

Tesis de Posgrado

Metabolismo del ácido delta amino levúlico y otros estudios relacionados con la porfiria experimental

Rivas, Emilio Adolfo

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Rivas, Emilio Adolfo. (1963). Metabolismo del ácido delta amino levúlico y otros estudios relacionados con la porfiria experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1148_Rivas.pdf

Cita tipo Chicago:

Rivas, Emilio Adolfo. "Metabolismo del ácido delta amino levúlico y otros estudios relacionados con la porfiria experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1148_Rivas.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Metabolismo del Acido Delta Amino Levúlico y Otros Estudios Relacionados con la Porfiria Experimental

Emilio Adolfo Rivas

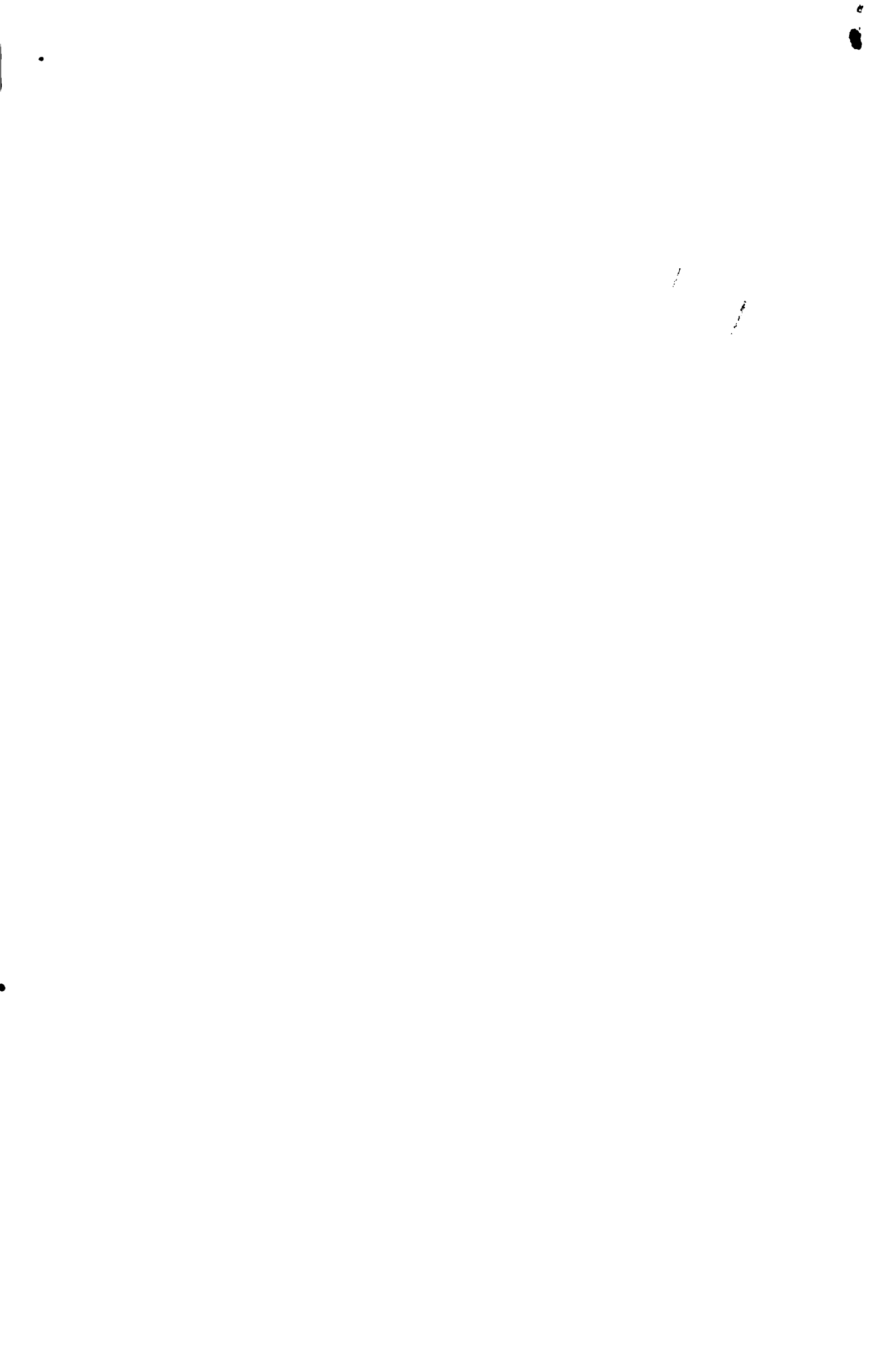
**Tesis presentada para optar al
Titulo de Doctor en Química
Orientación Química Biológica**

TESIS: 1118



BUENOS AIRES

1 9 6 3



METABOLISMO DEL ACIDO DELTA AMINO LEVULICO Y OTROS
ESTUDIOS RELACIONADOS CON LA CEFIRIA EXPERIMENTAL

El ácido delta amino levúlico (ALA) es un precursor metabólico, intermediario natural en la biosíntesis de porfirinas.

En este trabajo de tesis se analizan detalladamente los antecedentes metabólicos de la biosíntesis del ALA a partir de los trabajos de Shemin y Rittenberg en 1945 con glicina marcada N¹⁵, mencionando las experiencias principales mediante las cuales se conocieron los primeros pasos metabólicos de la biosíntesis de porfirinas, hasta que Shemin y Russell en 1953 demuestran que el ALA es un paso obligado en el camino de la biosíntesis de estos compuestos tetrapirrólicos. Se analiza también el curso metabólico del ALA vía porfobilinógeno (PBG), como así también su posible conversión en purinas a través del denominado ciclo glicina-succinato de Shemin.

La biosíntesis del ALA se realiza a partir de glicina y succinil Co A, o de glicina y ácido succínico con la presencia de diferentes factores necesarios para el proceso como ser fosfato de piridoxal, Mg⁺⁺, Co A, oxígeno, etc. El mecanismo por el cual se realiza este proceso, también es comentado en este trabajo.

La enzima encargada de llevar a cabo esta reacción es la ácido delta amino levúlico sintetasa (ALAS) y se encuentra presente en la fracción mitocondrial de los eritrocitos y de otras células, como así también en la fracción sobrenadante de centrifugar a 100.000 X g las partículas subcelulares de las bacterias fotosintéticas *Rhodospseudomonas spheroides*. Se hace mención a algunos metabolitos activadores e inhibidores de esta enzima.

La ácido delta amino levúlico deshidrasa (ALAD), es la enzima responsable de la conversión del ALA en PBG; es una enzima sulfhídrica típica y parece realizar los dos pasos necesarios para la unión de dos moléculas de ALA.

El ciclo succinato-glicina es otro camino metabólico del ALA; dirigido por la ácido delta amino levúlico transaminasa (ALAT) enzima ésta que parece ser limitante de la síntesis de hemo, y que está presente en las células de los tejidos con altas velocidades de metabolismo de ácidos nucleicos, como los eritroblastos de la médula ósea.

En 1952 comienzan a publicarse los primeros trabajos sobre porfiria experimental en los Estados Unidos, bajo la dirección de Watson. Desde entonces, distintos grupos de investigadores han encarado el estudio de este tópico desde enfoques diferentes, que son comentados en este trabajo. Con el acopio de ideas que estos grupos de investigación exponen hasta 1960, en la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales se plantea un trabajo sobre porfiria experimental, para estudiar en detalle el cuadro químico correspondiente a las porfirinas y precursores. Utilizando métodos más exactos y específicos que en los trabajos anteriores, se estudia la excreción urinaria de ALA (por primera vez hasta entonces en porfiria experimental), PBG y porfirinas en animales sometidos a la porfiria experimental.

También se encara el estudio comparativo de la incorporación de glicocola $2-C^{14}$ en proteínas de homogenatos de hígados normales y porfíricos, basándonos en observaciones de Schwartz y colaboradores sobre la disminución de la catalasa hepática en animales porfíricos.

Se realiza el estudio experimental de los métodos de valoración del ALA. Se estudia exhaustivamente el método de las resinas de intercambio iónico que permite separar PBG y ALA de orina, pasando ésta simultáneamente por una resina aniónica Dowex 2 que retiene el PBG y una catiónica fuerte, Dowex 50 que retiene el ALA. Este es eluido de la resina y convertido en el compuesto 2 metil-3 acetil-4 (3 ácido propiónico) pirrol mediante una síntesis de Knorr con acetil acetona a pH 4,6. Este derivado pirrólico se reconoce luego colorimétricamente mediante el reactivo de Ehrlich con para dimetil amino benzaldehído (DMAB) en medio fuertemente ácido. Se ensayan distintos tipos de reactivos de Ehrlich, adoptándose el llamado reactivo de Ehrlich modificado con DMAB y ácido perclórico (23) en medio acético glacial.

- La reacción de Ehrlich se produce con todos los derivados pirrólicos con una posición alfa libre, y se comenta su mecanismo y los distintos factores que influyen para lograr condiciones óptimas de reacción.

Se determina la curva de absorción para el compuesto coloreado resultante de la reacción de Ehrlich con el 2 metil-3 acetil-4 (3 ácido propiónico) pirrol y se calcula su coeficiente de extinción molar. Se estudian las características y preparación de las resinas especialmente de Dowex 50, determinándose las curvas de saturación y de elución del AIA frente a esta resina.

Se realizan ensayos de recuperación de AIA de soluciones standard de concentración conocida y de orinas normales y porfíricas. De soluciones standard se recupera alrededor del 90% y de orinas humanas y de conejos porfíricos alrededor del 80% y 90% respectivamente.

El AIA puede ser valorado también mediante una reacción con piricato alcalino, con el que forma un compuesto coloreado hasta hoy desconocido. Se estudia el método original debido a Chuster, y las posteriores modificaciones introducidas por otros autores, determinándose el coeficiente de extinción molar para el compuesto resultante de una de las modificaciones al método

El AIA fue identificado por dos métodos diferentes de cromatografía sobre papel.

Las experiencias de porfiria experimental fueron realizadas sobre ratas Wistar machos, de un peso aproximado a los 400 g y sobre conejos de ambos sexos cuyo peso oscilaba entre los 1700 y 2700 g.

Los animales fueron drogados diariamente por vía intragástrica o parenteral según se describe, con Sedormid (alil isopropil acetil carbamida) o con AIA (alil isopropil acetamida). Mediante el suministro de estas drogas se indujo a los animales un estado que mimetiza a la porfiria aguda.

Se describen los métodos de identificación y dosaje de porfiri-nas, como la purificación de las mismas por cromatografía de adsorción sobre carbonato de calcio de sus ésteres metílicos.

Se emplean métodos de cromatografía sobre papel de ésteres metílicos de porfirinas y de porfirinas libres, previa hidrólisis y descarboxilación de los primeros.

Se aíslan porfirinas de algunos órganos de estos animales.

Se encara también, como ya se mencionó el estudio comparativo de la incorporación de glicina $-2-C^{14}$ en las proteínas de hígados normales y porfíricos, con el objeto de determinar si la disminución de la catalasa hepática es debida o no a una síntesis disminuida de las proteínas totales del hígado en los casos de porfiria experimental.

De los estudios relacionados con la porfiria experimental puede inferirse lo siguiente:

a) Las ratas porfíricas registran una excreción urinaria de ALA grandemente incrementada con respecto a las uro- y coproporfirinas. Los conejos porfíricos, en cambio, presentan un gran incremento en la eliminación de PBG pero en menor cantidad de ALA, y cantidades significativas de uroporfirina.

b) El cuadro clínico presentado por ambas especies de animales es el mismo, ya sea que hayan sido tratados con A.I.A o sedormid.

Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores.

La mayor parte de las uro- y coproporfirinas excretadas son del tipo isomérico III y también se han encontrado cantidades proporcionales de porfirinas hepta, hexa y pentacarboxílicas.

La totalidad de la fracción heptacarboxílica está formada por firiaporfirina III.

Con estos resultados podría explicarse la elevada producción de compuestos pirrólicos producidos en la porfiria experimental, postulando una hipótesis que considera la biosíntesis exagerada de ALA como responsable de la mayor producción de pirroles. La acumulación de ALA, por un mecanismo de "feed back" positivo originaría un incremento en la biosíntesis de PBG y porfirinas.

De los estudios relacionados con la biosíntesis de proteínas marcadas en animales normales y porfíricos no se puede sacar mayores conclusiones, pues presentan resultados algo inciertos. Ello podría deberse a la existencia de un pool diferente de glicina en los homocitos individuales de cada experiencia.

115
Esta glicina podría preexistir o sintetizarse durante la experiencia.

En definitiva, se concluye que existe gran similitud entre la porfiria experimental y la porfiria aguda humana y que el principal error metabólico se debe a una biosíntesis exagerada de precursores.

ACERCA - La mayor parte de estas experiencias fueron realizadas en colaboración con el Dr. Horacio Tigler y figuran en parte en su trabajo de tesis titulado "Metabolismo del porfobilinógeno".

Ezequiel A. Rivarola

Padrino de tesis
Doctor Moisés Grinstein

A Blanca R. Cuestas y a mis compañeros
de trabajo en el laboratorio de Química
Biológica, a quienes debo la finaliza-
ción de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

- Deseo expresar mi agradecimiento al Doctor Moises Grinstein, director de este trabajo, por su constante interés y por sus importantes consejos y sugerencias.
- A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Química Biológica.
- Al Dr. Aldo Mitta y a la Dra. Josefina Rodríguez quienes me han introducido en el campo de los radioisótopos.
- A la Comisión Nacional de la Energía Atómica, que ha cedido las ratas Wistar para la realización de esta experiencia.

ACLARACION

PRELIMINAR

Gran parte de los estudios relativos a la porfiria experimental que se describen en este trabajo de tesis, han sido realizados en colaboración con el Doctor Horacio A. Tigier y están incluidos en su trabajo de tesis: "Metabolismo del porfobilinógeno"

ABREVIATURAS USADAS

EN ESTE TRABAJO

ATCA	:	ácido tricloro acético.
ALA	:	ácido delta amino levúlico.
ALAD	:	ácido delta amino levúlico dehidrasa.
ALAS	:	ácido delta amino levúlico sintetasa.
ALAT	:	ácido delta amino levúlico transaminasa.
A.I.A.	:	alil isopropil acetamida.
ATP	:	adenosina trifosfato.
CoA	:	coenzima A.
DMAB	:	dimetil amino benzaldehido.
PBG	:	porfobilinógeno.
PyP	:	fosfato de piridoxal .
Rps. sph	:	Rhodopseudomonas spheroides.
Hb	:	hemoglobina.
EDTA	:	etilen diamino tetracetato

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

La formación del ácido delta amino levúlico (ALA) es una etapa obligada en la célula viva, para la síntesis de los compuestos tetrapirrólicos del tipo de las porfirinas. Uno de los atributos principales de la célula sería la formación de estos compuestos, de importancia biológica fundamental.

Todos los átomos de carbono y de nitrógeno del hemo de la hemoglobina (Hb), mioglobina, catalasas, peroxidases, citocromos y probablemente los de la dehidroporfirina de la clorofila de las plantas verdes y algas y los de la tetrahidroporfirina de la bacterioclorofila, son derivados del átomo de nitrógeno y de los cinco átomos de carbono del ALA.

De este tipo de derivados tetrapirrólicos, dependen funciones esenciales para la vida como son, entre otras, las oxidaciones intracelulares, el transporte de electrones, el transporte y almacenamiento de gases, etc. (1)

Sobre este tema, que ha sido estudiado exhaustivamente, existen numerosas puestas al día (2, 3, 4, 5, 6).

ANTECEDENTES Y BIOSÍNTESIS DEL ACIDO DELTA AMINO LEVULICO

En 1945 y 46, Shemin y Rittenberg (7, 8, 9) usando glicina marcada con N^{15} , determinan que este compuesto es usado específicamente en la síntesis del hemo de la Hb, al que le provee los átomos de nitrógeno. Se puede comprobar la síntesis de la Hb "in vitro", cuando se incuban sistemas tales como glóbulos rojos de pato (10), eritrocitos inmaduros de mamíferos (11) o sus hemolizados, en un medio conteniendo glicina marcada con N^{15} .

Otros investigadores, trabajando con glicina marcada con C^{14} de muestran que el metileno (12, 13, 14) pero no el átomo de carbono

del carboxilo (14, 15, 16) de este amino ácido, es incorporado al hemo.

Además, se puede determinar por degradación de la molécula de porfirina (17, 18, 19) que todos los carbonos metínicos puente, también derivan de la glicina.

En la síntesis de una molécula de hemo son utilizados en conjunto ocho residuos de glicina, de los cuales, cuatro deben sufrir desaminación en alguna etapa y todos sufren descarboxilación. Que da así establecido que la glicina suministra el átomo de nitrógeno y el carbono metilénico, cuya utilización precisa fué determinada por Wittemberg y colaboradores (20).

De los treinta y cuatro átomos de carbono de la protoporfirina 9, solamente ocho son suministrados por la glicina.

Usando acetato marcado con deuterio, Bloch y Rittenberg (21), obtienen hemo marcado, lo que indica la participación del acetato en la biosíntesis (22). Además, Radin, Rittenberg y Shemin (23) y Wittemberg y Shemin (24, 25) obtienen protoporfirina marcada, a partir de ácido acético con C^{14} en el metilo o en el carboxilo usando un sistema de glóbulos rojos de pato. Por degradación de la molécula formada (20) se demuestra que los veintiseis átomos de carbono restantes son suministrados por el acetato. Shemin y Wittemberg (24) postulan de estos descubrimientos, que en el curso de la biosíntesis de porfirinas, se forma primero un sustrato simple precursor del pirrol por unión asimétrica de dos unidades, una de cuatro carbonos y otra que es una molécula de glicina. Esta unidad de cuatro carbonos deriva del acetato a través de la operación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y debería ser algún tipo de derivado succínico. Rubinstein y colaboradores (26) y Wriston y colaboradores (27) confirman esto, que luego es demostrado por Shemin y Kumin (28), quienes incubando glóbulos rojos de pato con ácido succínico marcado en los carboxilos, encuentran una condensación de dos moléculas de succinato para formar el precursor pirrónico.

El hecho de que la adición de coenzima A (CoA) a concentrados de sangre de pato incrementa la utilización de succinato para la formación de porfirinas, sugiere a Shemin y Kumin que el derivado no simétrico del succinilo podría ser succinilCoA y trabajos posteriores de varios investigadores apoyan esta hipótesis.

Por otra parte, una vez conocida la estructura del porfobilinógeno (PBG) y demostrado que esta sustancia es un monopirrol intermediario en la biosíntesis del hemo que se forma en los tejidos a partir de la glicina, es posible especular sobre los pasos probables en el camino entre la glicina, el succinato y el mismo PBG.

En Londres, Neuberger y Scott (29) estudian algunos posibles precursores sintéticos de las porfirinas entre los que se hallan el ácido alfa succinamido acético, delta succinamido levúlico y delta amino levúlico, cuando Shemin y Russell (30) en los Estados Unidos anuncian que el ALA puede reemplazar al succinato "activo" y a la glicina, para la síntesis de porfirinas en sangre de pato. Estos investigadores sintetizan ALA químicamente por tres métodos diferentes y deducen que el primer producto de condensación de succinato y glicina podría ser el ácido alfa amino beta ceto adípico, el que perdería anhídrido carbónico fácilmente. Neuberger y Scott (29) confirman la actividad del ALA en la producción de hemo y porfirinas, mientras Diesel y Falk (31), demuestran su conversión en PBG y en porfirinas, en un sistema de hemolizado de glóbulos rojos de pollo.

Confirmando estos primeros hallazgos, Shemin, Abramsky y Russell (32) incuban ALA (5 C^{14}) con un sistema de sangre de pato, y encuentran la distribución esperada de la radioactividad por degradación posterior del hemo sintetizado.

Posteriormente se verá que la reacción que conduce al ALA a la formación de PBG, es similar a la síntesis de Knorr de pirroles y es realizada por la enzima ALAdehidrasa (ALAD). Esta enzima fué hallada por primera vez por Granick (33) en eritrocitos de pollo. En 1955 Schmid y Shemin (34) trabajando sobre eritrocitos de pato,

demuestran isotópicamente que son necesarias dos moléculas de ALA para formar una molécula de PBG.

Un estudio muy importante sobre el catabolismo del ALA, fué realizado en Londres en 1956, por Berlin, Neuberger y Scott (35, 36); estos investigadores, suministran ALA N^{15} a seres humanos y a ratas y comprueban, además de su incorporación en el hemo, que se encuentra radioactividad en la urea urinaria en la misma forma que si se hubiera suministrado glicina, pero que esta última es mucho más eficiente como precursor de ácido hipúrico que el ALA. También se registran marcas significativas en las proteínas hepáticas y se puede comprobar que tanto en el hombre como en la rata, el ALA se excreta por orina en grandes cantidades dentro de las pocas horas de administración.

La administración de ALA a hombres y a ratas, produce grandes cantidades de PBG en orina. Esta conversión del ALA en PBG, se incrementa con el nivel de la dosis, hasta alcanzar un máximo. El suministro de aquel metabolito, provoca en el hombre reacciones de piel comparables con la sensibilización. Estos mismos investigadores suministran también ALA C^{14} a hombres, ratas y gallos y registran que todos ellos incorporan igual proporción de C^{14} en el hemo de la Hb, independientemente de la dosis de ALA.

La administración de este metabolito es seguida por la eliminación rápida de C^{14} por la respiración, orina y heces y después de tres días solo se retiene de 1/5 a 1/3. Se cree que la eliminación de ALA por orina, se realiza únicamente por filtración renal. El máximo de la excreción pulmonar de C^{14} , precede en una hora al máximo de excreción urinaria del PBG radioactivo.

Neuberger, Scott y Shuster, en 1956 (37) sintetizan y estudian algunas sustancias relacionadas con el ALA. Obtienen, entre otros, el ester dietílico, el ester alfa monoetilico y los dos ésteres metil etílicos del ácido alfa amino beta ceto adípico. Estudian la hidrólisis de estos ésteres y de otros derivados, no pudiendo aislar el amino ácido libre, bajo ninguna circunstancia. Tanto el es

ter dietílico como el alfa mono etílico del ácido alfa amino beta ceto adipico, producen PBG o porfirinas en sistemas biológicos tales como homogenatos de hígado de ratas y suspensiones o extractos libres de células de *Rhodospseudomonas spheroides* (Rps. Sph.), pero sin embargo esta no es una evidencia suficiente para establecer que el ácido alfa amino beta ceto adipico sea precursor biológico del ALA.

COFACTORES

En 1958, Laver y Neuberger (38) muestran que un sistema particulado aislado de eritrocitos de pollos anémicos, cataliza la síntesis de ALA a partir de succinato y glicina, pero que se requiere oxígeno y que estas partículas se estimulan si en el medio existen iones Mg^{++} , fosfato, CoA y fosfato de piridoxal(PyP). Sostienen también que el alfa ceto glutarato es mejor precursor del ALA que el succinato.

Gibson Laver y Neuberger (39) muestran que el PyP causa un doble incremento en la síntesis del ALA, pero que no requiere oxígeno ni estimulación por fosfato o Mg^{++} . Además, la succinil CoA generada enzimáticamente a partir de succinato y CoA, también tiene capacidad para formar ALA.

Lascelles ya había indicado que las Rps. Sph. realizan esta sin tesis cuando se cultivan anaeróbicamente a la luz, y que también había considerable formación de ALA por extractos de microorganismos cultivados aeróbicamente en la oscuridad. Con estos datos, Gibson (40) utiliza un cultivo aerobio de Rps. Sph. adaptados a la luz, los desintegra por ultrasonido y utiliza el sobrenadante de una centrifugación a 105.000 X g. Estos extractos forman ALA de glicina y succinil CoA, que puede generarse enzimáticamente a partir de succinato o de alfa cetoglutarato. Este sistema es casi com pletamente inactivo en ausencia de glicina o PyP, siendo esta la evidencia más concluyente de que esta sustancia está involucrada en la síntesis del ALA. La actividad del sistema también se reduce

ce si falta CoA.

SITIO CELULAR DE SÍNTESIS

Simultáneamente con estos trabajos, Kikuchi, Shemin y Bachmann (41) y Kikuchi, Kumar, Talbidge y Shemin (42) trabajan con este mismo sistema libre de partículas de Rps. Sph. y encuentran que este mismo sobrenadante de 30 minutos a 100.000 X g. sintetiza ALA a partir de los mismos cofactores; además, sugieren que el sistema enzimático responsable para la síntesis del ALA está en muy pequeñas partículas que se separarían centrifugando otros 90 minutos a la misma velocidad.

Sano (43) en 1958 estudia el significado de las mitocondrias en la biosíntesis de porfirinas y hemo, usando eritrocitos y tejidos diferentes. Registra que estas partículas desempeñan un rol muy importante en tres pasos de la biosíntesis de porfirinas y hemo, que son los siguientes: condensación de glicina y succinato activo para formar ALA, descarboxilación oxidativa de uro y coproporfirinas a protoporfirina e incorporación del hierro al anillo porfirínico. Esto sugiere que en los eritrocitos la biosíntesis del ALA se realizaría en distinto lugar celular.

AMINO LEVULICO SINTETASA; MECANISMO

Se ha discutido que la reacción entre la glicina y la succinil CoA para producir ALA y anhídrido carbónico, requiere como cofactores PyP y iones Mg^{++} (38, 39, 40, 42, 44, 45, 46). Es razonable suponer que el reactante en la reacción enzimática es una base de Schiff o aldimina formada entre el grupo amino de la glicina y el carbonilo del PyP. En 1959, Lynen (47) indica que los compuestos del tipo acil-CoA pueden actuar tanto como nucleofílicos o como electrofílicos, y en la formación de ALA es probable que el carbono ácido, de la succinil CoA funcione como aceptor de electrones del reactivo nucleofílico (anión formado por la eliminación del

protón del carbono alfa del complejo glicina-PyP).

De acuerdo a Braustein y Snell, la reacción inicial sería:

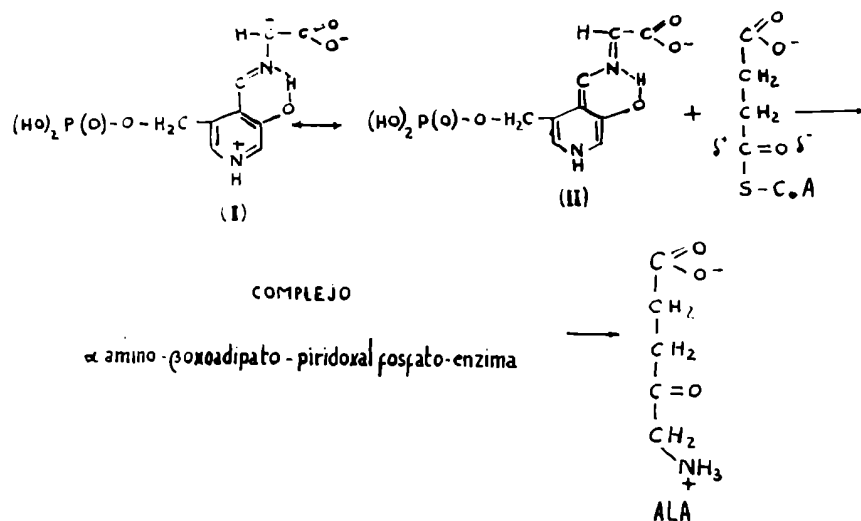


Figura 1: Mecanismo de la reacción entre glicina y succinilCoA según Braunstein y Snell.

Neuberger (48) discute extensamente esta reacción; supone que el protón unido al carbono alfa de la glicina, migra al nitrógeno del anillo y la estructura zwitteriónica (I) que resulta, se estabiliza por resonancia con una forma no zwitteriónica (II) en la cual todos los dobles enlaces están conjugados. Esta resonancia facilita la migración del protón y la formación del carbanión, que es reforzado por la aparición de un puente hidrógeno entre el nitrógeno de la glicina y el oxígeno fenólico. Se sugiere además que el complejo está unido a las proteínas por fuerzas iónicas a través de los fosfatos y carboxilos. La unión por los carboxilos a la proteína, ya ha sido sugerida para las aminoácido descarboxilasas por Rothberg y Steinberg (49) en 1957 como una atracción electrostática con un grupo positivo de la enzima. La amino ceto-

na sintetasa es bastante inespecifica respecto del grupo acilo unido a la CoA, pero el único amino ácido que se encuentra que actúa con el sistema enzimático es la glicina. Esto sugiere que es ella la que está unida a la enzima.

El PyP también está fuertemente unido a la proteína, lo que se demuestra pues esta conserva considerable actividad sin agregado de cofactores, aún luego de una diálisis prolongada.

Perault y colaboradores (50), aplican el método de los orbitales moleculares a este problema y demuestran que en la forma aniónica del complejo glicina-PyP el átomo de carbono derivado del átomo de carbono alfa del amino ácido tiene una alta densidad electrónica y reacciona con el carbono carbonílico electrofílico de la succinil CoA.

PAPEL DEL AMINO MALONATO

Recientemente se halló que la formación de ALA puede ser inhibida por aminomalonato (51), con efecto muy marcado aún a baja concentración. La inhibición es del tipo competitivo respecto de la glicina y parece que el amino malonato no tiene efecto marcado sobre otras enzimas que requieren PyP. Parece probable que el amino malonato se combine con el complejo enzima-PyP por su grupo amino, formando una aldimina con el aldehído del piridoxal. Probablemente uno o los dos grupos carboxilos se combinen con la proteína enzimática y el complejo resultante que luego no puede reaccionar con la succinil CoA, puede ser estéricamente más favorable que el correspondiente complejo con glicina que es intermediario en la síntesis del ALA.

CICLO SUCCINATO GLICINA

Shemin y Russel (30) encuentran que si se suministra a ratas ALA marcado con C^{14} en el átomo de carbono vecino al amino grupo el carbono isotópico aparece en grandes cantidades en el CO_2 respi

ratorio, en el formiato urinario y en los grupos ureido del ácido úrico. Proponen que el ALA es metabolizado por un camino cíclico, el ciclo succinato glicina, envolviendo la formación de intermediarios de un átomo de carbono derivados del átomo de carbono alfa del ALA. La importancia metabólica general de este camino no puede ser asegurada hasta el presente y los pasos enzimáticos involucrados no están aún propiamente definidos, con excepción de la primera reacción, la conversión del ALA en ácido gama delta dioxovalérico. En tejidos de mamíferos y en *Corynebacterium diptheriae* (52, 53) ha sido hallada una transaminasa específica, ALA transaminasa, que cataliza esta reacción.

En la figura número 2, puede apreciarse el ciclo succinato glicina, según Shemin y colaboradores (69):

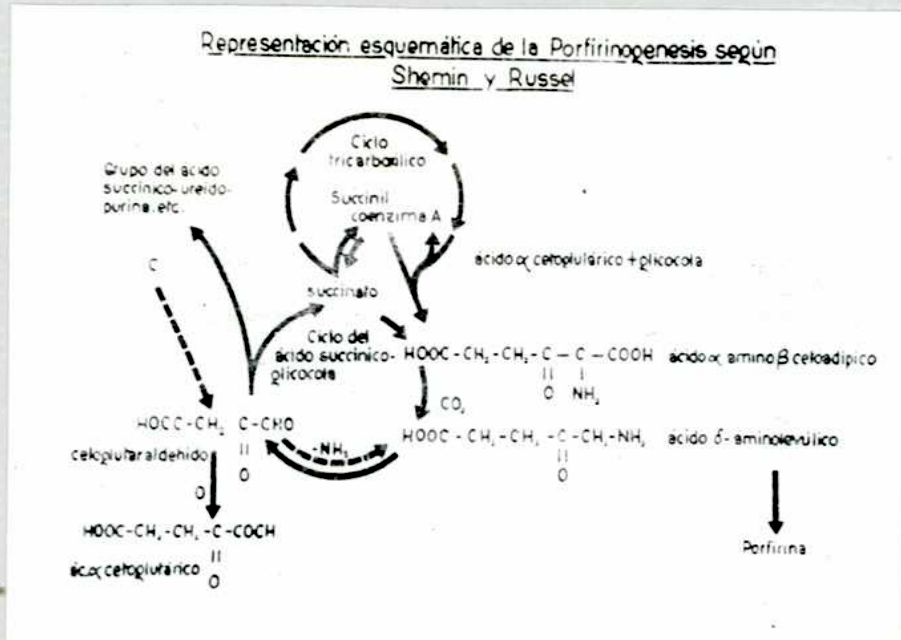


Figura 2: Ciclo succinato-glicina

IMPORTANCIA DE LA BIOTINA

Neuberger (48) considera el papel de la biotina en la síntesis del ALA discutiendo la posibilidad de que actúe catalizando la decarboxilación del ácido alfa amino beta ceto adípico, presente como un intermediario en el complejo PyP-ALA sintetasa. La evidencia en favor de tal presunción fué el hallazgo (luego confirmado por Lascelles (54)) de que la actividad ALA sintetasa (ALAS) parecía estar específicamente reducida en extractos de organismos en

medios que contenían muy baja concentración de biotina, si se la comparaba con la actividad de la ALAD o de la AIA-transaminasa (ALAT). Sin embargo, el hallazgo de que la iluminación de organismos deficientes en biotina y el agregado de biotina al medio produce crecimiento y síntesis de porfirinas y bacterioclorofila sin ningún incremento en la actividad sintetasa, indica que el efecto de la biotina no es ejercido directamente a través de un control de la actividad ALAS (51). Además, en otras condiciones que son desfavorables para la formación de bacterioclorofila por *Rps.sph.*, tales como las deficiencias en ácido nicotínico o tiamina, o el reemplazo de malato en el medio de crecimiento por acetato, también hay una depresión de la actividad ALAS. Parece que el efecto de la biotina al nivel de esta enzima es inespecífico y que la depresión de la síntesis de porfirinas y bacterioclorofila por la deficiencia en biotina es causada por algún otro mecanismo, posiblemente a través de una reducción en la concentración del PyP en las células.

Se registra también (48) que preparaciones comerciales de avidina y preparaciones que contienen 2.5 y 4.9 unidades de avidina/mg de proteína inhiben la actividad ALAS en extractos crudos de *Rps.sph.* Esta inhibición parece ser específica, pero vuelve a ser observada cuando la "avidina" se preincuba con biotina (51). Este hallazgo resulta algo sorprendente, pero cuando se hace una purificación cromatográfica más delicada de la avidina, logrando una actividad equivalente a 5.6 unidades/mg y una pureza del 80 %, no vuelve a registrarse la inhibición de la ALAS. Otras proteínas presentes en la clara del huevo como ovalbúmina, lisozima u ovomucoide, no causan inhibición de la enzima, por lo que debe pensarse que alguna proteína aún no identificada que contamina la avidina cruda, tiene un efecto inhibitorio específico sobre la ALAS.

ACIDO DELTA AMINO LEVULICO DEHIDRASA

La posterior condensación de dos moléculas de ALA con la eliminación de dos moléculas de agua para formar PBG fué estudiada extensamente con preparaciones purificadas de ALAD, enzima responsable de esta condensación (33, 55, 56, 57, 58, 59, 60). Esta enzima está extensamente distribuida en animales, plantas, y microorganismos (55); es muy soluble en agua y es una enzima sulfhídrica típica, puesto que es inhibida por agentes que reaccionan con los sulfhidrilos y requiere como activador agentes reductores tales como el glutatión reducido (55, 57). Es inhibida por EDTA (Etilen diamino tetraacetato) (55, 57) y ácidos delta cloro o delta oximino levúlico (61).

Los dos pasos de la reacción de condensación son respectivamente una condensación de tipo aldólico y una unión de base de Schiff, pero es incierto si solo uno o ambos pasos son catalizados enzimáticamente. Sin embargo, existe poca duda que sea suficiente una única proteína para llevar a cabo la reacción completa (55) y que una específicamente ambas moléculas de ALA (57).

Se encontró que la ALAD de hígado contiene cobre (62, 63) y magnesio (64) y que está disminuida en las ratas con deficiencias de cobre (62, 63,). La eliminación de cobre no afecta la actividad enzimática (63). Esta enzima parece no estar relacionada con la anemia producida por deficiencia de cobre (63), puesto que los animales deficientes en este metal tienen una actividad normal de dehidrasa en la médula ósea y una velocidad de síntesis de hemo "in vitro" normal (64). Tschudy y Collins (65) registran que la administración de 3 amino 1-2-4-triazol decrece la actividad dehidrasa de hígado de rata. En los microorganismos Rps. sph., se encuentra un incremento de la actividad dehidrasa durante la adaptación a la síntesis de bacterioclorofila (66).

ACIDO DELTA AMINO LEVULICO TRANSAMINASA

Kowalski, Dancewicz y Szot (67, 68) trabajando con homogenatos de hígado y riñón de ratas naturales y calentados, demuestran que la formación del ciclo succinato glicina del ALA es llevado a cabo por una enzima denominada delta amino levulico transaminasa (ALAT). La actividad de esta enzima es más notable en tejidos con altas velocidades en el metabolismo de ácidos nucleicos. Los eritroblastos de médula ósea contienen gran actividad, mientras que los eritroblastos circulantes y los eritrocitos contienen muy poca. Posiblemente la interacción de esta enzima con la ALAD dirija el metabolismo hacia la formación de porfirinas y Hb o hacia la formación de ácidos nucleicos si prevalece la ALAT. En las ratas el nivel de la transaminasa específica es mayor en riñones que en el hígado bazo o intestino delgado y menor en la sangre y en músculos. La actividad de la transaminasa decrece y la de la dehidrasa aumenta, cuando son activadas las funciones hematopoyéticas por administración de fenil hidracina. En concreto, parece ser que la ALAT limita la síntesis de hemo.

ANTECEDENTES SOBRE PORFIRIA

La porfiria, anomalía metabólica de tipo constitucional, está asociada a un trastorno profundo del metabolismo de las porfirinas. Actualmente se conoce también la existencia de porfirias adquiridas en un medio sin predisposición especial y causadas por agentes específicos. La porfiria experimental que será tratada más adelante está comprendida en este tipo de porfirias.

En los diferentes casos de porfiria, se encuentra significativamente aumentada la excreción urinaria de porfirinas y precursores metabólicos, apareciendo simultáneamente distintos síntomas de tipo clínico. Esta diferente sintomatología clínica, es la que ha originado distintas clasificaciones de las porfirias, basadas en diversos criterios. Una clasificación importante fué hecha por

Günther en 1922 (70) y otra por Wäldenström en 1937 (71); la clasificación aceptada actualmente es la de Watson (72) que clasificó a las porfirias de la siguiente manera:

I.- Porfiria eritropoyética.

II.- Porfiria hepática:

- a) Aguda
- b) Cutánea tarda
- c) Tipo mixto o combinado
- d) Latente

Esta clasificación está basada en estudios realizados en material experimental correspondiente a 161 casos de porfiria humana, como también en las porfirias experimentales en animales.

Se conoce como porfiria eritropoyética la que está caracterizada por la excreción urinaria de abundante copro- y uroporfirina de tipo isomérico I, no registrándose la presencia de precursores en orina. Las porfirinas anormales y las coproporfirinas en cantidades anormalmente altas se formarían en las células inmaduras de la médula ósea. En estos casos, los síntomas clínicos predominantes son: la fotosensibilidad y la anemia hemolítica.

En las otras formas de porfiria agrupadas como hepática, que son las más comunes, las porfirinas anormales y los precursores se formarían en el hígado.

La forma cutánea se presenta generalmente en personas de edad avanzada y se caracteriza por presentar fotosensibilidad, pigmentación de la piel y disfunción hepática; posee la característica de excretar por orina una mezcla de uroporfirina I más firiaporfirina III, conjunto conocido anteriormente como "porfirina de Wäldenström" (73), además de coproporfirina generalmente como complejo metálico.

Es una forma grave de la porfiria, la denominada aguda intermitente, que tiene una sintomatología clínica muy diversa, pues puede presentarse en forma de cólicos abdominales y en algunos casos con parálisis y trastornos psíquicos.

Esta forma es más frecuente de lo que se piensa, pues muchas veces se hace difícil un diagnóstico correcto. Se caracteriza por una gran excreción urinaria de los precursores metabólicos de las porfirinas, el ALA y el PBG. En menor proporción son excretadas algunas porfirinas, predominando las del tipo isomérico III.

La reacción de Watson y Schwartz (74, 75) permite diferenciar el PBG del urobilinógeno, y se basa en la diferente solubilidad en agua y en cloroformo del compuesto coloreado formado por reacción de estas sustancias con el para dimetil amino benzaldehído (DMAB). Este test se aplica directamente sobre la orina patológica y es una de las formas más útiles de diagnóstico de la porfiria.

En nuestro laboratorio se han estudiado químicamente dos casos de porfiria aguda, como complemento al estudio de la porfiria experimental. Se trata de dos mujeres jóvenes, una de ellas de 20 años, que presenta síntomas avanzados de parálisis y elimina gran cantidad de ALA y PBG por orina, cuya orina fué utilizada como materia prima para el aislamiento de PBG cristalino, y otra señora de 27 años, con síntomas más benignos, pero que en determinadas épocas hacen crisis con vómitos continuos y cólicos abdominales.

Otros detalles de tipo clínico relativos a los distintos tipos de porfiria, se describen en un trabajo del Dr. Grinstein (76)

ANTECEDENTES SOBRE PORFIRIA EXPERIMENTAL

En el año 1952 se publican los primeros trabajos relacionados con el estudio de la porfiria experimental. Estos trabajos fueron realizados por un grupo de investigadores en Minnesota (E.E.U.U) bajo la dirección de Watson. Existen, además otros grupos de investigadores que han realizado o realizan estudios sobre este tema, el que se tratará de analizar desde sus comienzos. Se tratará de encarar cronológicamente las contribuciones de estos distintos grupos de investigadores.

Schmid, Hanson y Schwartz (77), del grupo de Watson, publican

en 1952 la primera experiencia sobre porfiria experimental. En realidad, lo que producen es un saturnismo experimental, pues intoxican conejos con plomo; logran cristalizar uroporfirina I de médula ósea, que resulta similar a la aislada de la orina de una paciente con porfiria eritropoyética. Determinan además que durante la fase aguda, en los glóbulos rojos circulantes hay grandes cantidades de uroporfirina y la coproporfirina se encuentra aumentada. En el segundo trabajo, Schwartz, Keprios y Schmid (78) someten los conejos a un tratamiento combinado de plomo, fenilhidracina y luz y consiguen que estos adquieran temporariamente un estado similar al de la porfiria humana. Observan características similares a la porfiria eritropoyética, pues hay gran excreción urinaria de uroporfirina I al estado de porfirina libre y aumentos de uro- y coproporfirinas en médula ósea, pero las porfirinas hepáticas presentan valores normales. También registran rasgos de semejanza con la porfiria hepática, pues hay excreción de PBG por orina, como también de coproporfirina III.

Schmid y Schwartz (79) utilizan por primera vez el "Sedormid" (Alil isopropil acetil carbamida) para producir una porfiria experimental similar a la del tipo hepático. Deciden usar esta droga para inducir la porfiria en conejos, basándose en un caso humano observado por Duesberg en 1932 (80) que había contraído porfiria por ingestión exagerada de esta droga. Además, existían antecedentes de Ellinger y Rieser (81), de Duesberg y Fischer (82), y de Wälderström y Wendt (83) que habían notado aumentos en la excreción urinaria de porfirinas en seres humanos y conejos intoxicados con trienal (dimetil sulfon metil etil metano), sulfonal (dietil sulfon dietil metano) o dimetil sulfón dimetil metano.

Schmid y Schwartz (79) encuentran que el hígado de los conejos intoxicados con "Sedormid", contiene grandes cantidades de proto-, copro- y uroporfirinas, como así también PBG. La uroporfirina se halla principalmente en forma de precursores no fluorescentes. Por orina, se excreta PBG y porfirinas principalmente de tipo isoméri-

co III, aunque se identifican pequeñas cantidades de las del tipo I. En eritrocitos, médula ósea, bazo y cerebro, hay un contenido normal de porfirinas. Estos investigadores notan una parálisis pasajera en las patas traseras de los conejos. Discuten la posibilidad, que el origen de la porfiria estaría relacionado con el efecto primario del Sedormid sobre las enzimas de formación de ferro-porfirinas en las células hepáticas.

En 1953, Case, Aldrich y Nevé (84), en E.E.U.U. repiten sobre ratas la experiencia de Schmid y Schwartz, induciendo la porfiria con "Sedormid" administrado por vía estomacal y obtienen resultados bastantes similares. Determinan el PBG solo cualitativamente y dosan uroporfirinas sobre orina sin calentar. La mayoría de las porfirinas identificadas de esta manera, pertenecen al tipo isomérico III.

En París, se encuentra otro grupo importante de investigadores sobre porfiria experimental, Benard, Gajdas y Gajdos Török, que están trabajando en este problema desde 1953 (85). Ese año publican un trabajo en el que registran cantidades sustanciales de coproporfirina en orina de conejos intoxicados con "Sedormid", pero pocas cantidades de uroporfirina o PBG.

En 1954 estos mismos investigadores (86, 87, 88) utilizan como droga inductora de la porfiria sobre conejos, el alil isopropil acetamida (A.I.A.); suministran esta droga en una dosis única y elevada por vía estomacal, registrando a las pocas horas la aparición de PBG y uroporfirina en orina, como así también una acumulación hepática de porfirinas etero solubles.

La administración diaria de A.I.A. a conejos con degeneración grasa en el hígado producida por tetracloruro de carbono, los conduce a resultados similares, de lo que deducen que no es necesaria la integridad del hígado para la alteración del metabolismo de porfirinas. También encuentran que la inoculación de PBG en la sangre periférica o en la vena mesentérica de un conejo, no se convierte apreciablemente en porfirinas. De estas experiencias dedu-

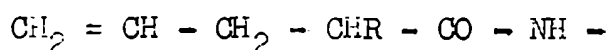
cen que el PBG podría formarse extrahepáticamente.

En ese año de 1954, se sospechaba que los barbituratos afectan el curso clínico de la porfiria aguda. Para confirmar esta su posición, Goldberg (89) en Londres, investiga el efecto de nueve barbituratos diferentes, sobre el metabolismo de las porfirinas en conejos. El ácido dialilbarbitúrico, produce un considerable aumento en la eliminación urinaria de PBG, copro- y uroporfirina III . El alil isopropil barbitúrico y el alil-(1-metil butil)-barbiturato sódico, originan solo un aumento moderado en la coproporfirina. Con otros barbituratos, no se registran aumentos importantes.

Goldberg y Rimington (90, 91) inyectan PBG a ratas y no registran aumentos significativos de porfirinas en orina. Además, la excreción urinaria de PBG es muy rápida, y no se registra acumulación en el hígado. Llegan a la conclusión de que el PBG se forma en el hígado.

En 1955, estos mismos autores (92) prueban el efecto de drogas diferentes como inductoras de la porfiria. Ensayan distintos tipos de animales, principalmente conejos, ratas y pollos. Observan aumentos en la excreción urinaria de PBG, uro- y coproporfirina . El dosaje del PBG fué realizado por el método de Vahlquist, hoy en desuso, y se calentó la orina antes de dosar uroporfirina. Los conejos tratados con A.I.A. o "Sedormid" pierden apetito, peso y se constipan. No observan ni parálisis, ni cambios en la presión sanguínea ni en los valores hematológicos. Demuestran que no disminuye la excreción de porfirinas ni de PBG, cuando se extirpa el bazo y se bloquea el sistema retículo endotelial.

Estos investigadores enuncian la hipótesis de que la porfiria experimental se debe a la superproducción de porfirinas y no a su no utilización. Además, llegan a la conclusión de que la estructura química que afecta el metabolismo de las porfirinas es:



En la figura pueden observarse las distintas drogas probadas

por Golberg y Rimington y cuales fueron sus efectos.

DROGA

ESTRUCTURAS

alil-isopropil-acetamida
(AI.A.)

alil-isopropil-acetil-urea
(Sedormid)

n-propil-isopropil-acetamida

alil-isopropil-ácido acético

ácido dialil barbitúrico(dial)

alil-(1 metil-butil)-barbiturato de sodio (seconal)

ácido alil-isopropil-barbiturico

+++ Efecto muy marcado (mucho copro-, uroporfirina y PBG)

++ Efecto marcado (mucho coproporfirina y poco PBG y uroporfirina)

+ Efecto moderado (solamente coproporfirina)

+ Sólo aumenta ligeramente la coproporfirina

--- Ningún efecto.

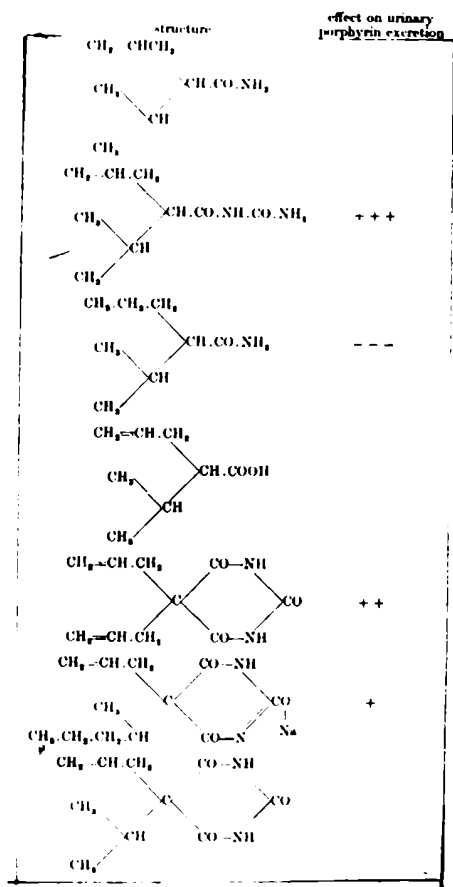


Figura N° 3: Efectos sobre la excreción urinaria de porfirinas.

El grupo de investigadores franceses ya comentado (93, 94) estudian ese mismo año la transformación de PBG a porfirinas en homogenatos de tejidos diferentes. El más activo de todos resulta el hígado, que forma pequeñas cantidades de copro y grandes cantidades de protoporfirina. También los homogenatos de riñon, pulmón, bazo y mucosa intestinal transforman el PBG en porfirinas. El N₂, CNK, nevarsenobenzol, malonato, alfa cetoglutarato y ATP inhiben la reacción, que es acelerada por el monofosfato de adenosina. Parece que intervienen reacciones oxidativas con la presencia de enzimas que contienen sulfhidrilos.

Stich, en un artículo del Ciba Symposium (95) encuentra que los derivados alílicos de la acetamida son los más eficaces para produ

cir porfiria experimental. Debido a este hallazgo, supone que existe una competencia entre la succinil CoA y la alquil succinil CoA formada a partir de los alil derivados de la acetamida. Falk rebaja esta teoría, pues dice que no se halla PBG marcado suministrando a conejos A.I.A. marcado.

En un trabajo posterior, Stich (96) llama la atención sobre el hecho de que el Sedormid usado contra las jaquecas causa porfiria.

Schmid, Figen y Schwartz (97), administran Sedormid a conejos y ratas y encuentran una rápida caída en la actividad de la catalasa hepática y un gran aumento de la concentración de porfirinas en el hígado. La actividad de la citocromo oxidasa y de la succino deshidrogenasa no presenta cambios significativos. Estudian la incorporación de glicina 2-C¹⁴ en la catalasa, la que parece concordar con la idea de que el Sedormid bloquea la formación de catalasa en el hígado. En realidad, no se sabe si este bloqueo se produce en la unión hemo proteínas, o en la biosíntesis proteica, ya que se carece de datos referentes a otras proteínas hepáticas.

Uno de los problemas que se discutirán más adelante en este trabajo de tesis, será precisamente el de la biosíntesis de proteínas en la porfiria experimental.

Schwartz (98) analiza la química y la biosíntesis de porfirinas relacionando la porfiria humana y la experimental y el metabolismo de PBG.

Schwartz y Ikeda, en otro estudio sobre porfiria hepática experimental (99) hacen referencia a ciertas porfirinas verdes aisladas de hígados de conejos porfiricos. Investigaciones posteriores realizadas por otros autores y en nuestro laboratorio, no pudieron confirmar la existencia de estas sustancias, que aparentemente serían distintas formas de la protoporfirina 9 .

En ese mismo año, Falman, Case, Nevé, Labbe y Aldrich (100) comienzan una serie de trabajos, mediante la inoculación de Sedormid en la yema de embriones de pollo. Observan gran acumulación de PBG y porfirinas de tipo III en el fluido alantoico y un significa

tivo retardo en el desarrollo embrionario. Los pollos presentan anomalías congénitas y retardo de crecimiento.

Labbe, Talman y Aldrich (101) comprueban que en este tipo de experiencias hay una disminución de ácido úrico paralela al aumento de coproporfirina. Inyectan adenina, que se metaboliza a ácido úrico sin alteraciones, de donde deducen que en la porfiria debe existir una falla en la biosíntesis de purinas. Además y de acuerdo con los trabajos de Shemin y Russell (30), consideran que la superproducción de PBG, proviene de un exceso de ALA, que presenta una alteración en su desaminación a alfa cetoglutaraldehído en el camino hacia las purinas.

En 1957, Schwartz y Watson (102) y Merchante, Wajchemberg y Schwartz (103), manifiestan que los homogenatos de hígado de ratas normales y con porfiria inducida por Sedormid, transforman el PBG a porfirinas a la misma velocidad. Esto indica que la biosíntesis exagerada de precursores no puede explicarse solamente como un bloqueo enzimático.

En el mismo año, Talman, Labbe y Aldrich (104) ensayan veinte compuestos de estructura relacionada con el Sedormid probando su actividad productora de porfiria sobre embriones de pollo. Concluyen que la estructura molecular responsable de esta acción debe ser una acetamida dialil sustituida o un derivado de acetamida donde un sustituyente es un grupo alilo y el otro contiene por lo menos tres átomos de carbono, preferiblemente en cadena ramificada. Consideran la posibilidad de que estos compuestos puedan interferir con la función de la vitamina B₁₂.

Stich en 1958 (105) trabaja con conejos a los cuales inocula diariamente Sedormid y otras drogas similares (todas con grupos alílicos). Encuentran una excreción elevada de PBG pero valores normales en la eliminación del ALA, a diferencia con los pacientes de porfiria aguda, los cuales excretan cantidades elevadas de ALA.

Solomon y Figge (106) en 1959 administran a ratones dietil 1-4 dihidro-2-4-6-trimetil piridina-3-5-dicarboxilato por vía oral, ob

servando incremento de la proto- y coproporfirina hepática . En cobayos solo registran un gran aumento de la coproporfirina urinaria y trazas de PBG.

Siempre sobre embriones de pollo normales y sometidos a porfiria experimental, Talman, Lobbe, Aldrich y Sear (107) estudian el metabolismo de bases púricas. Encuentran que la adenina se convierte bien en ácido úrico, pero no la xantina ni la guanina, ya sea en embriones normales como porfíricos. Un hallazgo importante, es que la adenina **reduce la formación** de porfirinas en embriones sometidos a porfiria experimental, pero la adenosina es menos efectiva.

Las conclusiones de este grupo de investigadores estadounidenses, recaen en el hecho de que existiría una alteración metabólica de las purinas, en la porfiria experimental

INTRODUCCION AL TRABAJO EXPERIMENTAL

Todos estos antecedentes nos conducen a concretar con respecto a la porfiria experimental las siguientes ideas, fundamentales, a comienzos de 1960:

De acuerdo con Rimington y colaboradores, parece posible que tanto en la porfiria experimental como en la porfiria aguda humana, exista una superproducción de porfirinas y precursores, más que una no utilización de ellos.

El grupo de Watson opina que debido a la disminución de la actividad de la catalasa, existiría un bloqueo enzimático, atribuyendo la gran formación de porfirinas a una compensación de este bloqueo.

Bénard y colaboradores piensan en una posible formación extrahepática del PBG.

Stich formula una hipótesis sobre la posible inhibición competitiva entre la succinil CoA, y la alquil succinil CoA, pero esta idea no es muy aceptada.

Aldrich y Labbe como vimos, suponen una alteración en el metabolismo de las purinas.

Con este acopio de ideas, en nuestro laboratorio de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales nos planteamos un trabajo sobre porfiria experimental, para estudiar con detalle el cuadro químico correspondiente a las porfirinas y precursores.

Utilizando métodos más exactos y específicos, se estudian en este trabajo la excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas en la porfiria experimental como también la presencia de porfirinas y precursores en algunos órganos.

Las observaciones de Schwartz y colaboradores sobre la disminución de la catalasa hepática, nos ha sugerido también un estudio

comparativo de la biosíntesis de proteínas marcadas por homogeneizados de hígados de animales normales y porfíricos.

SEGUNDA PARTE

VALORACION E IDENTIFICACION DEL ACIDO DELTA AMINO LEVULICO

En este capítulo se describen las diferentes técnicas utilizadas para identificar y valorar el ALA. Esta sustancia fué estudiada en soluciones puras y también en orinas normales y patológicas de ratas, conejos y seres humanos.

CRITERIOS DE VALORACION DEL ALA: METODO DE LAS RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO.

En 1956, Mauzerall y Cranick (108) describen un método colorimétrico sensible para la determinación cuantitativa del ALA y del PBG, como así también el análisis del ALA en orinas. Mediante este método ha sido posible hallar ALA en la orina de pacientes con porfiria aguda y en orina normal. La determinación del PBG está basada en la reacción de Ehrlich ya mencionada con DMAB en medio ácido, que forma un compuesto rojo medible colorimétricamente. Las determinaciones de PBG en orina son interferidas por urea, distintos pigmentos y agentes oxidantes y reductores (109). Algunos derivados del indol también reaccionan con este reactivo (110). El urobilinógeno no interfiere, a causa de la acidez en la cual es usado el método (74) .

Esbozo del método:

La orina, conteniendo PEG y ALA es pasada a través de una resina "Dowex 2" en su forma de acetato. El PBG es retenido en la columna (111) mientras que la urea el ALA pasan libremente a través de la misma. El PBG es entonces eluido de la columna usando ácido acético y determinándolo colorimétricamente por el reactivo de Ehrlich. Las sustancias no retenidas por la primera columna, son pasadas por una columna de resina "Dowex 50" en su forma ácida; la urea no se retiene en la columna, y el ALA que sí es retenido, se eluye posteriormente con acetato de sodio. El ALA

eluido es tratado con acetyl acetona a pH 4.6 , que mediante una síntesis de Knorr, forma un derivado pirrónico que se determina colorimétricamente con un reactivo de Ehrlich modificado. Este derivado pirrónico formado es el 2 metil-3 acetyl-4(3 ácido propiónico) pirrol.

DIFERENTES TIPOS DE REACTIVOS DE EHRLICH

El llamado reactivo normal de Ehrlich es una solución de DMAB al 2 % en ácido clorhídrico 6 normal.

El reactivo de Ehrlich modificado, puede referirse a la normalidad del ácido perclórico utilizado en su preparación; en este trabajo se utiliza el reactivo modificado (2 normal), que se prepara de la siguiente manera: 1 gramo de DMAB se disuelve en aproximadamente 30 mililitros de ácido acético glacial; se agrega luego 8 mililitros de ácido perclórico del 70 % y la solución se diluye hasta 50 mililitros con ácido acético. Este reactivo es inestable y debe ser preparado en el momento de usarlo. La ventaja de usar este reactivo con ácido perclórico, es que el color que desarrolla el pirrol es mucho más intenso y más estable.

MECANISMO DE LA REACCION DE EHRLICH Y FACTORES QUE EN ELLA INFLUYEN

Un pirrol P , el cual tiene usualmente una posición alfa sin sustituyentes se condensa en solución ácida con DMAB en exceso , para formar un producto de condensación coloreado E . (Figura 4, reacción 1). Puede observarse que la intensidad del color aumenta muy rápidamente, y disminuye muy lentamente . Treibs y Hermann (112) muestran que la sal coloreada E puede reaccionar con otra molécula de P para dar un compuesto incoloro, dipirril, fenil metano M (reacción 2). Bajo las condiciones usuales de acidez (alrededor de ClH 3 M) y un exceso de DMAB, se observa que la reacción 1 es más rápida comparada con la reacción 2 ; la ve

locidad de descomposición inicial de E sería entonces de segundo orden. Cuando las soluciones diluidas del orden de 5×10^{-5} M de PBG o del 2 metil-3 acetil-4(3 ácido propiónico) pirrol son mezcladas con un volumen igual de reactivo de Ehrlich normal, la velocidad inicial de descomposición del color observado teniendo en cuenta la Ley de Beer, sigue la cinética de segundo orden. Estos resultados suponen aceptar que hay dos reacciones consecutivas, como las que se muestran en la figura 4.

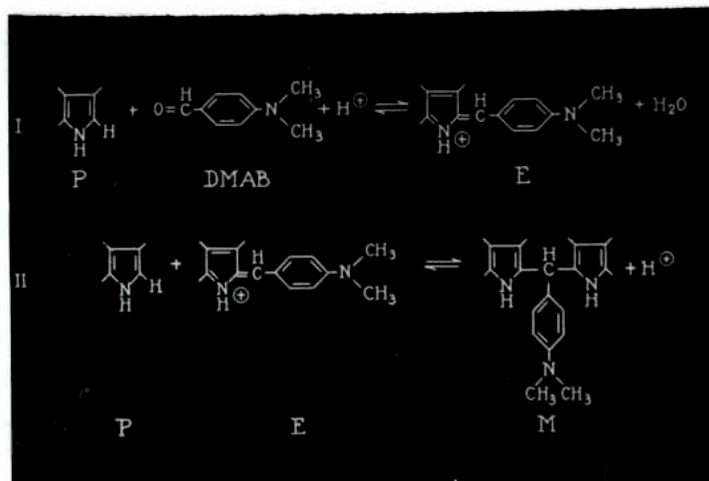


Figura 4 : Mecanismo de la reacción de Ehrlich.

Algunos de los factores que influyen en la concentración de E en el estado invariante, son los sustituyentes en el núcleo pirrólico, la concentración de ácido y el medio del solvente.

Los sustituyentes en el núcleo pirrólico, afectarán la formación del color de la sal a través de la resonancia y del efecto inductivo. En general, grupos electrodonantes (alquilo) favorecen la formación del color de la sal mientras que grupos aceptores (acetilo, carbetoxilo, nitro) tienen el efecto opuesto (112).

La elección de la concentración de ácido está gobernada por las velocidades de reacción 1 y 2 y por la posición de los numerosos equilibrios ácido-base involucrados. A muy bajas concentraciones de ácido, E se forma muy lentamente, mientras que a altas concentraciones, E se forma rápidamente pero la velocidad de desaparición se torna importante. Para pirroles con simples gru

pos electrónicos aceptores, se encuentra óptima una concentración de ácido de alrededor de 1 M, para lecturas dentro de los 15 minutos.

El solvente también influye en el estado invariable de E . Un cambio en el solvente, afecta el valor de la medida de E debido al cambio de ambas velocidades de reacción 1 y 2 y de la fuerza relativa de la base de todas las especies involucradas. Se observa la disminución de ambas velocidades de reacción y el incremento de la intensidad de E , usando ácido acético del 50 % (vol./vol.) en lugar de agua.

La intensidad del color es un tanto mayor, cuando se usa ácido perclórico en lugar de clorhídrico.

DETERMINACION COLORIMETRICA DE ALA

Como ya se mencionó, ALA se condensa con acetyl acetona o acetyl acetato de etilo para dar un derivado pirrólico con una posición alfa libre que reacciona con el reactivo de Ehrlich dando un compuesto coloreado. Este es un procedimiento general para amino acetonas.

La condensación con acetyl acetona es menos sensible que la condensación con acetyl acetato de etilo, pero con este reactivo altas concentraciones de amino ácidos, amoniaco o glucosa amina interfieren en la reacción, por lo que preferentemente la condensación se realiza con el primero de estos reactivos.

CURVA DE ABSORCION

El espectro de absorción es característico de una determinada sustancia y sirve como criterio de identificación. Este espectro nos indica la longitud de onda adecuada para efectuar las mediciones colorimétricas cuantitativas del ALA.

Para el trazado de la curva de absorción se utilizó clorhidrato del ácido delta amino levúlico (ClH.ALA) cristalino, cedido

gentilmente por el Department of Physiological Chemistry, Johns Hopkins School of Medicine, Maryland. Esta sustancia, en una dilución adecuada se condensó con acetyl acetona a pH 4,6 y se efectuó la reacción de coloración con el reactivo de Ehrlich modificado (2 N), leyéndose a los 15 minutos las densidades ópticas en función de las longitudes de onda (Figura 5).

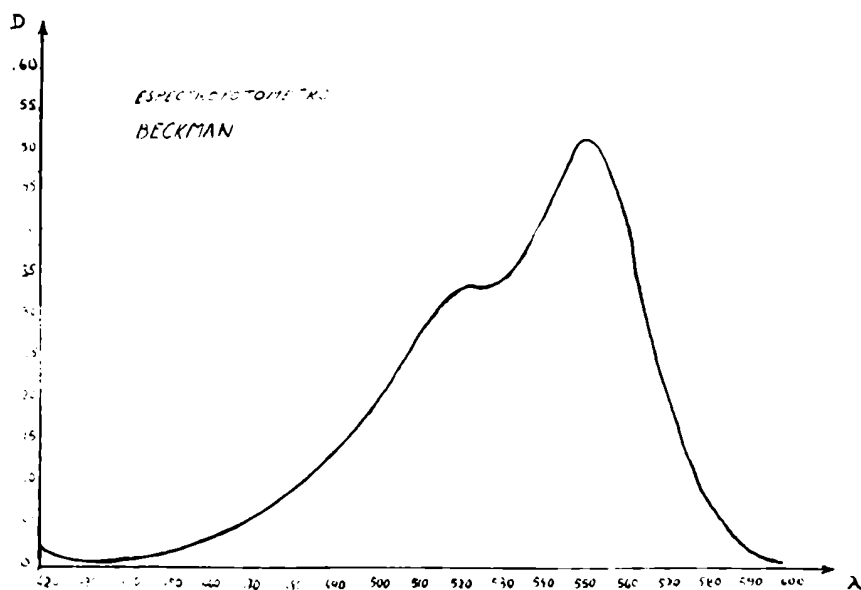


Figura 5: Curva de absorción del 2 metil-3 acetyl-4(3 ácido propiónico) pirrol.
Pico menor / pico mayor = 0.65 .

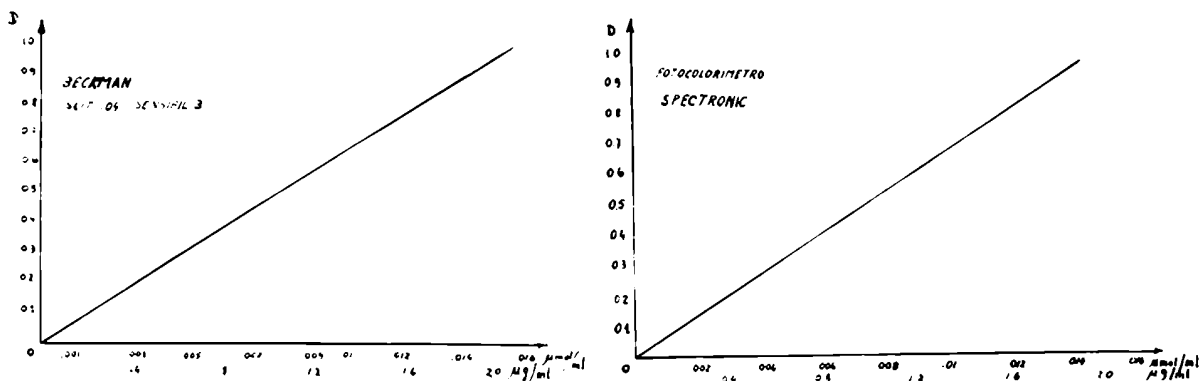
La curva obtenida coincide plenamente con la efectuada por Mauzerall y Granick (108) para el 2 metil 3 acetyl 4(3 ácido propiónico) pirrol. Registra un máximo a 552 $m\mu$ y un lomo a 525 $m\mu$, siendo la relación del segundo al primero igual a 0,65 .

DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE EXTINCION MOLAR

Como método de control para las posteriores determinaciones de ALA en la orina de los animales sometidos a la porfiria experimental, se procedió a la determinación de los coeficientes de extinción molar aparente con los reactivos descritos anteriormente.

Con tal fin se hicieron diluciones apropiadas de ALA.ClH que luego se hicieron reaccionar con acetyl acetona y DMAB para po -

der hacer una representación gráfica de la densidad óptica en función de la concentración (curva de calibración) a 552 m μ (Figuras 6 y 7).



Figuras 6 y 7: Curvas de calibración del 2 metil-3 acetyl-4(3 ácido propiónico) pirrol, en el espectrofotómetro Beckman y en el fotocolorímetro Spectronic, respectivamente.

Con estos datos se procedió a calcular los coeficientes de extinción molar aparente de esta reacción en el espectrofotómetro, como también el factor de multiplicación o constante del fotocolorímetro Spectronic para esta sustancia. Los resultados pueden observarse en la Tabla N^o 1 .

TABLA N^o 1

REACTIVO	INSTRUMENTAL	DATOS DE LITERATURA	DATOS EXPERIMENTALES
Ehrlich modificado (2 N)	Beckman "DU"	$6,8 \times 10^4$	6.5×10^4
Ehrlich modificado (2 N)	Spectronic	---	$k = 0.015$

Coeficiente de extinción molar aparente y constante del fotocolorímetro para la reacción entre el 2 metil 3 acetyl 4 (3 ácido propiónico) pirrol y el reactivo de Ehrlich modificado (2 N) .

Para estas determinaciones se utilizaron un espectrofotómetro Beckman modelo DU y un fotocolorímetro "Spectronic 20". Si bien la precisión del fotocolorímetro es menor que la del espectrofotómetro, resulta mucho más cómodo y práctico usar aquél cuando es necesario efectuar un número elevado de mediciones en serie.

METODO DE VALORACION DEL ALA EN ORINA MEDIANTE EL USO DE RESINAS DE INTERCAMBIO

En este trabajo se utilizó el método ya referido para las determinaciones de ALA y PBG con objeto de hacer un estudio más completo de la porfiria experimental en ratas y conejos.

Previamente a su aplicación el método fué puesto a punto mediante el estudio de la curva de saturación o de "breack through" de la resina, el estudio de la curva de elución del ALA en la misma y la realización de distintas pruebas de recuperación del ALA.

APLICACION DEL METODO

La índole del trabajo a realizar, requería numerosas determinaciones tanto de PBG como de ALA, por lo que junto con el Dr. Tigier ideamos unos portacolumnas de madera, que permitían trabajar con 12 columnas simultáneamente. En la figura N^o 8 puede verse uno de esos portacolumnas

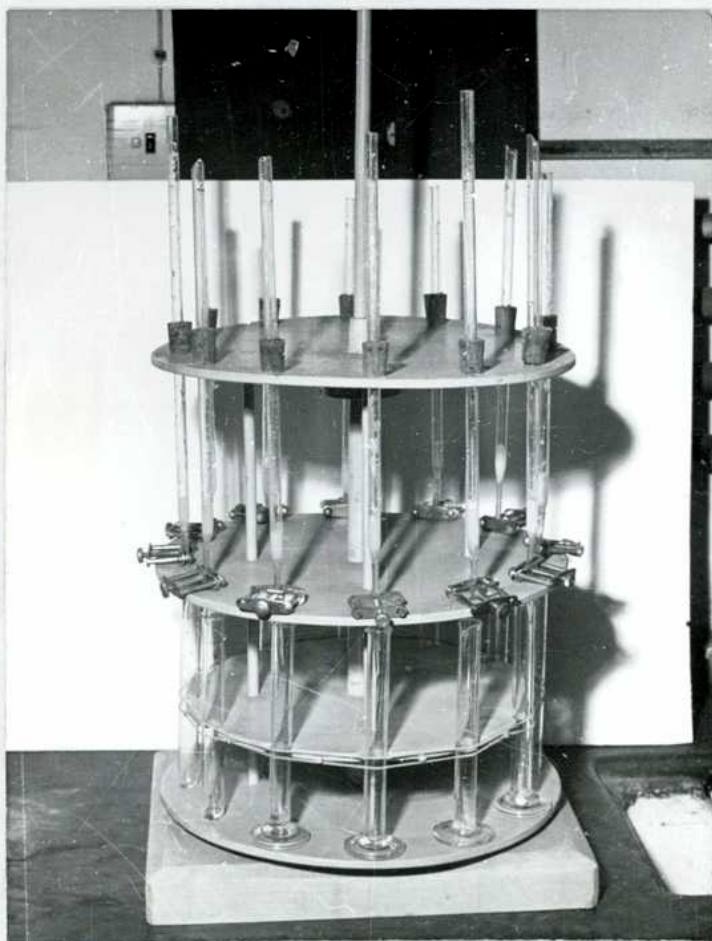


Figura 8
Portacolumna

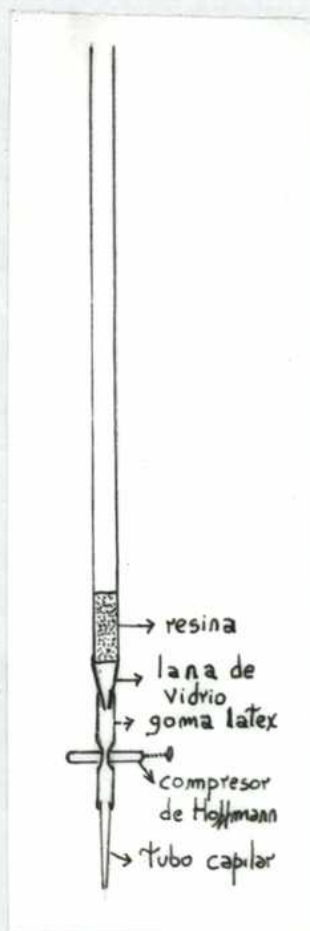


Figura 9
Columna

Las columnas que contienen las resinas son tubos de vidrio de 0,7 cm de diámetro por 30 cm de largo, que tienen un estrechamiento en la parte inferior, tapado con lana de vidrio, sobre la que se coloca una carga de 2 cm de altura de resina. En el estrechamiento inferior se coloca un tubo de látex adherido al otro extremo a un tubo capilar, y el flujo del líquido eluyente está regulado por una pinza de Hoffman que apreta sobre el tubo de látex. En la figura N° 9 puede verse el esquema de una columna.

CARACTERISTICAS DE LAS RESINAS

Para la retención del PBG de la orina, se utiliza la resina Dowex 2 x 8 en su forma acetato, por la que se hace pasar 1 ml de orina a pH entre 5 y 7 y luego se añaden 4 ml de agua para la elución del ALA, urea y otros metabolitos.

Los detalles relativos a esta resina, se describen en la tesis del Dr. Horacio Tigier.

La resina que retiene el ALA tiene las siguientes características: Dowex 50 x 8, catiónica fuerte, malla 20-50 (fué molida para lograr la malla 200-400 que indica la técnica), porosidad media, tipo estireno sulfónico, reemplazada en forma de ión hidrógeno, con una capacidad total de $5,2 \pm 0,3$ meq/gramo y una humedad del 50-56 %.

PREPARACION DE LA RESINA DOWEX 50

La resina Dowex 50 se suspende en agua que se decanta repetidamente, hasta que el sobrenadante se aclare; se convierte luego a la forma sódica, poniéndola en contacto durante una noche con una solución de HONa 2 N. Se lava hasta neutralidad y reconvierte a la forma hidrógeno tratándola con un volumen de ClH 4 N, 6 volúmenes de ClH 2 N, 6 volúmenes de ClH 1 N y agua.

Con esta resina se preparan las columnas de manera de obtener

un depósito de unos 2 cm de altura; La velocidad de elución de la columna debe ser aproximadamente de unos 5 ml cada 10 minutos.

Los 5 ml de solución eluidos de la resina Dowex 2 son pasados a través de la Dowex 50; se lava con 16 ml de agua para eliminar la urea y se adicionan luego 2 ml de acetato de sodio 0,5 M. El ALA es eluido posteriormente por agregado de otros 7 ml de acetato de sodio 0,5 M. A este eluido se añaden 0,2 ml de acetil acetona y se lleva a 10 ml con un buffer de acetato de pH 4,6. Esta mezcla se calienta 10 minutos en un baño de agua hirviente y se enfría a temperatura ambiente. De acá se toman alícuotas de 2 ml para efectuar la reacción colorimétrica ya comentada.

En todas las reacciones colorimétricas realizadas durante el estudio de la porfiria experimental, se usó el reactivo de Ehrlich modificado (2 N) y el fotocolorímetro "Spectronic 20" .

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL COMPORTAMIENTO DEL ALA FRENTE A LA RESINA DOWEX 50

CURVA DE SATURACION ("BREACK THROUGH")

Se cargó la columna con una solución de ClH.ALA que poseía un total de 360 μ g de esta sustancia; en el líquido efluente por la resina, no se alcanzó a detectar en ningún momento la presencia de ALA. Se pudo afirmar que la capacidad de la resina en el punto de "breack through" (saturación) no había sido alcanzada , por lo que durante las determinaciones comunes de ALA en orina , se estaba a cubierto de sobrepasar el límite de capacidad de la resina.

CURVA DE ELUCION

Se realizó el estudio de la elución del ALA de la resina Dowex 50, analizando su presencia en los eluidos de la fracción acetato de sodio 0,5 N mililitro por mililitro. El objeto de este estudio era poder comprobar que en realidad se eluye todo el

ALA agregado en la resina y determinar en qué fracción del eluido está presente la mayor cantidad del metabolito investigado.

Se pudo concluir que a partir del tercer mililitro de acetato de sodio 0,5 N comienza a eluir ALA de la columna.

En la figura N° 10 puede verse la forma de la curva de elución del ALA puro que coincide con la teóricamente esperada.

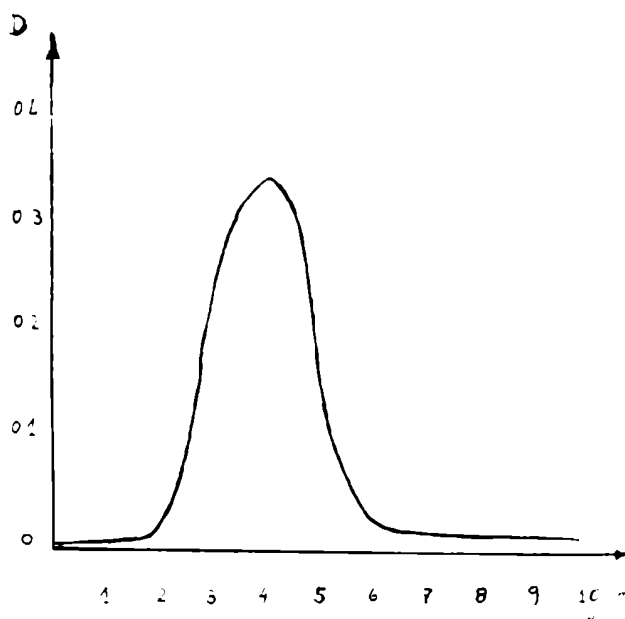


Figura 10: Curva de elución del ALA por la resina Dowex 50 x 8 .

ENSAYOS DE RECUPERACION

Con el objeto de determinar la eficacia de las resinas de intercambio iónico en la adsorción y elución del ALA, se efectuaron diferentes ensayos de recuperación.

En el primer ensayo, se utilizaron soluciones acuosas de ClH.ALA y se adsorbieron sobre la columna cantidades crecientes de este compuesto, que oscilaban entre los 10 y los 100 μg de ClH.ALA.

Se obtuvieron recuperaciones del orden del 86 al 95 % .

Cuando se intentó ensayar la recuperación del ALA sobre orinas normales, porfíricas y de conejos, se tropezó con muchos obstáculos

los para lograr resultados reproducibles. Después de repetidos intentos se obtuvieron datos concordantes y se observó que la orina de conejos debía diluirse al medio antes de ser pasada por la resina y que el pH debía estar muy cercano a 6,2 . Además , la resina debía tener el tamaño de partículas correspondiente a la malla 200-400 de fábrica y no ser preparada por molienda de la resina de mayor diámetro de partícula.

Así pudieron obtenerse recuperaciones del orden del 79 % sobre orinas humanas y del 88 % sobre orinas de conejos porfiricos, previa dilución y estricto llevado a pH .

METODO DEL PICRATO

También en el año 1956, Shuster (113) investiga dos métodos distintos para la ~~determinación~~ determinación del ALA. El primero basado en la misma reacción de Knorr para la síntesis de pirroles depende, como ya vimos, de la condensación del ALA con un compuesto carbónico adecuado para formar un pirrol alfa sustituido que da una coloración roja cuando se lo trata con DMAB. Independientemente, Granick y Vanden Schrieck en 1955 (114) publican un método semejante que posteriormente es exhaustivamente tratado por Mauzerall y Granick.

El otro método estudiado por Shuster es algo similar a la reacción de Jaffé para la determinación de creatinina con picrato alcalino. Tanto el ALA como la creatinina dan un color naranja oscuro en solución alcalina con ácido pícrico. La adición de ClH concentrado que bloquea el picrato de creatinina, intensifica y oscurece el color del picrato de ALA. El color con acetona origen de interferencias en la reacción de Jaffé, es también intensificado por el ClH, así que el test no es tan específico como podría desearse. El mecanismo de la formación del color en esta reacción es un punto todavía oscuro.

El autor describe, además, los efectos que produce la varia -

ción de diferentes factores sobre la determinación y especificidad, y la aplicación del método a materiales biológicos.

MODIFICACIONES AL METODO

En 1958, Laver, Neuberger y Udenfriend (44) estudian la formación de ALA por partículas obtenidas de eritrocitos de pollo, y proponen una modificación al método de Shuster, que incrementa la sensibilidad y la especificidad del mismo. Consiste en tratar 2 ml de solución que contiene hasta 0.5 micromoles de ALA con 0.2 ml de solución saturada de ácido pícrico y 0.5 ml de HONa 2.5 N. A los 7 minutos debe agregarse 1.0 ml de ClH 8 N, y después de 10 minutos se extrae el exceso de ácido pícrico con dos fracciones de 10 ml de éter cada una y con otra de 10 ml de éter de petróleo (P.E. 40°-60°). El color se lee en un espectrofotómetro a 420 m μ contra un blanco de reactivos.

Según los autores, este método permite determinar ALA en presencia de concentraciones de alfa ceto glutarato hasta 0.01 M.

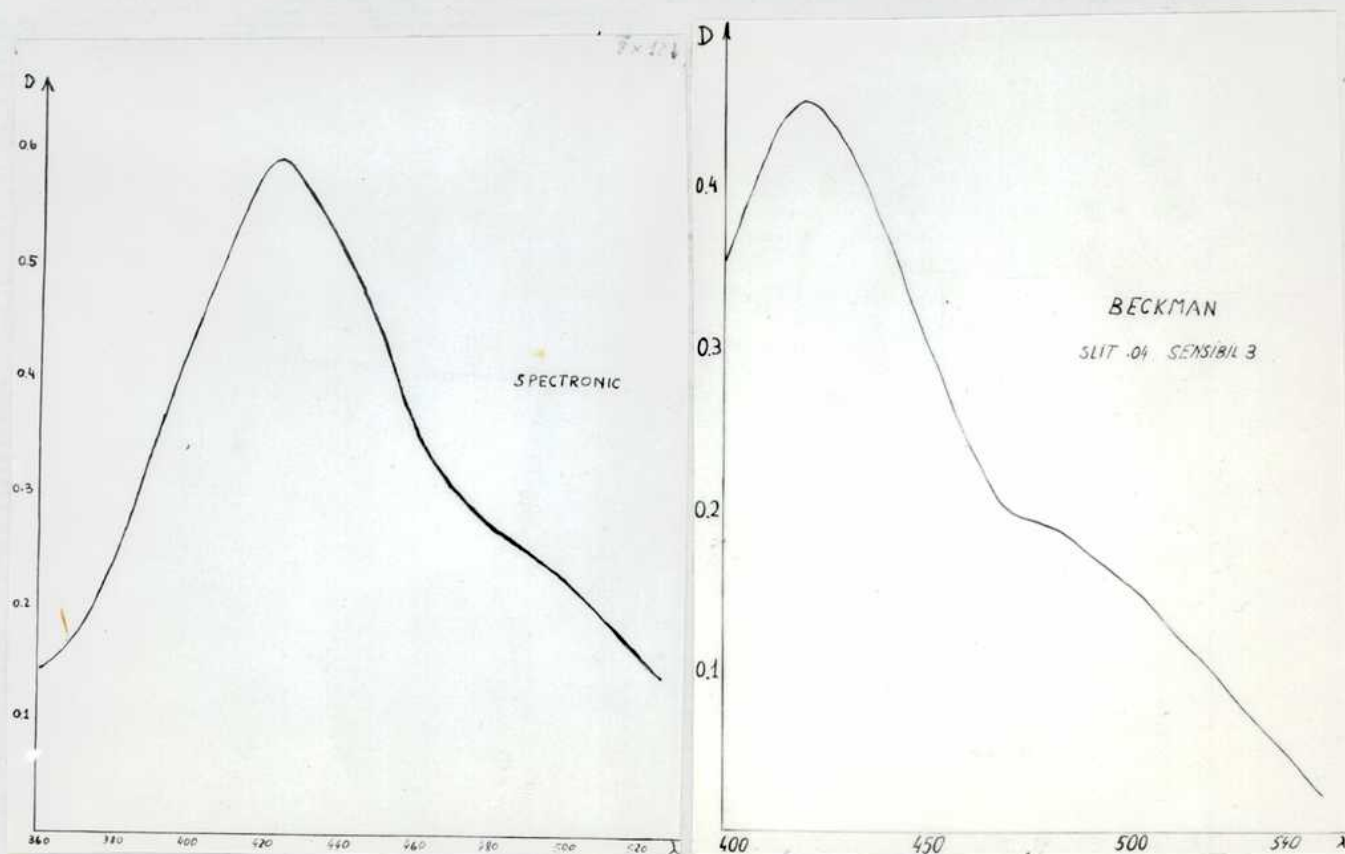


Figura 11 y 12: Curvas de absorción del complejo ALA-pícrato en el fotocolorímetro Spectronic y en el espectrofotómetro Beckman respectivamente.

La curva de absorción para el derivado ALA ácido pícrico puede verse en la figura N° 11 y 12 .

Este método fué usado para algunas determinaciones de ALA en órganos, pero luego fué cambiado por el método de Elliott (115) más cómodo y moderno, que es una nueva modificación al método de Shuster.

En el procedimiento original con ácido pícrico se recomienda que las mediciones de la extinción del complejo coloreado formado por el ALA sean hechas entre 450 y 470 $m\mu$. Sin embargo, a estas longitudes de onda la absorción debida al ácido pícrico es tal, que un pequeño error en la cantidad de este ácido añadido puede introducir un gran error en la estimación y afectar marcadamente la reproducibilidad de resultados. Estas dificultades pueden ser evitadas si las mediciones son hechas a 495 $m\mu$ donde la absorción debida al ácido pícrico es insignificante, aunque hay una leve pérdida de sensibilidad. Esto puede verse en el espectro del complejo ALA ácido pícrico que muestra la figura N° 13; esta modificación evita la necesidad de extraer el exceso de ácido pícrico que se usa en la técnica de Laver, Neuberger y Udenfried (44).

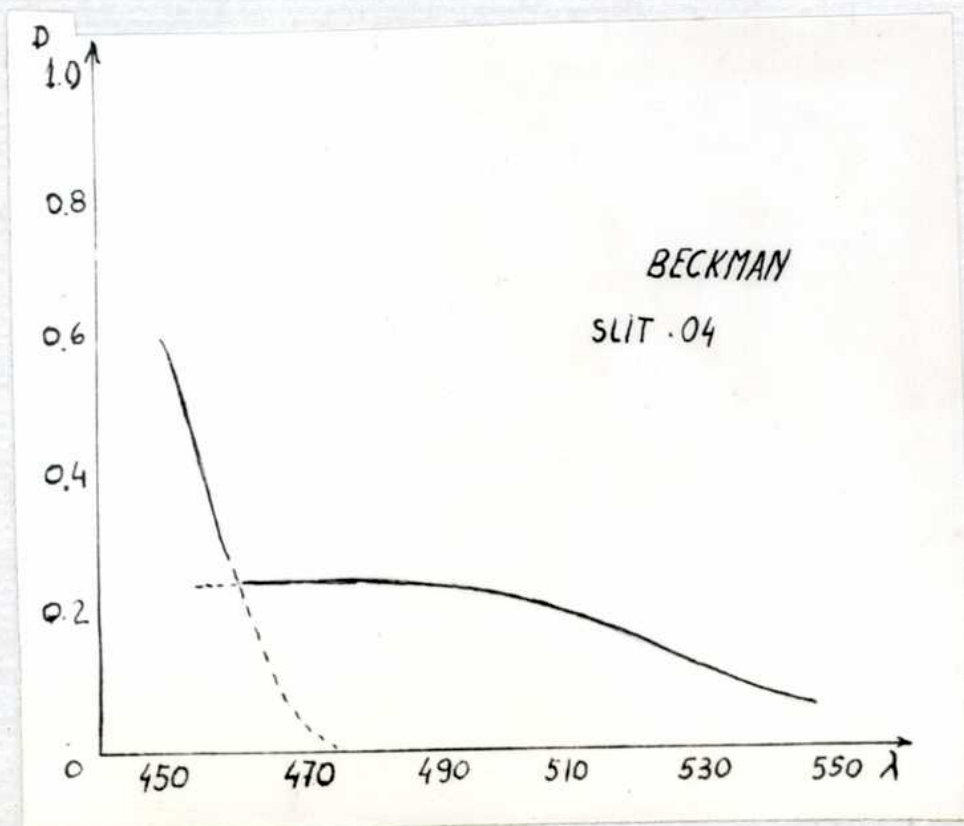
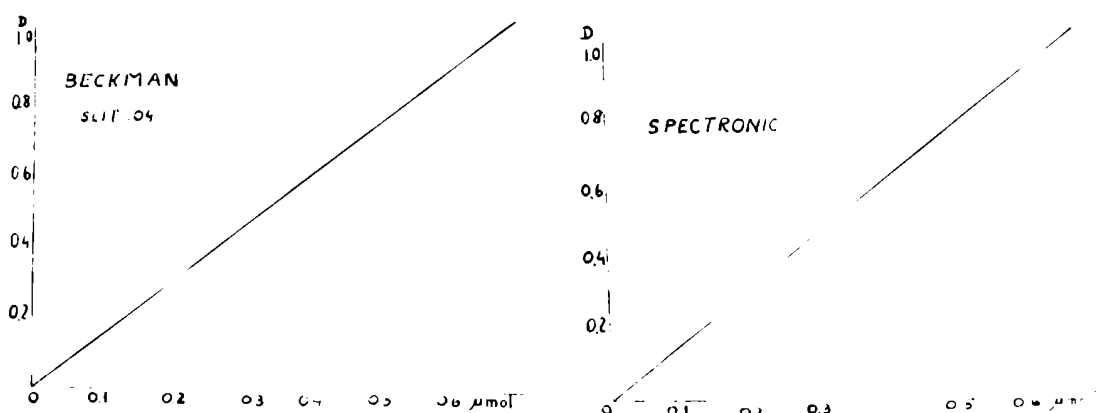


Figura 13: Curva de absorción del complejo ALA-picrato. Espectrofotómetro Beckman.

El método adoptado consiste en tratar la muestra (de 0.05 a 0.8 micromoles de ALA) en un volumen de 2.5 ml con 0.25 ml de una solución de ácido pícrico saturado a temperatura ambiente, y enfriarla a 0°C en un baño de agua helada. Se agrega luego 0.5 ml de HONa 5 N a 0°C y luego de agitar se deja reposar a esta temperatura. Luego de 14 minutos de reacción se agrega 1.75 ml de ClH 4 N , la solución se agita y se deposita en un baño de agua a la temperatura del cuarto. La absorción se lee a 495 milimicrones luego de un período de 10 minutos.

La absorción es proporcional a la concentración de la amino cetona hasta 0.8 micromoles de ALA, según el autor, pero de acuerdo a nuestra experiencia, podemos asegurar la proporcionalidad hasta 0.6 micromoles de ALA. Figuras (14 y 15).



Figuras 14 y 15: Curvas de calibración del complejo ALA-picrato, en el Beckman y Spectronic respectivamente.

COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR

Con las soluciones patrón preparadas con el ClH.ALA se trazaron las curvas de densidades ópticas versus concentraciones del complejo ALA-picrato mostradas en las figuras 14 y 15 y se calculó luego el coeficiente de extinción molar para este compuesto, que resultó del orden de 8.0×10^3 .

CRITERIOS DE IDENTIFICACION DEL ALA

CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Se utilizaron distintas técnicas para determinar la presencia de ALA, ya sea al estado libre, o condensado con acetyl acetona para formar el derivado pirrónico. La más conveniente resultó la utilizada por Mauzerall y Granick (108) que consiste en desarrollar el derivado pirrónico mencionado del ALA, con un sistema solvente consistente en la fase superior de una mezcla de butanol ; ácido acético : agua :: 4 : 1 : 5 , sobre papel Whatman N°1 . El Rf de este derivado es exactamente igual a 0.9 , y el del PBG es igual a 0.5 .

Otra técnica cromatográfica empleada, se basa en la descrita por Berlin, Neuberger y Scott (35) con algunas modificaciones . Se siembra el ClH.ALA patrón o el eluido de la columna Dowex 50, previamente ajustados a pH 2.0 con ClH, sobre papel Whatman N°1. El solvente empleado consiste en la fase superior separada a 24°C de una mezcla de butanol: ácido acético : agua :: 31.5 : 5 : 13.5. Se revela luego con ninhidrina al 1 % y el ClH.ALA da una mancha amarillenta con un Rf de 0.265.

Otro método de revelar el ClH.ALA es el indicado por Shuster (113) que consiste en mojar el papel con una solución de ácido pícrico saturado, luego con HClNa 5 N y finalmente con ClH 5 N , pero presenta el serio problema que el cromatograma se quiebra durante el secado, aunque el ALA se detecta muy bien.

En la Figura 16 pueden verse dos cromatogramas sobre papel del ALA. (Ver página siguiente)

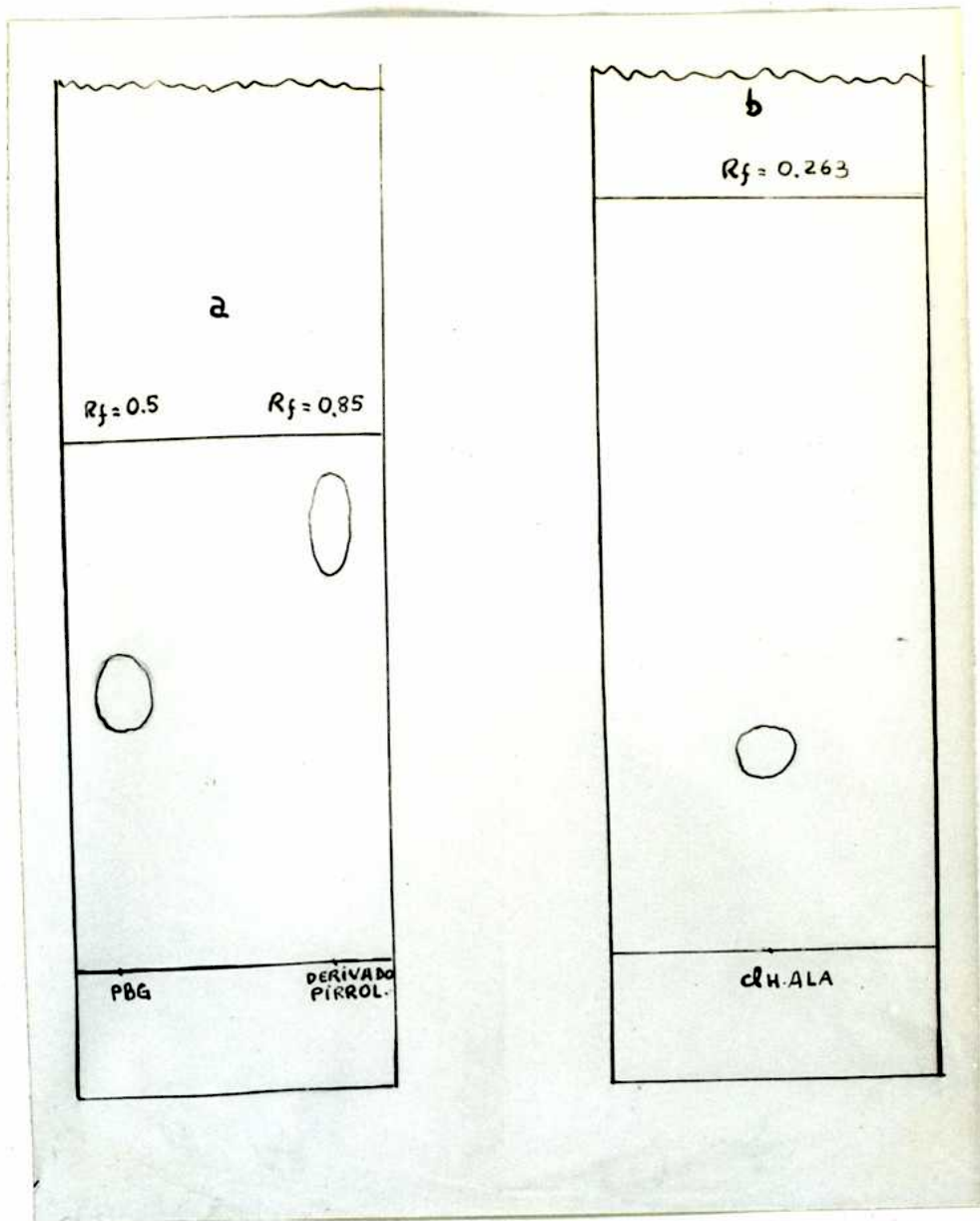


Figura 16: Cromatogramas sobre papel: a) ALA (como derivado pirr6lico) y PBG, aislados de orina humana. Solventes butanol : 6cido ac6tico : agua :: 4 : 1 : 5 . Rf : 0.85 y 0.5 respectivamente. b) ClH.ALA. Solventes butanol : 6cido ac6tico : agua :: 31.5 : 5.0 : 13.5 .Rf : 0.263

PORFIRIA EXPERIMENTAL

La mayoría de las experiencias descritas en este capítulo han sido realizadas en colaboración con el Doctor Horacio Tigier, y figuran ya en su trabajo de tesis.

Se describen los métodos utilizados para el estudio de las porfirinas y sus precursores metabólicos en la orina y algunos órganos de animales sometidos a la porfiria experimental, como así también en la orina de una paciente con porfiria aguda. La descripción de los distintos métodos de valoración del ALA, ya ha sido tratada en el capítulo anterior.

Los resultados obtenidos en esta experiencia están también registrados en este capítulo, reservándose la discusión de las conclusiones para la parte final del trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL

ANIMALES DE LABORATORIO

Se llevaron a cabo dos series de experiencias con seis animales cada una, con el objeto de estudiar las porfirinas y sus precursores metabólicos eliminados por la orina de estos animales sometidos a la porfiria experimental. Los animales utilizados, ratas y conejos, fueron tratados algunos con Sedormid y otros con A.I.A. Otras series de animales también fueron sometidos a la porfiria experimental, fueron utilizados para la determinación de los distintos isómeros de las porfirinas en la orina y en los estudios realizados en órganos.

Los conejos, en su mayoría blancos de ambos sexos tenían de 3 a 5 meses de edad, y su peso oscilaba entre los 1700 y 2700 gramos.

Las ratas, todas machos de raza Wistar, pesaban alrededor de 400 gramos, siendo de una edad aproximada a los tres meses.

Ambos tipos de animales fueron mantenidos en jaulas metabólicas y alimentados sin restricciones con "Forramex", antes y durante la experiencia.

SUMINISTRO DE DROGA

Las ratas fueron drogadas por vía parental o intregástrica, según el caso, con solución acuosa de A.I.A. en concentraciones del orden de los 24 mg por mililitro y en cantidades diarias de 200 a 400 mg por kilogramo de peso. El Sedormid se suministró como suspensión acuosa (preparada con ayuda de un agente tensioactivo "Tween 80") en concentraciones del orden de los 50 mg por mililitro y en cantidades diarias de 250 a 500 mg por kilogramo de peso.

Los conejos siempre se drogaron por vía intragástrica, suministrándoles ambas drogas en cápsulas de gelatina, en dosis diarias de 150 a 200 mg por kilogramo de peso.

Considerando que tanto la glicina como el ácido succínico intervienen en la biosíntesis del ALA y porfirinas, se intentó investigar qué efecto producían junto con otros cofactores si eran suministrados a las ratas por vía parental. Algunos animales fueron inyectados diariamente con una dosis de 50 μ M de ácido succínico, 50 μ M de glicina, 1 μ M de ácido pantoténico, 0.25 μ M de piridoxal, 5 μ M de ATP y 5 μ M de cloruro de magnesio, disueltos en una solución tampón de fosfatos de pH 7.3 .

METODO DE DOSAJE DE PORFIRINAS EN PORFIRIA EXPERIMENTAL

Por orina se excretan dos fracciones principales de porfirinas (la fracción de porfirinas solubles en eter, que incluye fundamentalmente a las coproporfirinas y las insolubles en eter, que comprende a las uroporfirinas y las porfirinas de siete carboxilos). Para poder dosar ambas fracciones se utilizaron dos técnicas; el método de Schwartz, Zieve y Watson (116) describe

fundamentalmente la extracción y dosaje de la fracción "copro" y la separación de la fracción "uro" con solución de acetato de sodio. Las técnicas descritas por Dressel y Tooth (117) y otros autores, permiten dosar la fracción "uro" de orina.

Las cantidades de uroporfirinas excretadas por orina en los casos de porfiria aguda humana o experimental, nunca pueden llegar a los niveles alcanzados por las porfirias cutáneas tardías; este hecho permite aplicar la variante del método citada en el párrafo anterior.

La determinación minuciosa de las uroporfirinas y una amplia discusión del método, puede consultarse en el trabajo de Dressel, Rimington y Tooth (118).

El método de dosaje aplicado en este trabajo, consta de los siguientes pasos; 2 a 5 ml de orina (según la intensidad de fluorescencia roja de la orina en el ultravioleta) se tratan con igual volumen de una solución tampón, compuesta de 4 partes de ácido acético glacial y 1 parte de solución saturada de acetato de sodio. Se agrega igual volumen de agua y se extraen las porfirinas con acetato de etilo. El acetato de etilo debe ser agregado en exceso, para evitar la emulsión entre la capa acuosa y la capa orgánica.

La fracción "uro" se extrae del acetato de etilo, lavando 2 ó 3 veces con solución de acetato de sodio al 1%. Si la cantidad de porfirinas es muy grande, puede juntarse la primera fracción acuosa con las fracciones de acetato de sodio y extraer nuevamente con acetato de etilo para recuperar la "copro" que pudiera haber pasado.

Así se tienen separadas las dos fracciones: la "uro" en acetato de sodio y la "copro" en acetato de etilo. La fracción "uro" se lleva a pH 3 - 3.2 con ácido acético y se la vuelve a extraer con acetato de etilo. En esta etapa debe realizarse una oxidación de los posibles porfirinógenos presentes en el medio, por tratamiento con una solución alcohólica fresca de iodo al

0.005 % . Finalmente se extrae la uroporfirina con fracciones de 1 a 2 ml de ClH al 10 % (3 N) , hasta que la fase acuosa no presente fluorescencia.

La fracción "copro" también se oxida con iódo y se extrae la coproporfirina con fracciones de 1 a 2 ml de ClH al 5 % (1.5 N) hasta fluorescencia negativa.

El dosaje de ambas fracciones en ClH, se realiza espectrofotométricamente, utilizando los coeficientes de extinción molar determinados por Salun, Batlle y Grinstein (119).

IDENTIFICACION DE PORFIRINAS EXCRETADAS POR ORINA

Las porfirinas excretadas por orina se identificaron generalmente con las técnicas usadas en el laboratorio de Watson, con algunas modificaciones circunstanciales.

La primera serie de determinaciones se realizó con ratas , con cuya orina se efectuó un procedimiento de extracción de porfirinas algo indirecto. Estas sustancias fueron extraídas de un "pool" de orina de ratas porfiricas mediante acetato de etilo.

Los porfirinógenos se oxidan por tratamiento con iodo, y el total de las porfirinas se extrae de la fase acetato de etilo repetidamente con ClH 3 N . Esta solución fuertemente ácida es llevada a pH 3 - 3.2 con solución saturada de acetato de sodio y las porfirinas se adsorben sobre talco. En esta etapa debe cuidarse que el líquido sobrenadante no presente las bandas de absorción características de las porfirinas, por observación espectroscópica.

El talco se suspende repetidas veces en porciones de una mezcla metanol:sulfúrico :: 19:1. De esta manera se separan las porfirinas del talco y comienzan a esterificarse; para conseguir una buena esterificación se acostumbra estacionar esta mezcla durante 48 horas a la oscuridad. Finalizado este periodo, se agrega un volumen igual de cloroformo y un gran exceso de agua

que elimina el metanol. Se agita y se deja estacionar para lograr la separación de las fases; la capa clorofórmica se lava dos veces con agua, una vez con NH_4OH al 10 %, nuevamente con agua y luego con una solución de ClNa al 7 % para romper las emulsiones.

Las porfirinas, que están ahora disueltas en cloroformo, se pasan a través de un papel de filtro embebido en este mismo solvente y se concentran casi a sequedad por destilación al vacío. En estas condiciones, las porfirinas pueden ser sometidas a procesos cromatográficos.

CROMATOGRAFIA SOBRE COLUMNA DE ESTERES DE PORFIRINAS

El método de la cromatografía en columna permite una separación primaria de los distintos tipos de porfirinas y fué aplicado primitivamente en el laboratorio de Watson. El detalle de este método cromatográfico con carbonato de calcio de uso corriente en nuestro laboratorio, está descrito en un trabajo de Grinstein (73).

En la figura N^o 17 pueden observarse dos columnas cromatográficas del mismo tipo pero de diferentes medidas.

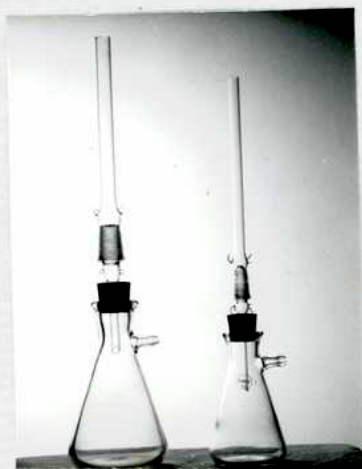


Figura 17: columnas cromatográficas

Los solventes de absorción y desarrollo sobre la columna de carbonato de calcio deben ser elegidos de acuerdo al tipo de porfirinas que se sospecha tener en los extractos.

Las porfirinas de bajo número de carboxilos corren rápidamente, por lo que es necesario utilizar como solventes de absorción benceno o eter de petróleo a una temperatura entre los 40 y 50°C, debido a que aquellas sustancias son poco solubles en estos solventes.

Los solventes de desarrollo son distintas mezclas de cloroformo benceno con mayor proporción de cloroformo cuanto mayor es el número de carboxilos de las porfirinas.

Cada banda separada del cromatograma se recromatografía hasta lograr una banda única. Lograda la pureza cromatográfica deseada, las porfirinas se cristalizan en metanol y se determina la forma cristalina y el punto de fusión. Una identificación más exacta se logra sometiendo estas fracciones a la cromatografía sobre papel.

CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL DE ESTERES DE PORFIRINAS

En esta experiencia se utilizó el método descrito por Falk y Benson (120), pero en su aplicación cuantitativa se introdujeron algunas modificaciones que fueron efectuadas por Batlle y Grinstein (121) en nuestro laboratorio. Las porfirinas esterificadas se siembran sobre tiras de papel Whatman N° 1; en una cuba previamente saturada con cloroformo, se hacen correr las muestras con un primer sistema solvente compuesto de 4 partes de querosene y 6 partes de cloroformo etanólico al 1 % durante 15 minutos. Esto tiene por objeto la eliminación de impurezas. El querosén que se utiliza es la fracción destilada sobre cloruro de calcio entre 190 y 250°C.

El papel se seca, se corta su extremo inferior, se marca la posición actual de las manchas que son observadas bajo la lámpara ultravioleta y se hacen correr nuevamente en un segundo sistema solvente compuesto de 4 partes de querosén y 2 partes de dioxano.

El solvente asciende por el papel unos 20 cm cuando se permite que el cromatograma desarrolle algo más de dos horas, y el revelado de las manchas se efectúa mediante el uso de la luz ultravioleta.

La adaptación del método cromatográfico a la forma cuantitativa, figura en el trabajo anteriormente citado de Batlle y Grinstein.

En este trabajo solo se mostrará una tabla en la que figuran los resultados de estas experiencias aplicadas a la orina de conejos y a la orina de un caso humano de porfiria aguda.

CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL DE PORFIRINAS LIBRES

La técnica cromatográfica sobre papel para porfirinas libres de Nicholas y Rimington (122) modificada por Ericksen (123) y puesta a punto en nuestro laboratorio por la Doctora Batlle, también fué utilizado aunque con menor frecuencia que la anterior.

Las porfirinas libres disueltas en HONH_4 2 N se siembran sobre papel Whatman N° 1 y se hacen correr en una cuba saturada con NH_3 , con un sistema solvente consistente en 3.5 partes de agua y 7 partes de 2-6 lutidina, en la oscuridad y durante 14 horas.

Este método permite diferenciar con relativa claridad, según las proporciones presentes, coproporfirinas I y III.

DESCARBOXILACION DE UROPORFIRINAS

Esta técnica fué usada según los casos para identificar o confirmar el tipo isomérico de las uroporfirinas, debido a que las coproporfirinas obtenidas por descarboxilación, pueden ser cromatografiadas por el método de la lutidina.

Los ésteres metílicos de las uroporfirinas se llevan a sequedad en un tubo de descarboxilación de Carius al que se agrega luego ClH al 1 % (0.3 N); luego se hace el vacío, se cierran los tubos a la llama y se calientan en estufa a 180°C durante 4 horas. Se procede luego a eliminar el ClH al vacío y las porfirinas descarboxiladas se esterifican y llevan a cloroformo mediante el método ya citado, para ser purificadas por cromatografía de adsorción en carbonato de calcio. Estos ésteres se vuelven a saponificar para poder realizar la cromatografía de porfirinas libres.

AISLAMIENTO DE PORFIRINAS DE ORGANOS

El método de Schwartz e Ikeda (99) fué ligeramente modificado para el mejor logro de los fines perseguidos.

Los tejidos triturados y homogeneizados, fueron tratados repetidas veces con una mezcla de 4 partes de acetato de etilo y 1 de ácido acético, que separa las porfirinas de su unión con las proteínas y permite una buena extracción de aquellas. Este extracto acético-acetato de etilo fué tratado con una solución de acetato de sodio al 5 % , que elimina la acidez y extrae las uroporfirinas, que luego son tratadas en la manera descrita para la orina. Las coproporfirinas restantes, extraídas con acetato de etilo sufrieron también el mismo tratamiento que en el caso de la orina.

Para poder identificar el tipo de porfirinas existentes en los tejidos, se elimina el ácido acético de la mezcla mediante sucesivos lavados con agua, y se extrae rápidamente el total de porfirinas con varias porciones de ClH al 10 % . Las porfirinas disueltas en ClH, se ajustan a pH 3 - 3.2 y se adsorben sobre talco. La identificación de las mismas se hizo por las técnicas anteriormente descritas.

Los órganos utilizados para este estudio fueron hígado y riñones de animales sometidos a la porfiria experimental.

RESULTADOS OBTENIDOS

Durante el curso de la porfiria experimental, se observó un aumento en la excreción urinaria de ALA al segundo día de iniciada la ingestión de la droga, que se acentúa para las ratas al sexto día y alrededor del noveno al décimo día en los conejos . Peso a ello, el aumento registrado en las ratas es mucho más pronunciado que en los conejos. La excreción de PBG se encuentra también aumentada y el incremento más pronunciado aparece cerca del octavo día en las ratas y alrededor del décimo primer día en

los conejos. La velocidad de aparición de los máximos de excreción, está en relación directa con la cantidad de droga inoculada. En las ratas se observa con frecuencia que los máximos de excreción de ALA preceden a los de PBG.

Tanto el ALA como el PBG excretados por orina, fueron identificados cromatográficamente sobre papel.

La orina de rata presenta un aumento significativo de copro y en menor cantidad de uroporfirinas. En la orina de conejo se registra igual aumento de ambas clases de porfirinas.

En las figuras 18 y 19 están graficados los resultados más representativos de las determinaciones de ALA, PBG, uro y coproporfirinas realizadas sobre la orina de ratas y conejos antes y durante la porfiria experimental.

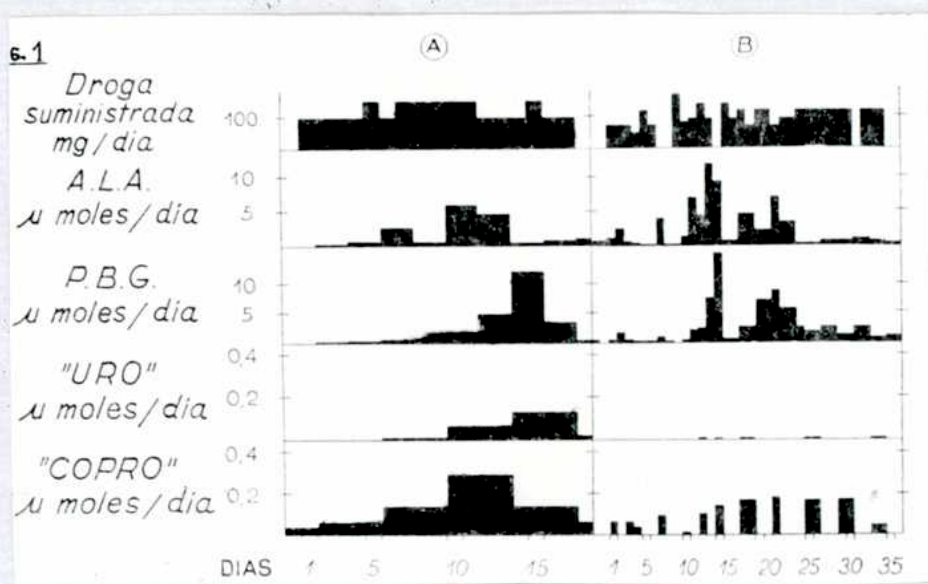


Figura 18: ALA, PBG, y porfirinas excretadas por orina de ratas tratadas con: A = Sedormid ; B = A.I.A.

Debe hacerse notar que los valores de uroporfirinas registrados en estas experiencias, son muy inferiores a los citados en la bibliografía. La diferencia es explicable, pues las determinaciones realizadas en nuestro laboratorio fueron hechas directamente sobre la orina sin calentamiento previo, mientras que en los trabajos oportunamente citados, gran parte de las porfirinas

dosadas son sintetizadas "in vitro" por el precalentamiento de la orina acidificada.

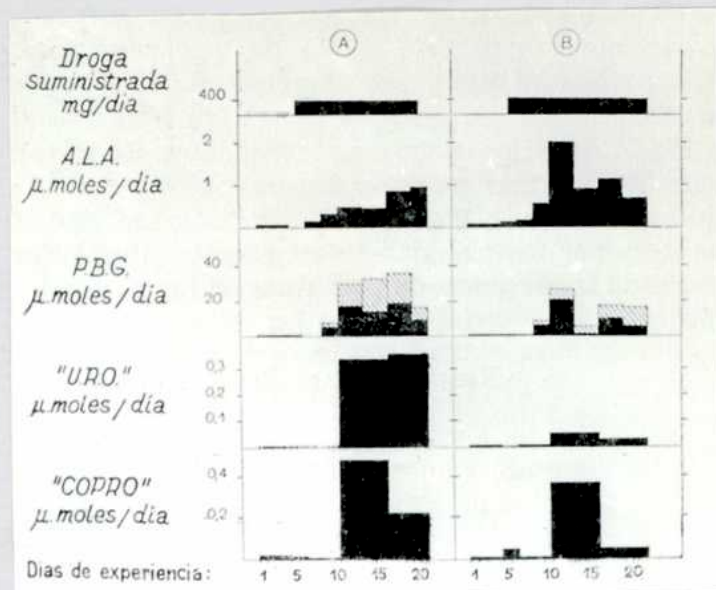


Figura 19: ALA, PBG y porfirinas excretadas por orina de conejos tratados con: A = Sedormid ; B = A.I. A. Los cuadros rayados sobre el PBG corresponden al dosaje directo hecho por simple dilución de la orina (método de Vahlquist). Citado por Mauzerall y Granick (108).

Los valores normales de excreción urinaria de porfirinas y sus precursores en ratas y conejos, así como los valores máximos de ALA y PBG y porfirinas observados durante las experiencias, están registrados en la Tabla N°2. La concentración de los precursores está también expresada en μ moles equivalentes de porfirinas por día ya que se ha tenido en cuenta que una molécula de porfirina equivale a ocho moléculas de ALA y a cuatro moléculas de PBG. En la misma tabla figuran los máximos de excreción correspondientes a la orina de un caso humano.

El análisis de los datos consignados demuestra que la excreción urinaria de precursores en los animales de experimentación es mucho mayor que la de porfirinas, pudiéndose observar el mismo fenómeno en el caso humano. Este hecho confirmaría cierta similitud entre la porfiria experimental y la porfiria aguda humana, lo que ya fué señalado por otros autores.

TABLA 2

PORFIRINAS Y PRECURSORES EXCRETADOS POR ORINA

VALORES NORMALES

	ALA			PBG			"URO"		"COPRO"	
	μg por día	μmol por día	μmol equiv p/día	μg por día	μmol por día	μmol equiv p/día	μg por día	μmol por día	μg por día	μmol por día
Ratas	18	0,14	0,02	27	0,12	0,03	0	0,00	37	0,05
Conejos	22	0,17	0,02	18	0,08	0,02	9	0,01	29	0,04

VALORES MAXIMOS

Rata Droga											
1	AIA	2750	21,10	2,64	4760	20,77	5,18	0	0,00	98	0,15
2	AIA	1650	12,60	1,57	3400	15,47	3,86	0	0,00	118	0,18
3	AIA	210	1,38	0,17	190	0,84	0,21	13	0,02	89	0,12
4	AIA	200	1,54	0,19	200	0,67	0,17	26	0,03	90	0,13
5	Sed.	750	5,85	0,73	1280	5,76	1,44	89	0,10	190	0,30
6	Sed.	800	6,16	0,77	1400	6,20	1,55	350	0,39	125	0,19
Conejo											
1	Sed.	140	1,07	0,13	4000	17,40	4,35	85	0,10	75	0,12
2	Sed.	290	2,30	0,28	5600	24,60	6,15	200	0,24	165	0,26
3	Sed.	150	1,00	0,12	4400	18,20	4,55	300	0,36	325	0,48
4	AIA	900	7,00	0,87	29000	130,00	32,50	670	0,80	330	0,48
5	AIA	230	1,90	0,24	4800	21,10	5,30	40	0,06	235	0,37
6	AIA	240	1,90	0,24	8000	35,40	8,85	150	0,18	290	0,44
Caso humano											
		108mg	825	106	366mg	1.620	405	300	0,36	1300	2,00

Los valores normales tabulados para ratas y conejos corresponden a pro medios de nuestras determinaciones. Haeger (124) en 1960 registra que los valores normales de excreción diaria de ALA en humanos alcanzan a 3 mg y para PBG a 1 mg. Distintos investigadores dan como excreción normal de uroporfirina en humanos 15 μg por día y para coproporfirina: de 100 a 300 μg diarios.

Un cuadro comparativo de los valores máximos de excreción urinaria de PBG, uro y coproporfirina en ratas y conejos obtenidos por nosotros y por los distintos laboratorios que trabajan en el tema se muestran en la tabla 3. No se registran valores para ALA, debido a que para este metabolito no existían método de dosaje.

TABLA 3

Laboratorio de investig.	Animales experiment.	PBG mg/día	"URO" μ g/día	"COPRO" μ g/día
Watson	Conejos		13.500(')	450
Aldrich	Ratas		110(') 1.500(')	150
Rimington	Conejos	110(")	18.500(")	340
	Ratas	6(")	---	52
Grinstein	Conejos	29	670	350
	Ratas	3	(")	190

Los valores marcados con un asterisco (') corresponden a determinaciones hechas sobre orina precalentada y acidificada; los señalados con el doble asterisco (") corresponden a determinaciones realizadas por el método de Vahlquist (125). La triple señal (") indica solo una reacción cualitativa, debido a que registramos solo un caso de 450 μ g por día.

El efecto producido sobre la excreción urinaria de porfirinas y precursores cuando se suministran cofactores a una rata sometida a la porfiria experimental, puede verse en la figura 20 que es del mismo tipo que las figuras 18 y 19 .

El descenso en la excreción de precursores fué notable durante el período en que se suministraron cofactores. Si bien estos resultados son sugestivos, con otros animales se obtuvieron algunos resultados un poco contradictorios.

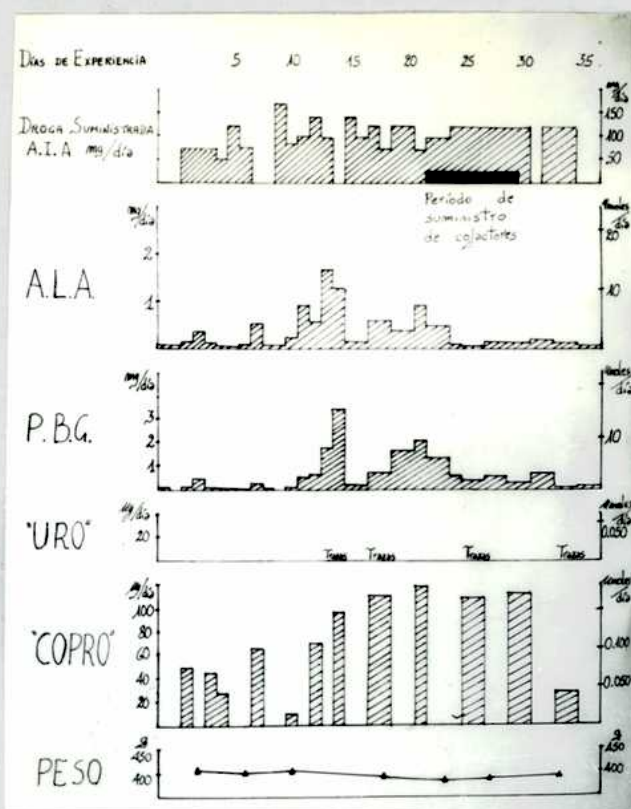


Figura 20: Efecto del suministro de cofactores.

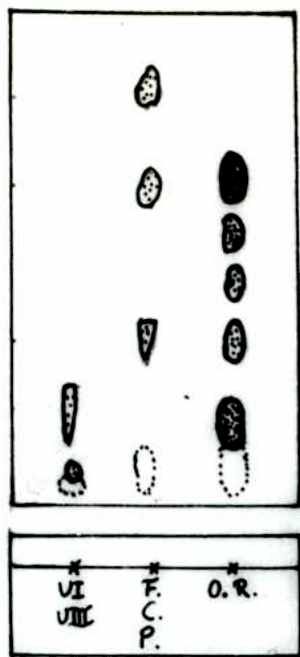
El tipo de porfirinas que se excretaron en la orina de ratas durante la porfiria experimental, se estudió cualitativamente luego de su extracción con acetato de etilo y ClH . Se absorbieron en talco y esterificaron con metanol sulfúrico por los métodos ya comentados.

La figura 21 muestra que mediante la cromatografía de Falk y Benson se logró su identificación obteniéndose manchas correspondientes a uroporfirina I, uroporfirina III, firiaporfirina III y coproporfirinas, en una corrida simultánea con los testigos correspondientes.

Entre la firiaporfirina y la coproporfirina aparecieron manchas cuyos R_f probablemente correspondan a porfirinas de 6 y 5 carboxilos.

Debido al mayor volumen de las muestras, tanto en la orina humana como en la de conejos, la adsorción de las porfirinas con talco fué efectuada directamente ajustando el pH entre 3 - 3.2 y continuando con la técnica ya conocida.

Figura 21:



- UI : Uroporfirina I
 - UIII : Uroporfirina III
 - F : Firiaporfirina III
 - C : Coproporfirina
 - P : Protoporfirina IX
 - O.R : Orina de ratas,
- Esteres de porfirinas.

Fué realizado además el estudio de la proporción de cada tipo de porfirinas presentes en las orinas porfíricas mediante el empleo de las columnas cromatográficas de carbonato de calcio y cromatografía sobre papel cuantitativa; como dato ilustrativo se muestran en la tabla 4 las cantidades relativas de porfirinas presentes en la orina de conejos y humana.

TABLA 4

CANTIDADES RELATIVAS DE PORFIRINAS AISLADAS DE ORINA DE CONEJOS Y HUMANA

PORFIRINAS	Orina de conejos porfíricos Estado:		Orina humana Porfiria aguda
	Inicial %	Avanzado %	
Protoporfirina	3,5	1,0	---
Tricarboxílicas	1,3	1,3	2,0
Coproporfirinas	45,0	11,0	26,0
Pentacarboxílicas	12,9	6,4	8,0
Hexacarboxílicas	6,7	3,2	12,0
Firiaporfirina III	10,9	9,2	8,0
Uroporfirina III	4,5	47,8	22,0
Uroporfirina I	15,3	20,0	22,0

Los Rf de la protoporfirina 9, firiaporfirina III, uroporfirina III y uroporfirina I, coincidieron con los Rf de los testigos puros. Las porfirinas tri-, penta- y hexacarboxílicas fueron deducidas de su posición en el cromatograma.

Algunas bandas de porfirinas de la cromatografía en columna de carbonato de calcio fueron recromatografiadas hasta la obtención de una banda única, como criterio de pureza para su cristalización. Se logró de esta manera la cristalización de las copro-, uro-, y uroporfirina III.

La coproporfirina urinaria observada al microscopio, permitió ver cristales de las formas isoméricas I y III. Se realizaron sucesivas recristalizaciones para purificar el producto, y los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de micropunto de fusión Fischer con calentamiento eléctrico. En la primera recristalización se registró un punto de fusión entre 145 y 147°C y en las sucesivas se obtuvieron puntos de 155-157°C y 163-165°C; estos resultados también indicaban que se estaba en presencia de una mezcla de los dos isómeros. Con las sucesivas recristalizaciones se lograba un enriquecimiento de la mezcla en el isómero de tipo I, pues los puntos de fusión de las sustancias puras son: coproporfirina I = 252°C y coproporfirina III de punto de fusión doble a 142 y 172°C. La cromatografía sobre papel de porfirinas libres (lutidina agua) mostró también una mezcla de los dos isómeros con proporción mayor de coproporfirina III.

También la uroporfirina evidenció cristales de ambos tipos isoméricos y una muestra registró un punto de fusión entre 270 - 275°C, registro que se repitió una vez recristalizado el producto. Una muestra diferente, registró un punto de fusión 260 - 264°C en la primera cristalización y de 262-267°C en la segunda. El punto de fusión teórico para la uroporfirina I es de 293-302°C y para la uroporfirina III de 255-258°C; estas cifras evidencian que las uroporfirinas urinarias son también una mezcla de ambos tipos isoméricos.

La cromatografía sobre papel de los ésteres metílicos de estas uroporfirinas (Falk y Benson) como la cromatografía de las coproporfirinas libres obtenidas por descarboxilación de las primeras, dieron evidencia de que se estaba en presencia de una mez

cla de ambos isómeros con preponderancia del tipo III.

La firiaporfirina III fué estudiada microscópicamente y se de terminó el punto de fusión de dos recristalizaciones; la primera registró una marca de 208-214°C y la segunda de 210-214°C , siendo el valor teórico de la sustancia pura 213-215°C; con esta porfirina se determinaron espectrofotométricamente los máximos de absorción característicos, que coincidieron con las del testigo aislado de una paciente con porfiria cutánea tarda. Estos picos se hallan representados en la figura 22.

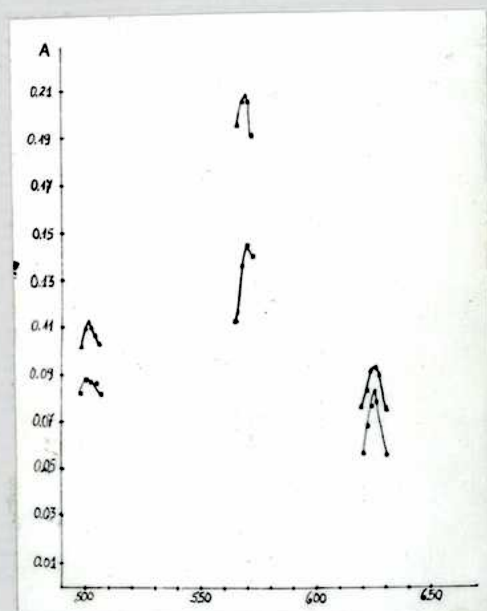


Figura 22: Máximos de absorción de la firiaporfirina III.

ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE INCORPORACION DE GLICINA C^{14}
EN PROTEINAS DE HIGADOS NORMALES Y PORFIRICOS

TRABAJO EXPERIMENTAL

Considerando las ideas expuestas en los trabajos de Schmid y Schwartz (79) en los que se sugiere que en el estado patológico de la porfiria se encuentra una disminución de la catalasa hepática, en nuestro laboratorio se encaró el estudio comparativo de la biosíntesis de proteínas en homogenatos de hígados de ratas y conejos normales y porfíricos.

El objeto de este trabajo era determinar si esa disminución de la catalasa hepática es debida o no a una síntesis disminuida de las proteínas totales del hígado en los casos de porfiria experimental, ya que Rimington había registrado aumentos en la biosíntesis del hemo.

Para tal fin, se incubaron bajo condiciones que serán discutidas más adelante homogenatos de hígados normales y patológicos en distintos medios que contenían glic- C^{14} precipitando luego las proteínas biosintetizadas y registrando la actividad específica de las mismas.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizarón ratas y conejos, como se describe en la página 45.

El hígado se extrae rápidamente, se lava repetidas veces con solución fisiológica helada y se suspende en el medio a incubar refrigerado en un baño de hielo. De cada hígado normal o patológico se cortan y pesan trozos entre 1 y 3 gramos, a los que se

agrega rápidamente, una cantidad determinada del medio en el que se efectuará la incubación, como si indica para cada caso.

PREPARACION DE LOS HOMOGENATOS

La preparación de los homogenatos fué realizada utilizando diferentes soluciones o medios de incubación:

A) Medio de incubación salino "standard"

Preparado de acuerdo con Winnick, Friedberg y Greenberg (126).

La mezcla incubante tiene la siguiente composición:

Cloruro de sodio	0.72 g
Bicarbonato de sodio	0.25 g
Fosfato monopotásico	0.10 g
Sulfato de magnesio heptahidrato	0.06 g
Glucosa	0.10 g
Citrato de sodio 5 $\frac{1}{2}$ hidrato	0.03 g

Estas sustancias se llevan a 100 mlilitros y se saturan luego con una mezcla de 95 % de oxígeno y 5 % de dióxido de carbono ("carbógeno"). La mezcla preparada se guarda en la heladera y antes de ser usada, debe agregársele 3 ml de una solución de cloruro de calcio al 1 % por cada 100 ml de medio.

Este medio, llamado "standard" por los investigadores anteriormente citados, se utiliza en la proporción de 15 ml de medio helado por cada gramo de hígado. Una vez preparado el homogenato de la manera como se indica más adelante, se satura este con "carbógeno", se tapa y ya se encuentra en condiciones de ser incubado en el termostato. El homogenato preparado de esta manera tiene un pH de 7.75 .

B) Sacarosa como medio de incubación

En la mayoría de las experiencias se utilizó como medio para preparar los homogenatos, una solución de sacarosa isotónica (0.25 M). Estos homogenatos se preparan siguiendo el método su-

gerido por Mc Lean, Cohn, Brandt y Simpson (127). La solución de sacarosa se utiliza en la proporción de 9 ml de solución 0.25 M por cada gramo de hígado. Solamente en dos experiencias se agregó al homogenato 0.5 mililitros de una solución de cloruro de magnesio 0.12 M antes de la incubación.

C) Medio de incubación salino (Medio X)

Este medio se prepara de acuerdo a las técnicas de Zamecnik y Keller (128) y está constituido de la siguiente manera:

Cloruro de magnesio	0.01 M
Buffer "tris"	0.02 M (pH 7.8)
Bicarbonato de potasio	0.035 M
Cloruro de potasio	0.025 M
Sacarosa	0.35 M

El pH óptimo con el que actúa este medio presenta una meseta entre 7.2 y 7.7 y el pH del homogenato total obtenido con esta mezcla está alrededor de 7.5 .

El extracto a incubar se prepara con 2.5 volúmenes de medio por cada volumen de tejido.

Los homogenatos fueron preparados en el aparato homogeneizador de vidrio a pistón de Potter y Elvehjem o en el homogeneizador mecánico "Virtis" a cuchillas. Ambos aparatos se mantienen constantemente refrigerados en baño de hielo.

La ruptura de las células enteras se realiza durante 1 a 1,5 minutos con el homogeneizador de Potter Elvehjem conectado a un agitador mecánico y durante 5 minutos con el aparato "Virtis" en la posición 30 del reóstato.

Durante las primeras experiencias realizadas, estos homogenatos se centrifugaron en la centrífuga "Jackson" a 600 rpm durante 1 minuto, con objeto de separar las células enteras y los eritrocitos, de las partículas subcelulares. Más tarde se empleó la técnica de Fitch y colaboradores (129) y los homogenatos fueron centrifugados en la centrífuga refrigerada International du-

rante 10 minutos a 2.000 rpm (aproximadamente 100 X g); la fracción libre de células se decanta y centrifuga nuevamente.

De estos homogenatos se toman un número determinado de alícuotas de acuerdo al peso de tejido original y se distribuyen en frascos de Erlenmeyer de 50 ml, que contienen entre 0.5 y 1 ml de una solución de glicina C¹⁴ con una actividad aproximada de 900.000 cpm.

INCUBADO

Los homogenatos así preparados se incuban durante 3 horas en un baño termostatzado con agitación entre 37 y 38°C.

PRECIPITACION Y LAVADOS

Se realiza de acuerdo al método de Mc Lean y colaboradores (127) ya citado. Finalizado el tiempo de incubación las proteínas se precipitan con 5 ml de solución de ATCA al 20 % agitando constantemente, y se centrifugan en la "Jackson" durante 5 minutos a 1.600 rpm.

Los líquidos se separan por decantación y se lavan luego dos veces con 10 ml de ATCA al 5 % y una vez con igual cantidad de ATCA al 5 % a 90°C para eliminar así los ácidos nucleicos. Las proteínas tienden a suspenderse en los líquidos de lavado por lo que deben decantarse rápidamente. Estas proteínas se redisuelven luego con 8 ml de una solución de HONa 0.4 N que contiene 20mg de glicina cada 8 ml. A veces es necesario ayudar a esta disolución, mediante un calentamiento a baño maría que no debe pasar de los 60°C y de los 2 minutos de duración, enfriando luego rápidamente en un baño de agua fría. Esta solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se reprecipita luego con 2 ml de ATCA al 50 %, agitando. Este precipitado se separa por centrifugación y decantación y se lava 2 veces con 10 ml de etanol, luego con 10 ml de una mezcla de volúmenes igua

les de etanol eter a 70°C durante 2 minutos y finalmente dos veces con eter.

SECADO

El secado de las proteínas debe hacerse raspando las partículas con una varilla de vidrio sobre las mismas paredes del tubo donde se han precipitado. Una vez logrado un polvo fino y seco, se colocan en estufa entre 100-110°C durante 2 horas, y se guardan inmediatamente en un desecador al vacío en presencia de HOK, hasta lograr constancia de peso, como está indicado por Bannerman, Gristein y Moore (130).

PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL RECUESTO

Las medidas de radioactividad se realizaron en un contador Nuclear Chicago Modelo D 47 con ventana micromil y corriente de gas. En este contador, un micro Curie equivale a 3.11×10^5 cpm.

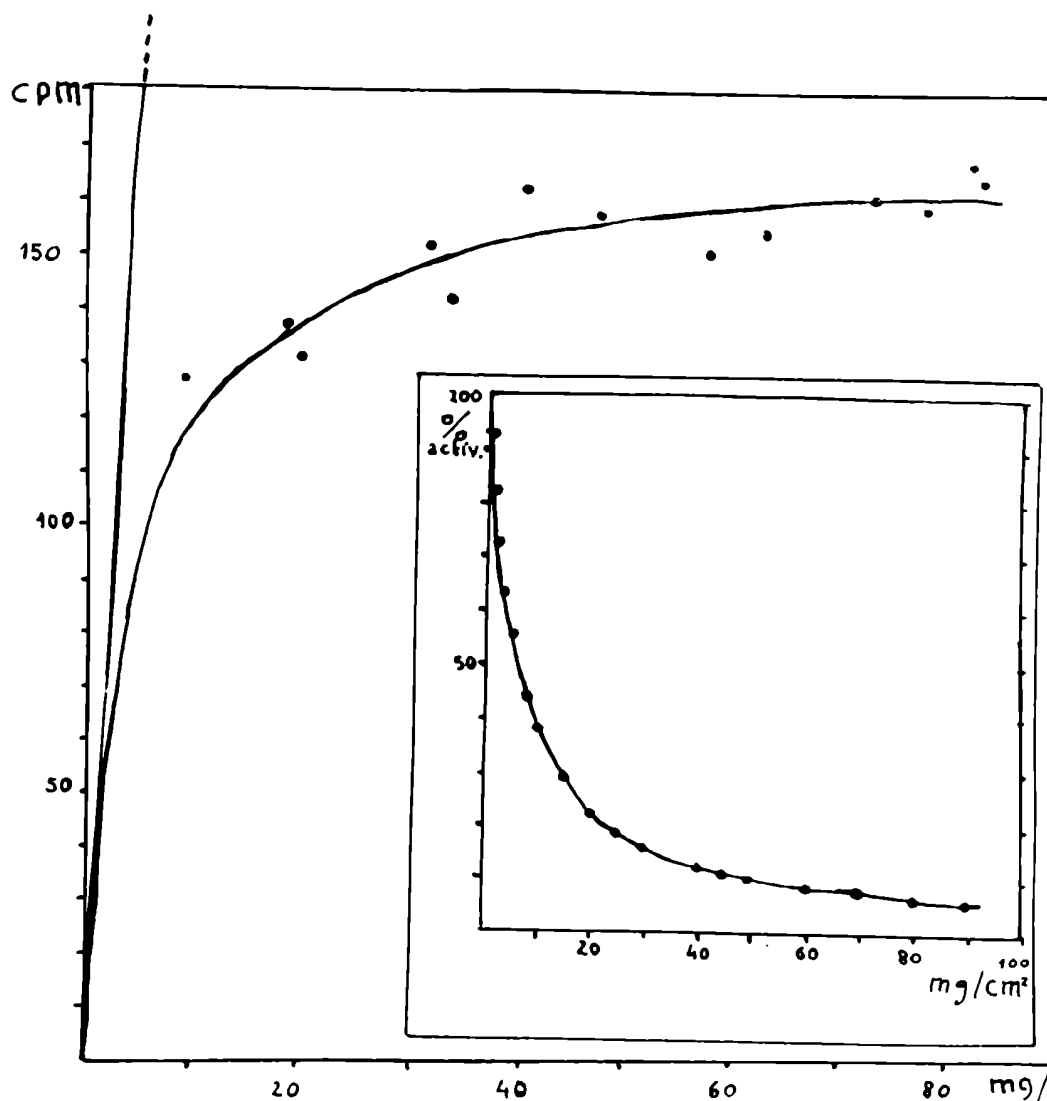
Se utilizan capsolctas de aluminio de 4,68 cm² de superficie, cuyo fondo se lija para facilitar la mejor fijación del fino polvo proteico. En estas capsolctas se colocan las muestras de proteínas listas para el recuento en fracciones que oscilan entre los 20 y 40 mg, expandiéndose las partículas por toda la superficie del fondo, para lograr un espesor uniforme.

Las correcciones debidas a autoabsorción se calculan usando una curva construida con glicina C¹⁴, expresándose los resultados en cpm referidas a un espesor infinitamente pequeño (figuras 23 y 24) (ver página siguiente).

EXPERIENCIAS DE TIEMPO CERO

Estas experiencias se realizan para determinar el error en cpm/mg cometido a causa de la posible adsorción de glicina C¹⁴ por el precipitado proteico.

Los homogenatos se preparan como se describió anteriormente, y se agregan al recipiente que contiene la cantidad de amino ácido radiactivo ya citada. Las proteínas se precipitan inmediatamente con ATCA al 20 %. La incubación no se realiza y se continúa con las operaciones comunes a las demás experiencias.



Figuras 23 y 24

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en estas experiencias, están reunidos en las tablas siguientes; ellos están separados de acuerdo al tipo de animales utilizados y al medio empleado para incubar.

Cada cifra representa el promedio de 2 a 4 determinaciones y en las tablas están expresados miligramos de proteínas en la capsula, cuentas por minuto (corregidas por fondo y por autoabsorción) y actividades específicas (cuentas por minuto por miligramo).

Las experiencias registradas son individuales, y están separadas de a pares, normal y porfirico paralelamente.

CONEJOS: INCUBACION MEDIO STANDARD

	Normal	Porfirico	Normal	Porfirico	Normal	Porfirico
mg proteina	20.8	18.1	21.1	17.0	19.2	23.5
cpm (correg.)	40.3	49.2	44.9	14.8	21.8	33.4
cpm/mg	1.93	2.71	2.03	0.87	1.13	1.42

CONEJOS: MEDIO DE INCUBACION: SACAROSA

mg proteina	20.9	16.7	28.7	23.0	16.9	26.2	24.6	24.9
cpm (correg.)	24.5	41.7	94.9	118.0	90.8	51.1	3667	9433
cpm/mg	1.17	2.48	3.30	5.13	5.37	1.95	149	378
mg proteina.	36.7	39.0	24.9	30.4	25.0	23.7		
cpm (correg.)	13300	5347	4700	1876	262.8	228.5		
cpm/mg	362	136	68.2	61.7	10.5	9.64		

RATAS: MEDIO DE INCUBACION: SACAROSA

mg proteina	57.7	40.7	22.6	30.4	33.2	29.7
cpm (correg.)	728.7	934.3	132.3	154.7	171.8	244.9
cpm/mg	19.3	23.2	5.8	5.0	5.2	8.2

CONEJOS: MEDIO DE INCUBACION: X

mg proteina	21.9	29.7	19.5	22.2
cpm (correg.)	309.3	237.5	435.3	443.0
cpm/mg	12.4	7.9	22.3	19.8

RATAS: MEDIO DE INCUBACION: X

	Normal	Porfirico	Normal	Porfirico	Normal	Porfirico	Normal	Porfirico
mg proteina	24.1	23.4	20.1	23.6	20.8	20.8	20.8	33.5
cpm (correg.)	222.6	272.7	151.6	228.1	116.6	116.6	116.6	139.5
cpm/mg	9.2	11.6	7.5	9.6	5.6	5.6	5.6	4.1

EXPERIENCIAS TIEMPO CERO

mg proteina	22.1
cpm (correg.)	5.5
cpm/mg	0.24

CONCLUSIONES Y DISCUSION

En este trabajo se ha estudiado detalladamente la metodología relacionada con el ALA y han sido descritas diferentes técnicas de identificación y valoración cuantitativa de dicha sustancia.

Se han realizado estudios fotocolorimétricos y espectrofotométricos del compuesto coloreado resultante de la reacción del 2 metil-3 acetil-4(3 ácido propiónico) pirrol con el reactivo de Ehrlich modificado (2N). Los mismos estudios se han realizado sobre el compuesto ALA-picrato, determinando los respectivos coeficientes de extinción molar.

El ALA ha sido también identificado por diferentes técnicas cromatográficas.

Se ha empleado el método de Mauzerall y Granick (108) para determinar ALA en orina. Dicho método está basado en la separación selectiva del ALA y PBG por medio de resinas de intercambio iónico, estudiándose las condiciones óptimas de adsorción y elución de soluciones puras de ALA, como así también la recuperación del ALA de orinas normales y porfíricas. La recuperación del ALA de soluciones puras, fué del orden del 90 % y de orinas normales y porfíricas del orden del 80 % y 88 % respectivamente. Este mismo método fué empleado también en los estudios relativos a la porfiria experimental.

La determinación e identificación de las distintas porfirinas excretadas por orina fué realizada por diferentes métodos adaptados a las condiciones experimentales.

De los estudios relacionados con la porfiria experimental puede inferirse lo siguiente:

A) Las ratas porfíricas registran una excreción urinaria de ALA y PBG grandemente incrementada con respecto a las uro- y coproporfirinas. Los conejos porfíricos, en cambio, presentan un gran incremento en la excreción urinaria de PBG, pero no de ALA, y cantidades significativas de uroporfirina con respecto a las ratas.

B) El cuadro químico presentado por ambas especies de animales era el mismo, hayan sido tratados estos con A.I.A. o Sedorimid.

Los estudios realizados sobre la fracción uroporfirina fueron hechos, a diferencia de otros investigadores, sobre orina sin ca

lentamiento previo.

Los resultados obtenidos coinciden con los registrados por Abbott y Rudolph (131) pero difieren con la sugerencia de Stich (105) de que habría una diferencia entre la porfiria aguda humana y la porfiria experimental, basada en los diferentes niveles de excreción del ALA por los conejos. Además, recientemente, Granich y Urata (132,133) publican que en la porfiria aguda inducida con 3,5- dicarboxi-1,4-dihidrocolidina, se registra un incremento 40 veces mayor en la actividad ALAS de la células del parénquima hepático de cobayo.

La mayor parte de las uro- y coproporfirinas excretadas en ambos tipos de porfiria son del tipo isomérico III y también se han encontrado cantidades proporcionales de porfirinas hepta, hexa y pentacarboxílicas.

La firiaporfirina III (73) cuyo porfirinógeno ha sido demostrado por Batlle y Grinstein (134) que es un precursor metabólico de la protoporfirina 9, ha sido identificada formando parte de la totalidad de la fracción heptacarboxílica.

Con estos resultados obtenidos en la porfiria experimental, se podría explicar la elevada producción de compuestos pirrólicos producidos en esta anomalía, postulando una hipótesis que considera la biosíntesis exagerada de ALA como responsable de la mayor producción de pirroles. La acumulación de ALA favorecería la formación de PBG, que a su vez induciría la producción de porfirinas. Esta se produciría por un mecanismo de estimulación de la actividad enzimática. La primera enzima estimulada sería la ALAD, luego la PBGdeaminasa, y así sucesivamente. Gibson (135) encuentra una mayor actividad de la ALAD en hígado de conejo tratado con Sedormid; lo mismo fué hallado en nuestro laboratorio por Tancioni, Tigier y Grinstein (136), quienes observan que el incremento de la actividad ALAD en hígado es prácticamente el doble en conejos porfíricos que en ratas porfíricas tratadas con Sedormid. Scott (137) anuncia que en las porfirias agudas humanas, la transformación de ALA en PBG se realizaría también a mayor velocidad, lo que coincidiría con nuestra hipótesis. Las variaciones observadas en uro-

y coproporfirinas pueden deberse a diferentes actividades en las enzimas que regulan su biosíntesis, o a diferentes velocidades de excreción.

Este tipo de mecanismo es similar al que Davidson (138) denomina "feed-back" positivo.

Una rata porfírica fué tratada con glicina, ácido succínico y otros cofactores entre los que se hallaba el ATP. La disminución en la eliminación de porfirinas y precursores que presentó este animal, no puede explicarse con solidez, pero ultimamente Benard y colaboradores (139) encuentran que el AMP produce un descenso en los niveles de excreción de porfirinas y precursores y Lottsfeldt y otros (140) registran que la inosina produce un efecto similar. De estos dos hallazgos podría inferirse que en nuestra experiencia, la disminución en la excreción de los metabolitos citados, sería debida al ATP.

De los estudios relacionados con la biosíntesis de proteínas marcadas en animales porfíricos y normales, no se pueden sacar mayores conclusiones, pues presentan resultados algo contradictorios. Ello podría deberse a la existencia de un pool diferente de glicina en los homogenatos individuales de cada experiencia. Esta glicina podría preexistir o sintetizarse durante la experiencia y llama la atención que este problema no haya sido abordado aún por otros investigadores, ya que en 1955 Rimington (141) sugirió que en la porfiria podría hallarse una biosíntesis disminuida de las proteínas, que explicaría el decremento de la catalasa hepática, ya que la biosíntesis de hemo, como se sabe, se halla enormemente incrementada.

Del presente trabajo se puede concluir, que existe gran similitud entre la porfiria experimental y la porfiria aguda humana, y que el principal error metabólico es debido a una biosíntesis exagerada de precursores.

APENDICE

INVESTIGACIONES RECIENTES EN EL CAMPO DE LA PORFIRIA EXPERIMENTAL

En 1960 continuaron los estudios de Solomon y Figge sobre porfiria experimental en ratones con derivados de la colidina. Estos autores encuentran coproporfirina III y protoporfirina 9 en el hígado de ratones, pero no detectan las porfirinas verdes descritas por Schwartz e Ikeda (99).

En 1961 Richards y Richards y Scott (142,143) dan cuenta de un incremento de ALA y PBG urinario suministrando glicina a animales porfiricos y a pacientes de porfiria aguda. Debe hacerse notar, que este tipo de experiencia fué también realizada en nuestro laboratorio, pero no se encontró ninguna variación en la eliminación urinaria de precursores.

En el mismo año, aparece en Turquía un nuevo tipo de porfiria cutánea atribuida a la ingestión de alimentos contaminados con hexaclorobenceno. Este problema induce a Ockner y Smith (144) a realizar una experiencia con ratas, a las que hacen ingerir la droga ya mencionada. En un lapso que varía entre 3 y 8 semanas, observan aumentos del ALA, PBG, uro- y coproporfirinas urinarias, pero no encuentran disminución de la catalasa hepática.

De Matteis, Prior y Rimington en 1961 y 1962 (145,146) prosiguen con estos estudios. Registran que el incremento de coproporfirina es el primero que se nota en la orina, apareciendo luego uroporfirina, PBG y finalmente ALA. En conejos hay excreción de uroporfirina III, firiaporfirina III y porfirinas hexa y penta carboxílicas, además de PBG, similar a lo que ocurre en la porfiria aguda humana. Estos auto-determinan que tanto el Sedormid como los derivados de la colidina, aq

tían en forma similar. También encuentran disminución de la catalasa hepática.

En una comunicación preliminar, Labbe, Onisawa y Lottsfeld (147) encuentran un aumento en la incorporación de Fe al hemo y en la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado de ratas porfíricas. Además Lottsfeld, Labbe y Aldrich (140) comunican que la inosina disminuye la excreción de porfirinas en ratas porfíricas, considerando la posibilidad de que este compuesto sea empleado en porfiria aguda humana.

Finalmente, Gajdos y Gajdos Török (139) demuestran que la adenosina 5 mono fosfato actúa en forma similar a la inosina en la porfiria experimental en embrión de pollo. La porfiria debida a hexaclorobenceno también es beneficiada por este compuesto.

De estos dos últimos trabajos, se puede vislumbrar la importancia que va adquiriendo el estudio metabólico de las purinas con relación a los problemas de biosíntesis de porfirinas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rimington, C.: Acta Med. Scand. 143, 161, (1952).
- (2) Shemin, D.: Currents in Biochemical Research Inters.N.Y.(1958).
- (3) Rimington, C.: British Med. J. 2, 189, (1956).
- (4) Rimington, C.: Ann. Rev. Biochem. 26, 561, (1957).
- (5) Rimington, C.: Rev. of pure and applied Chemistry 8, 129, (1958).
- (6) Vannotti, A.: Porphyrin, their Biological and Chemical Importance (1954).
- (7) Shemin, D. and Rittenberg, D.: J.Biol.Chem. 159, 567, (1945).
- (8) Shemin, D. and Rittenberg, D.: J.Biol.Chem. 166, 621, (1946).
- (9) Shemin, D. and Rittenberg, D.: J.Biol. Chem. 166, 627, (1946).
- (10) Shemin, D., London, I.M. and Rittenberg, D.: J.Biol.Chem. 183, 757, (1950).
- (11) London, I.M., Shemin, D. and Rittenberg, D.: J.Biol.Chem. 183, 749, (1950).
- (12) Altman, K.I., Casarett, G.N., Masters, R.E., Noonan, T.R. and Salomon, K.: J.Biol.Chem. 176, 319, (1948).
- (13) Altman, K.I., Salomon, K. and Noonan, T.R.: J.Biol.Chem. 177, 489, (1949).
- (14) Radin, N.S., Rittenberg, D. and Shemin, D.: J.Biol.Chem. 184, 745, (1950).
- (15) Grinstein, M., Kamen, M.D. and Moore, C.V.: J.Biol.Chem. 174, 767, (1948).
- (16) Grinstein, M., Kamen, M.D. and Moore, C.V.: J.Biol.Chem. 179, 359, (1949).
- (17) Muir, H.M. and Neuberger, A.: Biochem.J. 45, XXXIV, (1949).
- (18) Muir, H.M. and Neuberger, A.: Biochem.J. 47, 97, (1950).
- (19) Wittemberg, S. and Shemin, D.: Federation Proc. 9, 247, (1950).
- (20) Wittemberg, S. and Shemin, D.: J.Biol.Chem. 185, 103, (1950).
- (21) Boch, K. and Rittenberg, D.: J.Biol.Chem. 159, 45, (1945).
- (22) Ponticorvo, L., Rittenberg, D. and Bloch, K.: J.Biol.Chem. 179, 839, (1949).
- (23) Radin, N.S., Rittenberg, D. and Shemin, D.: J.Biol.Chem. 184, 755, (1950).
- (24) Shemin, D. and Wittemberg, S.: J.Biol.Chem. 192, 315, (1951).
- (25) Wittemberg, S. and Shemin, D.: J.Biol.Chem. 185, 83, (1950).
- (26) Rubinstein, D. and Denstedt, D.F.: J.Biol.Chem. 204, 623, (1953).
- (27) Wriston, J.C., Lack, L. and Shemin, D.: Federation Proc. 12, 294, (1953).
- (28) Shemin, D. and Kumin, S.: J.Biol.Chem. 198, 827, (1952).

- (29) Neuberger, A. and Scott, J.J.: *Nature*, 172, 1093, (1953).
- (30) Shemin, D. and Russell, C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873, (1953).
- (31) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E.: *Nature* 172, 1185, (1953).
- (32) Shemin, D., Abramsky, T. and Russell, C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1204 (1954).
- (33) Granick, S.: *Science* 120, 1105, (1954).
- (34) Schmid, R. and Shemin, D.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 506, (1955).
- (35) Berlin, N.I., Neuberger, A. and Scott, J.J.: *Biochem. J.* 64, 80, (1956).
- (36) Berlin, N.I., Neuberger, A. and Scott, J.J.: *Biochem. J.* 64, 90, (1956).
- (37) Neuberger, A., Scott, J.J. and Shuster, L.: *Biochem. J.* 64, 137, (1956).
- (38) Laver, W.G. and Neuberger, A.: *Biochem. J.* 67, 22p, (1958).
- (39) Gibson, K.D., Laver, W.G. and Neuberger, A.: *Biochem. J.* 68, 17p, (1958).
- (40) Gibson, K.D.: *Biochim. Biophys. Acta* 28, 451, (1958).
- (41) Kikuchi, G., Shemin, D. and Bachman, B.: *Biochim. Biophys. Acta* 28, 219, (1958).
- (42) Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. and Shemin, D.: *J. Biol. Chem.* 233, 1214, (1958).
- (43) Sano, S.: *Acta Haematologica Japonica* 21, 337, (1958) - Supplement May.
- (44) Laver, W.G., Neuberger, A. and Udenfriend, S.: *Biochem. J.* 70, 4, (1958).
- (45) Gibson, K.D., Laver, W.G. and Neuberger, A.: *Biochem. J.* 70, 71, (1958).
- (46) Kikuchi, G., Kumar, A. and Shemin, D.: *Federation Proc.* 18, 259, (1959).
- (47) Lynen, F.: *Symposium on Enzyme Reaction Mechanisms*, Oak Ridge, Tenn. *J. Cell Comp. Physiol.* 54, Supplement 1, 33, (1959).
- (48) Neuberger, A.: *Biochem. J.* 78, 1, (1961).
- (49) Rothberg, S. and Steinberg, D.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3274, (1957).
- (50) Persault, A.M., Pullman, B. and Valdemore, C.: *Biochim. Biophys. Acta* 46, 555, (1961).
- (51) Gibson, K.D., Matthews, M., Neuberger, A. and Tait, G.H.: *Nature* 192, 204, (1961).
- (52) Kowalski, F., Danciewicz, A.M. and Szot, Z.: *Bull. Acad. Polon. Sci. II* 5, 223, (1957).
- (53) Bagdasarian: *Nature* 181, 1399, (1958).
- (54) Lascelles, J.: *J. Gen. Microbiol.* 23, 487, 499, (1960).
- (55) Gibson, K.D., Neuberger, A. and Scott, J.J.: *Biochem. J.* 61, 618, (1955).
- (56) Schmid, R. and Shemin, D.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 506, (1955).
- (57) Granick, S. and Mauzerall, D.: *J. Biol. Chem.* 232, 1119, (1958).
- (58) Gibson, K.D.: *CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism*, 27, (1955).
- (59) Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: *Comp. Rend. Soc. Biol.* 149, 2138, (1955).
- (60) Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: *Rev. Franc. études cli. et biol.* 1, 966, (1956).
- (61) Tschudy, D., Collins, A., Caughey, W. and Kleinsphen, G.: *Science* 131, 1320, (1960).
- (62) Iodice, A.A., Richert, D.A. and Schulman, M.P.: *Federation Proc.* 17, 243, (1958).
- (63) Wilson, M.L., Iodice, A.A., Schulman, M. and Richert, D.A.: *Federation Proc.* 18, 352, (1959).

- (64) Margoliash, E.: Annual Review of Biochemistry 30, 549, (1961)
- (65) Tschudy, D. and Collins, A.: Science 126, 168, (1959).
- (66) Lascelles, J.: Biochem. J. 72, 508, (1959).
- (67) Kowalski, E., Daniewicz, A.M. and Szot, Z.: Proc. Intern. Congr. Intern. Soc. Hematol. 7th Roma 2, 308, (1958).
- (68) Kowalski, E.; Daniewicz, A.M. and Szot, Z.: Polskie Arch. Med. Wewn. setr. znej 29, 475, (1959).
- (69) Shemin, D., Russell, C. and Abransky, T.: J. Biol. Chem. 215, 613, (1955).
- (70) Gunther, H. J. Ergebn. allg. Path. u. Path. Anat. 20, 607, (1922).
- (71) Waldenström, J.: Acta Med. Scand. Suppl. 82, 254, (1937).
- (72) Watson, C. J.: Advances in internal Medicine, Vol. VI. Year Book Publishers, Chicago, pag. 235.
- (73) Grinstein, M.: La prensa médica argentina 42, 2683, (1955).
- (74) Watson, C. J. and Schwartz, S.: Proce. Soc. exptl. Biol. N. Y. 47, 393, (1941).
- (75) Moya, V.: Tratado de Análisis Biológicos. Ed. Mundi Bs. As. 1, 197, (1958).
- (76) Grinstein, M.: Rev. Assoc. Med. Arg. 72, 518, (1959).
- (77) Schmid, R., Hanson, B. and Schwartz, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 459, (1952).
- (78) Schwartz, S., Keprios, M. and Schmid, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 465, (1952).
- (79) Schmid, R., and Schwartz, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81, 685, (1952).
- (80) Duesberg, R.: Muenchner Med. Wechschr. 79, 1821, (1932).
- (81) Ellinger, A. and Rieser, O.: Z. F. Physiol. Chemio 28, 1, (1916).
- (82) Fisher, H. and Duesberg, R.: Arch. exp. Pathol. und Pharmakol. 166, 95, (1932).
- (83) Waldenström, J. and Wendt, S.: Z. Physiol. Chem. 259, , (1939).
- (84) Case, J. D., Alrich, R. A. and Nevé, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 566, (1953).
- (85) Benard, H., Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: Comp. Rend. Soc. Biol. 147, 1591, (1953).
- (86) Benard, H., Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: Comp. Rend. Soc. Biol. 148, 838, (1954).
- (87) Benard, H., Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: Comp. Rend. Soc. Biol. 148, 869, (1954).
- (88) Benard, H., Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: Comp. Rend. Soc. Biol. 148, 1754 (1954).
- (89) Goldberg, A.: Biochem. J. 57, 55, (1954).
- (90) Goldberg, A. and Rimington, C.: The Lancet 2, 172, (1954).
- (91) Goldberg, A.: Biochem. J. 59, 37, (1955).
- (92) Goldberg, A., and Rimington, C.: Proc. Roy. Soc. B 143, 257, (1955)
- (93) Gajdos Török, M., Benard, H. and Gajdos, A.: Compt. Rend. Soc. Biol. 149, 63, (1955).
- (94) Benard, H., Gajdos, A. and Gajdos Török, M.: Compt. Rend. Soc. Biol. 149, 312, (1955).
- (95) Stich, W. and Decker, P.: CIBA Found. Symp. on Porphyrin Biosynthesis 229, (1955).
- (96) Stich, W.: Freiburger Symposium Med. Univ. Klinik. 4, 266, (1956).

- (97) Schmid, R., Figen, J.F. and Schwartz, S.: *J. Biol. Chem.* 217, 1, (1955).
- (98) Schwartz, S.: *Federation Proc.* 14, 3, (1955).
- (99) Schwartz, S. and Ikeda, K.: *CIBA Found. Symp. on Porphyrin Biosyn.* 209, (1955).
- (100) Taiman, E.L., Case, I.D., Nevé, R.A., Labbé, R.F. and Aldrich, R.A.: *J. Biol. Chem.* 212, 663, (1955).
- (101) Labbe, R.F., Taiman, E.L. and Aldrich, R.A.: *Biochim. Biophys. Acta* 15, 590, (1954).
- (102) Schwartz, S. and Watson, C.J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 216 (1957).
- (103) Merchanto, A., Wajchemberg, B.L. and Schwartz, S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 221, (1957).
- (104) Taiman, E.L., Labbe, R.F., Aldrich, R.A. and Schropp, M.C.: *Archives of Biochem and Biophys.* 66, 289, (1957).
- (105) Stich, W.: *Klin. Wochschr.* 36, 586, (1958).
- (106) Solomon, H.M. and Figge, F.H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 583, (1959).
- (107) Taiman, E.L., Labbe, R.F., Aldrich, R.A., Sears, D. and Shafer, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 90, 446, (1959).
- (108) Mauzerall, D. and Granick, S.: *J. Biol. Chem.* 219, 435, (1956).
- (109) Prunty, F.T.G.: *Biochem. J.* 39, 446, (1945).
- (110) Dalgliesh, C.E.: *Biochem. J.* 52, 3, (1952).
- (111) Westall, R.G.: *Nature* 170, 614, (1952).
- (112) Treibs, A. and Herrmann, E.: *Z. Physiol. Chem.* 299, 171, (1955).
- (113) Shuster, L.: *Biochem. J.* 64, 101, (1956).
- (114) Granick, S. and Vanden Schrieck, H.G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88, 270, (1955).
- (115) Elliott, W.H.: *Biochem. J.* 74, 90, (1960).
- (116) Schwartz, S., Zieve, L. and Watson, C.J.: *J. Lab. and Clin. Med.* 27, 843, (1955).
- (117) Dresel, E.E.B. and Tooth, B.E.: *Nature*, 174, 271, (1954).
- (118) Dresel, E.E.B., Pimington, C. and Tooth, B.E.: *Scandinav. J. Lab. and Clin. Inv.* 1, 12, (1949).
- (119) Salum, Y., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M.: *An. Asoc. Quím. Arg.* 49, 269, (1961).
- (120) Falk, J.E., and Benson, A.: *Biochem. J.* 55, 101, (1953).
- (121) Batlle, A.M. del C. y Grinstein M.: Trabajo Presentado en el 8º Congreso Latinoamericano de Química.
- (122) Nicholas, R.E.H. and Pimington, C.: *Biochem. J.* 46, 147, (1950).
- (123) Ericksen, L.: *Scandinav. J. Lab. and Clin. Inv.*, 10, 314, (1958).
- (124) Haeger-Arcensen, B.: *Scandinav. J. Lab. and Clin. Inv.* 12, Suppl. 47, (1960).
- (125) Waldenström, J. and Vahlquist, B.: *Acta Med. Scand.* 117, 1, (1944).
- (126) Winnick, T., Friedberg, F. and Greenberg, D.: *J. Biol. Chem.* 173, 189, (1948).
- (127) Mc Lean, J.R., Cohn, G.L., Brandt, I.K. and Simpson, M.V.: *J. Biol. Chem.* 233, 657, (1958).
- (128) Keller, E. and Zemechnick, P.: *J. Biol. Chem.* 221, 45, (1961).
- (129) Mitch, W., Hill, R. and Chikoff, I.: *J. Biol. Chem.* 234, 1043, (1959).
- (130) Bannerman, R.M., Grinstein, M. and Moore, C.V.: *British J. Haematology* 5, 102, (1959).

- (131) Abbot, J.D. and Rudolph, S.G.: Federation Proc. 20, 276, (1961).
- (132) Urata, G. and Granick, S.: J. Biol. Chem. 238, 811, (1963).
- (133) Granick, S. and Urata, G.: J. Biol. Chem. 238, 821, (1963)
- (134) Batlle, A.M. del C. and Grinstein, M.: Biochim. Biophys. Acta 62, 197, (1962).
- (135) Gibson, K.D.: CIBA Found. Sympos. Porphyrin Biosynthesis 27, (1955).
- (136) Tancioni, A., Tigier, H.A. and Grinstein, M.: (En prensa).
- (137) Scott, J.J.: CIBA Found. Symp. on Porphyrin Biosynthesis 43, (1955).
- (138) Davidson, J.N.: The Biochemistry of the Nucleic Acids. London, pág. 188 (1960).
- (139) Benard, H., Gajdos, A., Gajdos Török, M.: The Lancet, 72, 7195, (1961).
- (140) Lottsfeldt, F.I., Labbe, R.F. and Aldrich, R.A.: J.A.M.A. 178, 928, (1961).
- (141) Rimington, C.: CIBA Found. Symp. on Porphyrin Biosynthesis 294, (1955).
- (142) Richards, F.F.: Brit. J. Haematol. 6, 34, (1960).
- (143) Richards, F.F., and Scott, J.J.: J. Clin. Sci. 20, 387, (1961).
- (144) Ockner, R.K. and Schmid, R.: Nature 189, 499, (1961).
- (145) De Matteis, F., Prior, B.E. and Rimington, C.: Nature 191, 363, (1961).
- (146) De Matteis, F. and Prior, B.E.: Biochem. J. 83, 1, (1962).
- (147) Labbe, R.F., Onisawa, Y. and Lottsfeldt, F.I.: Arch. Biochem and Biophys. 92, 373, (1961).

INDICE

Abreviaturas empleadas	5
Introducción	6
Antecedentes y biosíntesis del ácido delta amino levúlico	6
Cofactores	10
Sitio celular de síntesis	11
Amino levúlico sintetasa; mecanismo	11
Papel del amino malonato	13
Ciclo succinato glicina	13
Importancia de la biotina	14
Ácido delta amino levúlico dehidrasa	16
Ácido delta amino levúlico transaminasa	17
Antecedentes sobre porfiria	17
Antecedentes sobre porfiria experimental	19
Introducción al trabajo experimental	27
SEGUNDA PARTE	
Criterios de valoración del ALA: método de las resinas de intercambio iónico.	29
Esbozo del método	29
Diferentes tipos de reactivos de Ehrlich	30
Mecanismo de la reacción de Ehrlich y factores que en ella influyen	30
Determinación colorimétrica de ALA	32
Curva de absorción	32
Determinación de los coeficientes de extinción molar	33
Método de valoración del ALA en orina mediante el uso de resinas de intercambio	35
Aplicación del método	35
Características de las resinas	36
Preparación de la resina Dowex 50	36
Estudio experimental del comportamiento del ALA frente a la resina Dowex 50	37
Curva de saturación ("Break through")	37
Curva de elución	37
Ensayos de recuperación	38
Método del picrato	39

CONTENIDO

Modificaciones al método	40
Coeficiente de extinción molar	42
Criterios de identificación del ALA	43
Cromatografía sobre papel	43
Porfiria experimental	45
Parte experimental	45
Animales de laboratorio	45
Suministro de droga	46
Método de dosaje de porfirinas en porfiria experimental	46
Identificación de porfirinas excretadas por orina	48
Cromatografía sobre columna de ésteres de porfirinas	49
Cromatografía sobre papel de ésteres de porfirinas	50
Cromatografía sobre papel de porfirinas libres	51
Descarboxilación de uroporfirinas	51
Aislamiento de porfirinas de órganos	52
Resultados obtenidos	52
Estudio comparativo sobre incorporación de glicina C ¹⁴ en proteínas de hígados normales y porfíricos	61
Trabajo experimental	61
Animales de experimentación	61
Preparación de los homogenatos	62
Medio de incubación salino	62
Sacarosa como medio de incubación	62
Medio de incubación salino (Medio X)	63
Incubado	64
Precipitación y lavado	64
Secado	65
Preparación de las muestras para el recuento	65
Experiencias de tiempo cero	65
Resultados	66
Conclusiones y discusión	70
Apéndice: Investigaciones recientes en el campo de la porfiria experimental	73
Bibliografía	75
Índice	80