinidad por la glucosa y no es inhibida por el producto de reacción (o sea, la G6P).

La actividad de la GK en hígado es modulada por una proteína conocida como proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP). Esta proteína se une a la GK compitiendo con el sustrato e inhibiéndola (Vandercammen y Van Schaftingen, 1993). Sin embargo, no muestra el mismo efecto sobre los tipos I, II y III (Veiga-da-Cunha y col., 1994; Veiga-da-Cunha y col., 1996). En roedores, la inhibición generada por la GKRP es disminuida por altas concentraciones de glucosa y fructosa 1-fosfato (F1P), mientras que la F6P la potencia (Van Schaftingen, 1987; Veiga-da-Cunha y col., 1994; Veiga-da-Cunha y col., 1996). Ambas proteínas, GK

y GKR, colocalizan en el núcleo de hepatocitos en medio de cultivo (Mookhtiar y col., 1996; Toyoda y col., 1995).

1.2.2.1.2. Fosfofructoquinasa (PFK)

PFK cataliza, mediante una reacción reversible, la fosforilación de F6P a F1,6bisP. Forma parte del punto más importante de la regulación del flujo glucolítico. Está altamente regulada por un número importante de factores, como el ATP y la fosfocreatina que inhiben su actividad; así como AMP, Pi, F6P, fructosa-2,6 bisfosfato (F2,6bisP), F1,6bisP y el citrato. También presenta inactivación en presencia de glucagon, según estudios cinéticos en hepatocitos (Castaño y col., 1979).

En mamíferos, levaduras y algunos protozoos y bacterias esta enzima utiliza ATP como donor de fosfatos. Mientras que la PFK (E.C. 2.7.1.90) de plantas y otras bacterias y protozoos utilizan el fósforo inorgánico (Pi). (Martinez-Oyanedel y col. 2006).

Es una enzima compleja que se encuentra en diferentes tejidos como combinaciones aleatorias de tres tipos distintos de subunidades: tipo muscular (PFK-M), tipo hepática (PFK-L) y tipo plaquetaria (PFK-P), las cuales son expresadas diferencialmente en varios tejidos. Por ejemplo, músculo e hígado contienen solo PFK-M y PFK-L respectivamente. Sin embargo, en los eritrocitos humanos existen varias combinaciones de los tipos M y L. (Levanon y col., 1989; Simpson y Fotherhill-Gilmore, 1991; Vora y Francke, 1981; Vora y col., 1982; Weil y col., 1980).

Una de las vías más estudiadas de la regulación de la glucólisis hepática es la de F2,6bisP, la cual es sintetizada y degradada por una enzima bifuncional, fructosa-6-fosfato 2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (F6P2K/F2,6bisPasa) (Uyeda, 1991, Van Schaftingen y col., 1987). Esta enzima es regulada por fosforilación y desfosforilación.

En condiciones donde el ATP es alto, la glucólisis hepática está fuertemente inhibida, ya que éste inhibe a la PFK, dejando bajos niveles de F2,6bisP. En cambio, en condiciones donde la glucemia es baja (bajos niveles de ATP), la

enzima bifuncional es desfosforilada y se incrementan los niveles de F2,6bisP. Esto lleva a la desinhibición de la PFK por parte del ATP, resultando en la activación de la glucólisis (Uyeda, 1991).

1.2.2.1.3. Piruvato quinasa (PK)

PK cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP en piruvato y ATP. La enzima, que aparece en todas las células vivas, es clave en la ruta central del metabolismo de carbohidratos. En la especie humana han sido caracterizados dos genes diferentes: El PK-M que, se encuentra en el cromosoma 15 y, codifica las isoenzimas del tejido muscular y de los leucocitos y la PK-LR, que aparece en el cromosoma 1, que codifica las isoenzimas del hígado y de los eritrocitos (Noguchi y col., 1987; Consler y col., 1989). La deficiencia de PK, debida a una mutación en el gen PK-LR, origina alteraciones, únicamente, en el metabolismo de los eritrocitos, porque estas células no son capaces de compensar el defecto enzimático aumentando la síntesis de enzima mutada ni utilizar otras rutas degradativas. Por ello, la deficiencia de esta enzima es causa principal de la anemia hemolítica no esferocítica; los síntomas clínicos de esta enfermedad abarcan desde un estado hemolítico compensado hasta una anemia grave que puede provocar incluso la muerte de los pacientes.

1.2.2.2. Gluconeogénesis

La glucosa puede sintetizarse en hígado y riñón, a partir de precursores no glucídicos como lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos (Fig. 7), estos dos últimos son precursores menos efectivos. Sin embargo, se ha observado que en algunas aves (como la paloma y la gallina) el piruvato y la alanina son los precursores más deficientes (Dickson y Langslow, 1978). El principal punto de entrada en esta vía es el piruvato que, en la mitocondria, se carboxila a oxalacetato. En el citosol, el oxalacetato se descarboxila y fosforila para formar PEP.

La gluconeogénesis y la glucólisis están normalmente reguladas en forma recíproca (Fig. 8), de modo que una de las vías está detenida cuando la otra es muy activa. Por ejemplo, el AMP inhibe y el citrato activa la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6bisPasa, E.C. 3.1.3.11), una enzima clave de la gluconeogénesis, mientras que las moléculas tienen efectos opuestos sobre la PFK, enzima reguladora de la

glucólisis. La F2,6bisP también coordina estos procesos porque inhibe a la F1,6bisPasa. Así pues, cuando la glucosa abunda, el nivel elevado de F2,6-bisP inhibe la gluconeogénesis y activa la glucólisis.

Las hormonas que regulan esta ruta metabólica son el glucagon, la insulina y las catecolaminas. El glucagon estimula esta vía, mientras que la insulina la inhibe.

- ↗ El efecto de las catecolaminas depende del estado nutricional del organismo. También existe regulación por parte de diferentes productos finales de esta vía.

1.2.2.3. Glucogenogénesis y glucogenolisis

La glucogenogénesis y la glucogenolisis (Fig. 9) son las vías por las cuales se sintetiza y degrada, respectivamente, el glucógeno.

La síntesis de glucógeno está regulada por la enzima *glucógeno sintetasa* (GS, E.C. 2.4.1.11), la cual cataliza la transferencia de glucosa desde la UDP-glucosa al hidroxilo terminal de la cadena de glucógeno en crecimiento.

El glucógeno se degrada por una vía diferente. La glucógeno fosforilasa (GP, E.C. 2.4.1.1) cataliza la escisión del glucógeno formando glucosa-1-fosfato (G1P). La síntesis y degradación del glucógeno están controladas coordinadamente por una cascada amplificadora disparada por hormonas, de modo que la GS es inactiva cuando la GP es activa, y viceversa.

Estas enzimas están controladas por fosforilación y por interacciones alóstéricas no covalentes. En un estado de buena alimentación, la GS es activada alstericamente por G6P cuando está presente en concentraciones elevadas. Por el contrario, la GP es inhibida, de la misma forma, por la G6P, así como por el ATP.

La GP hepática se activa por transfosforilación (del ATP), debida a la enzima quinasa desfosforilasa, en presencia de magnesio. Esta activación es acelerada varias veces por el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc, o fosfato de 3,5-ribosa-adenina cíclica). El glucagón y la adrenalina triplican la formación de AMPc, por lo tanto, activan así la GP hepática, lo que explica su potente efecto glucogenolítico.

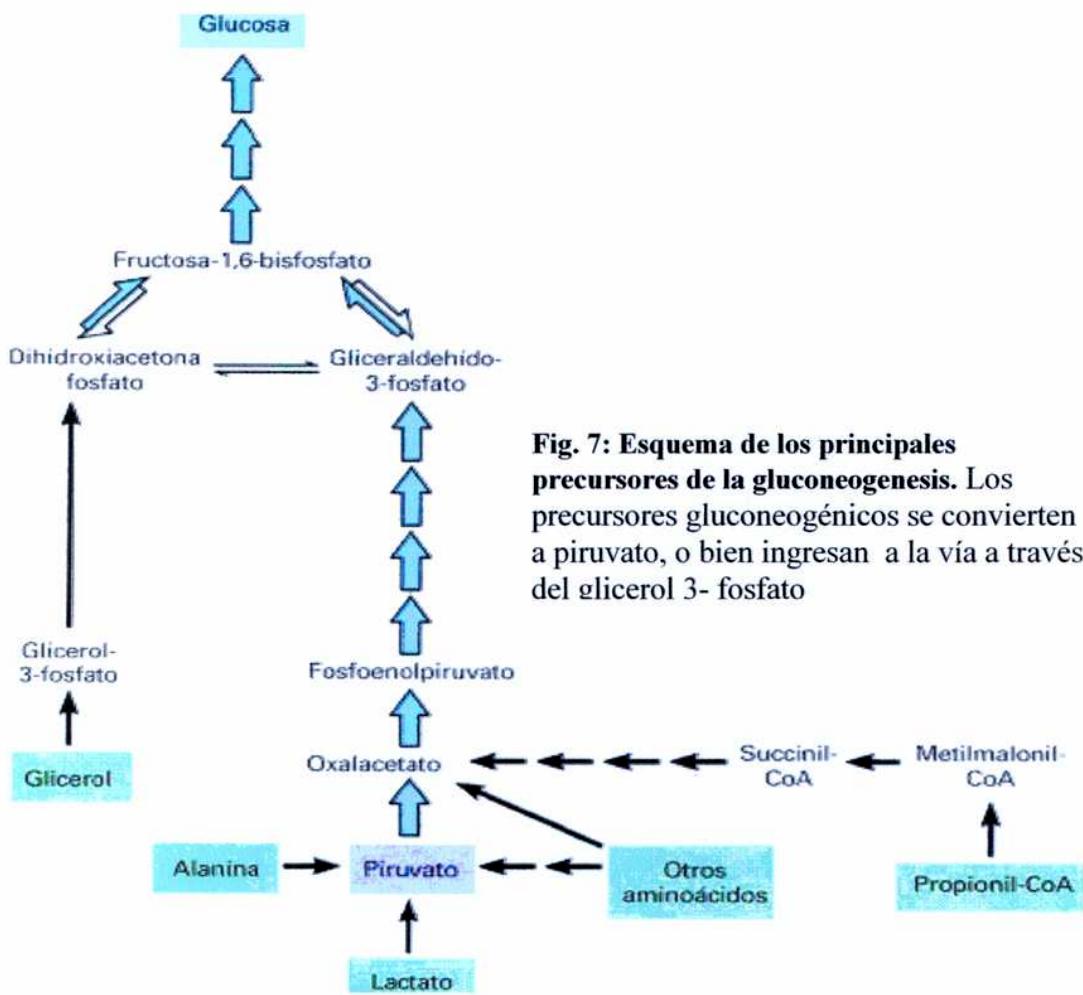


Fig. 7: Esquema de los principales precursores de la gluconeogénesis. Los precursores gluconeogénicos se convierten a piruvato, o bien ingresan a la vía a través del glicerol 3- fosfato

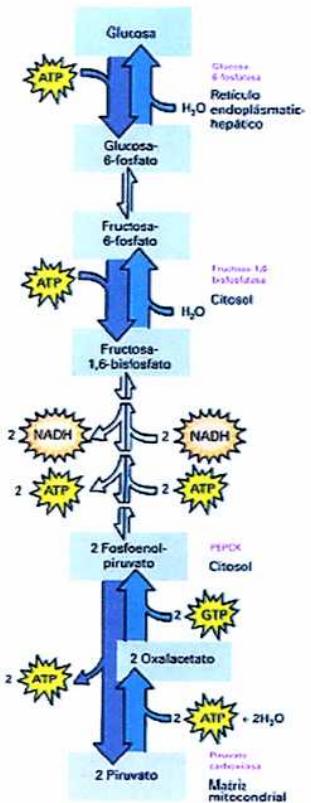


Fig. 8: Regulación de la gluconeogénesis y de la glucólisis. Se muestran las reacciones de ambas vías metabólicas.

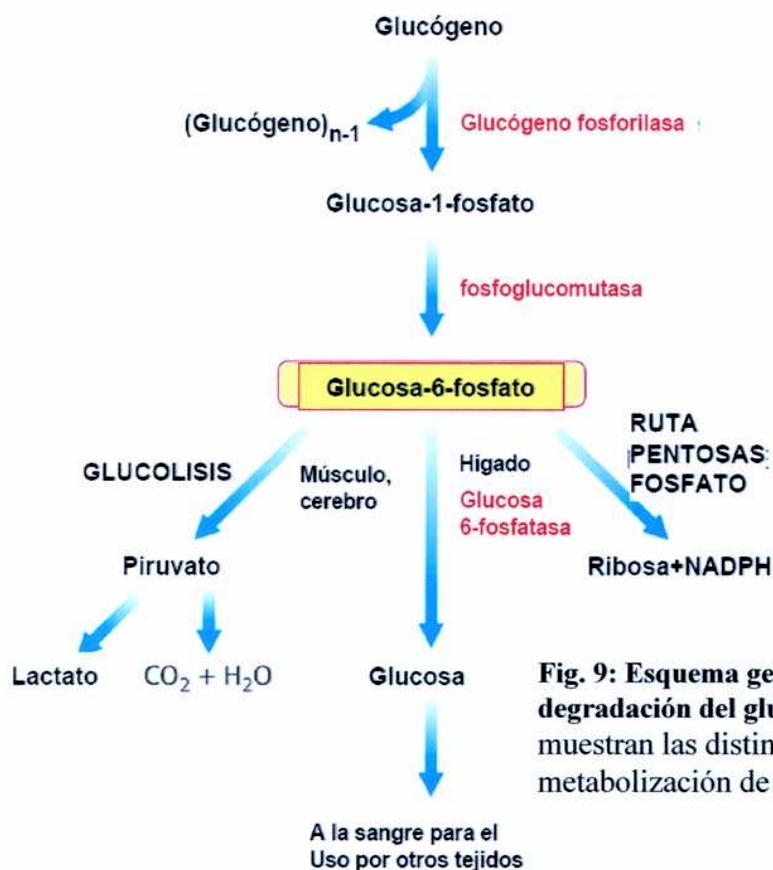


Fig. 9: Esquema general de la degradación del glucógeno. Se muestran las distintas vías de metabolización de la glucosa

1.2.2.4. Camino de las Pentosas

El camino de las pentosas (PPP) consiste en una serie de reacciones que ocurren en el citosol. Este camino cumple con 2 funciones principales: generar NADPH a partir de NADP, el cual es empleado para reacciones biosintéticas y como sustancia protectoras de las células contra el estrés oxidativo, y ribosa-5-fosfato (R5P) empleada para la síntesis de ácidos nucleicos (Fig. 10) (Barret, 1997).

En la mayoría de los organismos las enzimas que forman parte de PPP están localizadas en el citosol, con la excepción de las plantas, en las cuales están presentes en plástidos (Eicks y col., 2002). En el hígado de rata, existe una fracción menor de todas las enzimas de este camino que están localizadas en el

- retículo endoplasmático (Bublitz y Steavenson, 1988), y dos de las deshidrogenasas
- ↑ también están presente ~~también~~ en los peroxisomas (Antonenkov, 1989)

La G6P ingresa al PPP transformándose en R5P y genera 2 moléculas de NADPH. Este camino posee dos fases: una de reducción y otra de oxidación. La fase de oxidación es la responsable de la producción de NADPH y la síntesis de ácidos grasos, así como también de otras moléculas básicas de los tejidos animales. La actividad lipogénica es el estímulo más fuerte de esta fase del ciclo.

El control normal de este camino está dado por la variación en las cantidades de las enzimas presentes. Por ejemplo, la lipogénesis en ratas alimentadas con hidratos de carbono está relacionada con el aumento de la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6GDH, E.C. 1.1.1.44) de 5 a 10 veces en el hígado (Tepperman y Tepperman, 1958; Fitch y col., 1959^a; Fitch y col., 1959^b; Fitch y Chaikoff, 1960; Winberry y Holten, 1977). El control fino, en cambio, depende de la relación citoplasmática de NADPH/NADP⁺ (Kather y col., 1972; Sapag-Hagar y col., 1973). El NADPH se comporta como un potente inhibidor de la G6PDH y la 6GDH al competir con el NADP⁺ por el sitio activo de estas enzimas.

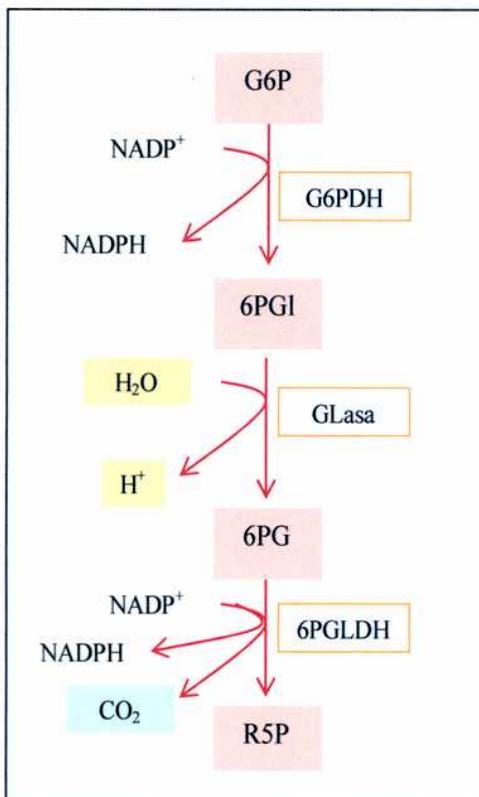


Fig. 10: Esquema de la vía de las pentosas. G6P, glucosa 6-fosfato; 6PGl, 6-fosfoglucolactona; 6PG, 6-fosfogluconato; R5P, ribosa 5-fosfato; G6PDH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; GLasa, glucolactonasa; 6PGLDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

1.2.2.4.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La principal función de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, E.C.1.1.1.49) es la de abastecer a la célula de ribosas para la síntesis de DNA y RNA a través de PPP, permitiendo así la proliferación celular (Stryer, 2002). Sin embargo, una función aún más importante es la producción de NADPH, el componente reductor citoplasmático más importante (Fig. 11).

Ha sido demostrado que la G6PDH es la enzima reguladora de la biotransformación de xenobióticos y defensas contra el estrés oxidativo dependientes de NADPH (Spolarics, 1998; Biagiotti y col., 2000).

El mantenimiento del pool de NADPH, regula los niveles de glutatió reducido, encargado, a su vez, de remover de las células compuestos muy nocivos tales como los peróxidos. Este proceso es importante en los glóbulos rojos y granulocitos ya que éstos se caracterizan por no poseer mitocondrias siendo únicamente posible la reducción del NADP por esta vía. El NADPH es esencial para la integridad de los glóbulos rojos, ya que el glutatió los protege del estrés

oxidativo. La acumulación de compuestos tales como peróxidos produce hiperoxidación lipídica de las membranas, así como también la oxidación del hierro de la hemoglobina.

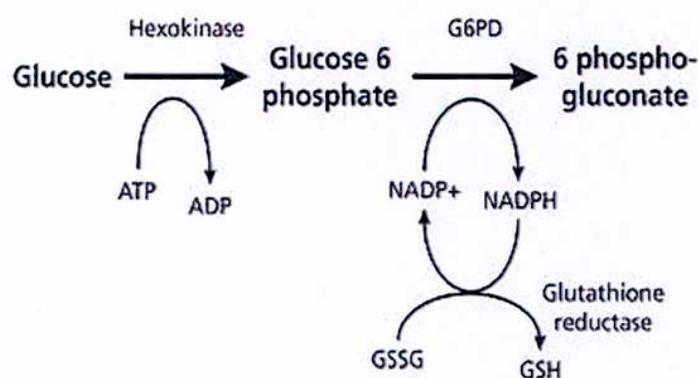


Fig. 11: Generación de NADPH. Se muestran las enzimas que actúan tanto en la producción de NADPH, como las involucradas en la restauración de glutatión reducido (GSH). G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

La G6PDH está localizada principalmente en la fracción microsomal de numerosos tejidos así como también en el citosol (Mandula y col., 1970). Una tercera actividad fue descripta por Zaheer y col. (1967), el cual la caracterizó en la fracción mitocondrial del hígado luego de varios pasos de purificación. Ésta fue comparada con la actividad de la Hexosa-6 fosfato deshidrogenasa (H6PDH), dado que ambas son purificadas juntas y tienen similar función con una única diferencia: la G6PDH solo utiliza glucosa como sustrato a diferencia de la H6PDH que tiene la misma afinidad por todas las hexosas.

1.3. Estrés oxidativo

1.3.1. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

Un radical libre (R^{\cdot}) es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en R^{\cdot} captando o perdiendo un electrón. Asimismo, los R^{\cdot} también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de

poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen, por tanto, vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Armstrong y col., 1984; Cadenas, 1989; Pryor, 1986; Webster y Nunn, 1988).

La molécula de oxígeno (O_2), como tal, puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones desapareados, cada uno de ellos localizados en un orbital antienlazante π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el O_2 pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese R^\cdot aceptando un par de electrones, estos deberían tener espines paralelos (Cadenas, 1989; Webster y Nunn, 1988). Según el principio de exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el O_2 aumente su reactividad tendría que invertirse el spin de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univaleente produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. 12).

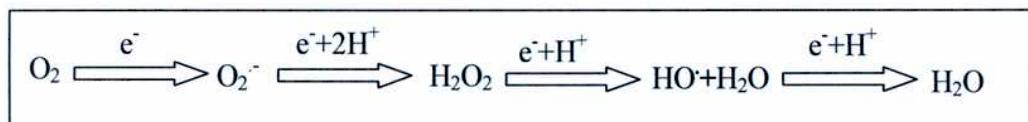


Fig. 12: Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular. O_2 , oxígeno molecular; O_2^\cdot , anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; OH^\cdot , hidroxilo; H_2O , agua.

La inversión de los electrones de los orbitales externos del O_2 origina dos formas de oxígeno singulete: el oxígeno singulete delta (δ), que debido a su larga vida media es el de mayor importancia biológica, y el oxigeno singulete sigma (σ), más reactivo que el anterior pero de corta vida media porque rápidamente decae al estado delta (Cadenas, 1989; Proctor y Reynolds, 1984; Webster y Nunn, 1988).

Cuando un único electrón reduce la molécula de O_2 se produce el anión superóxido (O_2^\cdot) (Fig. 13, ecuación 1). Esta es una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación (Cadenas, 1989; Fridovich, 1993). Si son dos los

electrones que se incorporan al O₂ se forma el ión peróxido (O₂⁻²), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este compuesto es peligroso para las células, porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el radical hidroxilo (OH[·]) (Mello-Pilho y col., 1984; Pryor, 1986; Pryor y Church, 1991). La reducción de O₂ por tres electrones da lugar al citado OH[·]. Esta especie es una de las más reactivas que se conocen y, por tanto, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y ángstrom, respectivamente). Así, es improbable que el OH[·] formado en la mitocondria, por si mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula (Pryor, 1986). Una fuente importante de OH[·] es la reacción de Haber-Weiss que es, a su vez, el balance de dos reacciones (Fig. 13, ecuaciones 2, 3 y 4) (Halliwell y Gutteridge, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1992; King y col., 1982). Finalmente, la reducción tetravalente del O₂ origina una molécula de agua (H₂O).

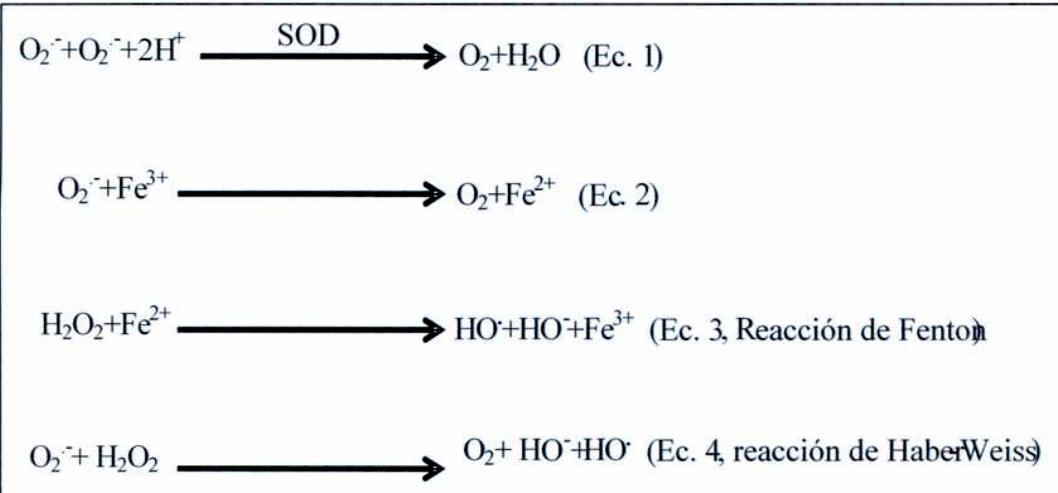


Fig. 13: Formación de radicales libres. SOD, superóxido dismutasa

1.3.2. Toxicidad de xenobióticos mediada por ROS

La formación de R[·] está implicada en la toxicidad de un amplio rango de xenobióticos. Realmente muchos compuestos químicos, para ejercer su acción tóxica, requieren una activación metabólica a intermediarios reactivos que pueden ser R[·] (Halliwell y Gutteridge, 1989; Mason, 1982; Proctor y Reynolds, 1984).

La activación de muchos xenobióticos a intermediarios radicales se puede realizar por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. La mayor parte de los compuestos se activan por una vía catalizada enzimáticamente. Distintas reductasas están implicadas en esta activación de xenobióticos a R· (Kappuz, 1986). En cualquier caso, el R·, formado por la captación de un electrón, puede sufrir una reducción adicional y convertirse en un metabolito capaz de interactuar con distintas biomoléculas, o bien, en presencia de O₂, puede transferir el electrón a este último, produciendo O₂· y regenerando la molécula original (R).

La formación de intermediarios R· de muchos compuestos químicos está catalizada por la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador de electrones (Trush y col., 1982). En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NAD(P)H y O₂ y generación de O₂· y otras ROS (Fig. 14). Este ciclo redox conduce una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos, a la muerte celular (Sies, 1985).

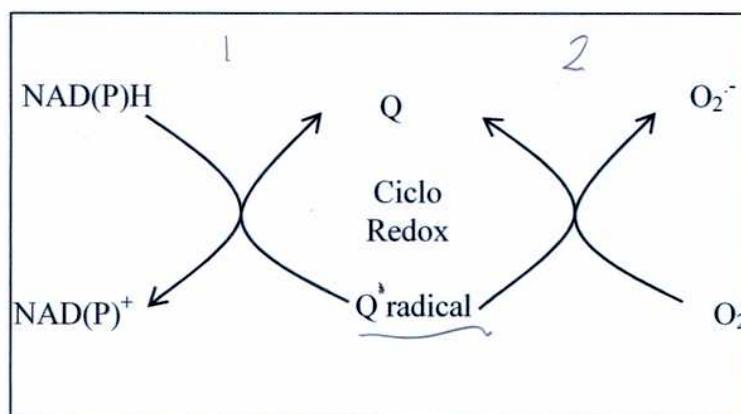


Fig. 14: Ciclo redox de xenobióticos en mitocondrias de hígados de ratas. Q, xenobióticos

1.3.3. Reacciones con biomoléculas

La mayoría de los R· de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen un período de vida media muy corto, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundos. No obstante, cuando un R· reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros R·; de manera que es posible que se generen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos

del sistema que originó el primer R[·]. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos (Blake y col., 1987; Harman, 1992; Pryor, 1986; Southorn y Powis, 1988; Webster y Nunn, 1988).

Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono son los blancos fundamentales de las ROS.

1.3.3.1. Proteínas

Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por las ROS. Estas, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el O₂^{·-} o con H₂O₂ para formar metahemoglobina (Freeman y Grapo, 1982). Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6), es inhibida por el O₂^{·-}, que la convierte en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo (Kono y Fridovich, 1982). Por último, el H₂O₂, producto de la dismutación del O₂^{·-}, también puede reducir el Cu⁺² de la superóxido dismutasa CuZn (SODCuZn, E.C. 1.15.1.1) a Cu⁺¹ reaccionado después con él y generando OH[·]. A su vez, éste ataca a un residuo adyacente de histidina del centro activo de la enzima, necesario para la actividad catalítica (Hodgson y Fridovich, 1975).

Debido a la reactividad de las ROS con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptofano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), metionina (Met) y cisteína (Cys) pueden sufrir modificaciones aminoacídicas. Estas reacciones dan lugar a alteraciones estructurales provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Freeman y Grapo, 1982; Gebicki y Gebicki, 1993; Stadtman, 1992; Webster y Nunn, 1988).

Los enlaces peptídico también son susceptibles de ser atacados por las ROS. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina (Pro) por OH[·] o O₂^{·-} (Wolff y Dean, 1986).

Finalmente, las ROS pueden generar subproductos al reaccionar con las proteínas que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación

de Trp hasta H₂O₂ y N-formil kinureina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamiento entre proteínas y/o lípidos (Freeman y grapo, 1982; Nielsen, 1981; Stadtman, 1992).

1.3.3.2. Lipidos

El OH⁻ e O₂⁻, así como el oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991; Choe y col., 1995; Choi y Yu, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1984; Horton y Fairhurst, 1987; Niki y col., 1991; Schaich, 1992). Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando la ROS quita el átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para formar un radical libre lipídico (L[.]). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por ROS, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. El L[.] se combina con otra molécula de O₂ y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el O₂⁻ puede entrar en contacto con iones metálicos de transición, produciendo más ROS que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultarán seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se verá alterada (Riceevans y Burdon, 1993).

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Blake y col., 1987; Pryor y Church, 1991; Southorn y Powis, 1988). Uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, el malodialdehído, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana (Nielsen, 1981; Valenzuela, 1991). Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan aun más alteradas.

1.3.3.3. Ácidos nucleicos

La citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con las ROS, especialmente el OH⁻ (Demple y Linn, 1982; Harman, 1992; Higuchi y Linn, 1995, Randerath y col., 1992; Webster y Nunn, 1988). Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de la hebra de DNA. Si el daño que se origina es grande y no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la muerte celular (Cerutti, 1985; Davies y col., 1990; Demple, 1990; Hoffman y col., 1984; Imlay y Linn, 1988). Se ha comprobado, por ejemplo, que la ruptura del DNA que ocurre durante la explosión respiratoria producida por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes (Birnboim y Kanabus-Kaminska, 1985; Martínez-Cayuela, 1995).

1.3.3.4. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son dañados por las ROS en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el OH⁻ para producir sustancias reactivas (Blake y col., 1987; Sies, 1985). Asimismo, los polisacáridos que sufren el ataque de las ROS, se fragmentan en unidades más sencillas.

1.3.4. Antioxidantes

A pesar de que las ROS son especies extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos (Fig. 15). De hecho las ROS se están produciendo continuamente en el organismo (Freeman y Grapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1989), el problema solo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes están debilitados (Halliwell y col., 1992; Jacob, 1995; Yu, 1994).

El organismo tiene un eficiente sistema para protegerse del daño oxidativo. Los mecanismos antioxidantes con que operan los seres vivos, particularmente los seres humanos, son múltiples, y dependen del tipo de especie reactiva y del lugar

donde ésta se genera. Dentro de las células, el sistema antioxidante es principalmente de tipo enzimático y en el espacio extracelular, es decir, en los fluidos biológicos como el plasma, el sistema antioxidante es de tipo no enzimático (Tabla 2). De este modo, contamos con antioxidantes específicos capaces de actuar oportunamente en distintos lugares.

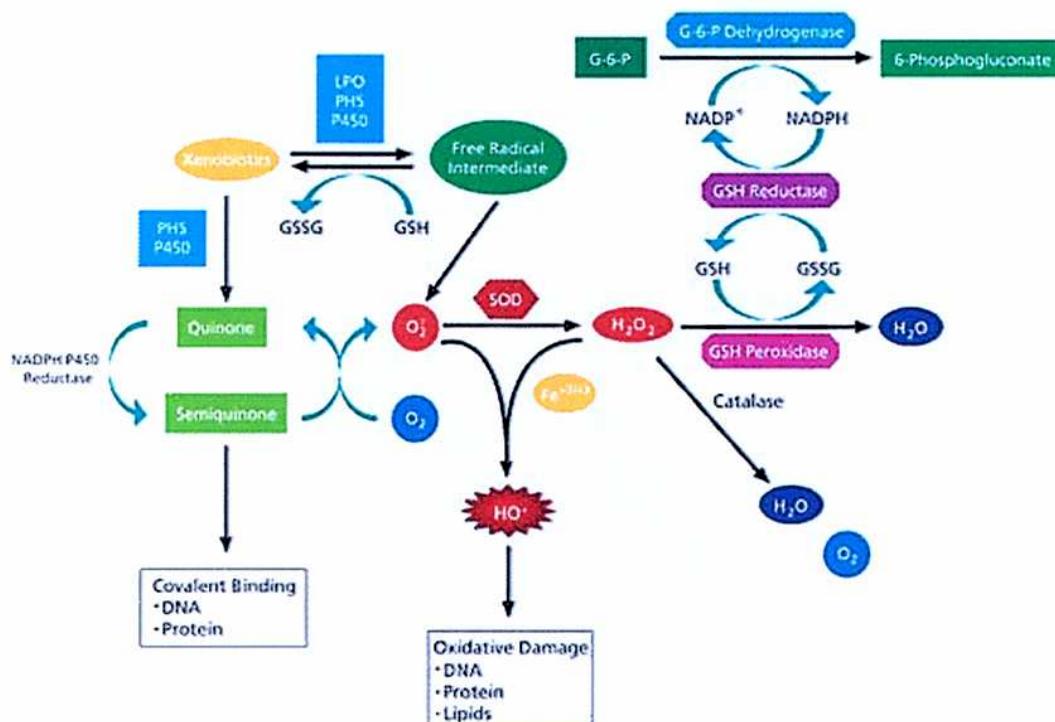


Fig. 15: Daño oxidativo. La G6PDH y la GR producen NADPH y GSH, respectivamente. Sin embargo, existen otras enzimas que utilizan estas sustancias para mantener la homeostasis celular.

1.3.4.1. Sistema de defensa enzimático

La primera defensa antioxidante en el interior de la célula está dada por las enzimas antioxidantes. Son endógenas y su acción depende de la presencia de un metal que puede ser cobre, hierro, magnesio, zinc o selenio. Actúan de dos formas: evitan la formación de ROS a partir de otras moléculas o convierten las ROS existentes en moléculas menos perjudiciales antes que puedan reaccionar y dañar otras moléculas vecinas.

Dentro de los sistemas enzimáticos se halla:

a) *Familia de las superóxido dismutasas* (SOD). Esta familia está constituida por metaloenzimas que convierten al O_2^- a H_2O_2 , se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios. Son cuatro tipos de enzimas: CuZnSOD, CuSOD, FeSOD y MnSOD.

b) *CAT* y las *peroxidases* que transforman el H_2O_2 en agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aerobias, plantas y animales. La glutatión peroxidasa (GPx, E.C. 1.11.19) y la glutatión S-transferasa participan en la detoxificación de xenobióticos como herbicidas, y usan el glutatión reducido (GSH) como sustrato. Las peroxidases no específicas se han encontrado en plantas y bacterias y pueden usar una amplia gama de substratos (Gamaley y Klyubin, 1999).

En los fluidos extracelulares no se encuentran CAT ni peroxidases y la SOD se encuentra en cantidades muy pequeñas, sin embargo la lista de reductores extracelulares es amplia e incluye a proteínas con capacidad de prevenir reacciones catalizadas por iones metálicos, uniéndose a metales y complejos metálicos biológicos de hierro y cobre (Stocker y col., 1991). Entre estos se cuentan:

- a) *Ceruloplasmina*: tiene actividad ferroxidasa, se une a cobre e inhibe reacciones tipo Fenton (Fig. 13, ecuación 3).
- b) *Transferrina y lactoferrina*: se unen al hierro e inhiben reacciones tipo Haber Weiss (Fig. 13).
- c) *Haptoglobina y Hemopexina* participan en la inhibición de la peroxidación lipídica catalizada por la hemoglobina.
- d) *Albumina* que tiene una función poco clara, se une al hierro y al cobre pero no inhibe las reacciones Fenton.

1.3.4.2. Sistema de defensa no enzimático

A la primera defensa antioxidante se suma otra: los antioxidantes no enzimáticos que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los

responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos, como el plasma, y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Estos antioxidantes son sustancias de diverso tipo que previenen o demoran el daño molecular. Para lograrlo, ceden un electrón a las ROS, con lo cual las desactivan y apagan el proceso. Al hacer esto se consumen, ya que la estructura molecular del antioxidante sufre daño o modificación química, transformándose en ROS inactivos o menos efectivos. Sin embargo, ello tiene un costo mucho menor para el organismo que si esa modificación o daño la sufriera una molécula con una función biológica más importante. Por ejemplo, es preferible la alteración química de una molécula de vitamina E, que puede ser reconstituida por otro antioxidante o reemplazada a través de la dieta, que el daño al material genético y sus consecuencias.

1.3.4.2.1. Metabolitos

a) El *glutatión* (γ -glutamil-cisteinil-glicina) en su forma reducida (GSH), es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración intracelular. A través de distintas vías no enzimáticas puede eliminar ROS. Actúa, también, como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 . El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de algunas reacciones enzimáticas. Participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en proteínas con otras moléculas como la tioredoxina y glutaredoxina entre otros tioles. La restauración de la molécula de GSH esta a cargo de la enzima glutatión reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2), la cual mediante la oxidación del NADPH reduce al glutatión. El GSH está sujeto a control hormonal y a su vez puede modular la expresión hormonal al regular los receptores hormonales que contienen grupos tioles o disulfuros, como por ejemplo el receptor NMDA (N-metil D-aspartato), el cual tiene grupos sulfhidrilos y está sujeto a control redox. (Gamaley y Klyubin, 1999).

b) La *bilirrubina* y el *ácido úrico* se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton (Fig. 13, ecuación 3). El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el ataque del ozono y NO_2^- .

- c) Los aminoácidos con capacidad para secuestrar iones metálicos, son susceptibles a la oxidación en presencia de H₂O₂. (Stadtman y Berlett, 1991).
- d) La *melatonina* atrapa al radical OH⁻, además de estimular enzimas antioxidantes importantes (SOD, GPx y GR), se considera actualmente como un importante antioxidante. En dosis farmacológicas es efectiva para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos. (Reiter y col., 1997).

1.3.4.2.2. Antioxidantes derivados de la dieta

Los antioxidantes derivados de la dieta parecen ser importantes para mantener una buena salud complementando las funciones de las defensas celulares (tabla 2). Entre los más importantes antioxidantes obtenidos a partir de la dieta están los carotenoides, el α-tocoferol y el ácido ascórbico, los dos primeros son antioxidantes liposolubles que disminuyen el daño fotoquímico en la oxidación de lípidos en el ojo y en la piel. El ácido ascórbico es requerido como cofactor por diferentes enzimas. Existen enfermedades en las cuales se produce una disminución del ácido ascórbico y, por lo tanto, se genera un estado de estrés oxidativo, como por ejemplo la artritis reumatoide (Stocker y col., 1991). Algunos antioxidantes tienen funciones paradójicas en tanto que pueden funcionar como prooxidante, como el ácido ascórbico cuando está en presencia de hierro o cobre (Stocker y col., 1991).

Tabla 2: Defensas antioxidantes. Ejemplos de alimentos que contienen compuestos que ayudan al organismo a defenderse contra las ROS. GPx, glutatión peroxidasa, 1O_2 , oxígeno singulete

Naturaleza	Sistema	Comentarios
Enzimática	SOD	Muy eficiente
	CAT	Menos efectiva
	GPx	Muy poco específica
No enzimática	glutatión	Regula los equilibrios redox.
	Acido úrico	Captura especialmente al OH ⁻
	Coenzima Q	Hace más eficiente el pasaje de electrones.
	Bilirrubina	Derivado del metabolismo de degradación del hemo.
	Vitamina E (α-tocoferol)	Germen de trigo, verduras de hojas, aceite de bacalao, cereales integrales, avellanas.
	Vitamina C (Ac. Ascórbico)	Frutas y verduras frescas. Elimina nitritos, 1O_2 , OH y O ₂ ⁻
	βcaroteno	En zanahoria, espinaca, verduras de hojas, frutas. Reactiva células T. Neutraliza radicales libres y al 1O_2
Inorgánica	Selenio (Se)	Leche y productos lácteos, pescado, legumbres, almendras. Esencial para la GPx
	Zinc (Zn)	Mariscos, carne, cereales integrales, germen de trigo. Participa en la SOD

HIPÓTESIS

Sabiendo que, en este modelo de porfiria hepática aguda inducido por dos drogas porfirimogénicas, se produce un bloqueo de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis, así como un estado de estrés oxidativo producido por la acumulación de ALA, se propone que:

1. Las alteraciones de las actividades enzimáticas del camino de la glucólisis y/o de las pentosas, así como el bloqueo de la gluconeogénesis y/o de la glucogenolisis, podrían devenir en el decremento de la glucosa hepática disponible, explicando, así, el efecto positivo que tiene la administración de glucosa en las porfirias hepáticas agudas.
2. El ALA hepático generado en el modelo de porfiria aguda desarrollado produce una situación de estrés oxidativo que daña proteínas.
3. Las relaciones NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺ son alteradas por la acción de las drogas porfirimogénicas como consecuencia del estrés oxidativo producido en el hepatocito y que tal situación altere la actividad de la G6PDH en el camino de las pentosas.
4. El contenido de glutatión reducido y total, así como la actividad de la glutatión reductasa, se observan alterados en este modelo experimental de porfiria hepática aguda.

OBJETIVOS

2.1. Objetivos Generales

El proyecto propone evaluar en un modelo de porfiria aguda en ratas, desarrollado por la administración de drogas porfirimogénicas (AIA/DDC) las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y en estrés oxidativo, así como también la determinación del contenido de distintos metabolitos implicados en estrés oxidativo.

2.1.1. Actividades de las enzimas de la glucólisis

Estudiar las actividades de la *glucoquinasa* (GK), *fosfofructoquinasa* (PFK) y *piruvato quinasa* (PK) para evaluar su influencia sobre la disponibilidad de glucosa en función de la dosis de AIA y DDC.

2.1.2. Actividades de la enzima reguladora del camino de las pentosas

Evaluar la actividad de la enzima clave del camino de las pentosas: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para evaluar su influencia sobre la disponibilidad de glucosa y su comportamiento frente al estrés oxidativo en función de la dosis de AIA/DDC.

2.1.3. Evaluación de parámetros de estrés oxidativo

El daño oxidativo que producen las ROS provenientes del ALA acumulado a nivel de diferentes tejidos, principalmente el hepático, mediante la determinación de parámetros indicadores de estrés en función de la dosis de AIA/DDC.

Las relaciones NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺ como indicadores de daño oxidativo celular, dada la importancia de ambos, no solo en la regulación de la homeostasis celular, sino y en diversas anomalías metabólicas.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Investigar el efecto de 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA) y 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidrocololidina (DDC) sobre el camino de síntesis del hemo en ratas. Realizar la determinación de ALA como parámetros indicador del grado de porfiria establecida.

2.2.2. Medir en el modelo de porfiria aguda desarrollado en ratas, las actividades de glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa (PFK) piruvato quinasa (PK) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH). Correlacionar los valores de las actividades enzimáticas con la variación de la dosis de las drogas porfirinogénicas.

2.2.3. Medir algunos de los parámetros de estrés en el modelo de porfiria aguda desarrollado en ratas. Realizar las determinaciones de niveles de glutatión reducido y total, actividad de glutatión reductasa, carbonilación de proteínas. Correlacionar los valores de las actividades enzimáticas con la variación de la dosis de las drogas porfirinogénicas

2.2.4. Medir las relaciones de NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺ en el modelo de porfiria aguda desarrollado en ratas. Relacionar los valores obtenidos con los valores de las actividades enzimáticas del metabolismo de carbohidratos y los diferentes parámetros con la dosis de las drogas porfirinogénicas.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Reactivos e instrumentos

El 2-alil-2-isopropil-acetamida (AIA) fue obsequiado por Roche Co. (Alemania). El 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidrocolidina (DDC) fue adquirido de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI).

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutatión reductasa, triosa fosfato isomerasa, glicerolfosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, aldolasa, lactato deshidrogenasa, así como el glutatión reducido y oxidado, la glucosa 6-fosfato, la fructosa 6-fosfato, NADP, NADPH, NADH, trifosfato de adenosina (ATP), β -mercaptoetanol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) y *N*-ethyldibenzopyrazine ethyl sulfate salt (phenazine ethosulfate; Pes) fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El cloruro de guanidinio fue obtenido de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las drogas y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Se utilizó el siguiente instrumental: ultracentrífuga Beckman XL 90 serie S, Sorvall SRC5C y centrifugas de mesa DCS-16-RV de Presvac y micro7 de Fisher Scientific, homogeneizador Potter-Elveheim y balanza Eletronic Balance FX-300.

Las absorbancias, así como las velocidades de las enzimas, se determinaron en un espectrofotómetro Shimatzu ultravioleta/visible -160-A.

3.2. Tratamiento de animales

Se emplearon ratas hembras Wistar de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CONEA, Argentina). Al comienzo del experimento los animales pesaban entre 180–200g (día 1). Fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (25°C) y luz:oscuridad (12:12), con acceso *ad libitum* a la comida y al agua. La comida fue retirada 24 hs antes del sacrificio (día 2). Los procedimientos (utilización y cuidado) que involucran a los animales fueron realizados bajo normas internacionales [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, USA, 1996, and the Council of the European Communities Directive, 86/609/ECC; Resolución CD 140/00 FCEyN, UBA.

Proyecto de ley para la Utilización de Animales de Laboratorio, Asociación Argentina de Animales de Experimentación con Animales de Laboratorio (AADEAL) Boletín nº 15 y 16 (2001)].

Luego de 8 hs de ayuno se realizó la administración de AIA y DDC de forma subcutánea (sc) e intraperitoneal (ip), respectivamente. El AIA fue disuelto en solución fisiológica (0.15%, p/v) (De Matteis, 1971) y el DDC en aceite de maíz (De Matteis y Gibbs, 1972). Ambas drogas fueron preparadas previa administración.

El AIA fue administrado en tres dosis diferentes, mientras que se empleó una única dosis de DDC. Los animales fueron separados aleatoriamente y divididos en los siguientes grupos: *grupo B* (100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso), *grupo M* (250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso), y *grupo A* (500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso). El grupo control (*grupo C*) recibió como vehículos solución fisiológica (sc) y aceite de maíz (ip). Estas dosis de AIA y DDC también fueron empleados por otros grupos, siguiendo protocolos de intoxicación similares o diferentes al aquí planteado (De Matteis, 1971; De Matteis y Gibbs, 1972), con el fin de obtener un modelo de porfiria aguda en ratas.

3.3. Preparación del tejido hepático

Los animales fueron decapitados 16 horas post-intoxicación. Todos los ensayos fueron realizados con 24 hs de ayuno (Fig.16). Ya que el efecto del AIA depende de la dieta previa que esté siguiendo el animal (Tschudy y col., 1964), el período de 8 hs de ayuno previo intoxicación garantiza que los efectos de la droga no se vean alterados por la dieta.

Una vez retirado el hígado éste se fraccionó para determinar las actividades de las enzimas glucokinasa, fosfofructokinasa, piruvato kinasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y glutatión reductasa, así como también el contenido de GSH, la relación NADPH/NADP⁺ y NAD⁺/NADH y el contenido de proteínas carboniladas. Para determinar la actividad de la enzima ALA-S se emplearon 500mg de hígado. Las porciones de hígado fueron homogenizadas mediante el uso de un homogeneizador Potter-Elvehejm.

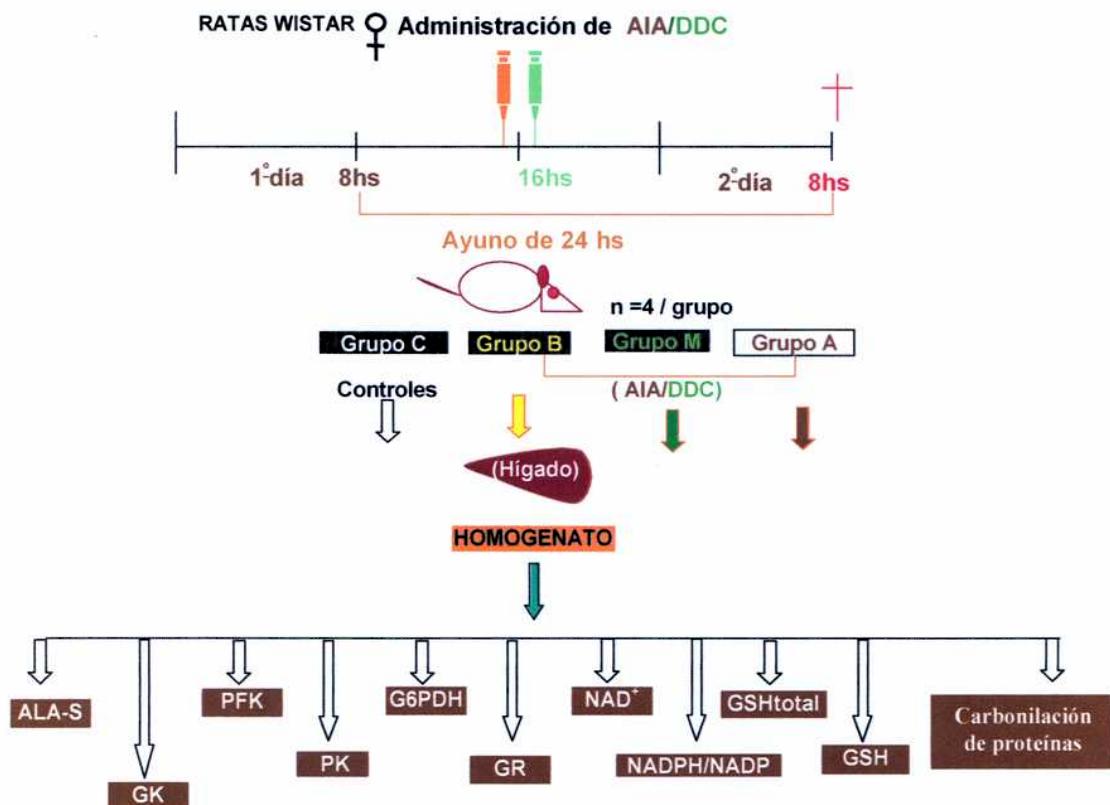


Fig. 16: Protocolo de trabajo. Esquema donde se muestran las enzimas y parámetros que se determinarán a lo largo de este trabajo.

3.4. Determinación de actividades enzimáticas

3.4.1. Actividad de δ -aminolevulínico-sintetasa (ALA-S)

500 mg de hígado se homogenizaron rápidamente (1:3 p/v) en una solución conteniendo 0,9% NaCl, 0,1mM Tris-HCl pH 7,4, y 0,5mM EDTA. Se incubó 0,5ml de homogenato con 0,1M glicina, 0,01M EDTA, 0,08M Tris-HCl (pH 7,2) en un volumen final de 2ml incubación a 37°C durante 60 minutos, de acuerdo al método de Marver y col., (1966). El producto se determinó espectrofotométricamente a 553nm (Mauzerall y Granick, 1956). Los resultados se expresan como nmol ALA/gr hígado. hora.

15CoA } } + succinato }

Exceso de β con Shrivastava et al.

3.4.2. Actividad de glucokinasa (GK)

El hígado fue homogeneizado en dos volúmenes de buffer de extracción pH 7 (0,15M KCl, 0,1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 10mM β -mercaptoetanol y 4 mM MgSO₄). La suspensión se centrifugó durante 80 minutos a 105.000xg a 4°C y el sobrenadante fue empleado en los ensayos enzimáticos. La actividad enzimática se determinó utilizando 0,1 unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, como enzima accesoria en el buffer de reacción (0,1M Tris pH 7,4, 0,2mM NADP⁺, 5mM ATP y 5mM MgCl₂). Se realizaron dos ensayo en paralelo: uno con alta concentración de glucosa (100mM) y otro con baja (0,5mM). Se mide la aparición de NADPH a 340nm durante 120 segundos. La actividad de la GK se obtiene mediante la resta de la actividad obtenida a baja concentración de glucosa (actividad de HK+GK) de la obtenida a alta concentración de glucosa (actividad de HK). Los resultados se expresan como nmoles de NADPH/ minutos.mg de proteína (Pilkis, 1975).

3.4.2. Actividad de fosfofructokinasa (PFK)

1g de hígado se homogeneizó en 2 ml de buffer conteniendo 30mM floruro de potasio (KF) frío, 10mM EDTA, 0,3mM β -mercaptoetanol a pH 7,5, se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10.000xg. La actividad enzimática fue determinada mediante el método de Kemp (1975), con las siguientes modificaciones. Se emplearon 0,5 unidades de α -glicerolfosfato deshidrogenasa y aldolasa y 5 unidades de triosa fosfato isomera como enzimas accesorias presentes en el buffer de reacción, el cual contenía, además, 75 mM glicilglicina, 3 mM EDTA, 18 mM de MgCl₂, 9 mM sulfato de amonio, 1mM ATP y 0,2mM de NADH. Se siguió la desaparición de NADH (Fig.17) durante 120 segundos a 340nm con el agregado de 17mM de fructosa 6-fosfato. Los resultados fueron expresados como nmoles de NADH/minutos.mg de proteína.

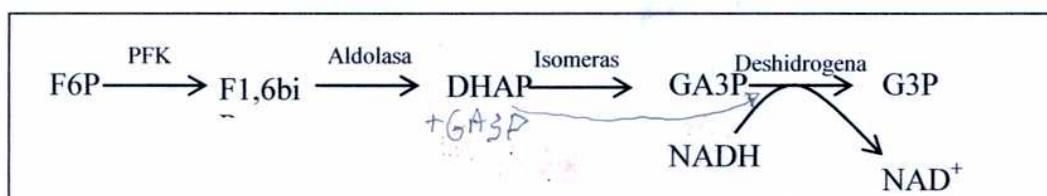


Fig.17: reacción producida por las enzimas accesorias para la determinación de PFK. F6P: fructosa 6-fosfato; F1,6biP: fructosa 1,6-bifosfato; DHAP: dihidrxiocetona fosfato; GA3P: gliceraldehído 3-fosfato; G3P: glicerol 3-fosfato.

3.4.3. Actividad de piruvato kinasa (PK)

El hígado fue homogeneizado en 3 volúmenes de buffer conteniendo 20mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5mM MgSO₄, 1mM EDTA, 0,2mM fructosa 1,6-bisfosfato y 10mM β-mercaptopetanol. Se centrifugó durante 60 minutos a 4°C a 105.000xg, se descartó el pellet y se determinó la actividad de PK mediante el decremento de NADH a 340nm, empleando lactato deshidrogenasa como enzima accesoria (Taunton y col., 1974).

3.4.4. Actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

Se realizó un homogenato 1:4 (1g de hígado en 3 ml de buffer pH 7,4 conteniendo 0,15M KCl, 7mM β-mercaptopetanol y 2,7mM EDTA). La preparación se centrifugó durante 60 minutos a 105.000xg para obtener el citosol. La fracción citosólica se ensayó con 50mM Tris-HCl, 10µM de MgCl₂ y 0,5mM de NADP⁺. La determinación de la actividad se realizó siguiendo el incremento de la absorbancia NADPH a 340nm (Glock y McLean, 1953). Los resultados se expresaron como nmoles de NADPH/min.mg de proteína.

3.4.5. Actividad de glutatión reductasa (GR)

1 g de hígado fue homogeneizado en 5 ml de buffer extracción, el cual contenía 0,1M buffer fosfato de potasio y 1mM EDTA (pH 7,5). Luego fue centrifugado durante 30 minutos a 11000xg. El sobrenadante obtenido fue mezclado con buffer de reacción pH 7,5 (0,1M PiK, 1mM EDTA y 0,1mM NADPH) y 50mM de GSSG. Se midió la actividad de GR a través del decremento de NADPH a 340nm (Beutler, 1969).

3.5. Determinación de metabolitos

3.5.1. Contenido de NAD⁺

Se realizó un homogenato 1:4 con buffer de extracción, el cual contenía 20mM bicarbonato de sodio, 100mM carbonato de sodio y 0,05% Triton X-100, luego se centrifugó durante 40 minutos a 4°C a 30.000xg. La mitad del volumen obtenido del sobrenadante se incubó durante 5 minutos con buffer conteniendo 100mM Tris-HCl (pH 8), 5mM EDTA, 0,5mM MTT, la reducción de este compuesto genera un producto que se cuantifica espectrofotométricamente, 10µl

NAD⁺ MTT
¿Qué es MTT?

de 200mM Pes y 0,2mg/ml de alcohol deshidrogenasa (Fig.18). Se agregó 100 μ l de etanol 6M y se centrifugó durante 150 segundos a 25°C para eliminar un pequeño precipitado generado por la oxidación parcial de la alcohol deshidrogenasa (Umemura y Kimura, 2004). Se determinó el contenido de NAD⁺ (A2). La otra mitad de sobrenadante recibió el mismo tratamiento, pero previamente se incubó a 60°C durante 30 minutos para destruir todo el NAD⁺ (A1). El contenido inicial de NADH y NAD⁺ fueron determinados a 570nm. Los resultados se expresaron como nmoles NAD⁺/hora.mg de proteína. Esto se debe a que el empleo de Tritón X-100 durante la extracción produce la liberación del NAD⁺ o NADH unido a proteína, así como también la ruptura de distintos compartimentos celulares donde pueden almacenarse. Se trabajó con una única concentración del detergente, por lo que el aumento observado se puede correlacionar directamente a la dosis de AIA y DDC empleados (Umemura y Kimura., 2004). También se calculó la proporción de NAD⁺ con respecto al total [(NADtotal = NAD⁺+NADH (A1+A2)] y la relación NADH/NAD⁺ (Fig.19).

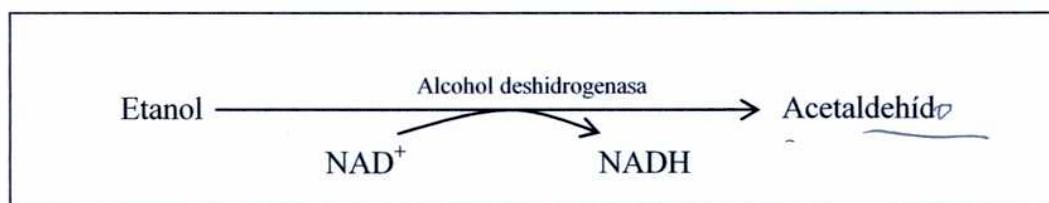


Fig.18: Reacción de alcohol deshidrogenasa.

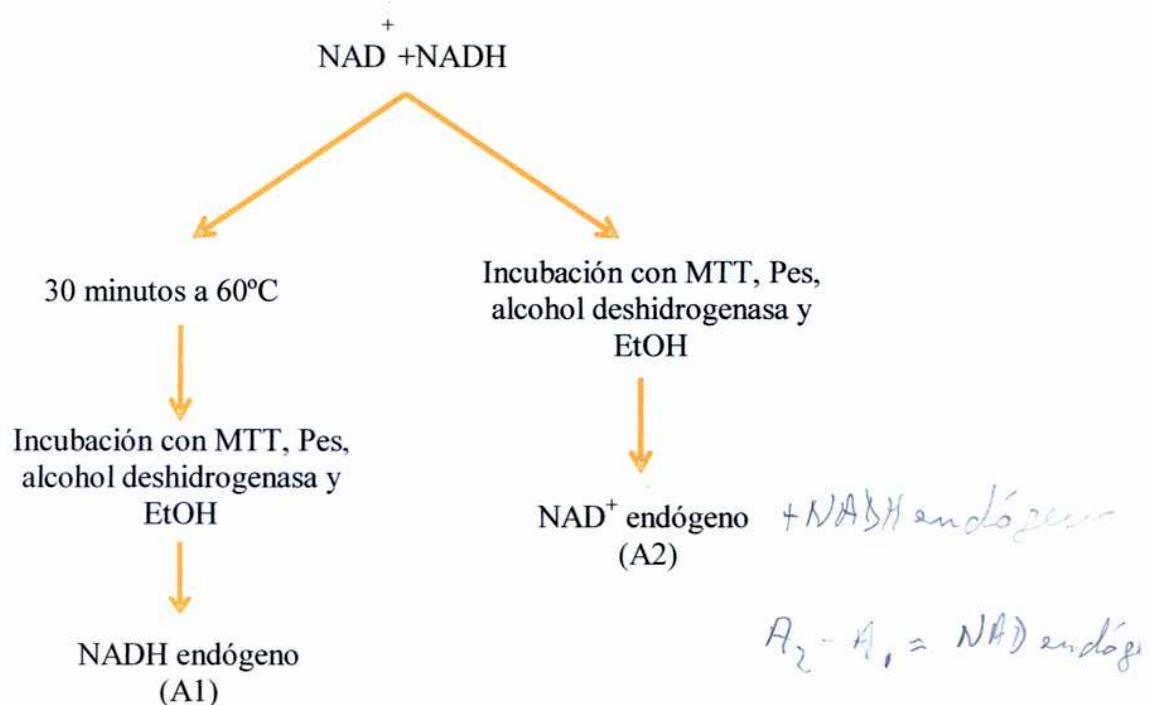


Fig19: Protocolo de medición del contenido de NAD⁺.

3.5.2. Relación NADPH/NADP⁺

Se realizó un homogenato 1:4 con perclórico 5% y ácido ascórbico 1% (Díaz-Flores, y col., 2006). El homogenato se mantuvo en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 8000xg. El sobrenadante fue llevado a pH 7 con NaOH concentrado (20 µl, aproximadamente) y se lo colocó en hielo durante 30 minutos más. La relación se determinó según el método de Zhang y col. (2000). Se incubó una fracción a 37°C con buffer contenido 0,1M Tris-HCl (pH 8); 0,01M MgCl₂; 0,05% (v/v) Triton X-100 y 5 unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa durante 5 minutos, luego se agregó 5mM de glucosa 6-fosfato y se incubó durante 5 minutos más. La fracción restante se incubó durante 5 minutos a 25 °C con 5 unidades de glutatión reductasa y 0,1M de buffer fosfato (pH 7,6) contenido 0,05M de EDTA y 0,05% Triton X-100, luego se agregó 5mM de glutatión oxidado y se dejó incubando

durante 5 minutos más. Ambas fracciones fueron leídas en el espectrofotómetro a 340nm. Se determinó el contenido de NADP^+ y NADPH según la Fig. 20.

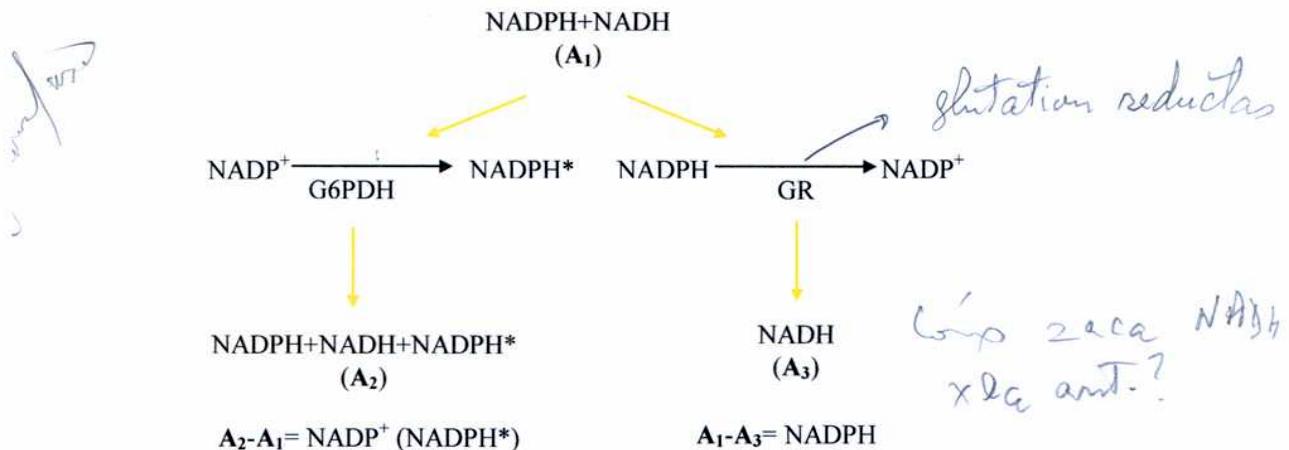


Fig.20: Protocolo para la determinación de la relación NADPH/NADP⁺.

3.5.3. Contenido de glutatión reducido (GSH)

1g de hígado se lo homogeneizó con 5 ml de buffer [buffer Tris HCl 20 mM (pH 7,5) y EDTA 0,5 mM]. Se precipitaron las proteínas con TCA 20%, se lo colocó en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 15 minutos a 70000xg a temperatura ambiente. La determinación de GSH o grupos tioles (equivalentes al GSH) se llevó a cabo con el método de Ellman (1959), empleando 1ml de 1,5 mM DTNB preparado con 0,25M buffer fosfato (pH 8) y midiendo a 412nm. Previamente, se realizó una curva de calibración empleando diferentes concentraciones de GSH (0-100 nmoles de GSH). Los resultados se expresan como nmoles de GSH/mg. proteína.

3.5.4. Contenido de glutatión total (GSH+GSSG)

Se realizó un homogenato con 1 g de hígado en 5 ml de buffer (0,1M buffer fosfato (pH 7,5) y 6,3mM EDTA). Se dividió el homogenato en tubos eppendorf y se precipitaron las proteínas con TCA 30%, se dejó reposar 15 minutos en hielo y se centrifugó a 10.000xg a 4°C durante 10 minutos. Se tomó una alícuota del sobrenadante y se la incubó durante 15 minutos a 30°C con 6mM DTNB y 0,3mM NADPH. Luego se agregó 0,5 unidades de GR. Este método está basado en la medición del DTNB que se libera al ser reducido el GSSG por la glutatión



reductasa. Los resultados se expresaron como nmoles de glutatión total/mg de proteína Griffith (1980).

3.6. Parámetros de daño oxidativo a macromoléculas

3.6.1. Contenido de proteínas carboniladas

Se realizó un homogenato 1:10 con 50mM de buffer fosfato conteniendo 1mM de EDTA, luego se centrifugó durante 60 minutos a 100.000xg. Los grupos carbonilos formados en el citosol fueron cuantificados agregando 1ml de 10mM de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 2M HCl a un volumen de citosol conteniendo 2mg de proteínas (200μl, aproximadamente). Se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad durante 1 hora, agitando en vortex cada 10 minutos. Las muestras fueron precipitadas con TCA 20% (concentración final) y centrifugadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. El pellet se lavó dos veces con TCA 10% y luego tres veces con 1ml de etanol:etil-acetato (1:1), para remover el DNPH libre. Los pellets fueron resuspendidos en 1ml de cloruro de guanidinio 6M (pH 2,3), durante 15 minutos a 37°C, agitando con vortex. El contenido de carbonilos se determinó midiendo la absorbancia a 390nm (coeficiente de absorción molar: 22.000/M.cm (Levine y col., 1994)).

3.7. Determinación de la concentración de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951). Empleando seroalbúmina bovina como estándar.

La concentración de proteínas para el ensayo de proteínas carboniladas fue determinada mediante una curva realizada con seroalbúmina bovina disuelta en cloruro de guanidinio y leída a 280nm junto con las muestras (Reznick y Paker, 1994).

3.8. Análisis estadísticos

Los resultados de las figuras y las tablas están expresados como media ± SEM de tres experimentos diferentes realizados por duplicado. En todos los casos se determinaron las diferencias significativas entre las medias con la prueba de Fisher, empleando $p<0.05$ como nivel de significancia. Las comparaciones múltiples se realizaron a través de la prueba de Tukey-Kramer.

RESULTADOS

4.1. Biosíntesis del hemo

4.1.1 Actividad de la enzima δ -aminolevulínico sintetasa (ALA-S)

Los cambios provocados en el camino metabólico del hemo fueron estudiados empleando diferentes dosis de AIA y DDC, para evaluar sus efectos sobre la actividad de la enzima ALA-S. La administración de AIA y DDC aumentó la actividad de ALA-S más de 500% (Fig. 21) en el grupo A ($103,52 \pm 18,46$ nmoles de ALA/h. g de hígado) respecto del control. Este aumento difiere significativamente con el grupo C ($15,31 \pm 2,97$ nmoles de ALA/h. g de hígado), B ($49,17 \pm 12,36$ nmoles de ALA/h. g de hígado), y M ($75,1 \pm 9,12$ nmoles de ALA/h. g de hígado).

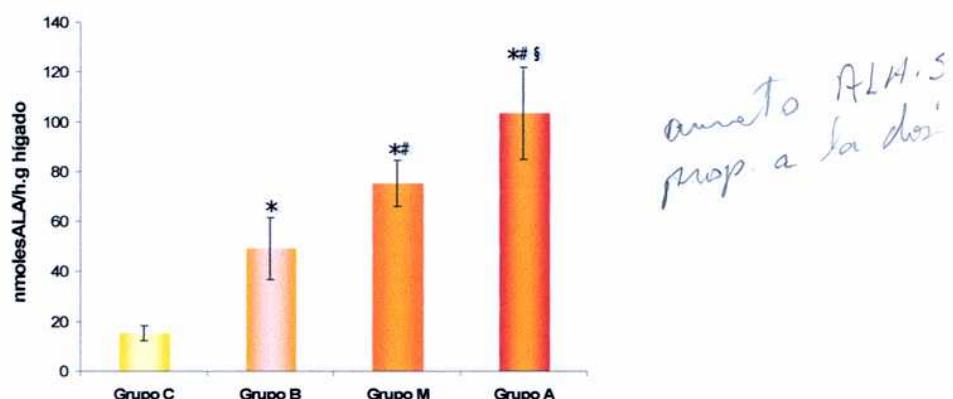


Fig. 21: Respuesta dosis dependiente de la actividad de la enzima ALA-S al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 10 animales. La actividad específica se expresa como nmoles ALA/h.g hígado.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.2. ENZIMAS REGULADORAS DE LA GLUCÓLISIS

Con el fin de estudiar que ocurre con las enzimas reguladoras de la glucólisis en este modelo, se estudió el comportamiento de la GK, la PFK y la PK hepáticas frente a diferentes dosis de AIA, luego de 16 h del tratamiento con AIA y DDC.

4.2.1 Actividad de la enzima glucoquinasa (GK)

Se analizó la respuesta de las HK hepática total (HK I, II, III y IV) para las diferentes dosis de AIA y DDC, midiendo a altas concentraciones de glucosa (100mM), mientras que la actividad de las HK I, II y III fue analizada a bajas concentraciones de glucosa (0,5mM). La actividad de la GK (HK IV) se calculó mediante la diferencia entre las actividades obtenidas a alta y a baja concentración de glucosa.

Luego de 16 h del tratamiento con AIA y DDC, la actividad de las HK hepática total en función a la dosis (Fig. 22A) mostró una disminución significativa del 50% en el grupo M ($17,68 \pm 4,30$ nmoles NADPH/min. mg proteína) y del 70% en el grupo A ($10,80 \pm 3,40$ nmoles NADPH/min. mg proteína) cuando se los comparó con el grupo C ($37,29 \pm 6,75$ nmoles NADPH/min. mg proteína). Por otro lado, el grupo A mostró una diferencia significativa cuando se lo comparó, mediante una prueba de comparaciones múltiples, con el grupo B ($22,88 \pm 2,28$ nmoles NADPH/min. mg proteína).

Por otra parte, al analizar la actividad de HK a baja concentración de glucosa (Fig. 22B) se observaron diferencias significativas con respecto al grupo C para los grupo B, M y A. Presentando este último un aumento del 50% respecto del grupo C.

La actividad de GK se obtuvo restando a los valores obtenidos de HK hepática total los obtenidos para HK a baja concentración de glucosa (Fig.22C). GK mostró una disminución del 75, 65 y 50 % para el grupo A ($7,83 \pm 1,01$ nmoles NADPH/min. mg proteína) cuando se lo comparó con el grupo C ($30,33 \pm 1,13$ nmoles NADPH/ min. mg proteína), B ($21,73 \pm 10,97$ nmoles NADPH/ min. mg proteína) y M ($14,35 \pm 0,38$ nmoles NADPH/min.mg proteína), respectivamente.

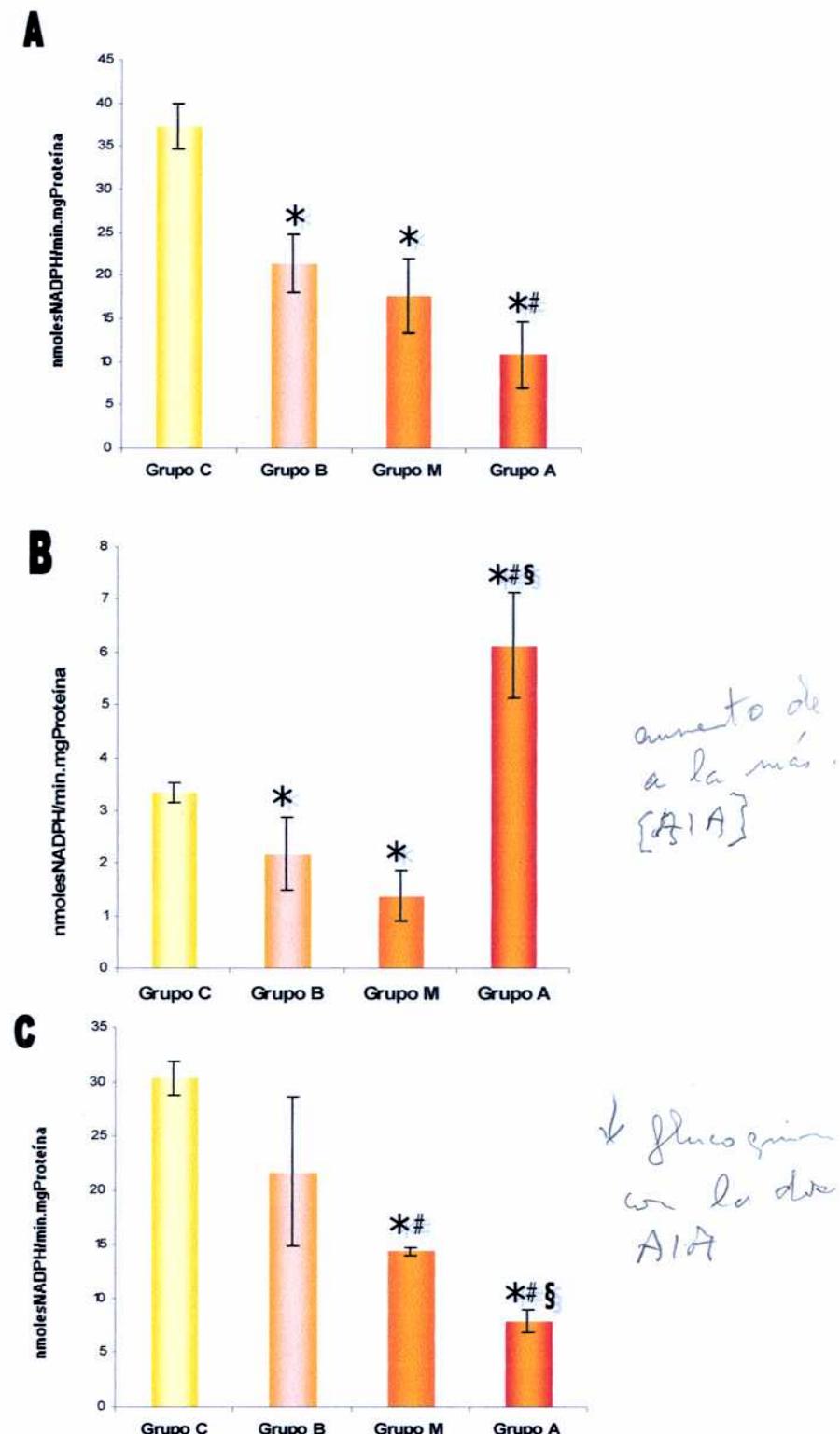


Fig. 22: Respuesta de la actividad de las enzimas HK+GK (A), HK (B) y GK (C) al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales. La actividad específica se expresa como nmoles NADPH/min. mg proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.2.2 Actividad de la enzima fosfofructoquinasa (PFK)

Se estudió la actividad de la PFK en hígados de animales tratados con AIA y DDC y se observó una disminución significativa del 40%, aproximadamente, en la actividad de la enzima (Fig. 23) para el grupo M ($2,42 \pm 0,32$ nmoles NADH/min. mg.proteína) y del 65% para el grupo A ($1,50 \pm 0,07$ nmoles NADH/min. mg.proteína) con respecto al grupo C ($4,12 \pm 0,64$ nmoles NADH/min. mg.proteína). El grupo B ($4,15 \pm 0,51$ nmoles NADH/min. mg.proteína) no mostró diferencias significativas con el grupo C.

Al realizar comparaciones múltiples entre grupos, se observó una disminución de la actividad del 40 y 65% para los grupo M y A con respecto al grupo B, respectivamente.

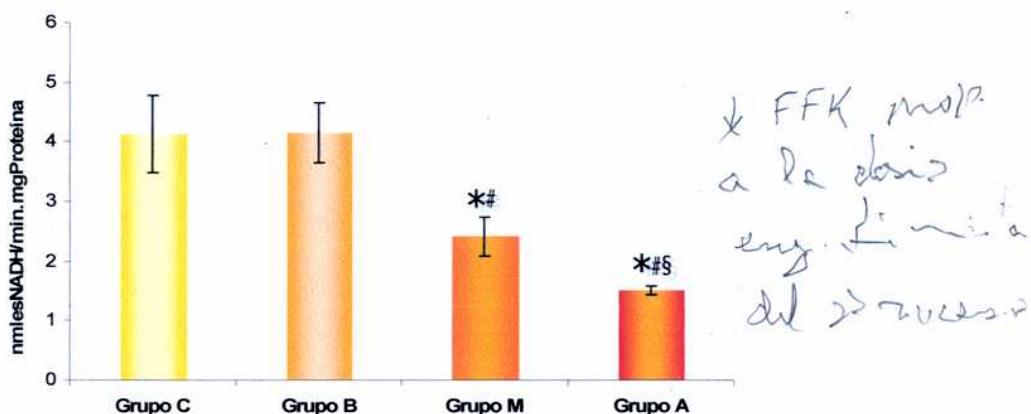


Fig. 23: Respuesta de la actividad de la enzima PFK al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales. La actividad específica se expresa como nmoles NADH/min. mg proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.2.3. Actividad de la enzima piruvato quinasa (PK)

Como último paso para evaluar esta vía metabólica, se analizó la actividad de la PK. Esta enzima representa el último paso regulador de la glucólisis.

Se analizó la actividad de la PK en animales tratados con diferentes dosis de AIA y DDC. Esta enzima mostró una variación en su actividad para el grupo A (Fig. 24),

observándose una disminución del 40% en el grupo A ($0,2 \pm 0,04$ nmoles NADH/min. mg.proteína) con respecto al grupo C ($0,317 \pm 0,06$ nmoles NADH/min. mg.protína).

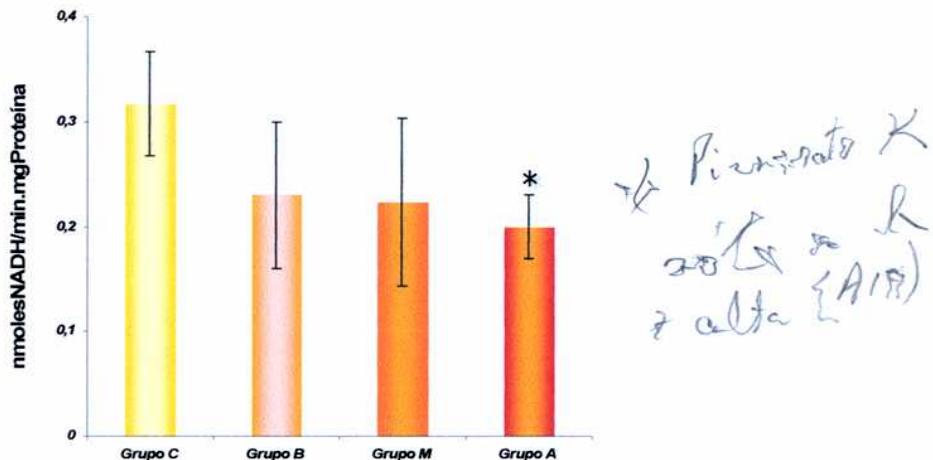


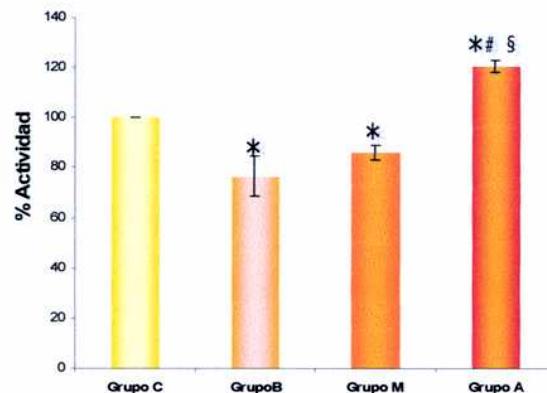
Fig. 24: Respuesta de la actividad de la enzima PK al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media ± SEM para 3 animales. La actividad específica se expresa como nmoles NADH/min. mg proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.3. ENZIMA REGULADORA DEL CAMINO DE LAS PENTOSAS

4.3.1. Actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

Luego de 16h del tratamiento con AIA y DDC, la actividad de la G6PDH hepática mostró una disminución significativa del 35 y 15% para los grupos B ($11,84 \pm 0,79$ nmoles NADPH/min. mg.proteína) y M ($13,07 \pm 4,57$ nmoles NADPH/min. mg.proteína), con respecto al grupo C ($20,92 \pm 4,16$ nmoles NADPH/min. mg.proteína), respectivamente. El grupo A ($33,19 \pm 1,96$ nmoles NADPH/min. mg.proteína) mostró un aumento significativo del 20% con respecto al grupo C (Fig. 25). Al realizar un análisis de comparaciones múltiples a través de la prueba de Turkey-Kramer, se observó que el grupo A mostró un aumento significativo del 50% con respecto al grupo B y del 40% con respecto al grupo M.



Que significa
lo de =
esta anot?

Fig. 25: Respuesta de la actividad de la enzima G6PDH al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media ± SEM para 3 animales. La actividad específica se expresa como nmoles NADPH/min. mg proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4. INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

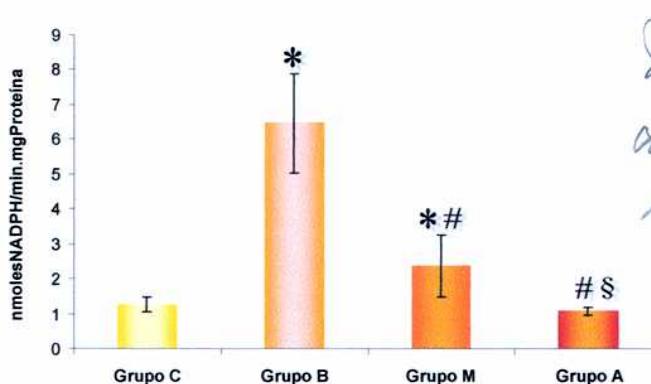
Se analizó el comportamiento de dos enzimas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular, la enzima G6PDH (descripta en la sección 4.3.1.), la cual es la principal generadora de NADPH, y la enzima GR (Fig. 26). Ambas fueron analizadas en animales tratados con diferentes dosis de AIA y DDC. Por otra parte, se analizó el contenido de NAD^+ , NADP^+ , GSH y glutatión total, así como el contenido de proteínas carboniladas.

4.4.1. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR)

La actividad de la GR en animales tratados con diferentes dosis de AIA y DDC mostró un aumento significativo de más de 5 veces para el grupo B ($6,45 \pm 1,42$ nmoles NADPH/min. mg.proteína) y de, aproximadamente, 1 veces para el grupo M ($2,37 \pm 0,89$ nmoles NADPH/min. mg.proteína) cuando se las comparó con el grupo C ($1,26 \pm 0,20$ nmoles NADPH/min. mg.proteína). El grupo A ($1,08 \pm 0,11$ nmoles NADPH/min. mg.proteína) no mostró una variación significativa con respecto al grupo C.

Al realizar una prueba de comparaciones múltiples entre los grupos tratados con AIA y DDC, se observó un decremento del 85 y 55% del grupo A con respecto a los

grupos B y M, respectivamente. El grupo M disminuyó, de forma significativa, en un 65% con respecto al grupo B.



*glutation red.
aumento mayor en
nuevos animales AIA*

Fig. 26: Respuesta dosis dependiente de la actividad de la enzima GR al tratamiento con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales. La actividad específica se expresa como nmoles NADPH/min. mg proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4.2. Nucleótidos pirimidínicos

Se evaluó la relación NADPH/NADP⁺, así como el contenido de NAD⁺ con respecto al NADtotal (NAD⁺+NADH) y la relación NADH/NAD⁺ en hígado de animales tratados con diferentes dosis de AIA y DDC. Por otra parte, se analizó el contenido de NADtotal con respecto a la cantidad de proteínas.

4.4.2.1. Relación NADPH/NADP⁺

Se analizaron los niveles de NADPH y NADP⁺ para los distintos tratamientos con AIA y DDC y se calculó la relación entre la forma reducida y la oxidada en hígados de animales tratados.

Los grupos B y M mostraron una disminución del 75 y 70% con respecto al grupo C (Tabla 3). El grupo A disminuyó un 40% con respecto al grupo C, y al realizar un análisis de comparaciones múltiples con los grupos B y M, mostró un aumento del 120 y 113%, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3: Relación NADPH/NADP⁺ en animales tratados con AIA v DDC.

	Grupo C	Grupo B	Grupo M	Grupo A
NADPH/NADP ⁺	1,24	0,33*	0,35*	0,75*#§
SEM	0,05	0,03	0,05	0,01

Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media ± SEM para 3 animales.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4.2.2. Contenido de NAD⁺/NADtotal; NADH/NAD⁺ y NADtotal/mg.proteína

Al determinar el contenido de NAD⁺ con respecto al NADtotal (Fig. 27A), se observó una disminución del 70% para el grupo A ($0,05 \pm 0,02$), del 80% para el grupo M ($0,03 \pm 0,01$) y del 55% para el grupo B ($0,07 \pm 0,01$), con respecto al grupo C ($0,16 \pm 0,07$). Al realizarse una prueba de comparaciones múltiples, únicamente el grupo M mostró una disminución significativa del 53% con respecto al grupo B. El grupo A no mostró diferencias significativas ni con el grupo B ni con el M.

La relación NADH/NAD⁺ (Fig. 27B) aumentó aproximadamente 2.5 veces para los grupos M y A con respecto al grupo C, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos al realizar una prueba de comparaciones múltiples. El grupo B no mostró variación con respecto al grupo C.

Por otro lado, se determinó la proporción de NADtotal/mg.proteínas (Fig. 27C). Si bien todos los grupos muestran diferencias significativas con el grupo C ($0,02 \pm 0,01$ nmoles NADtotal /mg.proteína), el grupo A ($0,05 \pm 0,01$ nmoles NADtotal/mg.proteína) aumenta en un 300% al compararlo con el grupo C.

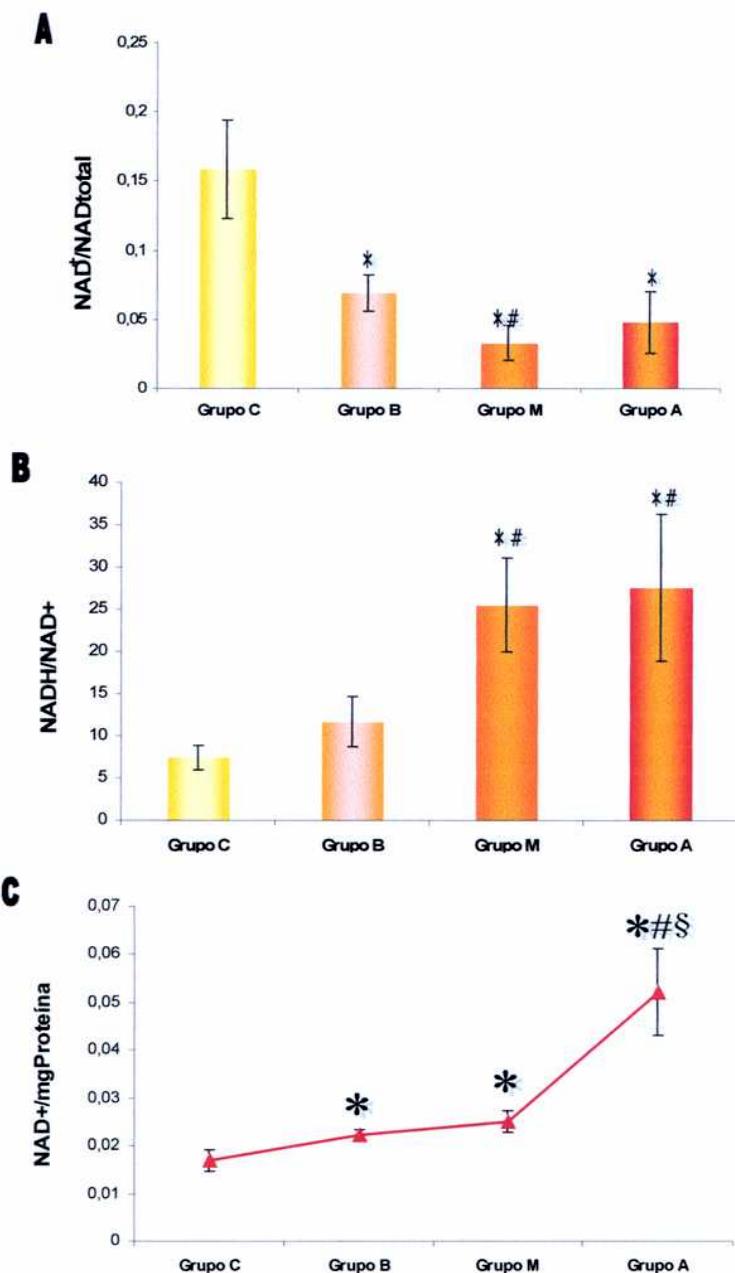


Fig. 27: Relación NAD⁺/NADtotal (A), NADH/NAD⁺ (B) y NAD⁺/mg.proteína en animales tratados con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media ± SEM para 3 animales.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B; § $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo M. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4.3. Contenido de glutatión

Se emplearon hígados de animales tratados con distintas dosis de AIA y DDC para analizar el contenido de glutatión reducido (GSH) y glutatión total (GSH+GSSG).

4.4.3.1. Contenido de glutatión reducido (GSH)

Se evaluó el contenido de GSH en hígados de animales intoxicados con diferentes dosis de AIA y DDC (Fig. 28), donde los tres grupos tratados con la droga mostraron un decremento significativo con respecto al grupo C ($0,63 \pm 0,09$ nmoles GSH/mg.proteína).

El grupo B diminuyó en un 30%; el grupo M, en un 34% y el grupo A, en un 28% con respecto al grupo C. Por otro lado, al realizar una prueba de comparaciones múltiples (a través de la prueba de Tukey-Kramer) observamos que los grupos B ($0,44 \pm 0,08$ nmoles GSH/mg.proteína), M ($0,42 \pm 0,03$ nmoles GSH/mg.proteína) y A ($0,46 \pm 0,05$ nmoles GSH/mg.proteína) no varían con la dosis del tóxico.

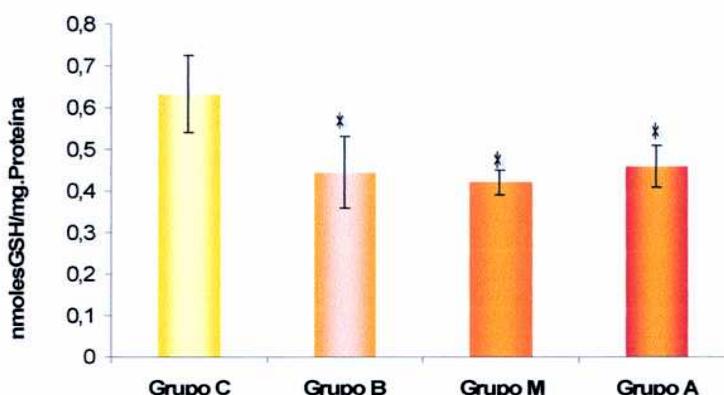


Fig. 28: Contenido de GSH en animales tratados con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales. El contenido de GSH se expresa como nmols de GSH/mg.proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto del grupo C. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4.3.2. Contenido de glutatión total (GSH+GSSG)

Se evaluó el contenido de glutatión total (GSH+GSSG) presente en hígado de animales intoxicados con diferentes dosis de AIA y DDC (Fig. 29).

El tratamiento con AIA y DDC mostró una disminución del contenido de glutatión total con respecto al grupo C ($0,37 \pm 0,07$ nmoles de glutatión total/mg.proteína) de los grupos B ($0,08 \pm 0,03$ nmoles de glutatión total/mg.proteína), M ($0,12 \pm 0,02$ nmoles glutatión total/mg.proteína) y A ($0,15 \pm 0,01$ nmoles glutatión total/mg.proteína).

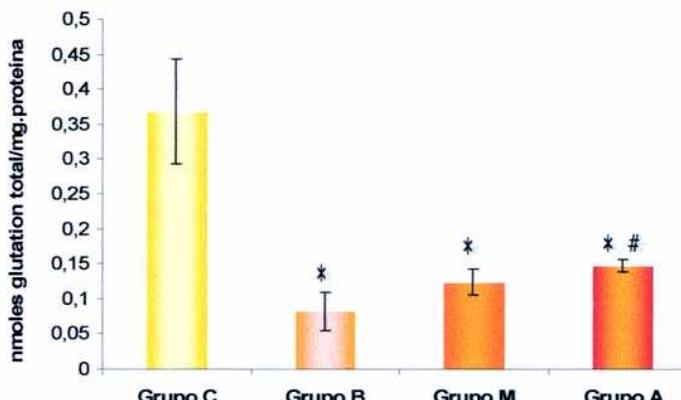


Fig. 29: Contenido de glutatión total (GSH+GSSG) en animales tratados con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 3 animales. El contenido de glutatión total se expresa como nmols de glutatión total/mg.proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto del grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto del grupo B. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

4.4.4. Parámetros de daño oxidativo a macromoléculas

Unos de los parámetros de daño a macromoléculas que se evaluó en este trabajo fue el contenido de proteínas carboniladas en hígados de animales intoxicados con diferentes dosis de AIA y DDC luego de 16h del tratamiento.

4.4.4.1. Contenido de proteínas carboniladas

Al analizar el contenido de carbonilos en proteínas de hígado de animales tratados con diferentes dosis de AIA y DDC, se observó un aumento significativo con respecto al grupo C del 37, 180 y 200% para los grupos B, M y A, respectivamente (Fig. 30). Sin embargo, al realizar una prueba de comparaciones múltiples entre los grupos tratados con AIA y DDC, observamos que los grupos M y A aumentaron más de una vez con respecto al grupo B, pero no mostraron diferencias significativas entre ellos.

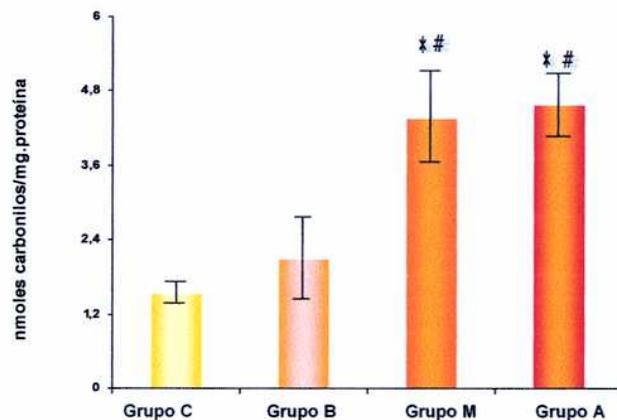


Fig. 30: Contenido de proteínas carboniladas en animales tratados con AIA y DDC. Los animales fueron inyectados subcutáneamente (sc) con dosis diferentes de AIA e intraperitonealmente (ip) con una dosis de DDC, y divididos en los siguientes grupos: grupo B, 100 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo M, 250 mg AIA + 50mg DDC/kg peso; grupo A, 500 mg AIA + 50mg DDC/kg peso. El grupo control (grupo C) recibió como vehículos: solución fisiológica, sc y aceite de maíz, ip. Cada barra representa la media \pm SEM para 6 animales. El contenido de proteínas carboniladas se expresa como nmols de carbonilos/mg.proteína.

* $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo C; # $P < 0,05$ es significativamente diferente respecto al grupo B. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba Tukey-Kramer.

DISCUSIÓN

Las porfirias hepáticas agudas son enfermedades caracterizadas por la acumulación hepática y excreción aumentada de precursores, como ALA, PBG y porfirinas. Los síntomas bioquímicos y clínicos de estas patologías pueden desencadenarse por estrés hipocalórico, por ello, los tratamientos con glucosa revierten la sintomatología (Nordmann y Puy, 2002). De la sobreproducción de ALA devienen las ROS (Fig. 31), que producen un estado de estrés oxidativo que genera una respuesta por parte del sistema de defensa antioxidante (Bechara, 1996).

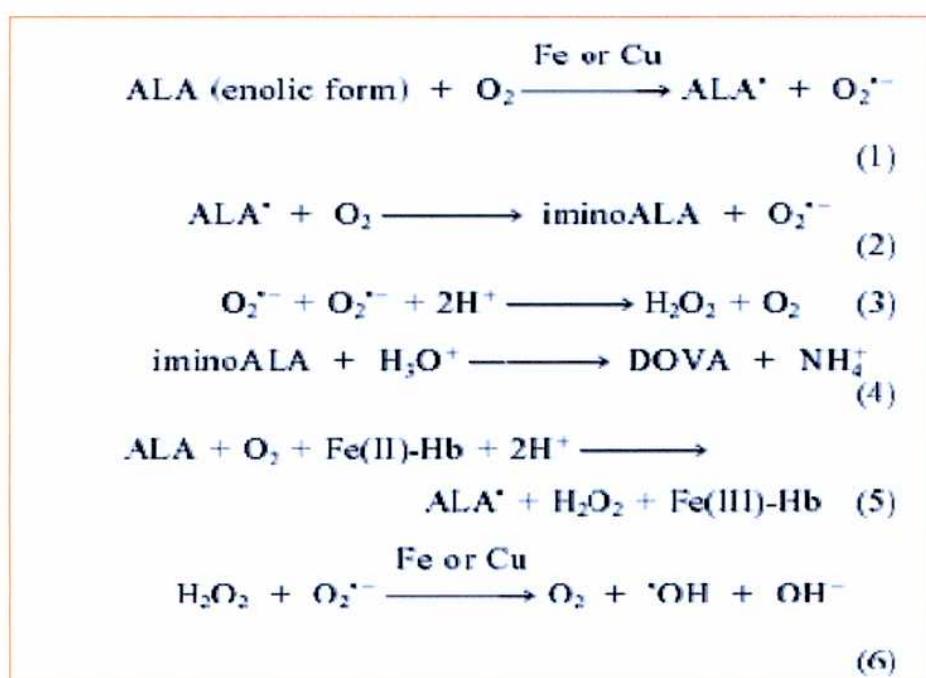


Fig. 31: Reacciones de generación de ROS a partir de ALA.

El modelo de intoxicación empleado en este trabajo resultó apropiado para analizar el metabolismo de hidratos de carbono y evaluar la situación de estrés oxidativo generado por la acumulación de ALA.

La administración conjunta de AIA y DDC a ratas, genera una porfiria hepática debido a que se produce una depleción del pool de hemo regulatorio. El AIA actúa alquilando al hemo y generando pigmentos verdes que, a su vez, provocan la inactivación irreversible del citocromo P450. En este proceso, el hemo que debería formar parte del citocromo P450 es destruido (Ortiz de Montellano y Mico, 1981; Smith y De Matteis, 1980). Así resulta un desbalance en la

concentración de hemo que está destinada a regular su propia síntesis. Por su parte, el DDC produce la formación de N-alquilporfirinas, las cuales actúan como inhibidores de la actividad de la enzima ferroquelatasa (Marks y col., 1988). Whiting y Granick (1976) han demostrado que una combinación de AIA y DDC, luego de 18 h de tratamiento, produce un aumento en la actividad de la enzima ALA-S en hígados de embriones de pollo de hasta 600 veces.

El modelo animal aquí presentado mimetiza, desde el punto de vista bioquímico, un tipo de porfiria, conocida como porfiria variegata (PV). De hecho, algunos trabajos realizados sobre esta enfermedad humana describen en este tipo de porfiria, una inhibición de la actividad de la enzima ferroquelatasa (Cole y Marks, 1984), Así como otros describen la inhibición de la actividad de la enzima protoporfirinogeno oxidasa (PPO) (Kappas y col., 1995).

Lelli y col. (2005) observaron en ratas que la administración simultánea de ambas drogas (AIA y DDC) provoca un aumento en el contenido de ALA y PBG hepático dependiente de la dosis de las drogas porfirinogénicas y una disminución del 50 % de la actividad de la enzima ferroquelatasa.

En el presente trabajo de Tesis, se evaluó la actividad de la enzima ALA-S, la cual mostró un aumento de su actividad dependiente de la dosis de las drogas AIA/DDC, se la empleó así, como parámetro indicador del grado de porfiria

Por otro lado, el hígado juega un rol muy importante en la homeostasis de la glucosa, manteniendo un balance entre el almacenamiento de la glucosa, vía glucogenogénesis, y la síntesis de glucosa, vía gluconeogénesis, y/o su libereación vía glucogenolisis (Hers, 1990; Nordlie y col., 1999). La administración de AIA y DDC genera un bloqueo de la gluconeogénesis, por la inhibición de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y de la glucogenolisis, por la disminución de la actividad de la glucógeno fosforilasa (GP) (Lelli y col., 2005), lo cual provocaría una disminución de la disponibilidad hepática de glucosa. Por otra parte, si bien se sabe que los ataques de porfiria se desencadenan y/o agravan frente a situaciones de dietas deficitarias en hidratos de y que el tratamiento de los pacientes con glucosa por vía oral provoca la reducción de la excreción de precursores en la orina, y una supresión de la inducción de ALA-S, los mecanismos por los cuales estos hechos ocurren no han sido totalmente dilucidados.

Pareció, por todo lo expuesto, interesante determinar las actividades de las enzimas relacionadas con el catabolismo de la glucosa. Para estudiar la glucólisis, en este modelo experimental, se midieron las actividades de las tres enzimas reguladoras de este camino metabólico: la GK, la PFK y la PK. Para la evaluación del PPP se midió la actividad de la G6PDH.

La GK cataliza la fosforilación de la glucosa en los hepatocitos, islotes pancreáticos y algunas células neurosecretoras (Jetton y col., 1994). Es un componente clave en la maquinaria sensora de la glucosa en los mamíferos. A diferencias de otras hexoquininas, la GK tiene baja afinidad por la glucosa. La actividad de esta enzima tras la administración simultánea de AIA y DDC disminuye de forma dosis dependiente. Al mismo tiempo que se evaluó la actividad de la GK, también se midió la actividad de la HK total (actividad de la HK I, II, III y IV), la cual mostró una disminución dosis dependiente de las drogas porfirinogénicas con respecto al grupo C debido, fundamentalmente, a la disminución de GK. Las HK tipo I, II y III se diferencian de la GK en que poseen una mayor afinidad por la glucosa y son inhibidas por el sustrato (Wilson, 2003). Por otra parte, la actividad de la GK hepática está regulada por insulina y por hormona tiroidea, las cuales controlan la expresión del mRNA de esta enzima (Iynedjian y col., 1988; Poner y Seitz, 1989). Se especula que, en este modelo, el decremento de la actividad de la GK podría deberse a que se encuentra afectada la síntesis proteica hormonalmente modulada, o bien se encuentra alterada la regulación de esta actividad enzimática por la proteína regulatoria GKRP (Vandercammen y Van Schaftingen, 1993), o bien las ROS dañan la estructura proteica, también podría deberse a un evento multifactorial.

Luego de la administración simultánea de AIA y DDC, las actividades de PFK y PK disminuyeron significativamente para el grupo A. Si bien la PFK mostró una respuesta dependiente de la dosis de las drogas porfirinogénicas, disminuyendo significativamente para los grupos M y A, la PK no mostró este tipo de comportamiento. Es importante hacer notar que la regulación de la transcripción del gen de PK está ejercida por insulina y glucosa, si algunos de estos componentes no está presente en cantidades suficientes su actividad se verá afectada (Kanh, 1997).

Por otro lado, Bechara (1996) ha demostrado que el estrés oxidativo puede ser gatillado por la acumulación de ALA en la porfiria aguda intermitente (PAI) y en el envenenamiento por plomo. Lelli y col. (2005) han demostrado que el aumento de la actividad de la enzima ALA-S produce un estado de estrés oxidativo, observándose un aumento de los distintos marcadores de estrés, como peroxidación lipídica, quimioluminiscencia urinaria y la respuesta antioxidante de SOD que correlacionan con la sobreproducción de ALA generada. Sin embargo, la actividad de la enzima CAT se halló disminuida, debido en parte a la naturaleza hemoproteica de la misma.

Así, pareció interesante estudiar otros parámetros de estrés, como el contenido de NADPH, NADH, GSH y glutatión total. También se midieron las actividades de las enzimas G6PDH y GR, ambas involucradas en la generación de sustancias protectoras, NADPH y GSH, respectivamente.

La G6PDH, es la enzima de velocidad limitante en el camino de las pentosas (PPP), utiliza G6P para generar NADPH y R5P, principal precursor de la síntesis de ácidos nucleicos. El comportamiento observado en la actividad de la enzima G6PDH, en este modelo, evidenció que la misma disminuye su actividad en los grupos B y M respecto del grupo C. Sin embargo, cuando se emplearon dosis más altas de AIA (500mg/kg.peso), la actividad de esta enzima aumentó, respondiendo al estrés oxidativo producido y generando un aumento en el catabolismo de la glucosa. De esta manera la G6PDH se comportaría como un modulador del estado redox celular aumentando la producción de NADPH (Kletzien y col., 1994)

Por otra parte, el NADPH es generado por tres vías. La primera de ellas es la reacción catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs. La enzima mólica también es capaz de generar NADPH transformando malato en piruvato durante la síntesis de los ácidos grasos, reacción que es llevada a cabo en el citoplasma. El PPP es la tercera vía por la que se genera NADPH, tanto la G6PDH como la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) producen NADPH. Al analizar la relación NADPH/NADP⁺ hepática se observó una disminución en todos los grupos al compararlos con el grupo C. Esto sugiere que aumenta el consumo del nucleótido pirimidínico reducido debido al estrés oxidativo generado en este modelo experimental. Al realizar comparaciones entre los grupos A, M y B, se observó, sin embargo, un aumento de esta relación con la dosis, esto puede

deberse a la contribución de NADPH proveniente de la actividad aumentada de la G6PDH, y la disminución en la actividad de la GR, la cual consume NADPH para regenerar el GSH. Alteraciones en la actividad de G6PDH, GR y NADPH/NADP⁺ fueron reportadas en hígado y páncreas de ratas con diferentes disturbios metabólicos relacionados con situaciones alteradas de glucemia (Díaz-Flores y col., 2006)

La GR es la enzima encargada de restaurar el GSH a través de la oxidación de NADPH. En el presente trabajo se halló que la actividad de la GR está aumentada más de 6 veces a las dosis más bajas de las drogas porfirinogénicas. En cambio, a dosis altas, no se produce aumento de la actividad, la que se mantiene en los valores basales. Esto podría estar indicando que a altas dosis de AIA/DDC la GR sufriría algún tipo de modificación oxidativa por parte de las ROS que impedirían evaluar su inducción. Esta variación en la respuesta de la GR, sin embargo, no provoca una variación en el contenido de GSH, que siempre se observó disminuido respecto al grupo C. Esto podría sugerir que a bajas concentraciones de las drogas porfirinogénicas la inducción de la GR aumentaría el contenido de GSH, pero también aumentaría su reutilización por enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) o la glutatión trasferasa (GST), que mantienen los niveles de GSH siempre disminuidos respecto del grupo C.

Se analizaron los niveles de glutatión total (GSSG + GSH) mediante el método de Griffith (1980). Se observó una disminución del contenido total de glutatión para los grupos B, M y A respecto al grupo C. Para poder determinar los contenidos de glutatión oxidado y reducido, se debería realizar el ensayo de Griffith (1980) empleando 2-vinilpiridina (2-VP), el cual es un modificador irreversible de GSH.

Otra instancia para analizar las vías metabólicas de los hidratos de carbono, es medir el contenido de NAD⁺. Este nucleótido pirimidínico es reducido a NADH en varias vías metabólicas. Una de ellas es la glucólisis, la cual genera dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa. A partir de dos moléculas de pirúvico se forman dos moléculas de acetil-CoA y dos moléculas más de NADH. Y por último, se generan tres moléculas de NADH en la mitocondria a nivel del ciclo de Krebs por cada molécula de acetil-CoA. Si bien, estas 9 moléculas de NADH formadas durante estos procesos a partir de una molécula de glucosa, son

utilizadas en la membrana interna de la mitocondria por la cadena transportadora de electrones, podría existir un desbalance en la relación NADH/NAD⁺, ya que se ha demostrado que las enzimas regulatorias de la glucólisis disminuyen su actividad en este modelo. Así, cuando se calculó la relación NADH/NAD⁺ se observó un aumento de la misma en función de la dosis de AIA y DDC empleada, esto sugiere que el NAD⁺ está siendo reducido a NADH en mayor proporción en los grupos tratados que en el grupo C. Estos resultados permiten especular que, si bien las enzimas glucolíticas están disminuidas en su actividad, la fuente regeneradora de NAD⁺, principalmente la cadena transportadora de electrones, podría estar afectada por el daño oxidativo a nivel de membrana mitocondrial. Lelli y col. (2005) han demostrado en un modelo experimental de porfiria aguda en ratas que existe un incremento en la peroxidación lipídica generada por el estrés oxidativo, esto podría producir una alteración de la estructura de la membrana mitocondrial, lo que dificultaría la oxidación de NADH a través de ella.

Se analizó el contenido de grupo carbonilos en proteínas, como otro parámetro indicativo del estrés oxidativo producido en estas biomoléculas. Así se observó un aumento de grupos carbonilos en proteínas en función de la dosis de las drogas AIA/ DDC. Por otra parte, se realizó una búsqueda en Internet para analizar si las secuencias de aminoácidos presentes en los sitios catalíticos y de unión al sustrato o a cofactores de las distintas enzimas estudiadas podrían estar afectadas por la oxidación y la consiguiente aparición de grupos carbonilos. Los aminoácidos sensibles a este tipo de modificación son aquellos aminoácidos azufrados o con cadenas laterales insaturadas, como Phe, Met, Trp, y Tyr. La introducción de grupos carbonilos, también genera modificaciones secundarias en las cadenas laterales de algunos aminoácidos, como Cys, His y Lys, o escindiendo la unión peptídica, al modificar la Pro (Freeman y Grapo, 1982; Gebicki y Gebicki, 1993; Stadtman, 1992; Webster y Nunn, 1988).

Se ingresó a la página de “*The ExPASy*” (Expert Protein Analysis System, 2006) para obtener las secuencias de la GK, PFK, PK, G6PDH y GR mediante el código enzimático (EC) o el nombre de cada enzima. Una vez obtenida la secuencia, se determinó el porcentaje de aminoácidos que pueden ser modificados con respecto al total de la cadena, así como la ubicación de estos aminoácidos dentro de la misma (Tabla 4).

Los resultados de este análisis arrojaron un porcentaje de entre el 25 y 30% de aminoácidos blanco del daño oxidativo en las enzimas estudiadas. De todas formas, al evaluar los resultados de Tabla 4 se puede especular que el decremento en las actividades algunas de las enzimas estudiadas puede deberse, en parte, al daño causado por la introducción de grupos carbonilos en aminoácidos fundamentales para su función. Como por ejemplo, en la GR el único sitio catalítico de la enzima esta formado por aminoácidos blanco de daño por carbonilación, lo que podría explicar en parte porque esta enzima disminuye su actividad frente al estrés oxidativo, generado en este modelo. De la misma manera, el daño generado sobre la actividad de la G6PDH no parecería ser tan importante, ya que ninguno de los cinco sitios de unión para el NADP⁺ posee aminoácidos que puedan ser alterados, y solo el 50% de los sitios de unión al sustrato podría estar afectado.

Tabla 4: Dominios de importancia biológica de las enzimas GK, GKR, PFK, PK, G6PDH y GR.

	Descripción	Nº aminoácidos	aminoácidos blancos	%
GK	Regulador	488	120	24
	Unión a glucosa	28	10	35
	Unión a glucosa	28	10	35
	Catalítico	435	97	22
	Sec. total	972	240	26
GKRP	Sec.total	626	170	27
PFK	Unión a F6P	1	1	100
	Unión a F6P	1	1	100
	Unión a F6P	1	1	100
	Unión a F6P	1	1	100
	Unión a ATP	5	3	60
	Unión a ATP	17	3	17
	Sec. total	779	221	28
PK	Catalítico	1	-	0
	Unión a Mg ⁺²	3	-	0
	Unión a Mg ⁺²	3	-	0
	Unión a Mg ⁺²	3	-	0
	Sec. total	574	151	26
G6PDH	Unión a NADP ⁺	1	-	0
	Unión a NADP ⁺	1	-	0
	Unión a NADP ⁺	1	-	0
	Unión a NADP ⁺	1	-	0
	Unión a NADP ⁺	1	-	0
	G6P	1	1	100
	G6P	1	-	0
	Sec. total	514	179	34
	GR	Catalítico	1	100
	Sec. parcial	424	109	25

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se evaluaron dos caminos metabólicos seguidos por la glucosa, la glucólisis y el PPP y algunos parámetros de estrés oxidativo en un modelo de porfiria aguda experimental y se concluyó que:

1. Las actividades de las enzimas reguladoras de la glucólisis, GK, PFK y PK, se encuentran disminuidas para altas dosis de AIA/DDC. La GK muestra una respuesta de su actividad enzimática, AIA/DDC-dependiente. Esto podría deberse a alteraciones que las drogas porfirinogénicas causan en la regulación hormonal de esta proteína que influyen en la expresión de su mRNA, y a la inhibición por GKRP que puede modificarse por acción conjunta de las drogas.

1.1. La PFK posee el 100% de aminoácidos blanco de carbonilación en sus dos sitios catalíticos. Por lo tanto el daño oxidativo podría ser una causa, entre otras, de la disminución de su actividad en los animales tratados.

2.1. La disminución de actividad de la PK podría explicarse como el resultado de una disminución de inducción de la transcripción por probable déficit de insulina y baja disponibilidad de glucosa hepática.

2. La G6PDH, reguladora del PPP, muestra una un aumento de su actividad en este modelo para altas dosis de AIA/DDC. *In vivo*, se podría especular que tal aumento produciría una mayor producción de NADPH como respuesta al estrés oxidativo y una disminución de la glucosa hepática por aumento de su catabolismo.

3. La relación NADPH/NADP⁺ aumenta en función de la dosis, comportándose como un metabolito protector contra el estrés oxidativo. Este aumento se debería en parte al aumento en la actividad de la G6PDH y a la disminución de la actividad de la GR. (*Glutatión Reductasa*) *GSH-NADP* *A.G.*

4. La GR disminuye su capacidad de inducirse al aumentar la dosis de AIA-DDC. Se podría especular que esta pérdida se debe al daño oxidativo que sufriría la proteína en su sitio activo o en su estructura general.

5. El contenido de GSH hepático disminuye respecto del grupo C y no muestra variación al ir aumentando las dosis de las drogas porfirinogénicas. El contenido de glutatión total, al ser determinado por otro método aumenta

levemente con la dosis de los tóxicos, indicando un posible aumento de la síntesis de GSH en respuesta al estado de estrés oxidativo.

6. Si bien la glucólisis esta disminuida, se observa un aumento del contenido de NADH. Esto podría relacionarse con cambios de estructura de la membrana mitocondrial debido al daño a lípidos producido por estrés, lo que afectaría la actividad de las proteínas, participantes en el transporte de electrones, que reoxidarán el NADH.

7. El contenido de proteínas carboniladas aumenta en este modelo experimental por lo tanto puede especularse que la actividad de las mismas se afecta por daño oxidativo de sus aminoácidos.

Finalmente, teniendo en cuenta estos resultados, se puede especular que las alteraciones producidas en el catabolismo de la glucosa, en este modelo experimental, pueden estar relacionadas, en parte, con el daño oxidativo causado por las ROS sobre las estructuras de las proteínas enzimáticas y que esta situación podría asociarse al beneficio que la administración de hidratos de carbono produce en pacientes con porfiria hepática aguda

PERSPECTIVAS

Se prevé continuar el presente trabajo desarrollando los objetivos que a continuación se detallan:

- 1.** Estudiar las alteraciones hormonales en este modelo de porfiria, niveles hormonales, regulación de la actividad hormonal y caracterización de receptores, para las siguientes hormonas: adrenalina, noradrenalina, glucagón, insulina y glucocorticoides.
- 2.** Medir los intermediarios de la glucólisis: glucosa hepática, G6P, F6P y piruvato.
- 3.** Determinar el contenido de glutatión total, GSH y GSSG mediante el método de Griffith (1980).
- 4.** Estudiar de las actividades enzimáticas de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST), así como el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- 5.** Evaluar el efecto de antioxidante *in vivo*, mediante la administración previa o posterior a la intoxicación con AIA y DDC.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me acompañaron durante esta etapa maravillosa de mi vida. A aquellas que me apoyaron, contuvieron y me guiaron en este camino lleno de enseñanzas y alegrías.

Mi especial agradecimiento a las chicas del laboratorio que me ayudaron y enseñaron. Por su paciencia y perseverancia para guiarme en este trabajo.

Marta, gracias por la oportunidad que me diste y por poder aprender junto a vos.

Leonor, gracias por permitirme formar parte de este proyecto y trabajar junto a todas ustedes.

Adriana, gracias por tus consejos. Tu sabiduría y tranquilidad fueron de mucha ayuda.

Carmen, más que una técnica de laboratorio fuiste mi maestra, gracias por todo el cariño que me diste.

A las chicas, Sandra, Gisela y Juliana, compañeras y amigas de tantas cosas hermosas.

A mi papá y mi mamá que hacen tanto por mi y, a pesar de la distancia, siempre estuvieron junto a mí y no permitieron que baje los brazos. A mis hermanos, Fernando y Amalia, con quienes compartí estos años en Buenos Aires. A todos ellos, quienes son el pilar de mis logros.

A mis amigas de acá, Juli, Eve y Jime con quienes compartí tantas alegrías y tristezas y me enseñaron tanto.

A mis amigas de allá, Silvia, Adri, Mari y Marie, quienes a pesar de estar lejos siempre estuvieron presentes.

A Ariel, por acompañarme en este año tan importante y especial. Gracias por ser parte de mi vida.

Y a todas aquellas personas que estuvieron y están.

MUCHÍSIMAS GRACIAS!!!

REFERENCIAS

- ◆ Aikens J. & Dix T.A. (1991). "Perhydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides". *J. Biol. Chem.* 266:15091-15098
- ◆ Armstrong R.S., Sohal R.G., Cutler, R.G., Slater T.F. (1984). "Free radicals molecular biology, aging and disease". Raven, New York.
- ◆ Anderson K.E., Sassa S., Bishop D.F., Desnick R.J. (2001). "The porphyries". En: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. "The metabolic basis of inherited disease", 8th ed. vol. 1. New York: McGraw-Hill; 2991- 3062.
- ◆ Antonenkov V.D. (1989) "Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes". *Eur. J. Biochem.* 183:75-82.
- ◆ Barrett, M.P. (1997). "The pentose phosphate pathway and Parasitic Protozoa". *Parasitol. Today* 13:11-16.
- ◆ Bechara E.J. (1996). "Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:841- 851.
- ◆ Beutler E. (1969). "Effect of Flavin Compounds on Glutathione Reductase Activity: En Vivo and En Vitro Studies". *J. Clin. Env.* 48:1957-1966.
- ◆ Biagiotti E., Bosch, K.S., Ninfali, P., Frederiks, W.M., Van Noorden, C.J.F., (2000). "Posttranslational regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in tongue epithelium". *J. Histochem. Cytochem.* 48:971-977.
- ◆ Birnboim H.C., Kanabus-Kaminska M. (1985). "The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide may involve a metabolic process". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6820-6824.
- ◆ Blake D.R., Ratten R.E., Tamec J. (1987). "Free radicals in biological systems- A review orientated to inflammatory processes". *Br. Med. Bull.* 45:371-385.
- ◆ Bonkovsky H.L., Cable E.E., Cable J.W., Donohue S.E., White E.C., Greene V.J., Lambrecht R.W., Srivastava K.K., Arnold W.N. (1992). "Porphyrogenic properties of the terpenes camphor, pinene, and thujone (with a note on historic implications for absinthe and the illness of Vincent van Gogh)". *Biochem. Pharmacol.* 43:2359-2368.
- ◆ Bottomley S.S. y Müller Eberhard U. (1988). "Pathophysiology of heme synthesis". *Semin. Hematol.* 25:282-302.

- ◆ Bublitz C., Steavenson S. (1988). "The pentose pathway in the endoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 263:12849-12853.
- ◆ Cadena E. (1989). "*Biochemistry of oxygen toxicity*". *Annu. Rev. Biochem.* 51:79-110.
- ◆ Castaño J., Nieto A., Feliu J.E. (1979). "*Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes*". *J. Biol. Chem.* 254: 5576-5579.
- ◆ Cerutti P.A. (1985). "*Prooxidant states and tumor promotion*". *Science*. 227:375-381.
- ◆ Choe M., Jackson C., Yu B.P. (1995). "*Lipid peroxidation contributes to age-related membranes rigidity*". *Free Radical Biol. Med.* 18:977-984.
- ◆ Choi J.H., Yu B.P. (1995). "*Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity*". *Free Radical Biol. Med.* 18:133-139.
- ◆ Cole S.P., Marks G.S. (1984). "*Ferrochelatase and N-alkylated porphyrins*". *Mol. Cell. Biochem.* 64:127-137.
- ◆ Consler T.G., Woodard S.H., Lee J.C. (1989) "*Effects of Primary Sequence Differences on the Global Structure and Function of an Enzyme: A Study of Pyruvate Kinase Isozymes*". *Biochem.* 28: 8756-8764.
- ◆ Davies K.J.A., Wiese A.G., Sevanian A., Kim E.H. (1990). "*Repair system in oxidative stress*". En: Finch C.E., Johnson, T.E. "*Molecular biology of aging*". Wiley-Liss, New York.
- ◆ De Matteis F. (1971). "*Loss of haem in rat liver caused by the porphyrogenic agent 2-allyl-2-isopropylacetamide*". *Biochem J.* 124:767-777.
- ◆ De Matteis F. (1972). "*The effects of drugs on the activities of 5-aminolaevulinate synthetase and other enzymes in the pathway of haem biosynthesis*". *Biochem J.* 130:52-53.
- ◆ De Matteis F., Gibbs A. (1972). "*Stimulation of liver 5-aminolaevulinate synthetase by drugs and its relevance to drug-induced accumulation of cytochrome P-450. Studies with phenylbutazone and 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*". *Biochem J.* 126:1149-1160
- ◆ Demple B., Linn, S. (1982). "*5,6-saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide*". *Nucleic Acid Res.* 10:3781-3798.
- ◆ Demple B. (1990). "*Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses*". *Mutat. Environ. A*: 155-167.

- ♦ Díaz-Flores M., Ibañez-Hernández M.A., Galvan R.E., Gutierrez M., Durán-Reyes G., Medina-Navarro R., Pascoe-Lira D., Ortega-Camarillo C., Vilar-Rojas C., Cruz M., Baiza-Gutman L.A. (2006). “*Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity an NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat*”. Life Science 78: 2601-2607.
- ♦ Dickson A.J., Langslow, D.R. (1978). “*Hepatic gluconeogenesis in chickens*”. Mol. Cell. Biochem 22: 167-181
- ♦ Doss M., Sixel-Dietrich F., Verspolh, F. (1985). “ Glucose effect and rate limiting function of uroporphyrinogen synthase on porphiryn metabolism in hepatocytes culture: relationship with human acute hepatic porphyrias”. J. Clin. Chem. Biochem. 23:505-513.
- ♦ Eicks M., Maurino V., Knappe S., Flugge U. and Fischer K. (2002). “*The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and plastidic pentose phosphate pathway in plants*”. Plant Physiol. 128, 512- 522.
- ♦ Elder G.H. (1998). “*Genetic defects in the porphyrias: types and significance*”. Clin. Dermatol. 16:225–233.
- ♦ Elder G.H., Hiit R.J. (2001). “*Treatment of acute porphyria*”. Hosp. Med. 62:422– 5.
- ♦ Ellman G.L. (1959). “*Tissue sulphydryl groups*”. Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77.
- ♦ Ferrannini E., Wahren J., Felig P., DeFronzo R.A. (1980). “*The role of fractional glucose extraction in the regulation of splanchnic glucose metabolism in normal and diabetic man*”. Metabolism 29:28-35.
- ♦ Fitch W. M., Hill R., Chaikoff, I. L. (1959a). “*The effect of fructose feeding on glycolytic enzyme activities of the normal rat liver*”. J. Biol. Chem. 234:1048-1051.
- ♦ Fitch W. M., Hill R., Chaikoff I. L. (1959b). “*Hepatic glycolytic enzyme activities in the alloxan-diabetic rat: response to glucose and fructose feeding*”. J. Biol. Chem. 234:2811-2813.
- ♦ Fitch W. M., Chaikoff I. L. (1960). “*Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets high in glucose and fructose*”. J. Biol. Chem. 235:554-557.

- ♦ Freeman B.A., Grapo J.D. (1982). "Biology of disease. Free radicals and tissue injury". Lab. Invest. 47:412-426.
- ♦ Fridovich I. (1993). "Superoxide radical: an endogenous toxicant". Annu. Rev. pharmacol. Toxicol. 23:239-257.
- ♦ Gamaley I.A., Klyubin I.V. (1999). "Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions". Int. Rev. Cytol. 188:203-55.
- ♦ Gebicki S., Gebicki J.M. (1993). "Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals". Biochem. J. 289:743-749.
- ♦ Glock G.E., McLean P. (1953). "Further studies on the properties and assays of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver". Biochemistry. 55: 400-408.
- ♦ González C., Ureta T., Sanchez R., Niemeyer H. (1964). "Multiples molecular forms of ATP: hexose 6-phosphotransferase from rat liver". Biochem. Biophys. Res. Commun. 16:347-352.
- ♦ Granick S., Urata G. (1963). "Increase in activity of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine". J. Biol. Chem. 238: 821-817.
- ♦ Griffith, O.W. (1980). "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine". Anal. Biochem. 106:207-212.
- ♦ Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease". Biochem. J. 219:1-14.
- ♦ Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989). "Free radicals in biology and medicine". 2nd ed. Oxford University Press, Clarendon, Oxford.
- ♦ Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation". FEBS Lett. 307:108-112.
- ♦ Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now". J. Lab. Clin. Med. 119:598-620.
- ♦ Harman D. (1992). "Role of free radicals in aging and disease". Ann. N. Y. Acad. Sci. USA. 673:126-141.
- ♦ Hayashi N., Yoda B., Kikuchi G. (1969). "Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of delta-aminolevulinate synthetase in

- liver mitochondria. IV. Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver". Arch. Biochem. Biophys. 131:83-91.*
- ♦ Hers H.G. (1990). "Mechanisms of blood glucose homeostasis". J. Inherit. Metab. Dis. 13:395–410.
- ♦ Higuchi Y., Linn S. (1995). "Purification of all form of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells". J. Biol. Chem. 270:7950-7956.
- ♦ Hoffman M.E., Mello Filho A.C., Meneghini R. (1984). "Correlation between cytotoxic effect of H_2O_2 and the yield of DNA strand break in cells of different species". Biochim. Biophys. Acta. 781:234-238.
- ♦ Hoppner W., Seitz H.J. (1989). "Effect of thyroid hormones on glucokinase gene transcription in rat liver". J. Biol. Chem. 264:20643–20647.
- ♦ Horton A.A., Fairhurst S. (1987). "Lipid peroxidation and mechanism of toxicity". CRC Crit. Rev. Toxicol. 18:27-79.
- ♦ Imlay J.A., Linn S. (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity". Science. 240:1302-1309.
- ♦ Iynedjian, P.B., Gjinovci, A., Renold, A.E. (1988). "Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats". J. Biol. Chem. 263, 740-744.
- ♦ Jacob R.A. (1995). "The integrated antioxidant system". Nutr. Rev. 15:755-766.
- ♦ Jetton T.L., Liang Y., Pettepher C.C., Zimmerman E.C., Cox F.G., Horvath K., Matschinsky F.M., Magnuson M.A. (1994). "Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut". J. Biol. Chem. 269:3641-54.
- ♦ Kanh A. (1997). "Transcriptional regulation by glucose in liver". Biochimie. 79:113-118.
- ♦ Kappas A., Sassa S., Galbraith R.A., Nordmann Y. (1995). "The porphyrias". En: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Stanbury J.B., Wibgaarden, J.B., Fredickson D.S. (Eds.). Metabolic and Molecular Basis of Enherited Disease. McGraw-Hill, New York. 2103–2159.
- ♦ Kappuz, H. (1986). "Overview of enzyme system involved in bioreduction of drugs and in redox cycling". Biochem. Pharmac. 35: 1-7.

- ◆ Kather H., Rivera M., Brand K. (1972). "Interrelationship and control of glucose metabolism and lipogenesis in isolated fat-cells. Control of pentose phosphate-cycle activity by cellular requirement for reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate". Biochem. J. 128:1097-1102
- ◆ Kemp R.G. (1975) "Phosphofructokinase from rabbit liver". Meth. Enzimol. 46:67-71.
- ◆ King T.E., Mason H.S., Morrison M. (1982). "Oxidases and related redox systems". Pergamon Press, Oxford.
- ◆ Kletzien R.F., Harris P.K., Foellmi, L.A. (1994). "Glucosa-6-phosphate dehydrogenase a housekeeping enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrientes, and oxidant stress". FASEB J. 8:174-181
- ◆ Kono Y., Fridovich I. (1982). "Superoxide radical inhibits catalase". J. Biol. Chem. 257:5751-5761.
- ◆ Lelli S.M., San Martín de Viale L.C., Mazzetti M.B. (2005) "Response of glucose metabolism enzymes in an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species". Toxicology. 216: 49–58
- ◆ Levanon D., Danciger E., Dafni N., Bernstein Y., Elson A., Moens W., Brandeis M., Groner Y. (1989). "The primary structure of human liver type phosphofructokinase and its comparison with other types of PFK". DNA. 8:733–743.
- ◆ Levine R. (1994). "Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins". Meth. Enzymol. 186:464-478.
- ◆ Loftus L.S., Arnold, W.N. (1991). "Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria?". BMJ. 303:1589–1591.
- ◆ Lowry H.O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent" J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- ◆ Macalpine I., Hunter R. (1966). "The "insanity" of King George 3rd: a classic case of porphyria". BMJ. 5479:65–71.
- ◆ Macalpine I., Hunter R., Rimington C. (1968). "Porphyria in the royal houses of Stuart, Hanover, and Prussia. A follow-up study of George 3rd's illness". BMJ. 1:7–18.

- ◆ Mandula B., Srivastava S.K., Beutler E. (1970). “*Hexose-6-phosphate dehydrogenase: distribution in rat tissues and effect of diet, age and steroids*”. Arch Biochem Biophys. 141:155-61.
- ◆ Marks G.S., McCluskey S.A., Mackie J.E., Riddick D.S., James C.A. (1988). “*Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450*”. FASEB J. 2:2774–2783.
- ◆ Martinez- Oyanedel J., McNae I.W., Nowicki M.W., Keillor J.W., Michels P.A.M., Fothergill-Gilmore L.A., Walkinshaw M.D. (2006). “*The first cristal structure of phosphofructokinase from a eukaryote: Trypanosoma brucei*”. J. Mol. Biol., doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.019.
- ◆ Martinez-Cayuela M. (1995). “*Oxygen free radicals and human disease*”. Biochemistry. 77:147-161.
- ◆ Marver H.S., Tschudy D.P., Perlroth M.G., Collins A. (1966). “*Delta-aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in liver homogenates*”. J. Biol. Chem. 241:2803-2809.
- ◆ Mason R.P. (1982). “*Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals*”. En: Pryor W.A. “*Free radicals in biology*”. Academic Press, New York. 5:161-173.
- ◆ Mauzerall D., Granick S. (1956). “*The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine*”. J. Biol. Chem. 219:435-46.
- ◆ May B.K., Dogra S.C., Sadlon T.J., Bhasker, C.R., Cox T.C., Bottomley S.S. (1995). “*Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates*”. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 51:1–51.
- ◆ Mello-Pilho A.C., Hoffmann M.E. & Meneghini R. (1984). “*Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron*”. Biochem. J. 218:273-275.
- ◆ Meyer U.A., Marver H.S. (1971). “*Chemically induced porphyria: increased microsomal heme turnover after treatment with allylisopropyl-acetamide*”. Science. 171:64-66.
- ◆ Mookhtiar K.A., Kalinowski S.S. Brown K.S., Tsay Y.H., Smith-Monroy C., Robinson G.W. (1996). “*Heterologous expression and characterization of rat liver glucokinase regulatory protein*”. Diabetes. 45:1670-1677.

- ◆ Mustajoki P., Nordmann Y. (1993). “*Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks*”. Arch. Intern. Med. 153:2004–2008.
- ◆ Nakao K., Wada O., Takaku F., Sassa S., Yano Y., Urata G. (1967). “*The origin of the increased protoporphyrin in erythrocytes of mice with experimentally induced porphyria*”. J. Lab. Clin. Med. 70:923-932.
- ◆ Nielsen E. (1953). “*Porphyria due to drugs; preliminary report*”. Ugeskr. Laeger 115:1616-1618.
- ◆ Nielsen H. (1981). “*Covalent binding of peroxidized phospholipids to protein. III. Reaction of individual phospholipids with different proteins*”. Lipids. 16:215-222.
- ◆ Niki E., Yamamoto Y., Komuro E., Sato E. (1991). “*Membrane damage due to lipid oxidation*”. Am. J. Clin. Nutr. 53:2015-2055.
- ◆ Noguchi T., Yamada K., Enoue H., Matsuda T., Tanaka T. (1987). “*The L-type and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters*”. J. Biol. Chem. 262:14366-14371.
- ◆ Nordlie R.C., Foster J.D., Lange A.J. (1999). “*Regulation of glucose production by the liver*”. Annu. Rev. Nutr. 19:379–406.
- ◆ Nordmann, Y., Puy, H. (2002). “*Human hereditary hepatic porphyries*”. Clin. Chim. Acta.325:17-37.
- ◆ Ortiz de Montellano P.R., Mico B.A. (1981). “*Destruction of cytochrome P-450 by allylisopropyl-acetamide is a suicidal process*”. Arch. Biochem. Biophys. 206:43–50.
- ◆ Pierach C.A., Jennewein E. (1999). “*Friedrich Wilhelm I and porphyria*”. Sudhoffs Arch. Z. Wissenschaftsgesch. 83:50–66.
- ◆ Pilks S.J. (1975). “*Glucokinase in rat liver*”. Meth. Enzymol. 42:31-9.
- ◆ Ponka P. (1999). “*Cell biology of heme*”. Am. J. Med. Sci. 318:241–256.
- ◆ Proctor P.H., Reynolds E.S. (1984). “*Free radicals and disease in man*”. Physiol. Chem. Phys. 16:175-195.
- ◆ Pryor W.A. (1986). “*Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions*”. Annu. Rev. Physiol. 48:657-667.
- ◆ Pryor W.A., Church D.P. (1991). “*Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity*”. Free Rad. Biol. Chem. 11:41-46.

- ◆ Randerath K., Reddy R., Danna T.P., Watson W.P., Crane A.E., Randerath E. (1992). "Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ^{32}P -postlabeling". Mutat. Res. 275:355-366.
- ◆ Reiter R.J., Guerrero J.M., Escames G., Pappolla M.A., Acuna-Castroviejo D. (1997). "Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity". Ann. N. Y. Acad Sci. 825:70-8.
- ◆ Reznick A.Z., Packer L. (1994). "Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay". En: Packer L. (Ed.), Meth. Enzymol. "Oxygen Radicals in Biological Systems". Academic Press, San Diego, 233:357-363.
- ◆ Riceevans C., Burdon R. (1993). "Free radical lipid interaction and their pathological consequences". Prog. Lipid. Res. 37:37-110.
- ◆ Sapag-Hagar M., Lagunas R., Sols, A. (1973). "Apparent unbalance between the activities of 6-phosphogluconate and glucose-6-phosphate dehydrogenases in rat liver". Biochem. Biophys. Res. Commun. 50:179-185
- ◆ Sassa S., Granick S. (1970). "Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in culture". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:517-522.
- ◆ Sassa S. (1988). "Heme stimulation of cellular growth and differentiation". Semin. Hematol. 25:312-320.
- ◆ Schaich K.H. (1992). "Metals and lipid oxidation. Contemporary issues". Lipids. 27:209-218.
- ◆ Schmidt R. (1963). "Hepatotoxic drugs causing porphyria in man and animals". S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 14:212-220.
- ◆ Sies H. (1985). "Oxidative stress". Academic Press, London.
- ◆ Simpson, C.J., Fothergill-Gilmore, L.A. (1991). "Isolation and sequence of a cDNA encoding human platelet phosphofructokinase". Biochem. Biophys. Res. Commun. 180:197-203.
- ◆ Smith A.G., De Matteis F. (1980). "Drugs and hepatic porphyrias". Clin. Haematol. 9:399-425.
- ◆ Southorn P.A., Powis G. (1988). "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions". Mayo Clin. Proc. 63:381-389.

- ◆ Spolarics Z., (1998). “*Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid*”. J. Leukoc. Biol. 63:534–541.
- ◆ Stadtman E.R., Berlett B.S. (1991). “*Fenton chemistry. Amino acid oxidation*”. J Biol Chem. 266:17201-11.
- ◆ Stadtman E.R. (1992). “*Protein oxidation and aging*”. Science. 257:1220-1224.
- ◆ Stocker R., Bowry V.W., Frei B. (1991). “*Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol*”. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88:1646-50
- ◆ Stryer L., (2002). Biochemistry. Spectrum, New York.
- ◆ Taunton O.D., Stifel F.B., Greene H.L., Herman R.H. (1974). “*Rapid reciprocal changes in rat hepatic glycolytic enzyme and fructose diphosphatase activities following insulin and glucagon injection*”. J. Biol. Chem. 249:7228-7239.
- ◆ Tepperman J., Tepperman H. M. (1958). “*Effects of antecedent food intake pattern on hepatic lipogenesis*”. Am. J. Physiol. 193:55-64.
- ◆ Thadani H., Deacon A., Peters T. (2000). “*Diagnosis and management of porphyria*”. BMJ. 320:1647–1651.
- ◆ The ExPasy (2006). www.ca.expasy.org
- ◆ Thunell S. (2000). “*Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyries*”. I. Update. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 60:509–540.
- ◆ Toyoda Y., Miwa I., Satake S., Anai M., Oka Y. (1995). “*Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose*”. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215:467–473.
- ◆ Trush M.A.; Mimnaugh E.G., Gram T.E. (1982). “*Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the roles of free radicals in drug action and toxicity*”. Biochem. Pharmacol. 31:3335-3343.
- ◆ Tschudy D.P., Welland F.H., Collins A., Hunter G.W. (1964). “*The effect of carbohydrate feeding on the induction of δ-aminolevulinic acid synthetase*”. Metabolism 13: 396-406.
- ◆ Tschudy D.P., Bonkowsky H.L. (1972). “*Experimental porphyria*”. Fed. Proc. 31:147-159.

- ◆ Umemura K., Kimura H. (2004). “*Determination of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in cell monolayers using a single extraction procedure and a spectrophotometric assay*”. Anal. Biochem 338:131–135
- ◆ Uyeda K. (1991). “*Phosphofructokinase and fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase*”. En: Enzyme Catalysis. Vol.2. Boston: CRC Press; p. 445.
- ◆ Valenzuela A. (1991). “*The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress*”. Life Sci. 48:301-309.
- ◆ Van Schaftingen E. (1987). “*Fructose 2,6-bisphosphate*”. Adv Enzymol. 59:315–95.
- ◆ Vandercammen A., Van Schaftingen E. (1993). “*Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase*”. Biochem. J. 294:551–556.
- ◆ Veiga-da-Cunha M., Dethieux M., Watelet N., Van Schaftingen E. (1994). “*Cloning and expression of a Xenopus liver cDNA encoding a fructose-phosphate-insensitive regulatory protein of glucokinase*”. Eur. J. Biochem. 225:43–51.
- ◆ Veiga-da-Cunha M., Courtois S., Michel A., Gosselain E., Van Schaftingen E. (1996). “*Amino acid conservation in animal glucokinases. Identification of residues implicated in the interaction with the regulatory protein*”. J. Biol. Chem. 271:6292–6297.
- ◆ Vora S., Francke U. (1981). “*Assignment of the human gene for liver-type 6-phosphofructokinase isozyme (PFKL) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody*”. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:3738–3742.
- ◆ Vora S., Durham S., Martinville B., George D.L., Francke U. (1982). “*Assignment of the human gene for muscle-type phosphofructokinase (PFKM) to chromosome 1 (region cen-q32) using somatic cell hybrids and monoclonal anti-M antibody*”. Somatic Cell Genet. 8:95–104.
- ◆ Webster N.R., Nunn J.P. (1988). “*Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions*”. Br. J. Anaesth. 60:98-108.
- ◆ Weil D., Cottreau D., Nguyen V.C., Rebouret R., Foubert C., Gross M.S., Dreyfus J.C., Kahn A. (1980). “*Assignment of the human gene for F-type phosphofructokinase to human chromosomes 10 by somatic cell hybridization and specific immunoprecipitation*”. Ann. Hum. Genet. 44:11–16.

- ◆ Whiting M.J., Granick S. (1976). “*Delta-aminolevulinic acid synthase from chick embryo liver mitochondria. I. Purification and some properties*”. J. Biol. Chem. 251:1340–1346.
- ◆ Wilson J.E. (2003). “*Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function*”. J. Exp. Biol. 206:2049-2057.
- ◆ Winberry L., Holten D. (1977). “*Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase. Dietary regulation of the rate of synthesis*”. J. Biol. Chem. 252:7796-7801
- ◆ Wolff S.P., Dean R.T. (1986). “*Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis*”. Biochem. J. 223:399-403.
- ◆ Yu B.P. (1994). “*Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*”. Physiol. Rev. 74:139-163.
- ◆ Zaheer N., Tewari K.K., Krishnan P.S. (1967). “*Mitochondrial forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver*”. Arch. Biochem. Biophys. 120:22-34.
- ◆ Zhang Z., Yu J., Stanton R.C. (2000). “*A method for determination of pyridine nucleotides using a single extract*”. Anal. Biochem. 285:163-167.

