

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de protoporfirina 9 en glándula de Harder : a) Estudios de las etapas enzimáticas b) Purificación y propiedades de la delta Ala dehidratasa

Tomio, Josefina María

1970

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:

Tomio, Josefina María. (1970). Biosíntesis de protoporfirina 9 en glándula de Harder : a) Estudios de las etapas enzimáticas b) Purificación y propiedades de la delta Ala dehidratasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1377_Tomio.pdf

Cita tipo Chicago:

Tomio, Josefina María. "Biosíntesis de protoporfirina 9 en glándula de Harder : a) Estudios de las etapas enzimáticas b) Purificación y propiedades de la delta Ala dehidratasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1970.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1377_Tomio.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**BIOSINTESIS DE PROTOPORFIRINA 9
EN GLANDULA DE HARDER**

- A. ESTUDIOS DE LAS ETAPAS ENZIMATICAS**
B. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA *S*ALA DEHIDRATASA

Josefina María Tomio

TESIS PARA OPTAR AL TITULO
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
QUIMICA BIOLOGICA

1377

BUENOS AIRES

1970

Préface de T. S. HOLES GRINSTEIN

A M I G P A D R E S

A D I F A

A G R A D E C I M I E N T O S

Desee expresar mi reconocimiento al Dr. H. Grinstein por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación con este trabajo, por su constante estímulo y el permanente interés en la dirección del mismo.

A mis compañeros del viejo Laboratorio de Química Biológica con quienes compartí muchas horas de tarea conjunta.

Quiero agradecer profundamente además, a la Lda. Victoria Tuzman quien tan cordial y eficientemente colaboró en la segunda parte del trabajo.

A la Dra. Ofelia C. de Barreiro, inestimable apoyo, consejera y crítica de toda mi carrera docente e investigativa.

Al Dr. E. Cabit quien me inició en el campo de la enzimología.

A los Dres. A.M.C. Batlle, A. Nitta y J.M. Castagnino por la ayuda brindada.

A la Srta Hilda Gasparoli por el cuidado y manejo de los animales.

Finalmente, a todos aquellos, que con su aliento y amistad han contribuido a la presentación del trabajo.

PUBLICACIONES

Los resultados de este trabajo han sido presentados en diversas reuniones nacionales e internacionales y han sido tambien objeto de publicaciones de divulgación científica.

XII Sesiones Químicas Argentinas. Córdoba - Argentina - 1967

"Aislamiento, purificación y propiedades de la δ -ALA dehidratasa en la glándula de Harder"

En colaboración con V. Tuzman y H. Grinstein.

Publicación: Abst. p 1-13

III Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas. Buenos Aires - Argentina - 1967

"Biosíntesis de protoporfirina 9 en la glándula de Harder"

En colaboración con H. Grinstein.

VII Congreso Internacional de Bioquímica. Tokio - Japón - 1967

"Biosynthesis of protoporphyrin 9 in Harderian glands"

En colaboración con H. Grinstein.

Publicación: Abst. Vol. V, J-399.

"Porphyrin biosynthesis" V.- Biosynthesis of protoporfirina 9 in Harderian glands".

J. M. Tomio and H. Grinstein.

European J. Biochem. 6, 80 (1968)

" δ - Aminolevulinate dehydratase from rat Harderian gland"

Purification and properties.

J. M. Tomio, V. Tuzman and H. Grinstein.

European J. Biochem. 6, 84 (1968)

A B R E V I A T U R A S

Gli:	Glicocola
B ₆ -O-P:	Fosfato de piridexal
CoASH:	Coenzima A
ATP:	5' Adenosina trifosfato
δ-ALA:	Acido 5 amino levulínico
PBG:	Porfobilinógeno
U - Urc - 8-COOH:	Uroporfirina
F - Firia - 7-COOH:	Firiaporfirina
H - Hexa - 6-COOH:	Porfirina hexacarboxílica
P - Penta - 5-COOH:	Porfirina pentacarboxílica
C - Copro - 4-COOH:	Coproporfirina
3-C - 3-COOH:	Porfirina tricarboxílica
Pr - Proto 9:	Protoporfirina 9
Uro'geno I o III:	Uroporfirinógeno I o III
7-COOH P.geno:	Firiaporfirinógeno
6-COOH P.geno:	Porfirinógeno hexacarboxílico
5-COOH P.geno:	Porfirinógeno pentacarboxílico
Coprogeno:	Coproporfirinógeno
Protogeno:	Protoporfirinógeno
δALA-S:	δALA sintetasa
δALA-D:	δALA desidratasa
EDTA:	Acido etilen diamino tetra acético
AIA:	Alil, isopropil acetamida.

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

G L A N D U L A D E H A R D E R

GLÁNDULA DE HARDER

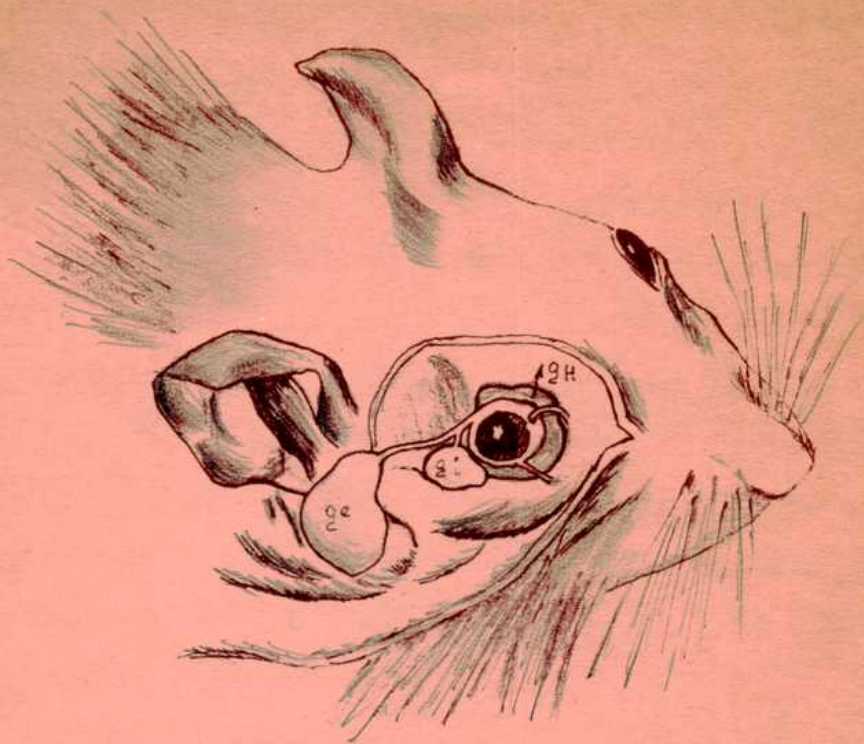
La glándula de Harder es una glándula palpebral terciaria profunda cuyo descubrimiento se le atribuye generalmente a Harder hacia 1694 (1), quien la describió en el ciervo (2). De origen ectodermal y naturaleza apocrina según Rolleston, se la encuentra en la mayoría de los vertebrados (3) y es característica de los mamíferos excepto algunos carnívoros y primates incluyendo al hombre. Cuando éstos la poseen, constituye sólo un vestigio como en el caso de un bosquimano informado por Giacomini (4). Está asociada íntimamente en su desarrollo con la membrana nictitante puesto que vuelca su secreción en el saco conjuntival, por un orificio bajo el vestigio del tercer párpado.

La glándula de Harder de los roedores ha sido descripta anatómicamente por Loewenthal (5) y Venable y Grafflin realizaron un estudio microscópico muy profundo de la misma, en ratas albinas (6).

La disección de la órbita de la rata revela la presencia de esta glándula (Fig. 1). Cuando se quita la fascia palpebral superior se hace visible una pequeña fracción de la misma entre el globo ocular y el borde orbital óseo, la que se continúa, más profundamente, por casi toda la circunferencia bulbar detrás del globo ocular. La glándula presenta dos lóbulos (de allí que se diga que tiene forma de herradura), siendo el brazo posteroinferior los veces mayor que el antero-superior. En animales adultos su extensión puede alcanzar de 12 a 15 mm de longitud. El peso de ambas glándulas para una rata macho de 200 g es aproximadamente de 300 mg, es decir, cerca del 0,2% de su peso corporal. Por otra parte, es interesante destacar el gran tamaño de esta glándula en los roedores, cuando se compara su peso con el de otras glándulas de su cuerpo.

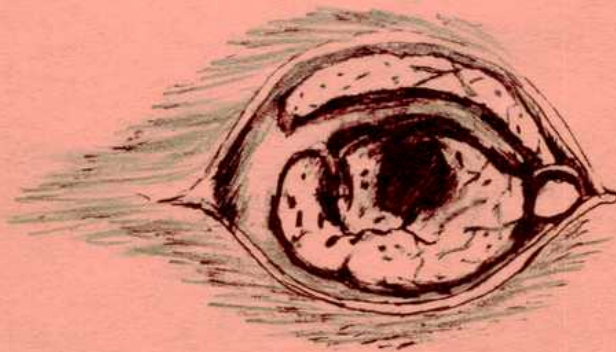
Al observársela detenidamente presenta un color marrón-rojizo con una cantidad variable de puntos o agrupaciones más oscuras sobre la superficie. Está recubierta con una fina cápsula de tejido conectivo que la une débilmente a la fascia orbital.

Cuando se la observa bajo microscopio de luz, presenta una estructura túbulo-acinosa compleja. Los estudios de secciones congeladas de material fijado



ILUSTRACION DE LAS GLANDULAS ORBITALES

ge: EXTRAORBITAL gi: INTRAORBITAL gh: HARDERIANA



GLANDULA DE HARDER

con formol revelan una cantidad variable de un pigmento amorfo en la lúmina glandular, en forma de acúmulos de diversos tamaños. De allí, que el color varíe de un amarillo-marrón a bajas concentraciones, hasta un rojizo-marrón a altas concentraciones, correspondiendo el grado máximo de color a los mayores agregados.

Asociadas muy estrechamente a estas agrupaciones pigmentarias se observan una cantidad de vesículas lipídicas, claras, muy compactas, hallándose el pigmento localizado en los intersticios (7).

El mecanismo de la excreción glandular es bastante simple. La excreción lipídica, que es la principal, se hace por la abertura de las vacuolas vecinas al polo apical de las células y el pigmento - generalmente en estado de disolución y otras veces granular - es arrastrado por los lípidos. Aquí, como en otras glándulas, la excreción del pigmento no es primaria, sino que está subordinada a otra, en este caso la lipídica (8).

Loewenthal describe por vez primera esas acumulaciones pigmentarias en los ratones, pero sin precisar su naturaleza (5).

La composición del pigmento no se conoce hasta 1924, fecha en que se publica uno de los trabajos pilares sobre esta glándula, presentado por Derrien y Turchini (8).

Estos investigadores, al disectar las cabezas de roedores del género "Mus" bajo luz ultravioleta, observan una intensa fluorescencia roja perteneciente a la glándula de Harder e informan que la fluorescencia se debe a la presencia de un compuesto de estructura porfirínica. Por sus características de solubilidad y las posiciones de las bandas de espectro de absorción, encuentran que esta sustancia se asemeja a las porfirinas naturales descritas por Kämmerer y Fischer, denominadas "Kämmerer-porphyrins" (9) y a la "ooporfirina" de las cáscaras de huevos de ciertos pájaros (10). Derrien y Turchini examinando las glándulas de diferentes especies de animales, entre ellos: ranas, tortugas, cobayos, conejos, urracas, pollos, etc., sólo encuentran fluorescencia roja en la de los roedores (8).

Fischer y sus colaboradores, posteriormente, establecen la identidad de

todas estas porfirinas, señalando que sus estructuras corresponden a la de la protoporfirina 9 (11).

El origen del pigmento porfirínico en esta glándula da lugar a una gran controversia al respecto.

Derrien y Turchini suponen que la porfirina no se forma en la glándula a partir de glóbulos rojos, por cuanto no constatan indicio de desintegración de hematíes (8). Observan además, que la pigmentación desaparece en los ápices de las células glandulares cuando las ratas se someten a la acción de lacrimógenos y que reaparece si se bloquea la secreción por una inyección de atropina. Sin embargo, no lo han encontrado evidencias para determinar si el pigmento se forma localmente o proviene directamente de la circulación.

Los resultados de los estudios biológicos de Grafflin son también negativos en este aspecto, concluyendo que la porfirina se formaría en otra parte del cuerpo y sería simplemente excretada por la glándula (7).

En 1938, cuando J. Thomas intenta descubrir el mecanismo del origen de la evolución del núcleo tetrapirrólico en el organismo -dado el rol primordial que los compuestos hierro-porfirínicos juegan en la actividad química de la célula- ya conocía la naturaleza protoporfirínica del pigmento presente en la glándula de Harder de ratas (12). Sin embargo, ignoraba si el pigmento se formaba localmente o si era aportado por la circulación, depositándose en la glándula.

El hecho de ser protoporfirina libre y no combinada como parte de hemoproteínas hace relativamente más fácil su aislación. Así, sus observaciones en ratas recién nacidas demuestran que esta glándula no contiene pigmento fluorescente, el cual comienza a aparecer después de 2 ó 3 días, acumulándose progresivamente y presentando una viva fluorescencia roja a la luz de Wood. Si bien Thomas no puede obtener evidencias definidas sobre el origen del núcleo porfirínico sus experiencias sobre hipertemia, anemia hemolítica y porfirinurias le hacen suponer que el pigmento no es llevado a la glándula por la circulación, sino que se forma localmente, probablemente por un mecanismo diferente a la formación de uro y coproporfirina (12).

Resulta interesante destacar la interdependencia hallada entre el fenó-

meno de cromodacriirrea y la glándula de Harder, después del establecimiento de la naturaleza porfirínica de su pigmento (13-14).

La secreción de lágrimas rojas (cromodacriirrea) se produce cuando las ratas se someten a diversas formas de "stress" tales como dietas carentes de factores vitamínicos B, deshidratación parcial e inducción por acetil-colina y otros agentes muscarínicos (15-18). Nosotros la observamos en ratas al inducir porfirias con diferentes drogas porfirinogénicas.

Posteriormente, varios grupos de trabajo describen la desaparición de este pigmento en las glándulas de Harder de diversos roedores, en estados carenciales de vitamina A y B₂ (17-18).

Mc Elroy y colab. trabajando con ratas deficientes en ácido pantoténico, determinan que el material rojo acumulado alrededor de sus fosas nasales no es sangre, sino porfirinas cuya mayor proporción corresponde a coproporfirina, al parecer proveniente de la glándula de Harder (19).

Sin embargo, este material es identificado como protoporfirina por sus características espectrales por Macrae y colab. (20). Barnard (21) examinando la secreción lagrimal de ratas intoxicadas con acetil colina y otras drogas sólo constata la presencia de protoporfirina. Towbin, Fanta y Hodge ratifican estos resultados y mediante sus experiencias de ablación sugieren que el pigmento de las lágrimas rojas inducidas por colina proviene de la glándula de Harder (22).

Strong, en la década del 40, efectúa estudios comparativos de la glándula de Harder en ratones de diferente edad y sexo para determinar la concentración de pigmentos porfirínicos en función de estos parámetros. De sus observaciones deduce que hay una mayor concentración de porfirinas en ratones hembras, puesto que sus glándulas observadas bajo luz normal poseen un mayor grado de pigmentación y bajo luz U.V. una mayor intensidad de la fluorescencia roja (23).

Referente a la edad, el contenido máximo de pigmentación se alcanza entre los 50 y los 75 días de vida, período de alcance de maduración sexual de los ratones y luego declina lentamente, un hecho ya observado e informado por Thomas en ratas (12,24-25) y confirmado posteriormente por Rohonyi y Lelenyi (26).

Strong y colab. publican, además, datos que señalan una correspondencia entre la cantidad de protoporfirina en la glándula de Harder y la susceptibilidad intrínseca al cáncer de las glándulas mamarias, en ratones (24,25). Observan, que cepas con una alta incidencia de tumores mamarios espontáneos tienen una muy alta concentración de protoporfirina y aquéllas resistentes no exhiben fluorescencia o la misma es muy leve, en edad madura. Además, sólo las hembras de cepas susceptibles al cáncer, transmiten la capacidad de desarrollar carcinomas de mama espontáneamente.

Sus observaciones les permiten concluir que el nivel de protoporfirina en la glándula, sería probablemente un reflejo del metabolismo de ese pigmento en todo el organismo, ejerciendo esa sustancia, quizás, una acción sensibilizante (24).

Bittner y Watson también efectúan estudios sobre el posible rol de las porfirinas en la etiología del cáncer especialmente el mamario, en los ratones. Sin embargo, no encuentran una correlación directa entre esos factores y sugieren que la aparente relación descrita por otros investigadores se debería a una influencia hormonal (27).

Collins, estudiando el efecto del medio ambiente sobre ratones, observa un aumento considerable en el contenido pigmentario de la glándula de Harder a mayores temperaturas (18). Thomas supone también, que la hipertemia puede producir un incremento general en la formación de porfirinas en el organismo y una acumulación en la glándula de Harder por acción directa sobre su metabolismo(12).

Diversos investigadores realizaron estudios histoquímicos detallados de la glándula de Harder.

Cohn demuestra la presencia de fosfolípidos, triglicéridos no saturados y probablemente colesterol, la que se confirma por estudios cromatográficos (28-29).

Si se compara la cantidad de lípidos con la de otros órganos, se ve que el predominio de este material es un rasgo típicamente característico de esta glándula, por lo que se aduce que parte de los lípidos elaborados por las glándulas podrían ser transformados a protoporfirina, o que podrían estar unidos al

pigmento como un complejo lipo-proteico (28).

Si tenemos en cuenta la insolubilidad e inestabilidad de la protoporfirina dada por sus grupos vinilos, tanto en solución como en forma sólida, podríamos suponer que los lípidos unidos a la protoporfirina actuarían como agentes protectores o estabilizantes de la misma.

En este tejido no se detecta la presencia de glucógeno, mucopolisacáridos ácidos ni hierro no combinado (28).

La glándula presenta actividad fosfomonoestearásica, lipásica, adenosin-trifosfatásica y de fosfatasa alcalina (30). No posee nati-oxidasa, es pobre en peroxidasa y rica en deshidrogenasas. Abou-Harb sugiere que la riqueza en deshidrogenasas de las glándulas de Harder y el aumento paralelo al desarrollo post-natal de las ratas tanto de esta actividad enzimática como del contenido porfirínico da un argumento en favor de la capacidad para biosintetizar porfirinas (31).

Arvy realiza una cuidadosa investigación de la actividad acetilcolinesterásica, en la glándula de Harder de ratas albinas. Dicha actividad es importante en el epitelio glandular, revelando la presencia de una compleja red de fibras colinérgicas perivasculares y perialveolares, que permite comprender el mecanismo de la cromodacriirrea provocada por la inyección de acetil colina, pilocarpina, eserina o mutcarfínicos. Por lo tanto, la excreción masiva de las lágrimas rojas (porfirinas) se produce por excitación de sus redes colinérgicas bajo la acción de compuestos parasimpaticomiméticos (30).

Los trabajos subsiguientes comprenden el estudio de la síntesis de porfirinas en la glándula de Harder.

En 1955, Davidheiser y Figge encuentran que los homogenatos de glándulas de Harder de ratones producen porfirinas a partir del ácido δ -aminolevúlico, concluyendo que este tejido tiene una estructura secretora de porfirinas (32). Demuestran además que la biosíntesis de porfirinas en ratones está correlacionada con la edad y la cepa en estudio, datos que convalidan los resultados de fluorescencia obtenidos años antes por Thomas y Figge (12,25,33). La actividad biosintetizante de porfirinas es prácticamente nula en la glándula de ratones

jóvenes, aparece y se incrementa a medida que los animales se hacen sexualmente maduros, para permanecer luego constante.

Cuando el animal evoluciona sexualmente, la hipófisis incrementa la producción de hormonas relacionadas con este proceso (gonadotróficas, etc.), de allí que se trató de vincular el metabolismo porfirínico con las hormonas hipofisarias. Sin embargo, los estudios sobre la influencia de la hipofisectomía sobre la actividad bioporfirinogénica de esta glándula no logran mostrar diferencias significativas (34).

Se ha informado además que las glándulas de Harder de otros animales que no presentan fluorescencia roja bajo la luz U.V. poseen actividad biosintética de porfirinas, sin precisar exactamente su composición (35).

La función de esta glándula y la razón del alto contenido de porfirinas y su rol, no están aún definitivamente aclarados. Se acepta generalmente que la secreción de la glándula de Harder tiene la función fisiológica de lubricante del tercer párpado (2). Esta acción justificaría la observación de que las glándulas están especialmente desarrolladas en animales de agua (3). Además, y en virtud de la naturaleza lipídica de su secreción, esta glándula puede ayudar a las glándulas tarsales de los párpados a prevenir el derramamiento de lágrimas (28).

Thomas supone que uno de los roles que puede jugar la acumulación de porfirinas es permitir la compensación rápida de una elevada pérdida del pigmento porfirínico en el organismo (12).

Hais y colab. por su parte, sugieren que la protoporfirina acumulada podría actuar modificando el curso de reacciones fotoquímicas (29).

Todas estas hipótesis no son sino especulaciones que no tienen hasta el presente fundamentos experimentales.

Recientemente, han sido publicados resultados confirmatorios de nuestro trabajo. En ellos se establece la naturaleza tricarboxílica de una de las porfirinas presentes en la glándula de Harder, y la presencia de intermediarios tetrapirrólicos como productos de biosíntesis (36-7).

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

B I O S I N T E S I S D E H E M O

BIOSÍNTESIS DEL HEMO

Los dos pigmentos fundamentales de la materia viviente, la hemoglobina y la clorofila, derivan de un mismo precursor intermedio: la protoporfirina 9. Este es, a su vez, el producto final del camino metabólico de los tetrapirroles funcionales (Fig. 2).

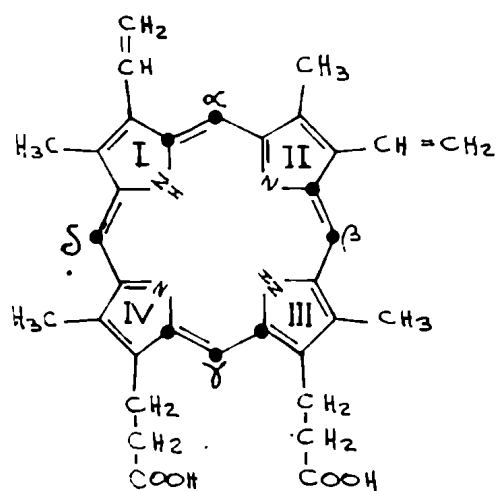
Dichos pigmentos no sólo están relacionados estructuralmente sino que también lo están por su función en el metabolismo energético. El hemo, formando parte de hemoglobinas y citocromos, participa en el proceso de la respiración, mientras que la clorofila, actuando como agente de captura de la energía radiante, lo hace en el proceso fotosintético.

De allí la importancia y el interés que tiene investigar la biosíntesis de estos compuestos tetrapirrólicos en los diferentes tipos de células y tratar de elucidar cada una de las etapas del camino metabólico, así como también el proceso de regulación que los rige.

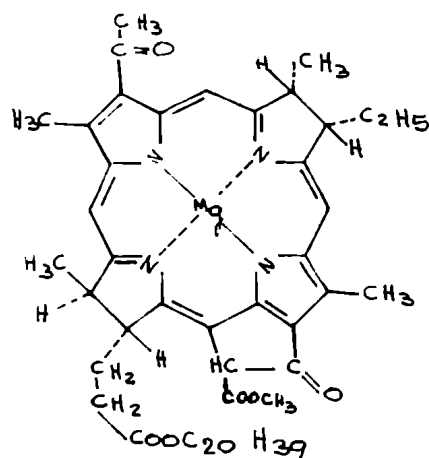
La dilucidación de la estructura química de las porfirinas ha sido brillantemente realizada en las primeras cuatro décadas de este siglo y está compendiada en los trabajos fundamentales de las escuelas de Hans Fischer (11), Willstätter (38) y Koster (39). Posteriormente, la tarea continuada de los laboratorios de Mc Donald, Mauzerall, Falk, Corwin, Rimington, Woodward y muchos otros, impartió un rápido desarrollo a los conocimientos relacionados con la síntesis orgánica y las propiedades físico-químicas de estos compuestos y que puede ser consultada en múltiples puestas al día (40-47).

En cuanto a su biosíntesis, se sabe que todas las células aeróbicas tanto vegetales como animales o bacterianas, tienen la capacidad de formar hemo. Además se ha encontrado que el mismo camino básico opera en todas estas formas de vida.

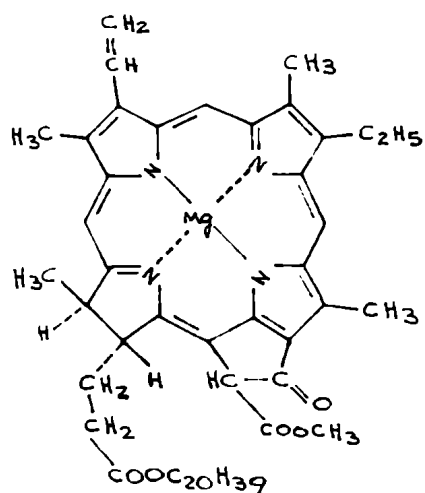
Al rever la biosíntesis de los compuestos tetrapirrólicos podemos comprobar que es válida, también para ellos, la premisa de que moléculas complejas son sintetizadas a partir de sustancias relativamente simples y fácilmente asequibles, así como la existencia de una unidad bioquímica en la materia viviente.



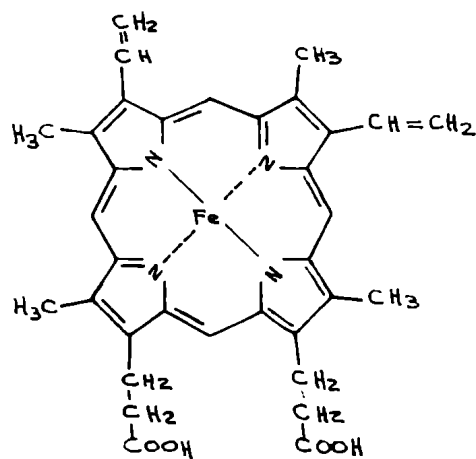
PROTOPORFIRINA 9



BACTERIOCLOROFILA



CLOROFILA a



HEMO

FIG. 2.-DERIVADOS TETRAPIRROLICOS.-

Las investigaciones primarias revelan que la molécula de protoporfirina se sintetiza a partir de 2 compuestos básicos - la glicocola, un aminoácido simple, y el succinato, un ácido intermediario del ciclo de Krebs - mediante una serie de pasos que comprenden condensaciones, descarboxilaciones y oxidaciones de los compuestos intermedios.

Diversos hitos de la investigación científica contribuyen a la elucidación de este camino metabólico, entre ellos, la aplicación de las técnicas isotópicas a estudios biológicos propuesta por Schoenheimer y Rittenberg (48) y la de las técnicas cromatográficas basadas en el hallazgo de Tswet, utilizadas principalmente por Fischer y Hofmann (49) y ampliamente desarrolladas "a posteriori" por una gran cantidad de investigadores (50). Shemin en Estados Unidos (51) y Neuberger en Inglaterra (52) haciendo uso de dichas técnicas establecen los eslabones primarios de este camino metabólico (Fig.3).

Otros aportes importantes son la aislación del porfobilinógeno por Westall (53), la determinación de su estructura por Cookson y Rimington (54) y la demostración de los porfirinógenos como los verdaderos intermediarios tetrapirrólicos, por Neve y colab. (55), previamente postulados por Bogorad (56), Granick (57) y Rimington (58) (Fig. 3).

Las etapas conocidas de este camino metabólico están esquematizadas en la Fig. 4.

La síntesis comienza cuando una molécula de succinato previamente activada y una molécula de glicocola en presencia de fosfato de piridoxal, dan origen a una molécula de ácido 5-aminolevulónico (δ -ALA).

En una segunda etapa, dos moléculas de este ácido se condensan para dar la unidad monopirrólica de los pigmentos porfirínicos conocida como porfobilinógeno (PBG). Cuatro de estos monopirroles se unen para formar un tetrapirrol cíclico incoloro y no fluorescente: el uroporfirinógeno.

Coproporfirinógeno se forma por la descarboxilación sucesiva de los cuatro grupos carboxilos de las cadenas acéticas laterales del octaporfirinógeno, pasando por los intermediarios pirrólicos que poseen 7-, 6- y 5- grupos carboxilos. Por una posterior descarboxilación y oxidación de dos de las cadenas propiónicas

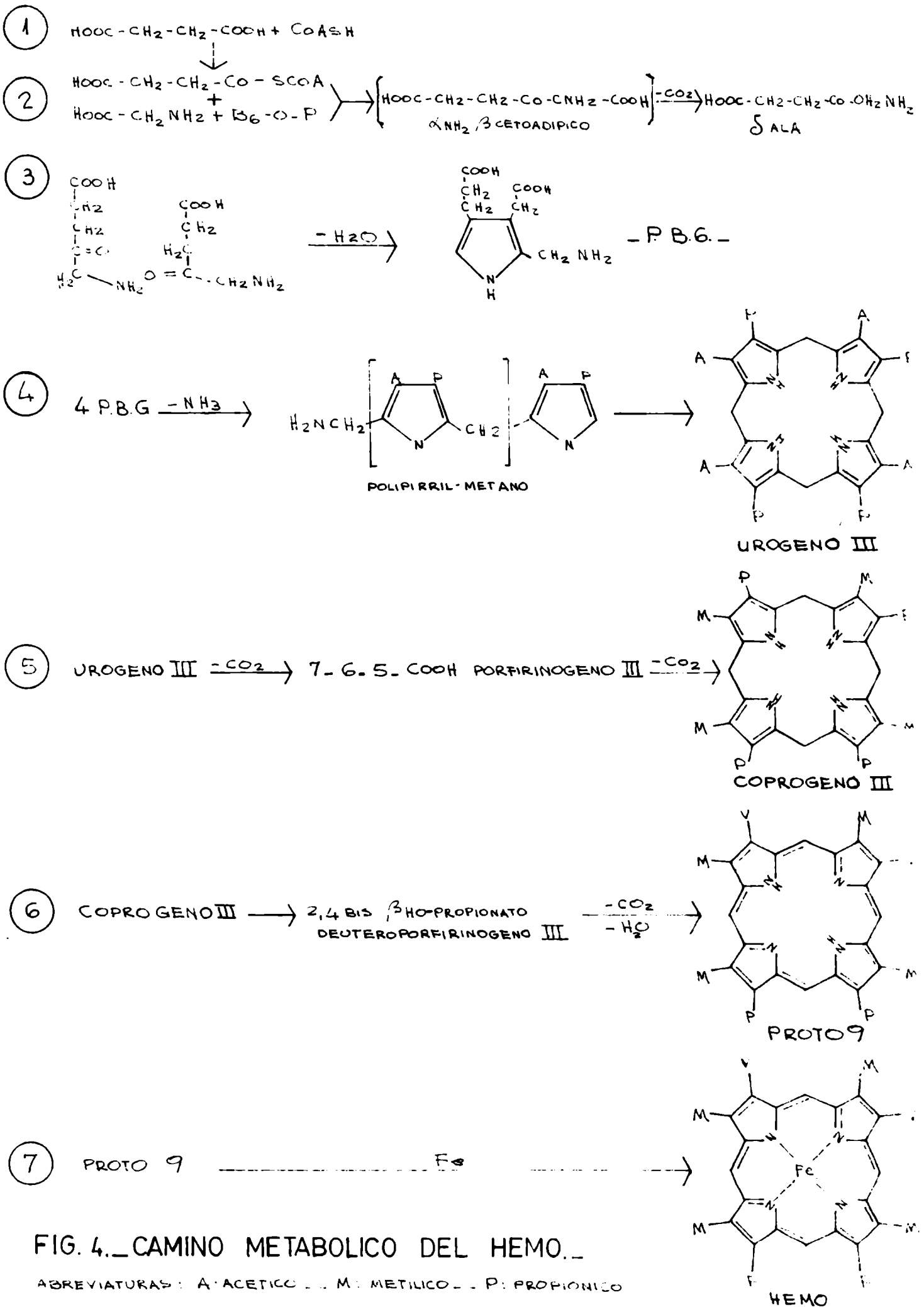


FIG. 4. CAMINO METABOLICO DEL HEMO.

ABREVIATURAS: A: ACETICO ... M: METILICO ... P: PROPIONICO

se obtiene protoporfirinógeno, que finalmente se oxida a protoporfirina, un compuesto de color eintensa fluorescencia roja.

En este punto divergen los caminos hacia la formación de hemo, por inserción de hierro, o de clorofila, si se introduce el magnesio.

Sólo la primera etapa requiere energía para la activación del succinato permitiendo su condensación con la glicocola para formar el primer intermediario: δ -ALA. Todas las otras reacciones son prácticamente irreversibles, y están termodinámicamente favorecidas puesto que comprenden la formación de anillos pirrólicos resonantes, descarboxilaciones y oxidaciones de los grupos acéticos y propiónicos.

Dos de las etapas parecen requerir oxígeno imprescindiblemente, la formación del precursor, succinil CoA y la oxidación de coproporfirinógeno a protoporfirina. Este hecho se ve correlacionado con la presencia de las enzimas que catalizan dichos procesos en partículas subcelulares (46), habiéndoselas encontrado fundamentalmente en mitocondrias (Fig. 5).

Analizaremos ahora cada etapa enzimática individualmente.

1.-BIOSINTESIS DEL ACIDO δ -AMINOLEVULICO : δ ALA-SINTETASA

El estudio de la génesis del grupo prostético de la hemoglobina comienza con Bloch y Rittenberg en 1945 (59) quienes encuentran hemo marcado con deuterio, en sangre de ratas a las que se les había administrado acetato deuterado.

Al año siguiente, Shemin, después de ingerir Gli N¹⁵, halla que la hemina de su sangre está marcada con N¹⁵. Este hecho, confirmado por múltiples experiencias, demuestra que la glicocola es el precursor nitrogenado específico de la molécula tetrapirrólica (60). Por medidas de derivados de la hemoglobina se establece además que la vida media del eritrocito humano es de aproximadamente 120 días (61), un valor excepcional si se toma en cuenta el estado dinámico que caracteriza a la mayoría de los compuestos biológicos, puesto que participan de procesos muy rápidos de síntesis y degradación.

La localización de los átomos de C y N incorporados al hemo se debe fundamentalmente al desarrollo de los métodos de degradación secuencial de la

protoporfirina, los que permiten delinear el origen de cada átomo, midiendo la radioactividad presente (62).

Una serie de estudios con isótopos radioactivos, llevados a cabo paralelamente en varios laboratorios, demuestran que mientras el átomo de C metilénico (C α)^{de la glicocola} es incorporado en el hemo, el átomo de C carboxílico no lo es (63-65). Queda así establecido que 8 átomos de C provenientes de moléculas de glicocola se incorporan a la protoporfirina por cada 4 átomos de N que derivan de esa misma fuente. Estos átomos de carbono del aminoácido dan origen a los carbonos que ocupan la posición α respecto de los grupos vinilos y propiónicos de las cadenas laterales, en cada uno de los pirroles, y a los carbonos que constituyen los 4 puentes metínicos de la protoporfirina (Fig. 2).

Diversas experiencias de síntesis y degradaciones similares, utilizando acetato C¹⁴, demuestran que el resto de átomos de C del tetrapirrol (26 átomos de C) provienen de dicho compuesto. Además, la distribución relativa de la incorporación en el hemo de los átomos de C tanto metilénicos como carboxílicos del acetato, sugiere que estos átomos no derivan de él directamente, sino que lo deben hacer a través de algún metabolito de 4 átomos de C asimétrico, $C_4H_7O_2$ generado probablemente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (66). Shemin postula entonces, que este compuesto sería un derivado asimétrico del succinato, posiblemente succinil coenzima-A, relacionando así, la biosíntesis de protoporfirina con el ciclo de Krebs. Su real participación se ve confirmada usando succinato, cetoglutarato y citrato radioactivos como sustratos y por estudios de inhibición con malonato, trans-aconitato, fluoracetato y arsenito (67-70).

La distribución de C¹⁴ en experimentos realizados con succinato marcado ratifica plenamente su utilización como una unidad y conjuntamente con los datos de incorporación de glicocola, permiten postular a Shemin que los cuatro anillos pirrólicos de la protoporfirina provendrían de un monopirrol común que primariamente tendría cadenas acéticas y propiónicas en sus posiciones β y que los metilos y vinilos se originarían por descarboxilaciones y dehidrogenación de esas cadenas (51).

Las experiencias de Schulman y Richert realizadas con glóbulos rojos de

animales alimentados con dietas deficientes en ácido pantoténico, demuestran una menor síntesis de hemo a partir de succinato y glicocola, lo que sugiere la participación de la coenzima A (CoASH) en esta biosíntesis (71-2).

Lascelles obtiene resultados similares utilizando extractos de *Tetrahymena vorax* crecidos en medios de cultivo deficientes en pantotenato (73). La intervención de succinil CoA como verdadero precursor fue convalidada por varios grupos de investigadores (57,60).

Shemin y Russell postulan, además, que el succinato activado podía condensarse con el C α de la glicocola para formar un cetoácido muy inestable, el ácido α amino β ceto adípico, que por pérdida del grupo carboxilo proveniente del aminoácido, daría origen al ácido δ aminolevúlico, primer intermediario en este camino metabólico (74-5).

Experiencias de dilución isotópica, con δ ALA y eritrocitos de aves demuestran que este producto es el que se forma e interviene en la biosíntesis del hemo, determinándose además que puede utilizarse como única fuente de todos los átomos de C y N de la protoporfirina (76-3).

En la mayoría de los casos estas investigaciones se han llevado a cabo utilizando glóbulos rojos nucleados, intactos o lisados, ya sea de aves o animales, éstos últimos en condiciones de eritropoyesis elevada.

Es sabido que las células rojas de las aves, siendo nucleadas, pueden sintetizar hemoglobina, mientras que en mamíferos, esta capacidad sólo se encuentra, normalmente, en ciertos estadios del desarrollo eritrocitario en médula ósea, o en sangre en condiciones de alta reticulocitosis (46,79-81). Las células rojas inmaduras contienen mitocondrias, pero a medida que ellas sufren el proceso de diferenciación pierden el núcleo y con él la capacidad de biosintetizar DNA. En estos estadios, las mitocondrias degeneran, diferentes enzimas se hacen limitantes y por ende, se pierde rápidamente la capacidad de síntesis de δ ALA, ya que las enzimas del ciclo tricarbóxico y de transporte de electrones están localizadas en dichas partículas. De allí, la necesidad de trabajar con células nucleadas, además de contar con la ventaja que otorga este material al ser la hemoglobina su constituyente proteico fundamental.

Los estudios de biosíntesis de tetrapirroles en otras fuentes naturales, ratifican los mismos precursores primarios que para los glóbulos rojos. Así, Della Rosa y colab. en *Chlorella vulgaris* (32) y Lascelles en *Rh. spheroides* y *Tetrahymena vorax* (73,83) demuestran la síntesis de porfirinas y clorofilas en estos microorganismos a partir de glicocola y diversos compuestos del ciclo de Krebs.

El hecho de que casi todas las células vivientes sinteticen tetrapirroles presupone la presencia del sistema enzimático que lleva a cabo la formación de δ -ALA en todos los tejidos; sin embargo, ha sido aislado en muy pocas células y prácticamente no ha podido ser purificado hasta el momento en buena extensión en tejidos normales.

Los primeros escarceos en la localización celular de la enzima que cataliza la síntesis de δ -ALA, la δ -aminolevúlico sintetasa, son realizados casi simultáneamente por varios laboratorios: Neuberger y Gibbon en Inglaterra, Shemin y Granick en Estados Unidos (34-39). Todos ellos detectan actividad biosintética tanto en partículas provenientes de hemolisados de pollos anémicos, como en glóbulos rojos intactos o lisados, de pollos normales. Comprueban además, la presencia de esta enzima en extractos libres de células de *Rh. Spheroides* (35,37).

La aislación de la δ -ALA sintetasa ha permitido efectuar estudios de requerimientos y regulación.

El grupo de Neuberger encuentra que la actividad enzimática en partículas intactas de eritrocitos de aves a partir de glicocola y succinato o α -cetoglutarato se estimula por el agregado de CoASH y fosfato de piridoxal (35-6). En estos sistemas no se detecta actividad cuando se parte de succinil CoA, sin embargo, si las partículas se someten a un proceso de congelamiento y descongelamiento, son capaces de utilizar dicho sustrato, lo que puede explicarse por la existencia de barreras de permeabilidad.

Por otra parte, Granick encuentra que los glóbulos rojos intactos son permeables a diferentes metabolitos del ciclo de Krebs, siendo la mayoría buenos precursores, mientras que las células congeladas y descongeladas se afectan

considerablemente, lo que lleva a suponer una inactivación de los sistemas enzimáticos del ciclo de Krebs en dichas células. El agregado de compuestos tales como fosfato de piridoxal, CoASH, glutamina, NAD^+ y una mezcla de nucleótidos restaura en parte la actividad de las células así tratadas (70).

Brown, por su parte, detecta buena actividad de δ -ALA-sintetasa en hemolisados de eritrocitos de pollo a partir de glicocola y succinato, evidenciando requerimientos de CoASH, ATP y fosfato de piridoxal (90).

Dresel y Falk comprueban una gran estimulación de la síntesis de porfirinas cuando adicionan un extracto cocido de levadura a hemolisados de eritrocitos de pollo (91). Este extracto se usa a menudo como fuente de CoASH lo que avalaría su acción activante en dichos sistemas.

En tejido animal, la etapa de formación de δ -ALA a partir de sus precursores no activados requiere el funcionamiento de los sistemas de transferencia de electrones y de fosforilación oxidativa completos, lo que se demuestra mediante estudios de inhibición con dinitrofenol, anaerobiosis y CO (46).

El fosfato de piridoxal es un cofactor necesario para la síntesis de δ -ALA, tanto en animales como en microorganismos (70,73,86,89-92) y este requerimiento justifica la anemia observada en deficiencias nutricionales de esta vitamina (72,93).

La reacción enzimática se inhibe por aminomalonato y por otras sustancias tales como cisteína, L - penicilamina y altas concentraciones de CoA los que interactuarían, probablemente con el grupo aldehído de la coenzima piridoxálica formando un anillo tipo tiazolidina como sugiere du Vigneau (94-95).

Kikuchi y colab. suponen que el fosfato de piridoxal activaría la glicocola mediante la formación de una base de Schiff, originándose un carbanión que se estabilizaría por pérdida de un protón al medio, estando todo el proceso mediado por la enzima δ -ALA sintetasa (88).

Brown y Schulman demuestran un requerimiento de iones ferrosos para sus preparaciones enzimáticas de glóbulos rojos (72,96-7). El grupo de Marsh encuentra que la incorporación de α -cetoglutarato C^{14} es menor en discos de hojas deficientes en hierro, mientras que la incorporación de δ -ALA no se ve alterada

en dicho material (98).

La participación de un metal en esta etapa tendría una función importante, como sería la de favorecer la formación de una base de Schiff estabilizándola por quelación, puesto que a pH fisiológico, la tendencia a generar dichas bases es muy pequeña.

Aktar y Jordan presentan pruebas que apoyan este proceso y deducen que la eliminación del protón para la formación del carbanión es estereoespecífica (99).

No obstante el cúmulo de conocimientos aportados por diversos laboratorios no está aún aclarado el mecanismo de acción de la δ -ALA sintetasa, proceso que comprende la condensación de una molécula de glicocola con otra de succinato y la eliminación de una molécula de CO_2 para dar δ -ALA.

Se ha supuesto y se han presentado algunas evidencias que demuestran que el aminoácido reacciona con el fosfato de piridoxal y la enzima para formar una aldimina dando un carbanión estabilizado sin pérdida del carboxilo (83). Esta estructura favorecería el ataque al átomo de C carbonilo electrofílico de la succinil CoA por el C α de la glicocola, según el esquema de Braunstein y Snell (100-1). La condensación produciría un ácido dicarboxílico, el ácido α amino, β ceto-adípico, el que perdería el grupo carboxilo cercano al grupo amino, espontánea o enzimáticamente.

Experimentalmente, no se ha detectado la presencia de este amino-cetoácido como un real intermediario transitorio de la reacción enzimática. Laver y colab. trataron de obtener sintéticamente el compuesto libre, pero sólo pueden detectarlo físicamente, a pH fisiológicos. Efectúan estudios de su velocidad de descarboxilación mediante el cambio de volumen y variación en la absorción en la zona del ultravioleta durante la reacción a diferentes pH, y determinan que la vida media del α amino β ceto-adipato a pH 7,0 es menor de un minuto (102). Este hallazgo excluiría, por lo tanto, la existencia de una enzima para la liberación del grupo carboxilo.

El hecho de que esta descarboxilación esté fuertemente favorecida termodinámicamente y los estudios cinéticos de eliminación de CO_2 radioactivo realizado por Kikuchi y colab. concordarían con una reacción concertada de ambas

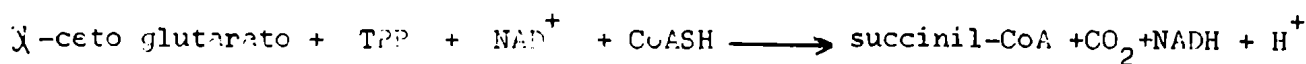
reacciones, las de condensación y descarboxilación.

El grupo de Shemin encuentra además, una inhibición por δ -ALA, lo que favorecería la idea de la formación del producto unido a la δ ALA sintetasa (88).

En la célula, el δ ALA proviene de la succinil-CoA, cuya formación puede tener lugar por diversos caminos metabólicos (46,103).

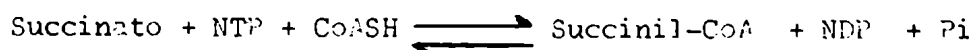
Dos de los firmemente demostrados son:

a) A partir del ceto-glutarato, con la integridad del sistema descarboxilante oxidativo del ciclo de Krebs:



Esta vía es considerada la principal en células animales.

b) Por reversibilidad de la succinil-CoA sintetasa dependiente de nucleósido trifosfatos, fundamentalmente en plantas y bacterias.



Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos propuestos.

Así, propionil CoA puede adicionar CO_2 con una biotin-enzima para formar metil malonil CoA, convirtiéndose en succinil CoA por otra enzima soluble dependiente de B_{12} (46,104).

El δ ALA podría formarse también por condensación del ácido semialdehído succínico con la glicocola activada para dar el ácido α amino β hidroxidípico el que se oxidaría a δ ALA, o por transaminación del ácido ceto-glutaraldehído, interconversión que ha sido encontrada en diferentes tipos de células (105-6).

Estos caminos alternativos podrían dar cuenta de la formación de δ ALA en tejidos donde no ha podido detectarse actividad de δ ALA sintetasa.

Por otra parte, Shemin y Russell, trabajando en tejidos animales, no sólo demuestran que el δ ALA se convierte en porfirinas, sino que proponen un camino metabólico alternativo, mediante el cual el C_5 de este compuesto y que corresponde al C metilénico de la glicocola (Fig. 3), funcionaría como una unidad de un átomo de carbono o "fragmento de C_1 ". Estudios realizados con marcadores isotópicos, señalan su incorporación en el grupo ureido de la guanina, en el ácido úrico y en el CO_2 , regenerándose nuevamente en este proceso el ácido succínico. Este ciclo, denominado glicocola-succinato o ciclo de

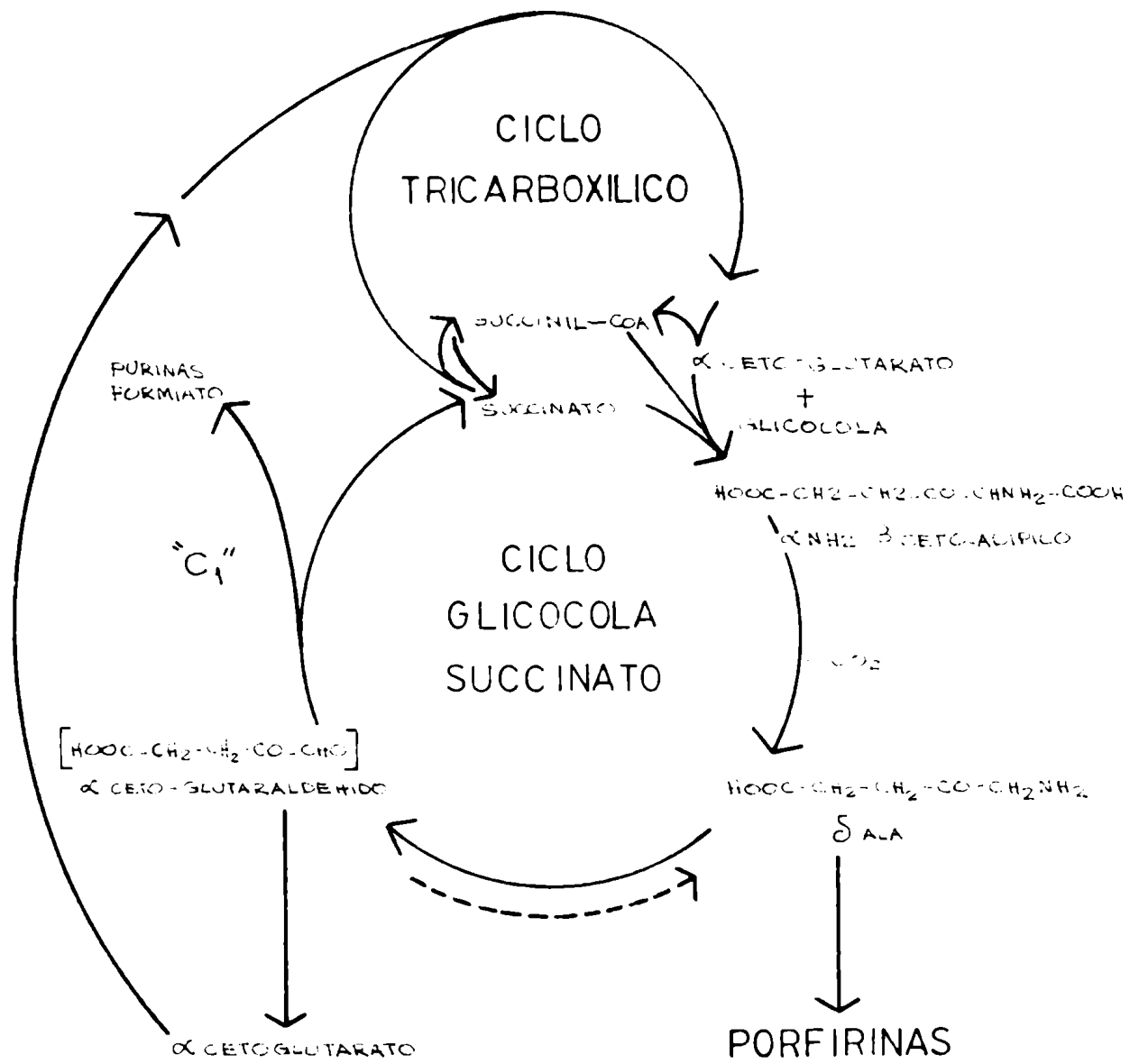


FIG. 6.- CICLO DE SHEMIN. -
interrelación con otros caminos metabolicos. -

Shemin provee un camino para la oxidación de la glicocola (74,107) Fig. 6

A pesar de la postulación de su distribución universal, la δ ALA sintetasa además de estar presente en las células rojas inmaduras ya citadas, ha sido detectada en tejidos animales, en condiciones fisiológicas normales, sólo, en hígado de cobayo (108) y en médula ósea de conejos (109).

Diversos microorganismos, levadura y tejidos vegetales presentan actividad de δ ALA sintetasa, estando asociada con estructuras subcelulares(98,110-11).

En hígado de ratas y ratones y en cultivos de tejidos embrionarios de pollos se logra determinar su actividad, sólo en condiciones de producción exacerbada de porfirinas (112-15), ya que, normalmente, en ambos tipos de células el nivel de δ ALA sintetasa es muy bajo. Sin embargo, es posible inducir la enzima (50 veces o más) por administración de diversas drogas porfirinogénicas, lo que facilita su estudio (113-18).

La localización de la enzima, en células animales, confirma su asociación con las mitocondrias y publicaciones recientes presentan pruebas de que estaría unida débilmente a la membrana mitocondrial interna, o libre, en el espacio de la matriz mitocondrial (116-120).

Burnham y Lascelles (121) logran purificar aproximadamente 10 veces la δ ALA sintetasa proveniente de extractos libres de células de Rh. spheroides, una bacteria fotosintética que posee un alto contenido de proteínas hémicas y presenta la mayor actividad, aún cuando se la compara con la de glóbulos rojos inmaduros o de la médula ósea, células cuya función primordial es biosintetizar hemoglobina (86,109).

Muy recientemente, Marver informa haber logrado purificar una enzima ALA sintetasa soluble, de hígado de ratas tanto normales como porfíricas(122), una localización ya observada por el grupo de Kikuchi (123).

En glóbulos rojos y en bacterias, la enzima no es específica para succinil CoA, puesto que presenta capacidad de formación de otras aminoacilcetonas, (85,6,89). Sin embargo, Granick y Urata encuentran evidencias de especificidad para ese sustrato, en mitocondrias de hígado de cobayos (116).

La formación de δ ALA está considerada, generalmente, como la etapa de

velocidad limitante en la biosíntesis de tetrapirroles (116,124).

La enzima que cataliza este paso y que regularía, primariamente, el camino que lleva a hemo y clorofila, puede ser inducida por una amplia serie de drogas y esteroides (113-117,125-7). Esta inducción se bloquea por hidratos de carbanos y se la refiere como "efecto glucosa", aunque no parece tener relación con el fenómeno de "represión catabólica" (113,128).

Barreiro observa que drogas porfirinogénicas tales como Sedormid, (alil-isopropil-acetil-carbámidá) inhiben la enzima UDP-glucurónil transferasa tanto "in vitro" como "in vivo", siendo mayor su efecto en el segundo caso (129).

Kappas y Granick comprueban que el ácido UDP-glucurónico bloquea también la inducción de las porfirinas producidas por los esteroides (130).

De aquí, que la acción inhibitoria de la glucosa se debería a su transformación en el derivado uridílico que conduciría a una mayor glucoronidación de sustancias que como los esteroides pueden incrementar la síntesis "de novo" de la δ -ALA-sintetasa.

Gajdos y Gajdos-Török y sus colab. demuestran en cultivos de Rh. spheroides, que altas concentraciones de ATP inhiben la síntesis y excreción de porfirinas a partir de glicocola y succinato, no así desde δ ALA.

Estos hallazgos les hacen suponer la formación de un probable inhibidor fisiológico que actuaría sobre la primera enzima (131). Encuentran, además, que niveles de ATP bajos, provocados por compuestos que son a su vez porfirinogénicos, favorecen la formación exacerbada de porfirinas en hígados de ratas (132-3).

En investigaciones recientes, el grupo de Neuberger trabajando con extractos de Rh. spheroides, encuentra un activador y un inhibidor de la δ ALA-sintetasa, de bajo peso molecular, sin determinar su naturaleza.

Ambos son estables al calor y se producen en los medios de cultivos de dichas células crecidas bajo diferentes tensiones de oxígeno (semianaerobiosis y aerobiosis) (134).

Lascelles había demostrado ya que estas bacterias fotosintéticas muestran una asombrosa respuesta a los cambios ambientales. Así, llegan a contener la mayor cantidad de pigmentos pirrólicos cuando las células bacterianas se

hacen crecer anaeróbicamente a la luz, o en la oscuridad, con baja aereación (103).

Como se ha dicho, el nivel de esta enzima en hígado de mamíferos es bajo y en condiciones fisiológicas normales, satisfaría las necesidades propias de la síntesis de citocromos, catalasas y otras proteínas hémicas. En este tipo de células, y en condiciones similares a las porfirias, Granick encuentra que la enzima se reprime por hemo (117).

A continuación, diversos investigadores publican evidencias confirmatorias y se sugiere que el hemo, producto tetrapirrólico final del camino metabólico de las hemoproteínas, bloquea la inducción de la δ ALA-sintetasa provocada por ciertas drogas y esteroides, con lo que se obtendría un mecanismo regulador para su propia síntesis (103,117,122,135-6).

Estos resultados han llevado a Granick a proponer como hipótesis, para esta secuencia metabólica, el ya clásico mecanismo de regulación a nivel molecular para un sistema reprimible (137).

El gen operador del "operón hemo" (Fig. 7a) estando bajo control represor regularía la actividad del gen estructural (G_1) que codifica la enzima de velocidad limitante (E_1) δ ALA-sintetasa. Todas las otras enzimas de la cadena biosintética - E_2 a E_7 - codificadas por sus correspondientes genes estructurales, estarían en cantidades no limitantes.

En este sistema, el gen regulador promueve la formación de un represor, que estaría constituido por una proteína (apo-represor) a la cual se uniría el hemo (co-represor) generándose el represor activo, el cual impediría la expresión de los genes estructurales. Este represor se inactivaría por metabolitos que competirían con el hemo. Así, ciertas drogas inductoras, en este caso porfirinogénicas, interaccionarían con el hemo por su sitio de unión sobre el apo-represor, inactivando el represor y provocando la de-represión del gen estructural para la δ ALA-sintetasa, la formación incrementada de la enzima limitante, y por ende, el aumento exacerbado de los niveles de los precursores porfirínicos.

Un efecto similar se asigna a los esteroides y otras hormonas inductoras, que competirían por el apo-represor (138-142).

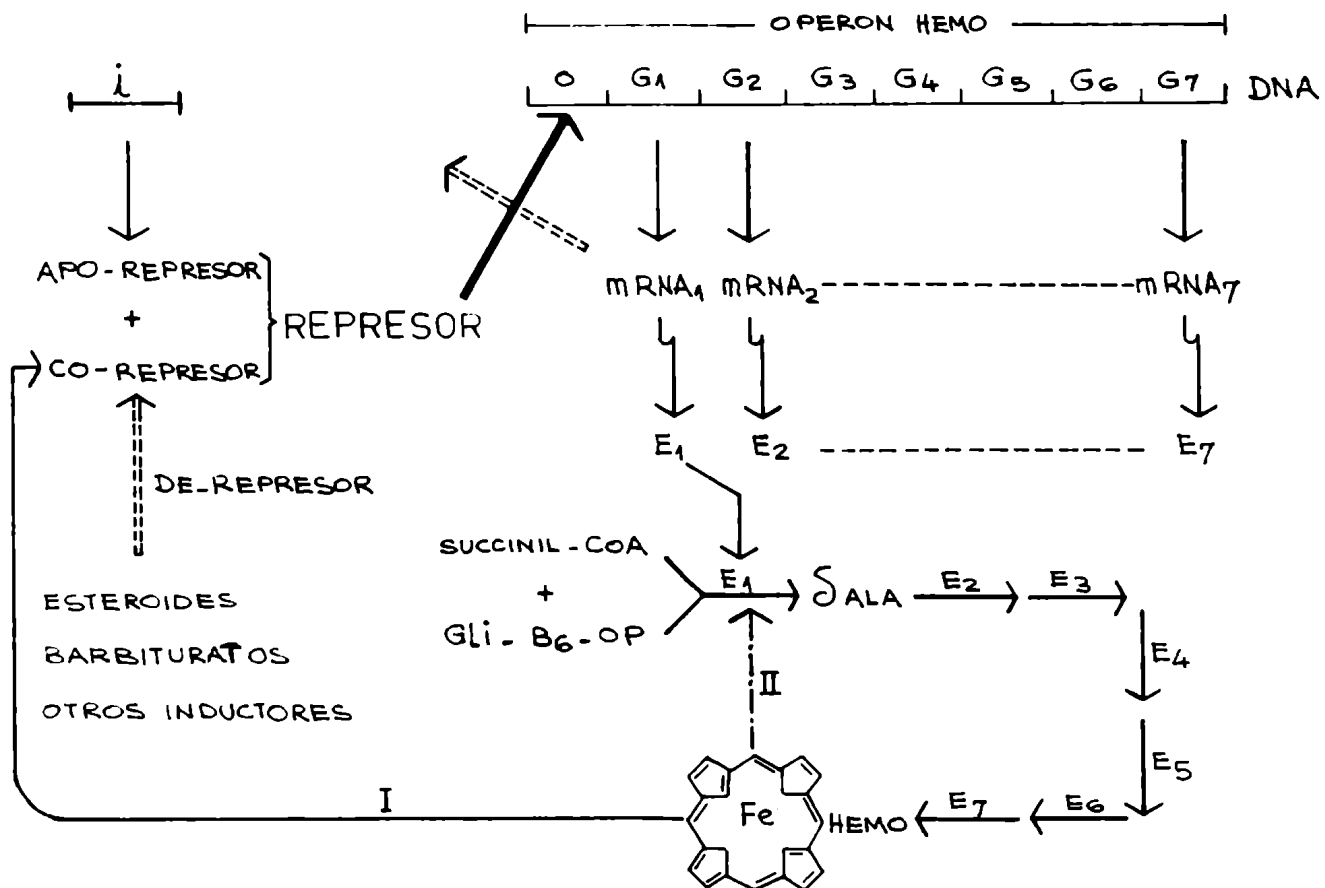


FIG. 7a. - MECANISMO DE REGULACION. -

El control de la biosíntesis de hemo puede llevarse a cabo por diversos mecanismos: I.- Represión, II.- Retroinhibición, III.- Compartimentalización.

I.- Esta secuencia metabólica puede suponerse que esta bajo regulación positiva. En este sistema el gen regulador genera un apo represor (inactivo) que al unirse con un co-represor - generalmente el producto final de una vía biosintética - forma un represor activo que interactúa con el operador (o) y no permite la expresión del mensaje genético inscripto en un trozo del DNA (operón). En ausencia del represor, los genes estructurales G_1 a G_7 , que determinan las estructuras de las enzimas relacionadas con la síntesis del hemo, se transcriben a los mRNA correspondientes, los que a su vez, son traducidos a las proteínas enzimáticas (E_1 a E_7). El gen G_1 transcribe el mensaje para la δ -ALA sintetasa, continuándose hasta el G_7 que expresa la hemo-sintetasa y que cataliza la formación del hemo. Este metabolito actúa como co-represor, dando el represor activo que bloquea la transcripción \longrightarrow . Diversos compuestos químicos (esteroides, barbituratos, etc.) actúan como co-represores, permitiendo la libre expresión del operon hemo \longleftarrow .

II.- El producto final de esta secuencia (hemo) actúa también inhibiendo la actividad de la 1.ª enzima (δ -ALA-S) \longleftarrow .

III.- La compartimentalización de las enzimas dentro de la célula está representada en la Fig. 7.

Una baja concentración de hemo o una sobrecarga de glucosa vía el incremento del ácido UDP-glucurónico de-reprimirían también el sistema.

Lascelles demuestra que la actividad de la δ -ALA-sintetasa bacteriana se inhibe por hemo, hemina y otros complejos férricos de diversos tetrapirroles, lo que indicaría que el hemo actúa como retro-inhibidor - "feed-back inhibition" (103,143-4).

En células animales, este efecto ha tenido resultados disímiles, Así, mientras Karibian y London encuentran retroinhibición, en eritrocitos intactos sólo a altas concentraciones, varios otros grupos de trabajo, no logran observar interferencia de la actividad enzimática con el hemo, en extractos crudos (109,117,145). Sin embargo, muy recientemente, Marver y colab. informan que la δ -ALA-S soluble de hígado de rata, es inhibida por hemo, y que varias proteínas se unen al mismo, impidiendo la acción inhibitoria competitiva (122). Estos hallazgos justificarían la imposibilidad que encuentran otros investigadores, de detectar la inhibición de la sintetasa por el producto final, por cuanto miden la actividad en sistemas no purificados.

En células bacterianas, la síntesis de δ -ALA-sintetasa es también reprimida por hemo (103). En cultivos deficientes de hierro, tanto las bacterias fotosintéticas como otros microorganismos son capaces de acumular porfirinas, fundamentalmente como coproporfirina (143,146-7). En estos cultivos y merced al bajo contenido de hemo que se forma, la síntesis de la enzima reguladora no estaría reprimida y funcionaría más activamente. Como las otras enzimas porfirinogénicas no son limitantes, hay una producción masiva de tetrapirroles y otros precursores que se acumulan en el medio (133).

Este mecanismo de control reprimible por hemo o derivados relacionados ha sido confirmado en varios laboratorios de investigación (103,122,136,148-50).

2.- BIOSÍNTESIS DE PORFODILINOGENO: δ -ALA-DEHIDRATASA

Si bien el ácido aminolevúlico fue un intermediario propuesto teóricamente por Shemin (66) como producto de condensación de la glicocola y el derivado succínico, su participación en esta secuencia metabólica tiene su comprobación

experimental, casi simultáneamente, en varios laboratorios. Los estudios de marcación isotópica llevados a cabo por Shemin y Russell establecen definitivamente que todos los átomos de C de la molécula del hemo derivan de este ácido (74). Neuberger y Scott, confirmando estos resultados, observan la formación de protoporfirina en hemolizados de glóbulos rojos de aves, a partir del ALA sintetizado químicamente por ellos (77).

Dresel y Falk demuestran también su conversión a un monopirrol al que Waldenström le había asignado la denominación de "porfobilinógeno" (78,151).

Este compuesto había sido aislado y cristalizado muy poco tiempo antes por Westall, de orinas de pacientes que padecían un tipo de porfiria denominada aguda, una enfermedad hereditaria de carácter recesivo (53). El porfobilinógeno es un compuesto que reacciona con el reactivo de Ehrlich dando una coloración roja característica, insoluble en cloroformo (152-4).

Su estructura, dilucidada por Cookson y Rimington en 1953 (54) corresponde a un compuesto penta-cíclico nitrogenado con dos cadenas laterales de ácidos acéticos y propiónicos en las posiciones β , β' y un grupo metilamino en posición α , estando la otra posición α' libre, Granick y Bogorad (155) y Kennard (156) presentan simultáneamente datos estructurales confirmatorios (Fig.3).

En cuanto a la localización de su síntesis, Shemin y colab. informan la transformación de ALA en porfirinas, por un extracto libre de células provenientes de eritrocitos de pollo hemolizados (76), mientras que Granick logra separar de estas mismas preparaciones una fracción proteica "soluble" que cataliza su conversión al monopirrol (157).

La enzima responsable de esta reacción "5-aminolevulíco-hidrolasa" denominada comúnmente "ALA-dehidratasa" (ALA-D) está vastamente distribuida en la naturaleza, probablemente presente en todos los organismos aeróbicos. Se la ha detectado en preparaciones de vegetales (157-162), animales (157, 163-70) y microorganismos (73,111,171-3).

Respecto de los tejidos animales estudiados, los glóbulos rojos de aves y el hígado son los que presentan mayor actividad de ALA-dehidratasa.

Se la encuentra localizada en la fracción soluble del citoplasma, indepen

cientemente de la fuente utilizada, se la ha purificado de hígado de buey (163), eritrocitos de aves y humanos (166,174), bazo e hígado de ratones (175), Rh. spheroides (121,176), y propionibacterium shermanii (171) y, simultáneamente con la que aquí se presenta, de hojas de trigo, levadura (111) e hígado de vaca (178). En los dos últimos años se la ha estudiado en otros muchos y variados tejidos para tratar de dilucidar sus características y el mecanismo de la reacción que cataliza (179-183).

El rango común más característico que presentan todas las dehidrasas estudiadas es ser sulfhidríficas. En la mayoría de los casos, se obtiene su actividad máxima por preincubación con reactivos reductores como glutatión o cisteína y todas se inhiben con reactantes de grupos sulfhidrilos libres.

El pH óptimo varía según el tejido estudiado, en animales es muy cercano a la neutralidad (163,166,174-5), mientras que los vegetales, levadura y Rh. spheroides y otras bacterias presentan pH óptimos en la zona alcalina (162,173, 176,182). Los metales la inhiben en el orden de los productos de solubilidad desde sulfuros (166), aunque se observan diferencias para enzimas de distintos orígenes (162,175,181). Complejantes del tipo etilendiaminotetraacético (EDTA) inhiben el sistema enzimático animal pero aún no se ha determinado la necesidad de un metal específico para su actividad, en estos tejidos (163,175).

La enzima de bacterias fotosintéticas no se inhibe por EDTA ni por α - α' piridilo pero se activa por iones potasio (121).

Recientemente, Nandi y Shemin comprueban que la α -ALA-D de Rh. spheroides posee las características de una enzima alostérica y que varios iones, especialmente los monovalentes, ejercen un efecto heterotrópico cooperativo (179,183). V. Vergnano y colab. publican propiedades semejantes para la enzima eritrocitaria (174).

La α -ALA-dehidratasa de vegetales se inactiva por EDTA pero el efecto puede ser revertido por iones divalentes aunque no requiere iones K (162). Resultados similares encuentra Walerich con su enzima bacteriana (171).

Barreiro presenta evidencias de la inhibición de la actividad de la α -ALA dehidratasa provocada por la reacción de reactivos sulfhidrilos con el grupo cetónico del sustrato (185).

Lascelles comprueba que la dehidratasa de Rh. spheroides se inhibe por hemo, producto final de este camino metabólico, pero en mucho menor grado que la δ -ALA-sintetasa (121) y Shemin y Coleman lo confirman trabajando con fracciones enzimáticas más purificadas (175,179).

No está aún dilucidado el mecanismo de la reacción que da origen al PBG, mediante la condensación de dos moléculas de δ -ALA.

Se sabe que el δ -ALA y compuestos similares a las aminocetonas son en general estables en medio ácido, pero que se condensan rápida y reversiblemente a cetoiminas y dihidropirazinas en solución alcalina (pH:8,0), pudiendo auto-oxidarse por aire a pirazinas aromáticas estables (166).

No obstante la reacción catalizada enzimáticamente puede concebirse como una síntesis química de pirroles del tipo de Knorr, comprendiendo: a) una condensación aldólica y b) la formación de una base de Schiff con pérdida de dos moléculas de agua.

Hasta ahora no se ha logrado aislar más de una entidad proteica en los diversos sistemas celulares y se piensa que ella actuaría catalizando toda la reacción (179).

De los estudios de inhibición llevados a cabo por Granick y Mauzerall y Nandi y Shemin puede deducirse que ni el grupo α -amino β -ceto, ni el grupo α -amino, solos, son suficientes para unir el sustrato a la enzima (163,166,186). Se comportan también como inhibidores de la reacción enzimática el ácido semialdehído succínico, el δ -cloro o δ -oxímino levulinato y el levulinato pero no el etil levulinato, lo que indicaría que un grupo carboxilo libre es esencial para su unión con la enzima (162,180,187).

Nandi y Shemin recientemente, establecen que la unidad monomérica de la δ -ALA-dehidratasa de Rh. spheroides tiene un peso molecular de 250.000 y que puede asociarse a un trimero por efecto de iones potasio (180).

Presentan también datos que implicarían la formación de una base de Schiff entre el grupo carbonilo del sustrato y un grupo amino de la enzima (180, 186).

En estados de porfirias inducidas con Sedormid (alil-isopropil-acetil-carbamida) o AIA (alil-isopropil-acetamida), se encuentra que la actividad de

la δ -ALA-dehidratasa en hígado de ratas es el doble que en condiciones fisiológicas normales (188) mientras que la administración de 3-amino, 2,4 tiazol la disminuye considerablemente (189).

Esta enzima está también inhibida en estados de intoxicación por plomo, en la enfermedad conocida como saturnismo (165-6, 190).

3.- BIOSINTESIS DE UROPORFIRINAS - PORFEBILINOGENASA

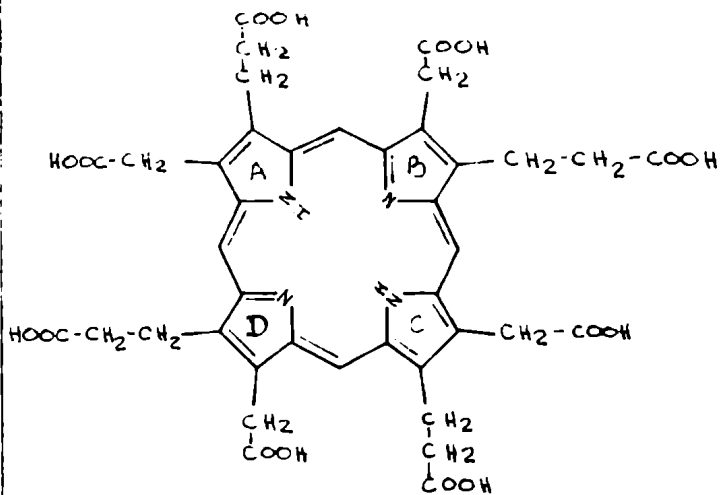
Aún antes de la aislación y conocimiento estructural del porfobilinógeno, varios investigadores especulan que un monopirrol podría estar involucrado como precursor en el camino biosintético del hemo (67,191).

Subsecuentemente a la demostración de su estructura se inician estudios sobre esta posible intervención.

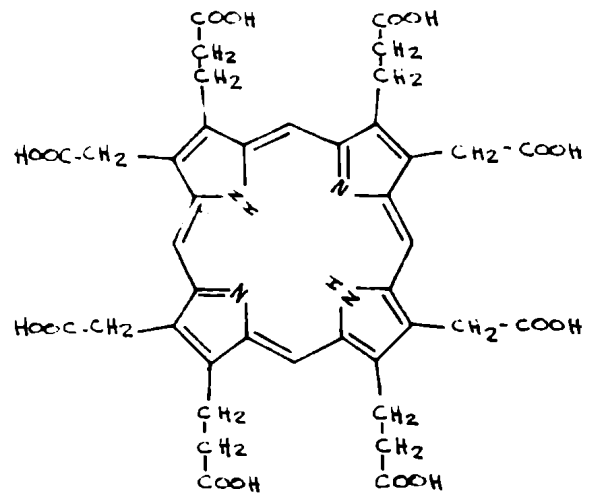
Aunque aparecen algunos intentos previos negativos (192-3) Falk, Dresel y Rimington (194) y Fogarty y Granick (195), simultáneamente, demuestran que el PPG es utilizado para la síntesis de protoporfirina y comprueban la presencia de porfirinas con mayor número de carboxilos, tanto en hemolisados de eritrocitos de pollos como en extractos libres de células de *Chlorella* y de hojas de espinacas.

Investigaciones posteriores llevadas a cabo en diferentes laboratorios y utilizando muy diversas fuentes, corroboran ampliamente que este monopirrol es el intermediario verdadero en la síntesis de hemo, similar al precursor pirrólico postulado (54,70,75,165-6,196-7).

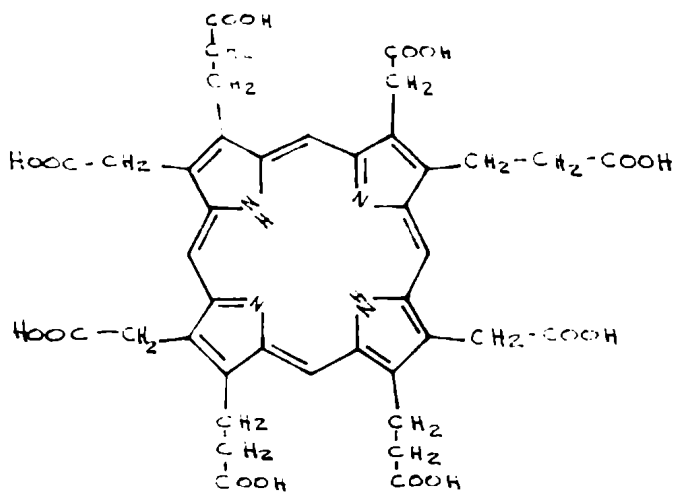
La condensación de cuatro moléculas de PPG (Fig. 4) con liberación de NH_3 , ya sea química o enzimática, da como resultado compuestos macrocíclicos formados por cuatro anillos pirrólicos unidos por puentes metálicos, con cadenas laterales de ácido propiónico y acético en los carbonos β , δ . Fischer asigna el nombre de uroporfirinas a estas estructuras (11) (Fig. 7b). De los cuatro isómeros posibles de esta porfirina sólo los tipos isoméricos I y III se hallan en la naturaleza y tienen importancia biológica. Del isómero III deriva la protoporfirina 9, metabolito clave del cual divergen los diferentes pigmentos cromoproteicos funcionales (45).



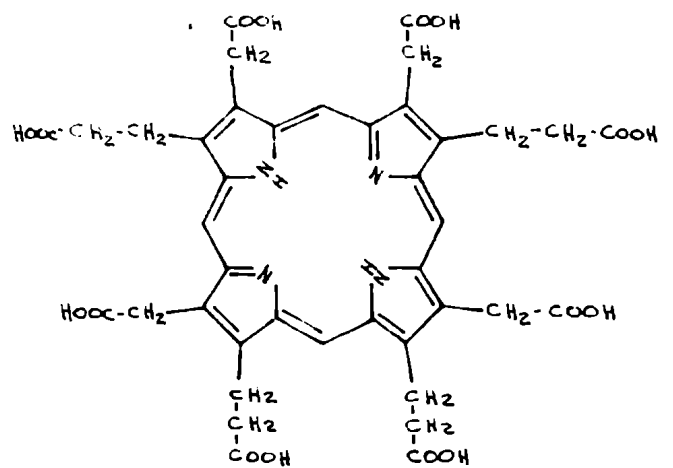
UROPORFIRINA I



UROPORFIRINA II



UROPORFIRINA III



UROPORFIRINA IV

FIG. 7b. ISOMEROS DE LA UROPORFIRINA.

Si la condensación se hace químicamente, se obtienen los diferentes tipos isoméricos de la uroporfirina (I, II, III, IV) en proporciones variables. La composición de estos productos depende notablemente de las condiciones experimentales, principalmente pH, temperatura y tiempo (198-200).

Si se realiza enzimáticamente con extractos crudos y en aerobiosis, el producto es fundamentalmente uroporfirina III aunque aparecen otras porfirinas con menor número de grupos carboxilos en las cadenas laterales (165,195-7). Estas porfirinas proceden de la oxidación, espontánea o enzimática de los correspondientes productos primarios de la reacción: los porfirinógenos. En este proceso de oxidación a porfirinas se liberan 6 átomos de hidrógenos y los puentes metínicos formados determinan conjuntamente con los de los pirroles, un sistema de dobles ligaduras conjugadas, altamente resonante y por lo tanto de gran estabilidad. La oxidación de las leucobases es fotocatalizada y sensibilizada por la porfirina producto (201). Estas estructuras resonantes dan a las sustancias un color púrpura y una fluorescencia roja brillante característica.

En extractos de hojas de espinacas y germen de trigo, Dogorad detecta la presencia de una sustancia lábil al calor, de naturaleza proteica y por lo tanto considerada como una enzima, que parece catalizar la oxidación del uroporfirinógeno formado en la reacción, a uroporfirina (202). Presenta además evidencias espectroscópicas de la aparición de un producto de oxidación transitorio que tiene una banda de absorción a 500 nm y que correspondería a un tetrapirrol con un nivel de oxidación entre el uroporfirinógeno y la uroporfirina (202). Sin embargo, no se han informado nuevos aportes que confirmen la existencia de esta enzima. Por otra parte se sabe que los porfirinógenos son muy fácilmente oxidables a las porfirinas correspondientes pasando por estados intermedios de oxidación sin la participación de enzimas y en presencia de aire (200-1,203-4).

El isómero I de la uroporfirina aparece en materiales biológicos de humanos y mamíferos en condiciones patológicas, como es el caso de algunas porfirias, principalmente la congénita (205-6).

Cuando extractos de *Chlorella*, precalentados a 50-60°C por tiempos cortos, se incuban con PPG presentan una variación en el tipo isomérico del producto formado. En estas condiciones solamente se produce uroporfirina I (195).

Igual comportamiento se observa con hemolizados de eritrocitos de aves o humanos y con extractos de bacterias fotosintéticas, cuando se someten a un tratamiento similar (197,201,207).

Fallot y colab. incubando glóbulos rojos humanos, a 37°C durante 24 horas obtienen uroporfirina I, además del isómero III (208).

El mecanismo fácilmente visualizable de formación del uroporfirinógeno I (macrociclo simétrico), comprendería una polimerización lineal de cuatro moléculas de PBG, con liberación de cuatro moléculas de NH_3 , mediante la unión del C del grupo metilamino de una molécula pirrólica y el carbono de la posición libre de otra adyacente y una ciclización de la cadena tetrapirrólica abierta. Este último paso podría ocurrir espontáneamente debido a la alta probabilidad que le otorga el ordenamiento espacial de su estructura molecular (200,209).

No obstante, el producto fisiológico normal que da origen a los derivados porfirínicos naturales proviene del isómero III, cuya formación implicaría que uno de los monopirroles se una en forma "rotada" (D en la Fig. 7b).

De diversos extractos celulares se han aislado sistemas enzimáticos complejos, solubles, que acoplados realizan la transformación de las moléculas de PBG en uroporfirinógeno III (197,202).

Se sabe además, que en este proceso intervienen 2 componentes proteicos diferentes, reconocidos por su susceptibilidad diferencial al calor: 1) el sistema "Porfobilinógeno deaminasa" o "Uroporfirinógeno I sintetasa" y 2) el sistema "Uroporfirinógeno III cosintetasa" o "Urogen isomerasa".

Dogora es el primero en detectar estas dos actividades enzimáticas en vegetales y logra obtener Uro'gen I sintetasa libre de cosintetasa (202).

La fracción proteica estable al calor que corresponde a la Uro'gen I sintetasa y que cataliza la formación de uroporfirinógeno I, ha sido purificada de vegetales, microorganismos y diferentes tejidos animales comprobándose que es una enzima "soluble" (166,202,210-13).

La sintetasa de vegetales se afecta ligeramente por precalentamiento a 70°C y pH 8,2 y requiere la presencia de reactivos tiólicos para su actividad. La enzima actúa sólo sobre PBG y se inhibe competitivamente por análogos de

este pirrol, tales como el ácido opsopirrol dicarboxílico, que carece del sustituyente en el C α ; el isoporfobilinógeno, compuesto que presenta inversión de las cadenas laterales y los ácidos 2-metil,3-4 pirrol-diacético y 2-metilamino-3-pirrol-acético, éste último por preincubación con la enzima (214-17). El PPG carboxilado no tiene efecto sobre la reacción (210).

El formaldehído y los dipirril-metanos no son sustratos de la reacción enzimática, a excepción del dipirril-metano con sustituyentes en cadenas laterales simétricos (APPA) y α metilaminos que con extractos crudos de bacterias fotosintéticas forman Uro II, una porfirina no natural (213-20).

Los estudios realizados con un dipirril metano sintético equivalente a la condensación de las moléculas de PPG, en presencia de este monopirrol, demuestran la formación de Uro'gen I (209).

La hidroxilamina y los iones amonio a altas concentraciones no afectan considerablemente el consumo enzimático de PPG por la sintetasa, pero parecen provocar la acumulación de intermediarios de la cadena polipirrólica abierta (165,221-2). Todos estos hechos permiten deducir que existirían sitios de unión específicos para la molécula del PPG - involucrando las cadenas acéticas y propiónicas - y que solamente este monopirrol con su cadena α metilamino es el que orienta a la condensación correcta, necesitándose además una posición libre del C α distal para el funcionamiento de la enzima.;

2) La otra fracción proteica necesaria para la formación de uroporfirina III o "uro'gen III cosintetasa" es lábil al calor y ha sido purificada de germen de trigo y de tejido animal, encontrándose presente en la fracción soluble celular (202,211-13). Si bien la enzima vegetal, se inhibe por iones NH_4 , en bazo no se observa este efecto (222-23). Estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio, confirman esta acción inhibitoria para la enzima de hígado vacuno (213a).

La actividad de cosintetasa se afecta por hidroxilamina pero no por iones sulfito o ditionito lo que presupone que la condensación tiene lugar a nivel de máxima oxidación (metano) (166).

Si bien las dos actividades (complejo sintetasa-cosintetasa), están pre-

entes en todas las fuentes ensayadas, no pudieron separarse de preparaciones; de eritrocitos de conejos y pollos con métodos electroforéticos, (166) ni de eritrocitos humanos o de aves, por las metodologías de Cornford y Lockwood (219,221). Esto llevó a sugerir que en células animales ambas enzimas estarían asociadas en forma de un complejo no dissociable, mientras que en vegetales se separarían más fácilmente.

Sin embargo, recientemente se logra aislar las dos actividades en diferentes tejidos hematopoyéticos (211-12). Pese a ello, Coleman no descarta la posibilidad de que la fracción cosintetasa sea un cofactor, es decir, una sustancia de bajo peso molecular que se halle unida firmemente a una fracción proteica. Para proponer su hipótesis presenta datos de dependencia de la cantidad de cosintetasa con la formación de uroporfirinógeno III (223,211)

La Uro'gen III cosintetasa no actúa directamente sobre el PBG como único sustrato, sino que necesita además la presencia de la fracción uro'gen sintetasa para dar el isómero III (202). El uroporfirinógeno I, producto de la sintetasa, tampoco es intermediario en la biosíntesis del isómero III (201-2). Es decir, que para la formación del isómero fisiológico normal deben coexistir el complejo sintetasa-cosintetasa y PBG. Bogorad informa, además, que polipirroles de cadena abierta se acumulan en las mezclas de reacción (224).

Estos datos llevan a Granick y Bogorad a presuponer que un compuesto formado por acción de la uro'gen sintetasa -quizás un tripirril metano- y otra molécula de PBG, son de algún modo reordenados por la uro'gen III cosintetasa para dar el uroporfirinógeno III (46,209,224).

En cuanto al mecanismo real de la formación de este compuesto asimétrico se postulan un gran número de especulaciones e hipótesis, las que son discutidas por varios autores (209,219,225-26). Muchas de ellas son ahora inconsistentes por el cúmulo de datos aportados y quedan solamente las que no han podido ser aún probadas experimentalmente.

Dalton y Dougherty muy recientemente realizan estudios de interacciones estéricas de ciertos supuestos intermediarios para esta transformación, utilizando modelos moleculares. Basándose en sus deducciones y en todos los datos experi

mentales acumulados hasta la fecha, proponen una nueva hipótesis para esta reacción secuencial, la que implica la formación de un tripirrol que se cicliza y que por reacción con otra molécula de PPG daría origen a las uroporfirinas (227).

Se sabe que los pacientes que padecen porfiria eritropoyética congénita excretan una cantidad exacerbada de uroporfirina I por orina, pero no se conoce cuál es la causa de este exceso.

Levin y colab. trabajando con hemolisados de eritrocitos de tales pacientes encuentran que la actividad de urogen III cosintetasa en hemolisados de tales enfermos es mucho menor que en individuos no porfíricos, confirmando los resultados obtenidos previamente con animales (228-9). Estas observaciones darían una explicación satisfactoria a la excesiva producción del isómero I en dicha enfermedad.

El grupo de Watson, por su parte, supone que este incremento se debería a un aumento de la actividad de la "urogen I sintetasa" (230).

4.- BIOSÍNTESIS DE COPROPORFIRINOGENO-DESCARBOXILASIS -

La naturaleza de los intermediarios tetrapirrólicos que llevan a la formación de protoporfirina, fue en las primeras búsquedas, bastante controversial.

La presencia de uroporfirina I y III y porfirinas con un menor número de grupos carboxilos, tanto en materiales biológicos de animales y humanos, como su acumulación en los sistemas de incubación y en los medios de cultivo de varios microorganismos, hicieron presuponer que las porfirinas podían ser intermediarios en este camino metabólico (41,56,83,103,194, 7,231-2).

Así, Salomon y colab. informan que preparaciones de médula ósea son capaces de convertir uroporfirina III C¹⁴ en hemo, observación confirmada por el grupo de Himington que incubando esta porfirina con hemolizado de eritrocitos de aves obtienen un 50% de transformación a protoporfirina aunque no logran observar la conversión neta de coproporfirina a la dicarboxilica (194,233).

Por otra parte, con la presencia de coproporfirinógeno en materiales biológicos, identificado por Fischer y Watson (11,234), consideraciones de la estructura química del PPG, como con el hallazgo de los intermediarios incolores de Granick y Bogorad y la incapacidad de utilizar diferentes isómeros de la uroporfirina como sustratos -demostrado por varios grupos de trabajo-, podría especularse que los porfirinógenos eran los verdaderos intermediarios biológicos. Es decir, los compuestos cuyos anillos tetrapirrólicos contienen 6 átomos más de hidrógenos que las porfirinas (42,55-6,147,225).

Las pruebas concluyentes de su intervención en esta secuencia metabólica son aportadas por Bogorad en 1955 y Neve y colab. en 1956, quienes incubando extractos de *Chlorella* y hemolisados de glóbulos rojos de aves, con uroporfirinógeno III, obtienen síntesis de copro y protoporfirina (55-6).

Posteriormente, esta participación se ve confirmada en muchos otros laboratorios (201,207,210,235-6).

Queda así, perfectamente establecido que las porfirinas no son los intermediarios reales, sino que son los productos de oxidación de las correspondientes leucobases.

La transformación de uroporfirinógeno a coproporfirinógeno requiere la eliminación de los cuatro grupos carboxilos de las cadenas laterales acéticas de los pirroles (Fig. 4), dando intermediarios con 7-, 6- y 5- grupos carboxilos. La demostración de la existencia de estos compuestos como productos enzimáticos en muy diversos sistemas de incubación sugirió que la descarboxilación procede en etapas y que los porfirinógenos poseyendo 7-, 6- y 5- grupos carboxilos son también intermediarios reales (46,225).

Esta participación tiene su comprobación experimental en nuestro laboratorio. Mediante experiencias de marcación isotópica, se demuestra que los porfirinógenos conteniendo 7-, 6- y 5- grupos carboxilos -isómeros III - se convierten en hemo actuando como intermediarios verdaderos de su biosíntesis y avalando todas las suposiciones formuladas (237-39).

Si bien la descarboxilación del uroporfirinógeno es un proceso secuencial no se conoce si se lleva a cabo por una o más enzimas ni si el mecanismo de eliminación de los cuatro carboxilos tiene un orden preferencial o es al azar.

Mauzerall y Granick logran aislar de hemolisados de eritrocitos de conejo una única fracción enzimática que descarboxila el uroporfirinógeno a coproporfirinógeno, por electroforesis zonal sobre almidón y a la que denominan "uroporfirinógeno-descarboxilasa". En sus incubados detectan, además, muy pequeñas cantidades de las porfirinas con un número intermedio de grupos carboxilos (201).

Con extractos libres de células de kh. spheroides Hoare y Heath obtienen resultados similares (210).

La enzima eritrocitaria tiene una alta afinidad por su sustrato, descarboxilando los 4 isómeros del uroporfirinógeno en el orden siguiente: III > IV > II > I, pero no actúa sobre las uroporfirinas. Los iones sulfito y ditionito, que forman complejos con los intermediarios de las di y las tetrahidroporfirinas, no la inhiben, descartándose que estas estructuras "porfometínicas" sean sustratos de la reacción enzimática. Esta descarboxilasa requiere grupos sulfhidrilos y anaerobiosis para su máxima actividad (201).

Urata y Kimura purificando las enzimas porfirinogénicas, presentes en eritrocitos de pollos, aislan una sustancia estable al calor y dializable que actuaría como cofactor en la descarboxilación de ciertos porfirinógenos (240).

Por su parte, Hoare y Heath presentan evidencias de un factor estable al calor que estimula la descarboxilación de los porfirinógenos formados por extractos ultrafiltrados de kh. spheroides a partir de PPG (197,210).

Recientemente, en nuestro laboratorio, se aísla una fracción altamente purificada de la descarboxilasa de eritrocitos de pollo a la que denominamos "porfirinógeno descarboxilasa", como una única entidad proteica con actividades diferenciales para los porfirinógenos con número variable de carboxilos (241-2).

La descarboxilación a coproporfirina es mayor si el uroporfirinógeno es generado enzimáticamente en el medio de incubación a partir de sus precursores inmediatos -ALA o PPG - que si es agregado exógenamente previa reducción de la porfirina correspondiente (220,242).

Las porfirinas, compuestos que exhiben una marcada absorción espectral en el visible y en el infrarrojo, son reducidas muy rápidamente por amalgama de sodio, en la oscuridad y en ausencia de aire, pero pueden ser fotoreducidas por agentes reductores suaves, tales como las diaminas terciarias.

En este proceso se comprueba la presencia de compuestos con diferentes niveles de oxidación y cuyas estructuras han sido propuestas por Mauzerall (203).

El nivel máximo de reducción da como producto los porfirinógenos o hexahidroporfirinas, con una banda de absorción cercana a los 220 nm y que caracteriza a los núcleos porfíricos, mientras que en los estados intermedios se detectan las tetrahidroporfirinas, con una banda a 550 nm y las dihidroporfirinas, con bandas a 440 y 735 nm.

La reoxidación se produce muy fácilmente en contacto con aire o por tratamiento con solución acuosa de iodo.

Mauzerall y Feher demuestran también la presencia de un radical libre del tetrapirrol que representa, probablemente la estructura de una uroporfirina con un electrón adicional el cual posee una amplia banda de absorción en la región del visible (243).

5.- BIOSINTESIS DE PROTOPORFIRINA - COPROPORFIRINOGENASA

Coproporfinógeno III, producto de la etapa anterior, se convierte en protoporfinógeno, por descarboxilación y deshidrogenación específica de dos de las cadenas propiónicas laterales, las que son transformadas a grupos vinilos. La pérdida posterior de 6 átomos de hidrógeno del macrociclo da como resultado protoporfirina 9 (Fig. 4). Este es el producto último de la cadena tetrapirrólica y el componente clave en el camino divergente de clorofilas y hemoproteínas.

En esta etapa el precursor directo es también el derivado hexahidrogenado de la coproporfirina III (244-5). Tanto Bernard como Falk han demostrado primariamente, que los glóbulos rojos nucleados forman protoporfirina cuando son incubados aeróbicamente, mientras que en anaerobiosis sólo sintetizan

coproporfirina (194,296).

Por otra parte, se ha comprobado que las fracciones solubles de diferentes células animales son capaces de sintetizar porfirinas conteniendo más de 4 grupos carboxilos, pero no protoporfirina, a menos que se le adicione al sistema la fracción particulada (165,195,244-5,247-9). Todas estas evidencias permiten concluir que el sistema enzimático responsable de este paso, en células animales, está localizado en mitocondria. En vegetales y microorganismos, también se lo encuentra asociado a partículas subcelulares (98,195,250-4).

Sano y Granick estudiando su distribución en diferentes tejidos de conejos y cobayos comprueban que el hígado y la médula ósea son los que poseen mayor actividad (255).

Hasta el momento no se conoce si la reacción total catalizada por el sistema coproporfirinógeno oxidasa descarboxilante (coprogenasa) es llevada a cabo por una o más enzimas y cuál es el mecanismo y secuencia en el proceso de descarboxilar y oxidar las dos cadenas laterales.

Varios grupos de investigadores han estudiado los requerimientos y características de este sistema enzimático.

Si bien se lo detecta en la mayoría de los organismos vivientes, sólo se lo ha purificado de mitocondrias e hígado mamífero, de donde se lo ha separado como una única entidad proteica, caracterizado electroforéticamente (255+59).

La reacción enzimática total requiere oxígeno molecular como único aceptor de hidrógeno y no se ha logrado otro oxidante que lo reemplace, ya sea aceptor de electrones artificial o biológico (255,258-9).

Lascelles y colab., examinando cultivos de *Rhodospseudomonas spheroides*, bajo diversas condiciones ambientales, comprueban que el oxígeno suprime la producción de bacterioclorofila y que estas bacterias, crecidas anaeróbicamente, conservan la capacidad de biosintetizar hemo para satisfacer sus necesidades hemoproteicas funcionales.

Para explicar esta divergencia, Lascelles postula la necesidad de algún otro compuesto oxidado, generado por el sistema fotosintético, que lleve a cabo la descarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno en ausencia de oxígeno (103).

Por su parte, Mori y Sano demuestran la conversión de coproporfininógeno a protoporfirina en extractos de bacterias fotosintéticas estrictamente anaeróbicas sólo cuando son incubados en aerobiosis. Este requerimiento no puede ser reemplazado por los diversos aceptores de electrones ensayados.

Ehteshamuddin, en contraposición, informa la síntesis anaeróbica de protoporfirina no dependiente de aceptores exógenos, por extractos sonicados de *Pseudomonas spheroides* crecidas aeróbicamente (251).

Muy recientemente, Tait logra determinar actividad de coprogenasa en incubaciones realizadas anaeróbicamente, de extractos totales e *Rh. spheroides* crecidas bajo condiciones fotosintéticas, siempre que se le adicione al sistema: metionina, iones Mg y ATP (254).

Tait concluye que sus extractos son capaces de sintetizar un aceptor de electrones, no identificado, que puede sustituir al oxígeno en la biosíntesis de protoporfirina.

De las preparaciones purificadas de mitocondrias de hígado mamífero, no se han aislado ni detectado cofactores necesarios para esta transformación.

Esta enzima no es inhibida por cianuro, iodo acetamida y dinitrofenol. Sí lo es por δ -fenantrolina y α, α' -dipiridilo pero no por otros quelantes, pudiendo ser reactivada por lisis, lo que sugiere un metal unido firmemente a la enzima (255,259).

La coprogenasa de levadura no es inhibida por los reactantes de iones metálicos.

Los resultados obtenidos con microorganismos suponen un rol importante para el hierro en esta reacción, ya que se observan una acumulación de coproporfirina, cuando las bacterias crecen en condiciones de deficiencia de este metal. Las incubaciones realizadas con ALA o PBG y extractos bacterianos llegan sólo hasta coproporfirina III, excepto si se le adicionan iones ferrosos al sistema, sintetizando entonces, protoporfirina (73,83,260).

En plantas superiores no se ha observado en cambio, la necesidad de hierro para esta conversión (98).

La coenzima *b* es un cofactor involucrado directa e indirectamente en

esta etapa, para el ciliado *Tetrahymena vorax*, ya que células deficientes en ácido pantoténico y en presencia de hierro, biosintetizan coproporfirina, mientras que las normales son capaces de formar protoporfirina (83).

Porra y Falk informan la presencia de porfirinas que estarían unidas a las proteínas durante la reacción catalítica (256).

La enzima es específica para coproporfirinógeno III y no transforma los isómeros I o II ni la coproporfirina III (244,255-6,261).

Preparaciones de *Euglena* y mitocondrias de hígado vacuno son capaces de utilizar coproporfirinógeno IV - isómero no biológico - como sustrato, aunque muy pobremente (40,252).

Esta especificidad estructural, así como la de la enzima descarboxilante, encontrada en diferentes células, asegura la producción de un solo tipo de protoporfirina en la naturaleza, el número 9, de la serie isomérica III.

Sano y Granick detectan un intermediario que suponen poseería tres cadenas propiónicas y una vinílica. Este derivado aparece en el medio de incubación, desapareciendo a medida que prosigue la reacción enzimática.

La existencia de un intermediario tricarbóxico -cuya naturaleza se desconoce- ha sido ya sugerido para el camino metabólico del hemo, puesto que un compuesto que se comporta cromatográficamente como tricarbóxico aparece en algunos sistemas de incubación y lo encontramos nosotros entre las porfirinas presentes en la glándula de Harber (165,195).

Porra y Falk encuentran que el 4-monopropiónico-deuteroporfirinógeno 9 un derivado tricarbóxico, puede ser convertido a un compuesto dicarbóxico que suponen es el 4-monovinil derivado (252).

No son utilizados como sustratos los hematoporfirinógenos, el 2,4-diacético-deuteroporfirinógeno, el trans 2,4-liacrílico-deuteroporfirinógeno ni el monopropiónico-deuteroporfirinógeno (255,262).

Experimentos previos realizados con agua tritiada sugirieron que la oxidación y descarboxilación ocurrirían simultáneamente y Granick propone como hipótesis tentativa que la oxidación de las cadenas propiónicas procedería por eliminación de un ión hidruro, con liberación simultánea de CO₂, sin

embargo, este mecanismo no tendría en cuenta el requerimiento de oxígeno (263).

Sano, posteriormente, sintetiza un derivado oxidado, el 2,4 bis[3]hidroxipropionato-deuteroporfirinógeno y encuentra una transformación a protoporfirina del 25%, con su sistema enzimático mitocondrial (264). Puesto que el sutrato es una mezcla de estereoisómeros, esta conversión implica una alta especificidad isomérica de la enzima. Comprueba además, que la transformación se produce tanto en aereo como en anaerobiosis, lo que le hace suponer que el oxigeno se requiere sólo, para la formación de los supuestos intermediarios oxigenados. De aquí que el compuesto hidroxilado sería el resultado de una reacción de tipo oxigenasa sobre el coproporfirinógeno III, el que se deshidrataría para dar un acril-derivado y finalmente se descarboxilaría.

La participación de un compuesto di-acrílico intermediario, ya propuesto como isómero cis - estaría avalada por algunos hallazgos experimentales (255,257). Así, se ha demostrado que el derivado trans-diacrílico no actúa como sustrato y que el ácido fumárico no inhibe la reacción, mientras que el ácido maleico sí lo hace (259).

Una descarboxilación simultánea o no, de estos compuestos transitorios daría origen a protoporfirinógeno, otro intermediario que ha sido detectado en sistemas de incubación y cuya posterior oxidación -enzimática o espontánea- produciría la protoporfirina 9 (255-6).

Muy recientemente, Schiefer informa que la mayor actividad enzimática de síntesis de proto y hemo, a partir de ALA y fracciones celulares de hígado de rata, se encuentra en el citoplasma. Sus datos avalarían el concepto de que las porfirinas mitocondriales son sintetizadas en el citoplasma y transferidas posteriormente a la mitocondria (265).

6.- BIOSÍNTESIS DE HEMO - QUELATASA

Esta etapa es el caso de bifurcación que lleva a la biosíntesis de hemoproteínas o de clorofila, dependiendo del ión metálico que se inserte en el anillo tetrapirrólico ya oxidado.

Las porfirinas forman quelatos metálicos extremadamente estables, especialmente con los elementos de transición: Fe, Co, Zn, Cu, Ni, etc. (11,266).

Sin embargo, la velocidad de formación del complejo metálico varía ampliamente con las condiciones experimentales. Así, en soluciones acuosas a pH neutro y 38°C el ión ferroso coordina espontáneamente con los átomos de nitrógeno de los pirroles de la protoporfirina y el rendimiento se ve favorecido si la porfirina coloidal, se encuentra monomolecularmente dispersa por acción de agentes tensioactivos (166,267). No ocurre lo mismo con el ión Mg, requiriéndose un proceso especial para la obtención de este complejo (266).

Los porfirinóenos, en cambio, no pueden unir metales puesto que son anillos tetrapirrólicos con puentes metilénicos.

Se supuso, consiguientemente, que en el proceso de biosíntesis, el metal sería incorporado al núcleo tetrapirrólico, con un estado de oxidación equivalente al de las porfirinas (266).

La facilidad de la quelación del Fe^{++} con la protoporfirina hizo pensar en una reacción no enzimática, sin embargo, el hecho de que existan microorganismos que requieren hemina como factor de crecimiento y que no puede ser reemplazada por la adición de hierro y protoporfirina al medio de cultivo, condujo a la búsqueda de la enzima (268-71).

Esto fue tarea ardua, por cuanto diferentes condiciones que favorecen la quelación, lo hacen en ambos mecanismos: químico y enzimático.

Si bien la incorporación de hierro se demostró muy tempranamente en una cantidad de sistemas de incubación con diferentes extractos, es a partir de 1960 y por diferentes grupos de investigadores, que se logra aislar y purificar la enzima quelante, denominada "protohemo-hierro-liasa", "hemo-sintetasa" o simplemente "quelatasa".

Ha sido encontrada en mitocondrias de hígado de rata, de eritrocitos de aves (268-4) y en extractos de levaduras y bacterias (275-82), siempre asociada a partículas subcelulares, pudiéndose la solubilizar por dispersión mecánica o agentes activantes de superficie.

Recientemente, se la ha ubicado también en cloroplastos y proplástidos de diferentes vegetales (283-5).

Jones presenta evidencias de su localización en la membrana interna de

las mitocondrias de hígado de ratas, un hallazgo que es confirmado por el grupo de Mc Kay (120,236).

Neuberger y Traut encuentran en los cromatóforos de Rh. Spheroides y en diversos tejidos de mamíferos, una enzima que cataliza la incorporación de zinc en la protoporfirina 9, la que es inhibida competitivamente por iones ferrosos. Sin embargo, esta enzima exhibe la característica particular de quelar iones ferrosos, si se le añade ácido ascórbico a la mezcla de incubación (275). Posteriormente, Mazanowaka y colab. explican que el efecto diferencial de quelación de la enzima bacteriana con el Zn y el Fe, se debe a la presencia de peróxidos en el ensayo enzimático, el que elimina el agente reductor necesario para el Fe^{2+} (281).

Ciertas cepas de levaduras acumulan, intracelularmente, complejos de Zn-protoporfirina, en determinadas condiciones (287).

Otro de los metales que puede ser insertado enzimáticamente es el Co^{2+} y que es específico para bacterias que sintetizan vitamina B_{12} (278).

El mecanismo de la reacción que cataliza la ferroquelatasa y su regulación son todavía muy poco conocidos.

La presencia de los grupos vinilos en la porfirina dicarboxílica es una condición necesaria para la enzima que biosintetiza hemo, la que ha sido demostrada por Granick y Gilder en sus estudios con Hemophilus influenza. Estos microorganismos requieren para crecer hemo o protoporfirina y hierro, los que no pueden ser reemplazados por meso o deuterohemo, o dichas porfirinas con el ión metálico (279).

Sólo las fracciones purificadas o envejecidas requieren agentes reductores, tales como cisteína o GSH como cofactor y tienen máxima actividad en anaerobiosis, necesitándose agentes solubilizantes del tipo quelatos o Tween (268,271,273,281,286).

Las porfirinas dicarboxílicas pueden ser sustratos de la enzima de diferentes orígenes, no así las tetracarboxílicas, ni el protoporfirinógeno (271). Todos estos hechos presuponen una mayor selectividad de la enzima hacia el metal que hacia el tipo de porfirina, por cuanto la célula sólo le

ofrecerá la protoporfirina y en cambio debe elegir el ión ferroso para satisfacer los requerimientos hemoproteicos, entre los diversos iones metálicos presentes.

Borra y Falk detectan la presencia de intermediarios unidos a proteínas que podrían estar relacionadas con esta biosíntesis (258).

Schwartz observa que la adición de globina incrementa varias veces la actividad de la quelatasa de glóbulos rojos (272). En concordancia con estos resultados la protoporfirina unida a proteínas es más fácilmente incorporada a hemo que la protoporfirina libre. Se cree que el efecto es de solubilizar el sustrato (288).

Labbe y colab. informan que partículas mitocondriales de levaduras, carentes de lípidos, tienen escasa actividad de ferroquelatasa, la que puede ser incrementada por el agregado de fosfolípidos, efectos ya observados para la enzima bacteriana y la de mitocondrias de mamíferos (273,281-3).

El rol de los lípidos sobre esta enzima ha sido objeto de estudios en diversos laboratorios y recientemente, en forma muy amplia por el grupo de Yoneyama (289). Estos investigadores sugieren que como el sustrato no es soluble en soluciones acuosas neutras, grupos hidrofóbicos de moléculas fosfolípicas, que forman parte de la enzima quelante, atraerían la porfirina y repelerían a las moléculas de agua, mientras que los grupos ácido-fosfóricos hidrofílicos, atraerían el ión ferroso, el que sería luego transferido a la región hidrofóbica y atrapado por la protoporfirina.

En cuanto a la bifurcación del camino hacia clorofila, la etapa de inserción de magnesio al anillo tetrapirrólico no ha podido ser aún demostrada en los diversos sistemas ensayados, ya sea que se trabaje con células enteras o rotas. Sin embargo, se presupone su existencia, por cuanto ciertas mutantes de *Chlorella* acumulan protoporfirinas, Mg,-proto 9 y Mg-monometil éster-proto porfirina 9(103,209,290-1).

7.- DISTRIBUCION DE PORFIRINAS EN LA NATURALEZA

La gran concentración de porfirinas en la glándula de Harder es una

característica notable de los roedores. Sin embargo, esta acumulación no es la única que se conoce. En la naturaleza, las porfirinas pueden encontrarse tanto libres como en forma de complejos metálicos. De estas últimas derivan las metaloproteínas funcionales.

Las porfirinas libres, es decir, no ligadas a metales, de mayor abundancia son: la protoporfirina 9 y los isómeros I y III de la uro y coproporfirinas. En pequeñas cantidades todas ellas aparecen en la mayoría de los tejidos y órganos de animales -incluyendo el sistema nervioso - y en materiales de excreción biológicos, donde se hallan incrementadas en determinadas condiciones patológicas (46,58,292-3).

En ciertas especies, tanto de animales como de vegetales, aparecen acúmulos de diversas porfirinas. Así, en los nódulos de las raíces de plantas leguminosas y otras plantas superiores se observan relativamente grandes cantidades de proto y coproporfirinas libres (11,294,5).

Uroporfirina se encuentra en la caparazón de los moluscos, en las zonas de calcificación ósea de fetos y en planarias, animales sensibles a la luz (296-7).

Esta porfirina se encuentra, también, en formas de agregados, en las áreas pigmentadas de la cáscara de huevos de diversas especies de pájaros, la que se deposita en el momento de formación de las mismas. La yema de huevo tiene también protoporfirina (46,266).

Coproporfirina III y protoporfirina 9 se encuentran en algunos invertebrados marinos (293,298).

Diversos microorganismos, bajo condiciones determinadas, excretan grandes cantidades de porfirinas, principalmente como coproporfirina, aunque en algunos casos se las detecta como coproporfirinógeno (46,103,209,299-300).

El ciliado *Tetrahymena geleri*, produce protoporfirina lo que le produce un cambio de color (301).

En condiciones normales, el esqueleto óseo de la mayoría de los animales no contiene apreciable cantidad de porfirinas, mientras que en condiciones patológicas, como la de porfiria congénita presentan fluorescencia y un color marrón, debido a la uroporfirina depositada. El de la ardilla, normalmente tiene un

color oscuro, y cuando se lo observa bajo luz U.V. presenta la fluorescencia roja característica de las porfirinas (293).

Las plumas de las aves del Turaco - un ave del Africa Central - contienen un derivado metálico porfirínico denominado turacina. Esta sustancia es la que imparte a sus alas un brillante y hermoso color rojizo (302-306). Su composición es fundamentalmente uroporfirina III - como complejo de Cu - conteniendo una muy pequeña cantidad de firiaporfirina.

Borg y Catzias presentan evidencias de la presencia de un complejo Mn-porfirina en la sangre de estas aves (307).

La existencia de complejos porfirínicos de Zn, principalmente protoporfirina, ha sido demostrada en ciertas mutantes de levaduras (287).

Se han identificado también, otros complejos metálicos como las vanadio porfirinas en los aceites de esquistos.

Como complejos de hierro y magnesio, forman parte de grupos prostéticos de importantísimas cromoproteínas biológicamente activas tales como hemoglobinas, mioglobinas, eritrocruorinas, peroxidasas, catalasas, citocromos, clorofilas, bacterioclorofilas, etc. (45,266,293).

Las metaloporfirinas más importantes en el reino animal son, sin duda, los complejos de hierro, en las que la naturaleza ha aprovechado el cambio de valencia del estado férrico a ferroso y viceversa, para establecer un sistema de transporte de electrones, conectando las deshidrogenasas intracelulares con el oxígeno atmosférico, o uniéndose a proteínas, sin cambios de valencia del átomo de Fe, posibilitando su función de transportadores de O_2 o de reserva.

En esta enumeración, sólo se han presentado algunos de los muchos trabajos relacionados con la presencia de estos pigmentos en la naturaleza. Existen sobre este tema excelentes puestas al día (11,45,266,287,298).

PROPOSITOS

La glándula de Harder de rata presenta una acumulación anómala de porfirinas. El mecanismo de este acúmulo y su posible función fisiológica, es aún desconocida.

Como se ha comentado en la Introducción, la génesis de estos pigmentos dió lugar a una gran controversia. Si bien se había demostrado que la glándula era capaz de sintetizar tetrapirroles a partir de δ -ALA, y por lo tanto se sugería una función secretora, no se conocía, al inicio de este trabajo, la naturaleza de los productos, ni si las secuencias metabólicas que conducen a la síntesis de protoporfirina 9 eran similares a las de otros tejidos estudiados.

Por lo tanto, con el objeto de dilucidar este camino metabólico, debido a las funciones primordiales que cumplen las hemoproteínas en la actividad celular se encaró:

1) el estudio de la biosíntesis de proto 9 a partir de sus precursores primarios, así como la determinación y caracterización de cada una de las etapas relacionadas con esta secuencia.

Como parte de un trabajo comparativo de las actividades catalíticas de las enzimas relacionadas con este camino, para tratar de aclarar el mecanismo responsable de la acumulación observada en la glándula se decidió:

2) aislar, purificar y estudiar las propiedades de la enzima δ -ALA dehidratasa.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS

I.- S U S T R A T O S , P R O D U C T O S Y S U S T A N C I A S P A T R O N E S

Gli 2-C¹⁴: adquirida comercialmente en New England Corp. Mass.

Actividad específica: 3,0 mc/mmol

Succinil CoA: se prepara a partir de anhídrido succínico y CoASH según el método de Simon y Ghemin(308).

Coenzima A: de Sigma Chemical Co. (75%) grado p.a.

Anhídrido succínico: se prepara a partir de ácido succínico y anhídrido acético, ambos grado analítico (309). El producto obtenido de P.F.: 118°-120°C con descomposición a 175°-178°C, se guarda en desecador al vacío.

Preparación de succinil CoA:

Se realiza el mismo día de su utilización como se detalla:

10 mg de CoASH se disuelven en 5,7 ml de H₂O destilada fría y se neutraliza a pH 7-7,5 con CO₃HNa sólido. Se agregan 1,2 mg de anhídrido succínico, se mezcla y se deja estar en baño de hielo, aproximadamente 30 min.. Se controla la formación del compuesto por la reacción cualitativa del nitroprusiato en medio alcalino, sobre placa de toque (desaparición de la coloración roja característica de los grupos sulfhidrilos libres) (310). Debe usarse de inmediato.

La determinación cuantitativa del acil-CoA formado se hace por el micrométodo de Lipmann y Tuttle (311). El método consiste en la formación del hidroxamato del ácido succínico por adición de hidroxilamina, que con Cl₃Fe en medio ácido da un cromógeno que se lee a 540 nm. Se hace la curva de calibración con anhídrido succínico como patrón.

δ-ALA-HCl: obtenido comercialmente de Sigma Chemical Co.

δ-ALA-4 C¹⁴: adquirido en New England Corporation Mass.

actividad específica: 3,1 mc/mmol.

Porfobilinógeno: Se aísla de orinas de una paciente que padece porfiria intermitente aguda y se lo purifica por el método de Cookson y

Rimington (150). Se lo obtiene como monohidrato y se lo conserva en la oscuridad a 4°C. Se lo identifica por los cristales, punto de fusión (179°C-184°C con descomposición) y la reacción característica con el reactivo de Ehrlich (152).

Porfirinas

Uro III: se aísla de plumas de Turaco por extracción directa de las porfirinas con la mezcla esterificante y purificación por cromatografía de adsorción.

Uro I y Copro I: provenientes de orina de porfiria congénita.

Firia III: aislada de orinas de conejos saturnos.

Proto 9: se aísla de hemoglobina según la técnica de Grinstein (312).

Todas las porfirinas se reconocen por sus cristales, puntos de fusión y espectros característicos.

I I.- O B T E N C I O N D E P O R F I R I N A S

Las orinas provenientes de humanos o animales porfíricos, se llevan a pH 3 - 3,5 con HCl concentrado. Una vez ajustados a pH se pueden seguir dos técnicas:

a) Se extraen las porfirinas contenidas en la orina con un volumen de acetato de etilo. Este proceso puede repetirse hasta 3 ó 4 veces según la cantidad de material presente, controlándose siempre la fluorescencia. Se reúnen los extractos orgánicos y se extraen con HCl 10% en pequeños volúmenes, hasta fluorescencia negativa bajo luz U.V.

Para purificar los pigmentos se ajusta nuevamente el pH del extracto clorhídrico a 3 - 3,5 con acetato de sodio sólido y se reextraen con acetato de etilo. Estas fracciones reunidas se lavan, generalmente 2 veces, con volúmenes pequeños de agua destilada. Si los lavados contienen porfirinas se las recupera con acetato de etilo previo llevado a pH gris del Rojo Congo, y se las combina con las anteriores. Del extracto total orgánico se extraen finalmente con HCl 10% y se puede determinar su concentración por medición espectrofotométrica directa o por dilución de las soluciones en ese medio.

Generalmente, el volumen final de extracción es pequeño y se obtiene la precipitación de las porfirinas libres por ajuste del pH al punto isoeléctrico (3 - 3,5) y reposo en frío.

Las porfirinas se centrifugan, se lavan con agua destilada llevada a ese pH, se secan en desecador al vacío y conservan en la oscuridad sobre Cl_2Ca . El proceso de purificación mediante extracciones y precipitación se realiza, en ocasiones, varias veces para eliminar impurezas.

b) Se agrega a las orinas llevadas a pH una cantidad de talco variable según las porfirinas presentes, que permite la adsorción casi selectiva de éstas. Se mezcla, se deja reposar 10 min. y se filtra por Büchner al vacío. Si el sobrenadante presenta fluorescencia bajo luz U.V. se le adiciona nuevamente talco, continuándose con la misma técnica hasta que no sea visible más fluorescencia. Nacht determinó que la cantidad necesaria de talco varía entre 20 y 50 gramos por litro de orina, según la concentración del material a adsorber (313).

El talco prensado, se seca con vacío durante 15-30 min. y luego se coloca en estufa a baja temperatura para completar el secado.

El material así obtenido está listo para el proceso de esterificación posterior, que se detalla más adelante (sección VII-2). Luego de la esterificación se cromatografían en columnas de CO_3Ca , se separan y cristalizan por concentración de metanol-cloroformo según técnicas usuales (314).

I I I .- ANIMALES

Para la obtención de las glándulas de Harder empleadas en todos los estudios aquí presentados, se utilizaron ratas blancas tipo Wistar de ambos sexos supuestamente normales, salvo indicación especial. Cuando se necesitó gran cantidad de tejido para la aislación y purificación de enzimas, se usaron las cabezas decapitadas de ratas blancas cedidas por los laboratorios de Fisiología de la Facultad de Ontología, y de Histología de la Facultad de Medicina, previo congelamiento de las mismas para su traslado y hasta su manipulación. Generalmente se prefirieron animales machos de 200-300 g de peso, por el mayor tamaño de la glándula. Sin embargo, en las experiencias de medición de actividad de β -ALA-sintetasa se trabajó con animales jóvenes, oscilando su peso entre 130 y

150 gramos.

I V . - O B T E N C I O N D E L M A T E R I A L

Después que las ratas son muertas por dislocación cervical y decapitadas para su exsanguinación, se lleva a cabo la disección de las glándulas a temperatura ambiente. Para ello, se efectúa una incisión paralela al borde orbital superior hasta el ángulo anteromedio del ojo con un bisturí, cortando la fascia unida al margen medio y superior de la órbita, la membrana nictitante y la conjuntiva. Como la glándula de Harder ocupa la porción más profunda del ojo, detrás del globo ocular, sólo se ve con este corte, una pequeña porción en la parte superior. Con una pinza ocular se procede entonces, a quitar la fracción de glándula expuesta, e introduciendo la pinza entre el borde orbital superior y el globo ocular, por debajo de éste y mediante una leve tracción se extrae toda la glándula. Esta operación se hace tan rápidamente como sea posible, teniendo cuidado de excluir tejidos extraños y controlando bajo luz ultravioleta la fluorescencia roja del material a disectar para asegurar así una total remoción. Las glándulas se lavan inmediatamente con solución fisiológica fría y se secan con papel de filtro para eliminar la pequeña cantidad de sangre que a veces está presente por rotura de vasos sanguíneos. Después de pesar el material se congela en el refrigerador a -16°C , salvo indicación especial.

V.-P R E P A R A C I O N D E L O S S I S T E M A S E N Z I M A T I C O S

Las glándulas de Harder disectadas y congeladas, se muelen en un mortero de porcelana previamente congelado, con una pequeña cantidad de arena blanca, muy fina, libre de metales. Para ello se trata la arena con HCl concentrado caliente durante unas horas (2-4 hs.), se decanta y se repite la operación hasta que no se observa coloración amarilla. Luego se lava con agua destilada hasta reacción de cloruros negativa.

Este método de molido con arena y sin líquido, resulta más conveniente que la homogeneización del tejido con homogeneizadores de vidrio tipo Elvehjein

por su maniabilidad y rapidez. A continuación, las glándulas molidas se homogeneizan con las diferentes soluciones de acuerdo a las preparaciones requeridas y a los ensayos a realizar.

a) Homogenato total: Se homogeneiza el tejido (molido) con buffer Tris 0,05 M pH 7,2 ó buffer fosfato 0,134 M pH 6,8 ó sacarosa 0,25 M en una relación de 10 ml por cada gramo de tejido fresco. Se centrifuga a 700 x g durante 15 min en una centrifuga refrigerada y el sobrenadante obtenido se utiliza como "extracto crudo" u "homogenato total".

b) Mitocondrias : A partir de los homogenatos en sacarosa 0,25 M se obtienen las mitocondrias por centrifugación diferencial, usando esencialmente el método de Schneider y Hogeboom (315). El pH se mantiene neutro por adición de CO_3HNa . El precipitado mitocondrial se lava con la misma solución de sacarosa, eliminando el material no sedimentado. Para su uso, fundamentalmente en la medición de la actividad de δ -ALA-sintetasa, las mitocondrias provenientes de un gramo de tejido glandular se resuspenden en 0,5 ml de una solución que contiene sacarosa 0,25 M, buffer Tris 0,05 M pH 7,2, tioglicolato de sodio 0,02 M y EDTA 0,005 M. Esta suspensión se agita mecánicamente por 15-30 min. en cámara fría y se usa de inmediato.

c) Microsomos: El sobrenadante anterior se centrifuga a 78.000 x g durante una hora. El sedimento se suspende en el menor volumen de buffer correspondiente al ensayo a realizar.

d) Sobrenadante libre de mitocondrias: La solución resultante de la obtención de mitocondrias por centrifugación del homogenato a 11.000 x g durante 30 min. se utiliza como "extracto libre de mitocondrias" y se conserva en congeladora a -16°C hasta su uso.

e) Preparación de succinil CoA sintetasa: Se prepara esta enzima según la técnica de Kaufman y Alivisatos, esencialmente (316).

e₁) Polvo cetónico: se parte de hojas frescas de espinaca (5 kg.) homogeneizándolas con 20 volúmenes de acetona en frío. Se filtra muy rápidamente por Büchner y se lava el precipitado con acetona fría. El polvo seco se conserva en desecador, en cámara fría.

e₂) Purificación: Se extrae la enzima con buffer fosfato 0,017 M pH 7,4

y se hace un fraccionamiento salino con sulfato de amonio, conservando el que precipita entre 50 y 67% de saturación. El precipitado se disuelve con el mismo buffer y se hace un fraccionamiento con acetona entre 44 y 54%. Este precipitado centrifugado se conserva en desecador y es el que se utiliza como fracción enzimática de succinil CoA sintetasa. La determinación de la actividad específica de nuestra preparación enzimática con el sistema de Kaufman (316), dió un valor promedio de 0,6 μ moles/mg, en 30 min. de incubación.

VI. - SISTEMAS DE INCUBACION

a) Actividad de δ -ALA sintetasa:

La mezcla de incubación standard contiene: 40 μ moles de glicocola, 5 μ moles de succinato, 0,5 μ moles de succinil-Coenzima A, 0,5 μ moles de ATP, 0,25 μ moles de fosfato de piridoxal, 60 μ moles de ClK, 12 μ moles de Cl_2Mg , 100 μ moles de buffer Tris pH 7,2, glicocola 2- C^{14} ($5,97 \times 10^5$ cpm) y suspensión mitocondrial o las diferentes fracciones enzimáticas según se describen en los ensayos, en un volumen total de 2 ml.

Las suspensiones mitocondriales contienen aproximadamente 45 mg de proteínas por ml.

Las mezclas se colocan en erlenmeyers de 25 ml tapados muy flojamente con algodón, se incuban en baño termostatzado a 37°C con agitación mecánica, generalmente 30 min. a 1 hora. Al final de la incubación se agrega un exceso de 100 veces el sustrato no marcado (Gli), se detiene la reacción con ácido tricloroacético 10% o por calentamiento a 100°C durante 2 minutos y se valora el producto formado: ácido δ -aminodevúlico (δ ALA) como pirrol, según se describe en sección VII-b.

b) Actividad de δ ALA-dehidratasa:

Todos los ensayos de rutina para medir la actividad de esta enzima en anaerobiosis (2a. parte de Resultados) se realizan en tubos de Thunberg.

La mezcla de incubación en un volumen final de 2 ml contiene 134 μ moles de buffer fosfato pH 6,6, 20 μ moles de cisteína y las diferentes preparaciones enzimáticas obtenidas en el proceso de purificación. En el brazo lateral del

tubo de Thunberg se colocan 5 μ moles de δ -ALA neutralizada a pH 6,8.

Las mezclas se preincuban por 1 hora a 38°C en vacío para activación de la enzima. Se inicia la reacción mezclando el sistema y se incuba anaeróbicamente a 38°C por diferentes tiempos, con agitación mecánica. En los ensayos de control se reemplaza la fracción enzimática por otra hervida. Después de detener la reacción según se verá en sección VII-c, se determina la cantidad de PBG formado.

En los ensayos de la primera parte de Resultados, el sistema conteniendo buffer fosfato 0,067 M pH 7,0, 12 μ moles de Cl_2Mg , 60 μ moles de ClK , 5 μ moles de δ -ALA y las diferentes fracciones enzimáticas según se indican, se incuba en aerobiosis a 38°C, salvo indicación especial.

c) Actividad biosintética de porfirinas:

La mezcla de reacción estándar contiene 100 μ moles de buffer Tris pH 7,2 60 μ moles de ClK , 12 μ moles de Cl_2Mg , 5 μ moles de δ -ALA ó 2,5 μ moles de PBG como sustratos y 1 ml de homogenato total o de sobrenadante libre de mitocondrias en un volumen total de 4 ml. El sistema se incuba a 37°C en aerobiosis por tiempos variados entre 30 min y 24 horas y se determinan las porfirinas formadas. Cuando las incubaciones se llevan a cabo en anaerobiosis, se utilizan erlenmeyers con cierre esmerilado y provistos de un sistema para burbujeo constante de nitrógeno. Otros agregados y condiciones de ensayo se especifican en cada experiencia. En algunos estudios se usó δ -ALA- C^{14} para detectar variaciones muy leves en el contenido de porfirinas causadas por una baja biosíntesis.

d) Actividad total de la cadena biosintética:

El sistema de incubación es similar al de la sección (a) excepto que se utiliza como fracción enzimática, 1 ml de homogenato total, que se obtiene homogeneizando las glándulas con la misma mezcla de la suspensión mitocondrial (Ver sección V-b). El tiempo de incubación es de 4 horas a 37°C en aerobiosis. En estos ensayos se determina la actividad total midiendo la incorporación de $Gli\ 2-C^{14}$ en la protoporfirina 9, producto final de esta secuencia metabólica.

e) Actividad de succínico deshidrogenasa:

Se mide la actividad de succínico deshidrogenasa en mitocondrias de la

glándula de Harder, con el siguiente esquema de incubación: 100 μ moles de succinato de sodio, 30 μ moles de cianuro de potasio neutralizado, 3 μ moles de azul de metileno, 300 μ moles de buffer Tris 0,1 M pH 7,0 y agua destilada para tener un volumen de 3 ml. En el codo lateral del frasco de Warburg se coloca 1 ml de la fracción mitocondrial suspendida en el mismo buffer y se sigue la técnica manométrica dejando estabilizar durante 10 min. a 37°C. Se inicia la reacción mezclando el sistema y se leen cada 10 min. las variaciones de presión en el manómetro (317-18). Estas mediciones se efectuaron en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Campomar).

VII. - MEDICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS

a) Determinación de proteínas:

Las concentraciones de proteínas de las diferentes fracciones se evalúan por el método de Lowry (319) y/o por el método de Warburg y Christian (320), cuando ello es posible. Estos dos métodos dan resultados casi idénticos con soluciones enzimáticas diluidas - efluentes de columnas cromatográficas - por lo que se adopta el método de absorción en U.V. como análisis de medición de proteínas rápido, para esas fracciones.

La curva de calibración se hace utilizando albúmina de suero bovino cristalina como patrón.

b) Determinación de δ -ALA:

Debido a la pequeña actividad de δ -ALA sintetizada detectada en las mitocondrias de las glándulas de Harder de ratas y por ende, a la muy leve cantidad de δ -ALA generado enzimáticamente en los sistemas de incubación fue necesario modificar el método de Mauzerall y Granick (321) para evaluar el producto formado. Este método se basa en la medición del complejo coloreado que con el reactivo de Ehrlich da el derivado pirrólico que se genera por una reacción de condensación tipo Knorr entre acetilacetona y δ -ALA.

Las mezclas de reacción, que generalmente contienen mitocondrias, se desproteinizan por calentamiento a 100°C durante 2 minutos y se centrifugan obteniéndose una solución clara. A alícuotas de 1 ml de esta solución se le agregan

0,6 ml de acetato de sodio 1 M y 0,1 ml de ácido acético para dar el pH correspondiente a la reacción de condensación. Se agrega luego 0,05 ml de acetyl acetona y se completa a 2 ml con buffer acetato 0,1 M pH 4,6. El δ -ALA se convierte en el derivado pirrólico correspondiente - el 2-metil 3-acetil pirrol, 4-ácido propiónico - por calentamiento durante 10 min. en un tubo cerrado, en baño de agua a ebullición. Después de enfriar a temperatura ambiente se determina la concentración por colorimetría o bien se cromatografía (ver sección III-1).

Para su evaluación fotométrica se agrega un volumen igual del reactivo mercúrico de Ehrlich (108) y se lee la absorbancia a 552 m μ del compuesto de condensación formado, después de 15 minutos y dentro de los 30 minutos, puesto que luego se observa una disminución de la coloración.

La cantidad de δ -ALA presente se calcula utilizando el coeficiente de absorción molar E_M : $6,0 \times 10^4$ que se obtiene por calibración de soluciones patrones preparadas a partir de δ -ALA sintético. Se hacen blancos de corrección a tiempo cero de incubación y con enzima calentada. Generalmente se trabaja con el sistema reducido a la mitad.

c) Determinación de porfobilinógeno:

Cuando se mide PBG como producto biosintético, en el trabajo de aislación y estudio de la enzima δ -ALA dehidratasa (2a. parte de Resultados), la reacción se detiene por el agregado de 0,05 ml de una solución saturada de $SO_4 Cu$, seguida de agitación enérgica durante 20 segundos. La proteína precipitada se elimina por centrifugación a alta velocidad durante 3 min y la cantidad de PBG formada se determina en una alícuota del sobrenadante con el reactivo mercúrico de Ehrlich, para eliminar las interferencias en el desarrollo del color producidas por los grupos tiólicos presentes (108). El cromógeno se lee a 555 nm después de 15 min. y se utiliza el coeficiente de absorción molar E_M : $3,4 \times 10^4$ obtenido por calibración de una muestra de PBG recientemente cristalizada en las condiciones descriptas. $6,8 \times 10^4$ (Vol colorimétrica)

Inicialmente, se había utilizado la técnica de precipitación de proteínas con Fe_2O_3 coloidal dializado y $SO_4 Cu$ saturado, descripta por Gibson (163). Estudios comparativos permitieron observar que la adsorción de PBG sobre este precipitado llegaba en algunos casos a un 40% dependiendo de la cantidad de proteí-

na presente (Tabla 1). La utilización de Fe_2O_3 coloidal de diversos orígenes mostró también diferencias significativas en las mediciones. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió adoptar como método de rutina para desproteínizar el descripto en primer término.

T a b l a 1

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA DETERMINACION DE PBG

Las mezclas de reacción contienen los componentes básicos indicados en la sección VII-b y diferentes cantidades de "extracto crudo" como fracción enzimática de δ -ALA dehidratasa. Después de incubar a 38°C se separan dos alícuotas, y se procede a desproteínizar con: -sistema(a): 1 ml de Fe_2O_3 coloidal más 0,05 ml de SO_4Cu saturado; y -sistema(b): 0,05 ml de SO_4Cu saturado. Se agitan de inmediato y se centrifugan a 20.000 x g durante 3 min. Al sobrenadante o alícuota diluida se le agrega igual volumen de reactivo de Ehrlich y se lee a 555 nm después de 15 min. para determinar el PBG formado.

Extracto crudo (proteínas) mg	Porfobilinógeno medido	
	Sistema (a) nmoles	Sistema (b) nmoles
1,0	5,1	5,5
5,0	20,2	26,3
9,0	28,3	45,6

Cuando se quiso medir PBG y δ -ALA en los sistemas de incubación que utilizan homogenatos o sobrenadantes de 11.000 x g (1a. parte de Resultados se sigue la técnica cromatográfica sobre resinas de intercambio iónico de Granick y colab. con modificaciones (321). Las mezclas se desproteínizan con 1 ml de ácido tricloroacético (10%). Luego de centrifugar se separan alícuotas de

2 ml y se neutralizan por agregado de 0,2 ml de NaOH 1 M y 0,5 ml de acetato de sodio 0,5 M, llevando el pH a 5-6. Las soluciones se pasan luego por columnas de intercambio iónico utilizando resinas aniónicas en forma acetato-Dowex 1-X 8 o Bio Rad AG 1 x 8 de 0,7 x 3 cm., previamente equilibradas con buffer acetato 0,05 M pH 5. En la columna queda retenido el PBG y pasa el δ -ALA presente.

La columna se lava 3 veces con 3 ml de agua y el PBG se eluye con 3 ml de ácido acético 1 M y luego con 2 ml de ácido acético 0,2 M. La concentración se valora en una alícuota utilizando el reactivo de Ehrlich según se describió en sección VII-c.

El δ -ALA que percola y eluye con los lavados acuosos se pasa luego por una resina catiónica Dowex 50 x 8 (malla 200-400), donde queda retenido. La columna de 0,7 x 3 cm se lava con 5 ml de agua y con 3 ml de acetato de sodio 0,5 M. El δ -ALA se eluye finalmente, con 5 ml de acetato de sodio 0,5 M. Al líquido eluido se agrega 0,1 ml de acetyl acetona y se sigue la técnica ya detallada para la valoración de δ -ALA como derivado pirrólico.

4) Identificación y separación cromatográfica de δ -ALA y pirroles:

Tanto el δ -ALA como su derivado pirrólico fueron identificados cromatográficamente sobre la base de las técnicas de Granick y Shuster (108, 321-322). El δ -ALA formado en los incubados, después de su concentración en desecador, se toma con butanol, se siembra en papel Whatman N° 1 y se corre en forma ascendente durante 3 horas en el sistema butanol:ácido acético:agua (4:1:5) fase orgánica. El revelado se hace pulverizando con el reactivo de Ehrlich. En todos los casos ensayados las muestras presentan prácticamente, el mismo R_f que la solución testigo ensayada (R_f : 0,32).

Por otra parte, las soluciones remanentes del δ -ALA-pirrol (sección VII-b) se ajustan a pH 1 con HCl concentrado, y se extraen con éter sulfúrico (4 veces con 1 ml). Los extractos etéreos se evaporan a sequedad sobre placas calientes, y se toman con un pequeño volumen de butanol, sembrándose sobre papel Whatman N° 1.

Se cromatografían en forma ascendente a temperatura ambiente empleando

la capa orgánica del sistema H_2O : n-butanol: NH_4OH 10N (50:49:1), durante cuatro horas. Una vez seco, el papel se vaporiza con el reactivo de Ehrlich, apareciendo zonas de un color rosa anaranjado, que señalan la presencia del derivado ALA-pirrólico.

Las muestras a identificar se corren contra testigos del pirrol, preparados con soluciones patrones de δ -ALA, exhibiendo ambos un mismo R_f : 0,2. El rendimiento de todo el proceso varía entre un 35 a un 95%.

Cuando los pirroles provienen de experiencias con sustratos marcados, se evalúa la radioactividad como se detalla en el tópico correspondiente (sección XI).

El PBG, como producto biosintetizado por la δ -ALA dehidratasa, se identificó también cromatográficamente. Para ello la mezcla de incubación desproteínizada se concentra en desecador sobre NaOH y se desarrolla con el sistema n-butanol-ácido acético-agua (63:10:27) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se revela vaporizando con el reactivo de Ehrlich (323).

e) Análisis de porfirinas:

I.- Libres:

Se siguieron dos técnicas para el proceso de desproteínización:

1) Basado esencialmente en los métodos de Watson-Schwartz (324) y Dresel y Falk y colab. (325-26). Una vez que los sistemas de reacción se incubaron por los tiempos establecidos se detiene la reacción por agregado de 6 volúmenes de una mezcla de acetato de etilo-ácido acético (3:1 v/v) en baño de hielo. En este proceso se produce la precipitación de las proteínas, a la vez que se solubilizan las porfirinas presentes en el medio. El precipitado centrifugado se lava dos ó tres veces con pequeños volúmenes de la misma mezcla extractiva hasta fluorescencia negativa. Las fracciones reunidas se transfieren a ampollas de separación y se lavan con la mitad de su volumen de agua destilada por 2 veces. Si los lavados acuosos contienen porfirinas, se llevan a pH 3 -3,5 (gris al rojo congo) con acetato de sodio sólido y se extraen con pequeños volúmenes de acetato de etilo, que son agregados a la solución principal. De la fracción orgánica se extraen finalmente las porfirinas con HCl 10% (p/v) las que se diluyen

posteriormente a 5% para su determinación espectrofotométrica.

- 2) Ocasionalmente, las mezclas de incubación se detienen por el agregado de ácido clorhídrico concentrado, de manera tal que la solución final resultante tenga una concentración en HCl del 10%. Como generalmente se incubaba 4 ml de volumen total se les adiciona 1 ml de HCl concentrado. Se dejan reposar en frío y a la luz durante 30 min. , se centrifugan y los precipitados se lavan con solución clorhídrica al 10% hasta fluorescencia negativa.

Se procede finalmente a su lectura espectrofotométrica que se realiza siempre el mismo día, debido a la gran cantidad de protoporfirina presente y que, como se sabe, es poco estable en solución ácida. Durante todas estas manipulaciones los porfirinógenos formados en las incubaciones se oxidan totalmente a porfirinas. Esta aseveración puede comprobarse fácilmente mediante el agregado de una solución de I_2 (1%) y efectuando las lecturas correspondientes (201). No se observan variaciones en las absorbancias, antes y después de dicho tratamiento.

Las mediciones espectrofotométricas de las porfirinas libres en los extractos clorhídricos se realizaron en un Beckman D.V. barriendo la zona correspondiente a la banda de Soret.

La concentración de las porfirinas libres se determina por su valor en ese pico, utilizando los coeficientes de extinción obtenidos por Salum (327). Como la protoporfirina es el componente en mayor proporción que se usa generalmente, su coeficiente en los ensayos de rutina y como cálculo aproximativo.

II.-Esterificadas:

La identificación y posterior evaluación porcentual de las porfirinas aisladas de las mezclas de incubación requiere su transformación a los ésteres metílicos correspondientes. Este proceso se realiza mediante dos pasos: 1) adsorción y 2) elución y esterificación.

1- Adsorción de porfirinas

Las soluciones clorhídricas de las porfirinas libres se llevan a

pH 3 - 3,5 (gris del Rojo Congo) con acetato de sodio sólido antes de ser adsorbidas. Como en las glándulas de Harder hay gran cantidad de protoporfirina y ella se descompone fácilmente, se probaron diversos adsorbentes en cuanto a su poder de adsorción como al de desorción.

A) Adsorción sobre talco

Se procede como se describió en la obtención de porfirinas urinarias, sección II-b, excepto que no se seca por calentamiento en estufa, por cuanto provoca la descomposición de la protoporfirina.

B) Adsorción sobre Al_2O_3

A los extractos acuosos llevados a pH 3,5, se les agrega una cantidad de alúmina muy pequeña, dependiendo de la cantidad de porfirinas presentes. Después de agitar durante 5 min. se filtran por Büchner. Se controla la fluorescencia del líquido sobrenadante por lámpara U.V., agregándose adsorbente si fuera necesario. Este se seca al vacío durante 15 min.

En nuestros ensayos se utilizaron Al_2O_3 Merck para cromatografía de diversos grados, según la escala de Brockman. El adsorbente que da excelentes resultados es la alúmina de grado IV, por cuanto requiere menos tiempo y es más fácil su elución. Con esta técnica se obtiene una recuperación de porfirinas entre 80-90%.

C) Adsorción sobre florisil

El procedimiento es similar a los anteriores. Las soluciones con las porfirinas libres se dejan en contacto con el adsorbente sintético durante 10 min. con agitación magnética, luego se filtran y se secan al vacío, obteniéndose un 70% de recuperación.

Todas estas pruebas se efectuaron para aumentar el rendimiento del procedimiento de concentración respecto del de talco, que se calcula en un 50%. Si bien los dos últimos son mejores, son también mucho más caros.

2) Esterificación de porfirinas

Para las tres técnicas de adsorción detalladas (A,B,C) el paso siguiente consiste en una elución con una mezcla esterificante.

Los adsorbentes con las porfirinas se ponen en contacto con 15 ml de una solución de metanol:ácido sulfúrico (19:1 v/v) con agitación durante 5 min. Se dejan reposar hasta que decantan y se filtran por placa filtrante de vidrio de poro muy fino (S-IV). Se efectúan varios lavados hasta fluorescencia negativa de los eluidos, siendo el proceso de desorción muy rápido para la alúmina y más lento para el talco. Es necesario agregar ácido a la mezcla final pues hay pérdida del mismo por reacción con los adsorbentes. Comúnmente se agrega 1 ml por cada 100 ml de eluido.

Los extractos metanólicos se dejan reposar en la oscuridad durante 36 a 48 hs.. Después de este período se agrega a cada ensayo 20 ml de solución saturada de acetato de sodio y 5 a 10 ml de cloroformo, volcándose esta mezcla a una ampolla de decantación que contiene un volumen doble de la muestra de agua destilada. Es conveniente conservar el orden indicado de agregado, puesto que ocurre un mayor pasaje de porfirinas a la fase acuosa, si se vuelcan las porfirinas directamente. Se controla el pH hasta llegar al rosa del rojo Congo y se separan los extractos clorofórmicos. Estos se lavan 2 veces con agua destilada y una vez con una solución de ClNa 7%, controlándose por fluorescencia la extracción. Las soluciones clorofórmicas límpidas se filtran por papel de filtro embebido en Cl_3CH , y la concentración de porfirinas presentes se determina por lectura espectrofotométrica en la banda de Soret.

A posteriori, se procede a concentrar las soluciones clorofórmicas por destilación al vacío en baño maría. En estas condiciones las porfirinas pueden ser separadas e identificadas por cromatografía, Si las fracciones son puras pueden cristalizarse y caracterizarse.

Esterificación directa de las porfirinas de la glándula de Harder

En los estudios llevados a cabo para determinar la concentración de porfirinas presentes en la glándula y su identificación, el tejido se muele directamente con la mezcla esterificante - 10 ml por cada gramo de tejido húmedo - la que solubiliza muy rápidamente las porfirinas. La solución se filtra por papel de filtro embebido en metanol. El residuo se lava 3 ó 4 veces con la misma

mezcla, hasta fluorescencia negativa. A la solución final se le agrega 1 ml de ácido por cada 50 ml, puesto que se trabaja con tejido húmedo. Luego se prosigue con la técnica descrita en la sección anterior.

Extracción de porfirinas con acetato de etilo

Este procedimiento se usó en combinación con la desproteinización con HCl concentrado. Los extractos ácidos de las porfirinas libres una vez llevados a pH isoelectrico se extraen con acetato de etilo repetidamente hasta desaparición de la fluorescencia. Estas fracciones se reúnen y se lavan una vez con agua destilada, generalmente no pasan porfirinas al agua y por lo tanto no es necesario reextraerlas. Los extractos orgánicos se concentran en un evaporador rotatorio al vacío. Una vez secos, se les agrega la mezcla esterificante y se continúa el proceso como se describió.

VIII.- HIDROLISIS DE LAS PORFIRINAS ESTERIFICADAS

Las porfirinas libres se obtienen a partir de sus ésteres metílicos cristalinos por hidrólisis con HCl 25%. Para ello los ésteres se disuelven en el menor volumen posible de ácido y se dejan estacionar en la oscuridad, aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese período, la solución ácida se lleva con HONa conc. primero y luego con acetato de sodio a su punto isoelectrico (3 - 3,5) donde ocurre un cambio notable de color en la solución de porfirinas, y éstas precipitan. Se deja descansar en frío durante unas horas y el precipitado se centrifuga y se lava 2 veces con agua llevada a ese pH. Los cristales se secan en desecador al vacío sobre Cl_2Ca .

IX.- SEPARACION E IDENTIFICACION DE PORFIRINAS POR CROMATOGRAFIA

Las porfirinas en sus formas libres y esterificadas pueden ser separadas por cromatografía tanto de adsorción como de partición.

a) Cromatografía de adsorción en columna

Los adsorbentes que se utilizan en este trabajo son Cl_2Ca , de acuerdo al método de Grinstein (328) y OMg según Nicholas (329).

Para la separación de las porfirinas formadas en el sistema de incuba-

ción se usan columnas cromatográficas tipo Zechmeister, pequeñas, de 1 cm de diámetro por 20 cm de altura (330).

Los extractos concentrados de las porfirinas esterificadas se toman en benceno, se adsorben sobre la columna de CO_3Ca y se revela, en la mayoría de los casos, con una mezcla de benceno-cloroformo (9:1). La mezcla de desarrollo varía según la naturaleza y la cantidad de las porfirinas presentes. Como en nuestros ensayos la protoporfirina es un componente que está presente permanentemente y corre muy rápido en Cl_2CH , la proporción de este solvente debe ser muy controlada para lograr buenas resoluciones.

La separación de porfirinas provenientes de orinas, después de su esterificación, se obtiene con la misma técnica. Se utilizan columnas más grandes (2-3 cm de diámetro x 30-40 cm de altura) y se varía la composición del solvente de desarrollo de acuerdo a las porfirinas existentes y considerando que la velocidad de corrimiento aumenta con proporciones mayores del solvente polar.

Se usaron columnas de OMg como método de recromatografía, generalmente cuando la cantidad de porfirinas era pequeña y especialmente si la porfirina a separar contenía otras en proporción ínfima. Las porfirinas esterificadas se cargan en solución metanólica y se utiliza como solvente de desarrollo una mezcla de metanol- Cl_3CH que varía según las circunstancias. Una vez revelado el cromatograma, las porfirinas se eluyen del material (329) adsorbente con Cl_3CH y pueden ser evaluadas e identificadas espectrofotométricamente o por cromatografía sobre papel, cristalizadas si son entidades puras y caracterizadas por sus propiedades físico-químicas.

b) Cromatografía sobre papel

Porfirinas esterificadas

Se trabaja básicamente con el método de Falk y Benson que permite la separación de los ésteres metílicos de las porfirinas, y que resuelve además, la mezcla de los isómeros de uroporfirinas I y III, no así las de los otros tetrapirroles (331).

Las porfirinas esterificadas solubilizadas en Cl_3CH se cargan en forma

puntual o en banda sobre papel Whatman nº 1. En esta técnica se efectúan 2 corridas cromatográficas ascendentes y en la misma dirección a temperatura ambiente. La primera que se realiza como proceso de limpieza se lleva a cabo durante 1 min. empleando como solvente de desarrollo cloroformo etanólico (1%) -kerosene (3:2). La cuba se satura brevemente con Cl_3CH y una vez finalizada la corrida se corta la tira de papel, 0,5 cm por debajo de la banda de porfirina. La segunda, utiliza kerosene-dioxano (2:1) en atmósfera de dioxano y se deja correr 2 a 3 horas. Las porfirinas cromatografiadas se revelan bajo luz ultravioleta por su fluorescencia roja característica y se comparan las sustancias a identificar con testigos corridos simultáneamente o por sus R_f . Como estos valores no son muy reproducibles es conveniente correr siempre marcadores conocidos.

Cuando se quieren separar en escala preparativa mezclas de dos porfirinas con proporción muy pequeña de una de ellas, se hace uso de esta técnica cromatográfica. La solución clorofórmica de las porfirinas se siembra en forma de banda sobre papel Whatman nº 3 MM y se corre en el sistema de Falk y Benson.

Este papel permite la carga de hasta 4 veces la siembra en Whatman nº1. Una vez revelado el cromatograma las bandas se cortan y eluyen con Cl_3CH . Con esta técnica se obtienen muy buenas separaciones y porfirinas muy puras y sin problemas de cristalización.

Porfirinas libres: se sigue la técnica de Erikser. (332) que resuelve la separación de las porfirinas libres y específicamente los isómeros de coproporfirina I y III. Las porfirinas libres obtenidas después de su hidrólisis y disueltas en NH_4OH se siembran en papel Whatman nº 1 y se cromatografían en forma ascendente con el solvente de desarrollo 2-6 lutidina-agua (7:3) en atmósfera de amoníaco. Se corren durante toda la noche (14-16 hs.) en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C). Es necesario un control de la temperatura para lograr buena reproducción de los cromatogramas. Se revelan también por fluorescencia.

Las cromatografías de partición permiten en ambos casos, la separación

e identificación de las porfirinas según el número de grupos carboxilos presentes en el núcleo tetrapirrólico, ya sean libres o esterificados.

X.- ANALISIS INDIVIDUAL CUANTITATIVO DE PORFIRINAS

Las determinaciones cuantitativas de cada una de las porfirinas presentes en el medio de incubación se realizaron por el micrométodo de Patle y Grinstein (333). Los ésteres metílicos de las porfirinas se siembran en bandas de 4 cm de largo, con carga no mayor de 5 μ g sobre tiras de papel Whatman n° 1 y se cromatografían por el método de Falk y Benson descrito en sección IX-b.

Después de la separación e identificación, se cortan las tiras de papel, que contienen las diferentes porfirinas y se eluyen con pequeños volúmenes de cloroformo, controlando bajo luz U.V. su fluorescencia. La concentración de cada fracción se determina en los eluidos midiendo la absorción en el pico de Soret y utilizando los coeficientes de extinción característicos. Para las porfirinas con 6 y 5 grupos carboxilos, cuyos coeficientes no se conocen, se utilizan valores interpolados entre los de 7- y 4-COOH suponiendo una proporcionalidad entre los coeficientes y el número de carboxilos. De las cantidades recuperadas en los cromatogramas se obtienen los porcentajes de cada una de las porfirinas presentes en la muestra. Como se conoce la cantidad total de porfirinas libres, recalculada en función de los por ciento hallados, y de los coeficientes de extinción individuales, se pueden determinar las cantidades totales de las diferentes porfirinas en el sistema de incubación.

XI.- DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD

Las valoraciones de radioactividad de porfirinas y derivados pirrólicos de δ -ALA biosintéticos, se hicieron después de cromatografiar las diferentes muestras como se describe:

- a) Cortando las correspondientes bandas cromatográficas después de su revelado, ya sean porfirinas o pirroles, eluyendo con el solvente apropiado y sembrando las capsolitas de aluminio en forma de capa de muy pequeño espesor, de

tal manera que no es necesario efectuar correcciones por autoabsorción, es decir, se consideró espesor infinitamente pequeño.

Los resultados se expresan como cpm totales incorporados. Estas mediciones se efectuaron en un contador de flujo gaseoso con ventana micromil, Nuclear Chicago, Modelo D-47. La eficiencia de conteo en este aparato es de $3,11 \times 10^5$ cpm por μc .

b) Sembrando en las capsulitas las porfirinas totales esterificadas, o los elu^udos clorofórmicos provenientes de columnas cromatográficas, como se describió en a).

De la actividad específica de las mismas (cpm/ μg) y el % de cada componente presente en la mezcla, se calcula la radioactividad debida a cada porfirina.

c) Contaje automático de las tiras cromatográficas. Los cromatogramas se pasan por un registrador de radiocromatogramas automático. Las áreas radioactivas correspondientes a los diferentes compuestos se detectan y cuentan directamente. Este trabajo se efectuó en la C.N.E.A., en el laboratorio de "Moléculas marcadas" con la gentil dirección del Dr. A.E.A. Mitta.

El aparato empleado es un Radiochromatogram Scanner Packard Modelo 385, Recording Radiometer.

Si el número relativo de cuentas que se obtienen en los procedimientos a) y b) se toman como 100; en el procedimiento c) le corresponde un valor de 30.

La radioactividad medida fue concordante con los valores calculados espectrofotométricamente de las sustancias sintetizadas, cuando ello fue posible realizarlo.

XII.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Las curvas de absorción de diferentes porfirinas se realizan en ácido clor^uhídrico 5% para las formas libres, y en cloroformo para las esterificadas, utilizando un espectrofotómetro Beckman tipo D.U.

XIII.- PUNTOS DE FUSION

Los diferentes compuestos obtenidos se caracterizan por sus puntos de fusión que se miden en un aparato para micro punto de fusión Fischer-Johns con platina calentable eléctricamente.

XIV.- REACTIVOS, SOLVENTES Y ADSORBENTES

En general y debido a la facilidad con que las porfirinas forman quelatos con iones metálicos, los reactivos usados son de grado analítico o purificados antes de usar.

H₂O: se usa agua deionizada y destilada sobre vidrio.

Cl₃CH: se lava 3 veces con el doble volumen de agua destilada, para eliminar fosgeno y otras impurezas. Se lo seca sobre Cl₂Ca, se destila con columna rectificadora y se usa de inmediato. Para conservarlo se guarda en botella oscura y se le adiciona alcohol absoluto (1%).

CH₃COOC₂H₅: se redestila en el momento de usar.

Eter etílico: si da reacción positiva de peróxidos (IK en presencia de almidón) se lo purifica por el método del SO₄Fe en medio ácido(334).

Kerosene: el producto adquirido comercialmente se lava 3 veces con el doble volumen de agua destilada, se filtra por papel sobre Cl₂Ca y se destila recolectando la fracción entre 130 y 260°C. Posteriormente se redestila obteniéndose una fracción incolora entre 190 y 240°C que se conserva en frasco oscuro sobre Cl₂Ca.

OMg: se suspende en agua destilada, se decanta y deshidrata por calentamiento en estufa a 37°C durante 3 horas y se lo emplea como grado III según Brockman (335).

Al₂O₃: se lo utiliza como grado IV, preparado igual al anterior, pero secado en capa fina al aire a 20°C (329,335).

Florisil: (malla 60-100) proveniente de Floridin Co. Warren, Pensilvania, se emplea sin tratamiento previo.

Gel de fosfato de calcio: se prepara según la técnica descripta por Keilin

y Hartree (336) y se utiliza como gel envejecido.

Dowex 1 X8: (malla 200-400) adquirida comercialmente en forma cloruro se convierte a la forma acetato para su uso. La resina se suspende en agua destilada y se decanta. Luego se lava con acetato de sodio 3 N hasta que los lavados dan reacción de cloruros negativa. A continuación, se lava con agua para eliminar el acetato de sodio.

Dowex 50 X8: (malla 200-400) el producto comercial se suspende en HONa 2N y se deja reposar 10-12 hs. Se decanta y lava con agua hasta neutralidad. La resina es convertida a la forma protonada por tratamiento con 1 volumen de HCl 4N y sucesivamente con 6 volúmenes de: HCl 2N, HCl 1N y agua.

XV.- G E L E S

Las columnas para filtración por geles se preparan de acuerdo con las técnicas usuales (337).

El material comercial Sephadex G-100 se deja hinchar en agua destilada durante varios días y se decanta para descartar las partículas finas, que entorpecen el flujo. La suspensión del gel se deaerea y se empaqueta por gravedad en columnas de vidrio de 2 cm x 30 cm, se lava con buffer fosfato 0,067 M pH 6,8 y se lo equilibra con el mismo buffer conteniendo KCl 0,1 M.

XVI.- E L E C T R O F O R E S I S

a) Gel de poliacrilamida:

Se siguió esencialmente la técnica de Raymond y Weintraub con el asesoramiento del Dr. J. M. Castagnino (338-9). Se utiliza gel de poliacrilamida al 5% que se prepara disolviendo 5 g de "Cianagum 41" en 100 ml de buffer veronal pH 3,6. La solución de gelificación se obtiene agregando a la solución anterior 0,15 ml de dimetil amino propionitrilo y 150 mg de persulfato de amonio. Una vez mezclada la solución de trabajo se la vierte por medio de una pipeta en tubos cilíndricos de 0,8 cm x 3 cm de largo, hasta 8/10 de su altura. De inmediato, se

agrega por las paredes con una pipeta capilar agua destilada hasta formar una capa de 2 mm de espesor para eliminar el menisco del gel y se deja gelificar a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se procede al sembrado de las diferentes fracciones proteicas que cuando son muy diluidas (eluidos de columnas) se las aplica en sacarosa 0,5 M o se las concentra por diálisis inversa con etilenglicol según técnica de Kohn (340).

Las corridas se hacen en buffer veronal-sódico pH 8,6 fuerza iónica 0,06 durante 4 horas con corriente constante de 5 mA por tubo. Al término de la corrida se separan los geles y se tiñen por inmersión en una solución de Amido Schwartz 10 R al 0,25% en ácido acético 7%, durante 15 min. Después de dicho período se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y finalmente se decoloran por sucesivos lavados con una solución de ácido acético 5%.

b) gel de almidón: Se sigue la metodología descrita por Dodman (341) . Fueron realizadas por la Dra. Batlle con preparaciones purificadas de δ -ALA D glandular conjuntamente con dehidrasas de diferentes fuentes.

LOS ESTADOS

P a r t e I

BIOSINTESIS DE PROTOPORFIRINA 9

Estudios de las diversas etapas enzimáticas.

NATURALEZA DE LAS PORFIRINAS PRESENTES EN LA GLÁNDULA DE HARDER

El análisis de las porfirinas presentes en la glándula de Harder de ratas adultas, supuestamente normales, se realiza por esterificación directa del tejido. Generalmente se usan tandas de 10 a 30 ratas para la separación y purificación de las porfirinas individuales. Las glándulas se lavan con solución fisiológica para eliminar restos de sangre y se secan sobre papel de filtro, luego el material se trata directamente con la mezcla esterificante metanol: ácido sulfúrico según se describe en Métodos. Los ésteres metílicos de las porfirinas extraídas, se cromatografían sobre papel, y los resultados de un cromatograma tipo pueden verse en la Fig. 8. En esta representación se observa el desarrollo de una corrida cromatográfica, después de su revelación bajo luz ultravioleta, tanto de las porfirinas utilizadas como referencias (U I y III, F III, C III y P 9) como de una muestra del extracto clorofórmico de las porfirinas presentes en la glándula de Harder.

Hay que hacer notar que la separación de las porfirinas en todos los procesos cromatográficos utilizados se hace en función del número de grupos carboxilos de los sustituyentes β , β' de las cadenas laterales de los núcleos pirrólicos. Así en las cromatografías en papel, la velocidad de corrimiento es mayor cuanto menor es el número de grupos carboxilos presentes, ya sean libres o esterificados. Por ende, la porfirina con 8 carboxilos (Uro) presenta el R_f menor y la protoporfirina (2-COOH) tiene el mayor R_f . El análisis del cromatograma de la Fig. 8 revela la presencia de 3 componentes fluorescentes en la muestra ensayo. Una banda principal, intensa, que se corresponde con la corrida de protoporfirina testigo (Banda I), una de mucha menor intensidad que corre como la coproporfirina (Banda III) y otra más débil (Banda II).

En ocasiones sólo aparece una sola banda (II ó III), además de la de protoporfirina. La banda II, que se revela con línea de trazos por su pequeña cantidad, tiene un corrimiento intermedio entre las dos porfirinas testigos: copro y proto. Se la suele denominar como porfirina tricarboxílica (3-C), puesto que correspondería por su comportamiento cromatográfico a una porfirina con 3 grupos carboxílicos.

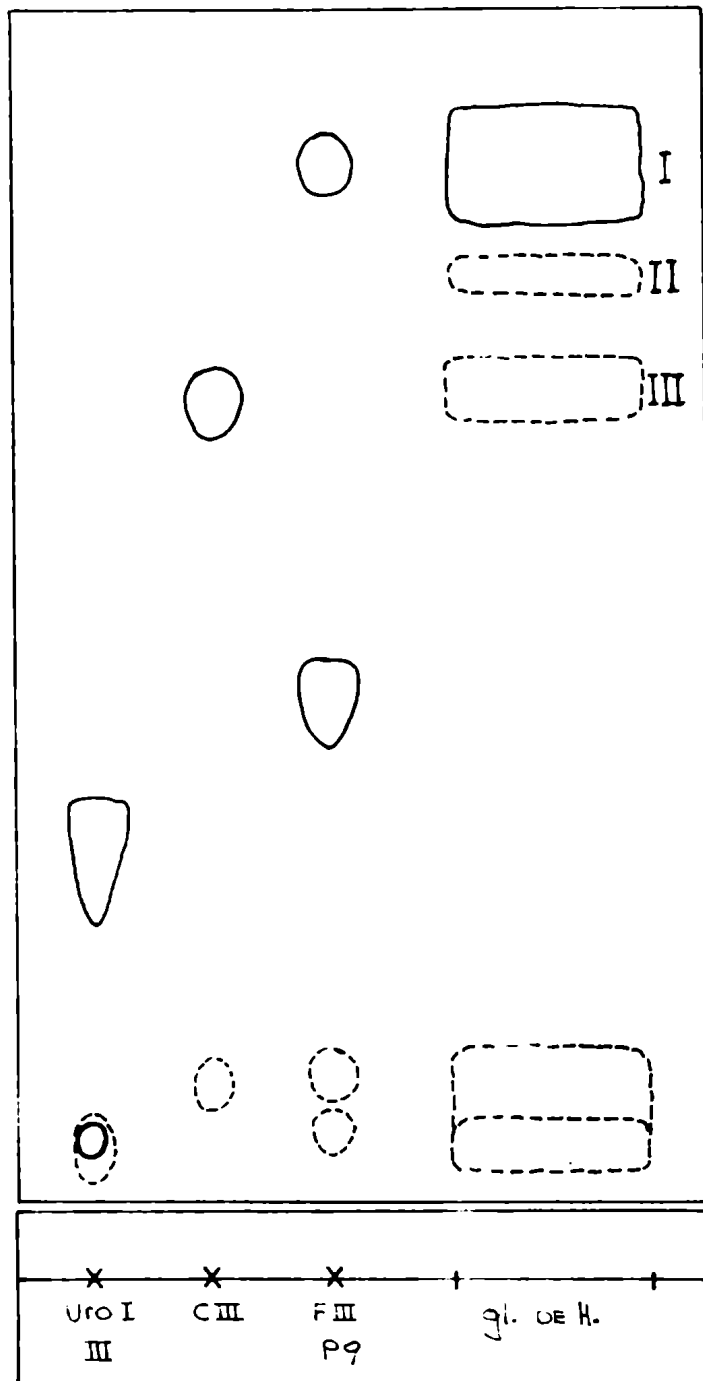


FIG. 8.- CROMATOGRAMA DE PORFIRINAS ESTERIFICADAS DE LA GLANDULA DE HARDER._

Para su evaluación individual las porfirinas se siembran en forma de bandas, se corren, eluyen y cuantifican según metodología detallada.

La protoporfirina es el componente tetrapirrólico que aparece siempre en mayor proporción. Los valores de las porfirinas presentes varían entre los siguientes límites: Protoporfirina: 84-87%; 3-COOH: 2-7% y coproporfirina: 9-11%.

Para su separación y caracterización las porfirinas extraídas se someten a cromatografías de adsorción.

El material esterificado se siembra en columnas de CO_3Ca y se desarrolla como se describe en Métodos. Con esta técnica sólo se pueden observar dos bandas separadas, una muy amplia, de color rojo violáceo, de intensa fluorescencia que corre muy rápidamente y otra mucho menor que comúnmente aparece acompañada con una banda de color verde. Todas presentan fluorescencia roja y la banda verde, enmascarada. Después de su elución se identifican por cromatografía en papel, correspondiendo a proto (la principal) y copro (la menor). A veces se detecta también la porfirina tricarbóxilica en esta segunda banda. Estas fracciones se purifican por cromatografías sucesivas tanto en columna como en papel Whatman 3 MM y se cristalizan. Sobre el material cristalino se efectúan estudios de caracterización: puntos de fusión, espectros y observación cristalográfica. Los datos se resumen en la tabla 2.

La fracción de coproporfirina purificada, se hidroliza para poder determinar su isomería, por cromatografía de la forma libre, empleando el método de la lutidina (329). El revelado indica sólo la presencia del isómero III de la coproporfirina. Este dato, conjuntamente con los de punto de fusión y espectro de absorción determinan que el compuesto es coproporfirina III.

Respecto de la banda II en la Fig. 8, que correspondería a una porfirina que poseyera 3 grupos carboxilos, y para el que se detecta un máximo a 406 nm en la banda de Soret, según se indicó antes, no fue posible estudiarla por la pequeña cantidad de material disponible.

Se determina además, la cantidad de porfirinas libres totales en la glándula de Harder de ratas. Para ello, se muele directamente el tejido con HCl 10% como se detalla en Métodos, extrayéndose las porfirinas hasta fluo-

encia negativa. En el líquido centrifugado se evalúa su concentración por lectura espectrofotométrica en un medio HCl 5%, considerando como coeficiente de absorción el de la protoporfirina puesto que es el componente presente en mayor proporción.

T a b l a 2

CARACTERIZACIÓN DE LAS PORFIRINAS PRESENTES EN LA GLÁNDULA DE HARDER

Las glándulas se procesan como se detalla en "Métodos" y se analizan las porfirinas obtenidas. Los espectros de absorción se realizan con los ésteres metílicos de las porfirinas en solución clorofórmica.

Porfirinas	R _f sistema kerosene dioxano	Puntos de fusión	Máximos de absorción (nm)				
			I	II	III	IV	V
Protoporfirina 9 (2-COOH)	0,85	227-229	630	575	543	506	407,5
3-COOH	0,72	-					406
Coproporfirina (4-COOH)	0,63	140-142	622	566	530	499	401

Cantidad presente: 0,15 µg de porfirinas libres/mg tejido fresco

Como se indica en la Tabla 2, el contenido promedio corresponde a 0,15 µg de porfirinas por mg de tejido glandular. Este dato es el valor de la media de diversas determinaciones que oscilaron entre 0,12 y 0,25 ug. El peso promedio de un par de glándulas de ratas machos, con aproximadamente 250 g de peso corporal, es de 300 mg ± 25.

Observaciones personales llevadas a cabo con material proveniente de ratas porfiricas, inducidas con diversas drogas porfirinogénicas (Sedormid, AIA, hexaclorobenceno, etc.) permiten establecer variaciones tanto en el contenido total de porfirinas de las glándulas, como en el tipo de las porfirinas presentes -diferente número de grupos carboxilos - y en su proporción relativa.

Así, en el caso de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno, la cantidad de porfirinas presentes muestra una disminución en su contenido total, y en casos de porfirias inducidas con barbituratos, se detecta la presencia de porfirinas con alto contenido carboxílico.

Debido a estos hallazgos se continúan estudios comparativos para determinar su posible significado.

BIOSINTESIS DE δ -ALA

Actividad de δ -ALA sintetasa

La posibilidad de evaluar la cantidad de protoporfirina biosintetizada por la glándula y/o sus variaciones a partir de sus precursores primarios: glicocola y succinato, una metodología común usada por todos los investigadores que estudiaron este camino metabólico en eritrocitos se ve obstaculizada en la práctica por la gran cantidad de protoporfirina presente en el medio, aportada por el sistema enzimático. Por lo tanto, esta metodología se descartó después de numerosas tentativas infructuosas. Posteriormente, se pensó determinar la actividad de la δ -ALA sintetasa, la enzima que cataliza la primera etapa en esta secuencia metabólica, es decir, la formación de δ -ALA a partir de sus precursores iniciales. Para ello se realizaron una variedad de ensayos previos, puesto que el producto que se forma en muy pequeña cantidad no es fácilmente detectable.

Se sabía además, que en los pocos tipos de células estudiados, dicho sistema enzimático aparece en fracciones particuladas (85, 116, 266) por lo que se obtienen las mitocondrias de este tejido por centrifugación diferencial. Sin embargo, aún trabajando con sustrato marcado (gli-2-C¹⁴) succinato y los cofactores conocidos, no se logra detectar actividad.

Se prueban diferentes condiciones:

- a) sistema conteniendo glicocola, succinato, fosfato de piridoxal, coenzima A, ATP, Mg⁺⁺ y extracto mitocondrial intacto, suponiendo activo el sistema enzimático endógeno generador de succinil-CoA;
- b) acoplando un sistema generador de succinil-CoA mediante el agregado

de glicocola, fosfato de piridoxal, succinato, CoA, ATP, Mg^{++} y la enzima tioquinasa purificada de espinacas, según se detalló en Métodos.

c) reemplazando el succinato y cofactores por succinil-CoA sintética.

d) mezclas de reacciones similares a las anteriores pero con mitocondrias congeladas y descongeladas.

e) variaciones en las condiciones de incubación: anaerobiosis, pH, buffer Tris o fosfato, concentraciones de los diversos sustratos, (alfacetoglutarato), preincubación del sistema enzimático con reactivos tiólicos, etc..

f) agregado del sobrenadante de mitocondrias.

En ninguno de todos estos ensayos fue posible medir actividad indubitable de la δ -ALA sintetasa. Se comprueba, sin embargo, la funcionalidad de las mitocondrias, por detección de la actividad de succínico deshidrogenasa en estas partículas (318).

Se prueba entonces, un pretratamiento de 15-30 minutos de las mitocondrias obtenidas por centrifugación, con una solución que contiene la siguiente mezcla: sacarosa 0,25 M, buffer Tris 0,05 M pH 7,2, tioglicolato de sodio 0,02 M y EDTA 0,005 M en una relación de 1:2 v/gramo de glándula según se detalla en Métodos (sección V-b).

En estas condiciones, las mitocondrias de la glándula de Harder de rata son capaces de catalizar la síntesis neta de δ -ALA.

Una experiencia tipo se describe a continuación:

Las mitocondrias obtenidas el mismo día de la experiencia - requisito necesario puesto que el congelamiento y descongelamiento hace perder la actividad catalítica, lo mismo que el "envejecimiento" aún de 12 horas - se pre-tratan con la mezcla señalada arriba y se adiciona de inmediato al sistema de incubación. Este contiene gli 2-C¹⁴, succinil CoA recién preparada, los cofactores necesarios y las diferentes fracciones celulares a ser ensayadas como sistema enzimático e indicadas en la Tabla 3. La mezcla se incuba a 37°C durante 1 hora en aerobiosis. Se detiene la reacción por calentamiento y después de obtener los pírroles se leen, cromatografían y se pasan por el registrador automático de radioactividad. La zona "marcada" coincide con la del

T a b l a 3

BIOSINTESIS DE δ -ALA EN GLÁNDULA DE HARDER

La mezcla de incubación contiene gli (40 μ moles) succinato (5 μ moles), succinil CoA (0,5 μ moles), ATP (0,5 μ moles), fosfato de piridoxal (0,25 μ moles), 14 ClK (60 μ moles) Cl_2Mg (12 μ moles), buffer Tris pH 7,2 (100 μ moles), Gli 2- C^{14} ($5,97 \times 10^5$ cpm $\times 10^5$ cpm) y las diferentes fracciones enzimáticas indicadas en un volumen final de 2 ml. Incubación 1 hora a 37° C en aerobiosis. Los porcentajes de incorporación se calculan sobre la base de las cuentas agregadas a cada sistema y las cuentas incorporadas en el δ -ALA, medidas según se detalla en Métodos.

Exp.	Fracción celular	C^{14} incorporado en δ -ALA	
		cuentas/min	Incorporación %
1	Mitocondrias (5,1 mg) *	652	0,11
2	Sobrenadante de mitocondrias (5,6 mg)*	18	-
3	Sobrenadante (4,6 mg)* + Mitocondrias (5,1 mg) *	739	0,12
4	Homogenato total (7,8 mg)*	32	-

* Estos valores expresan los mg de proteínas agregados.

Derivado pirrólico del δ -ALA corrido como control, evaluándose su radioactividad directamente o por elución de la banda correspondiente según se describe en Métodos. Los resultados representativos y que son promedios de varias determinaciones se muestran en la Tabla 3.

Es notorio que la preparación mitocondrial es la única fracción que muestra buena actividad de δ -ALA sintetasa. No se observa incorporación significativa en experimentos con sobrenadantes de mitocondrias demostrando la presen-

cia de esta enzima en fracciones subcelulares particuladas. Tampoco es posible detectar formación de $\hat{\delta}$ -ALA en homogenatos totales en estas condiciones. La adición de la fracción sobrenadante a mitocondrias o no tiene efecto, o el incremento en la incorporación de C^{14} es muy leve. No obstante, es de hacer notar la baja incorporación que hemos conseguido con este tejido.

Se realizaron diversos ensayos tendientes a lograr una máxima actividad estudiando los requerimientos del sistema enzimático.

Los resultados están resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4

REQUERIMIENTOS DEL SISTEMA MITOCONDRIAL

Las mezclas se incuban durante 1 hora a 37°C con la fracción mitocondrial pre-tratada (4,9 mg), Gli 2- C^{14} ($5,25 \times 10^5$ cpm), succinil CoA sintética y cofactores, salvo cuando se omite, según se indica. Como 100% se toma la incorporación de Gli en un sistema que contiene todos los sustratos y cofactores como en Tabla 3.

Exp.	Sistema	$\hat{\delta}$ -ALA n moles	Actividad %
1	Completo	12	100
2	Menos glicocola	0	0
	Gli (200 μ moles)	7,2	62
3	Menos fosfato de piridoxal	1,	10
4	Menos ATP	7,1	60
5	Menos Mg^{++}	8,5	70
6	Menos succinil CoA	0	0

La actividad de la enzima mitocondrial es máxima cuando contiene todos los cofactores indicados en el sistema de incubación. No hay actividad en ausencia de cualquiera de los 2 sustratos: glicocola y succinil-CoA y de fosfato de piridoxal. ATP y Mg^{++} si bien necesarios no son imprescindibles para la demostración de la funcionalidad catalítica.

Concentraciones altas de glicocola (100 mM) son inhibitorias de la reacción. El incremento en la concentración de succinil CoA determina un aumento casi proporcional en la formación de S-ALA.

T a b l a 5

FORMACION DE SUCCINIL-CoA ENDOGENO

En las mezclas de incubación se reemplaza succinil-CoA por CoASH (0,5 μ m) y se incuban con Gli 2-C¹⁴, fosfato de piridoxal y mitocondrias pretratadas (4,5 mg), en aerobiosis por 1 hora a 37°C; los demás componentes están en las concentraciones standards. En exp. 3 y 7 se agrega 0,6 ml de un extracto cocido de levadura. En exp. 6 se agregan 15 mg de enzima succinil tioquinasa preparada según métodos. Como 100% se toma la formación de S-ALA en el sistema standard.

Exp.	Sistema	Actividad %
1	Completo	100
2	Succ. + CoASH + ATP + Mg^{++}	5
3	Succ. + CoASH + Cofactores + extracto de levadura	20
4	Idem a (3) sin ATP	5
5	Idem a (3) sin oxígeno	0
6	Succ. + CoASH + Cofactores + tioquinasa	40
7	Completo + extracto de levadura	110

Se ensayó también la posibilidad de reemplazar al sustrato succinil CoA sintetizado químicamente por un sistema activante que lo generara endógenamente desde sus precursores: succinato, CoASH y los cofactores requeridos por el sistema activante, ATP y Mg^{++} . En las condiciones ensayadas, no suplieron al sustrato sintético (Tabla 5). Sin embargo, cuando se le adiciona el sobrenadante de un extracto hervido de levadura a 100°C se observa una ligera formación de δ -ALA. El agregado de este extracto al sistema completo no incrementa significativamente la cantidad de δ -ALA sintetizada.

En los ensayos de suplementación de sustrato endógeno es imprescindible la presencia de oxígeno (exp.5) puesto que en atmósfera de nitrógeno la inactivación es total. La adición de enzima tioquinasa de espinaca al sistema sintetizante de succinil CoA determina la formación del producto pero no alcanza nunca los valores del sistema normal.

ATP es otro cofactor necesario para la generación de succinil-CoA, sin embargo, demostró ser un efector antagonico, puesto que si bien es un componente requerido (Tabla 4) para máxima actividad de la δ -ALA sintetasa, a concentraciones mayores de 10^{-3} M comienza a tener un efecto inhibitorio (Tabla 6).

El producto de la reacción δ -ALA a concentraciones superiores a 10^{-3} M disminuye notablemente la reacción catalítica.

En todos los ensayos descriptos no se detecta síntesis de PPG ni de porfirinas.

El significado y conclusiones de estos resultados se discutirán a posteriori.

T a b l a 6

EFFECTO DE DIVERSOS COMPONENTES SOBRE LA FORMACION DE δ -ALA

Las mezclas de reacción y las condiciones de incubación son las normales excepto las omisiones y agregados indicados. 100% de actividad corresponde al sistema completo que contiene ATP $2,5 \times 10^{-4}$ M

Expt.	Sistema	Actividad %
1	Completo	100
2	Menos ATP	63
3	ATP $7,5 \times 10^{-4}$ M	97
	ATP 5×10^{-3} M	45
5	δ -ALA 5×10^{-3} M	58

BIOSINTESIS DE PORFEBILINOGENO

Actividad de la δ -ALA Dehidratasa

Para analizar la capacidad de biosintetizar PBG por este tejido se prueba actividad en diferentes fracciones subcelulares: homogenato total, suspensión mitocondrial, sobrenadante de mitocondrias y microsomas, usando δ -ALA como sustrato. Se logra demostrar que sólo tienen actividad las fracciones solubles de las preparaciones celulares. Para estos ensayos las partículas mitocondriales y microsomas se suspenden en buffer fosfato 0,34 M pH 7,0 en un volumen tal que 1 ml de la suspensión resultante contiene las partículas provenientes de 2 g de tejido glandular.

Los resultados, promedios de múltiples experiencias, están sintetizados en la Tabla 7.

T a b l a 7

LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA δ -ALA DEHIDRATASA

Las mezclas de reacción (4 ml) contienen buffer fosfato 0,067 M pH 7,0 Cl_2Mg (12 μ moles), CLK (60 μ moles), δ -ALA (5 μ moles) y las fracciones enzimáticas indicadas indicadas. Se incuban a 38°C durante 4 horas y se determina el PBG formado con el reactivo de Ehrlich.

Fracción celular	PBG formado	
	Aerobiosis nm/hr	Anaerobiosis nm/hr.
Homogenato total (6,2 mg)*	18,6	28,5
Sobrenadante de mitocondrias (4,6 mg)*	23,5	33,6
Mitocondrias (4,5 mg)*	0,9	1,3
Microsomas (3,5 mg)*	-	0

* Estos valores corresponden a mg de proteína agregada.

Como es dable observar en la Tabla 7, las fracciones particuladas estudiadas no presentan actividad dehidratásica significativa.

Además, las condiciones de anaerobiosis ejercen un pronunciado efecto sobre la actividad de la δ -ALA dehidratasa glandular.

Para determinar la capacidad de síntesis de PBG en estos ensayos no es necesaria la presencia de reactivos tiólicos a pesar de ser la δ -ALA dehidratasa una enzima sulfhidrífica. Sin embargo, el agregado de compuestos que poseen grupos sulfhidríficos incrementa notoriamente la actividad biosintetizante.

En la Tabla 8 puede verse el efecto activante que provoca la adición de glutatión reducido al medio de incubación que llega a valores de aproximadamente 60%.

T a b l a 9

EFFECTO DE ACTIVADORES DE LA δ -ALA DEHIDRATASA

El sistema de incubación es similar al de la Tabla 7, excepto para la exp. 3 donde se agrega 27 μ moles de GSH. El sistema enzimático usado es el sobrenadante de mitocondrias (4,6 mg). La actividad relativa se expresa respecto del ensayo aeróbico.

Exp.	Condiciones	FBG nm/hr	Actividad relativa
1	Aerobiosis	23,5	1
2	Anaerobiosis	33,6	1,4
3	Anaerobiosis + GSH (5×10^{-3} M)	49,1	2,1

Los estudios de purificación y propiedades de esta enzima se presentarán y discutirán en la segunda parte de Resultados.

B I O S I N T E S I S D E P O R F I R I N A S

1.- δ -ALA como sustrato

El estudio de la formación de compuestos tetrapirrólicos a partir de δ -ALA, utilizando extractos crudos como sistema enzimático y en diferentes condiciones, se hace mediante el análisis de las porfirinas presentes en el medio de incubación.

El sistema de reacción simple conteniendo buffer Tris, iones potasio y magnesio, cantidades no limitantes de sustrato y homogenato total, salvo

indicación especial, se incuba durante diversos tiempos, en aerobiosis a 37°C. Las porfirinas se extraen del sistema de incubación y se evalúan e identifican según se describe en Métodos. Un cromatograma de los productos presentes después de 4 horas de incubación se representa en la Fig. 9.

En ella se observa la presencia de todas las porfirinas intermedias en la biosíntesis de protoporfirina 9, es decir, porfirinas conteniendo 8-, 7-, 6-, 5-, 4- y 2- grupos carboxilos, en las cadenas β , β' laterales.

La dependencia de la síntesis total de porfirinas en un sistema standar, con el tiempo de incubación está ilustrado en la Tabla 9.

T a b l a 9

SINTESIS DE PORFIRINAS EN FUNCION DEL TIEMPO

La mezcla de incubación standard contiene δ -ALA (5 μ moles) CLK (60 μ moles) Cl_2Mg (12 μ moles) buffer Tris pH 7,2 (100 μ m) y 1 ml de homogenato total que corresponde a 40 mg de tejido húmedo. Después de incubar a los diferentes - tiempos se determinan las porfirinas libres presentes.

Tiempo de incubación (hr)	1	2	3	4	6	9	12	15	20	24
Porfirinas totales (nmoles)	10,3	20,3	29,6	40,1	59,4	92,6	118	141	160	164

Esta biosíntesis es lineal con el tiempo de incubación, en las condiciones señaladas, hasta períodos que oscilaron entre 12 y 14 horas, observándose una disminución acentuada en la velocidad después de este lapso de tiempo, alcanzando un valor constante después de 20 a 24 horas de incubación (Fig. 10).

Se estudia también, la relación entre la formación de porfirinas y la concentración del sistema enzimático agregado. Esta dependencia se representa en

FIG. 9._ CROMATOGRAMA DE PORFIRINAS BIOSINTETICAS._

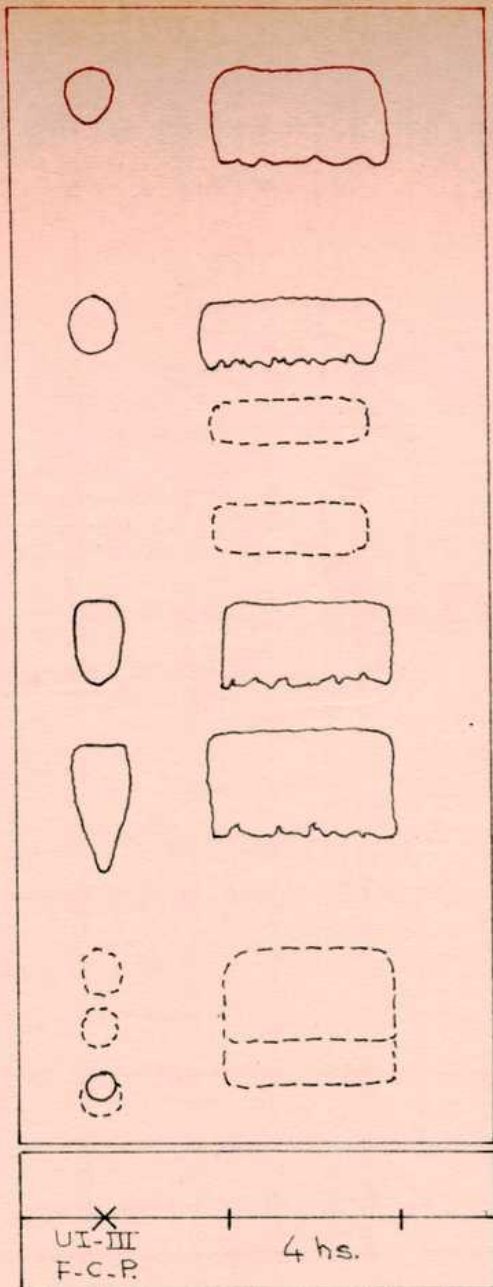
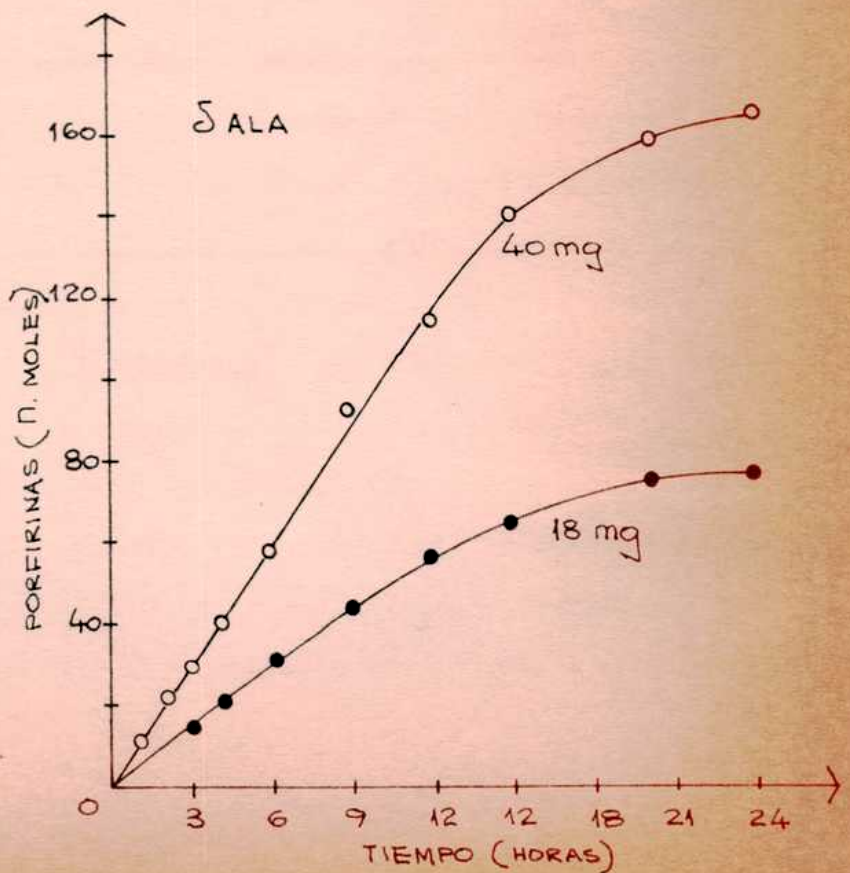


FIG. 10._ BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN FUNCION DEL TIEMPO._

SISTEMA DE REACCION SIMILAR A TABLA 9._



la fig. 10, notándose un incremento proporcional al aumento de la proteína enzimática ensayada.

Diversas incubaciones con homogenatos totales producen una mezcla de porfirinas, isómeros I y III, que en cromatografía sobre papel revelan poseer desde 8 hasta 2 grupos carboxilos, como está indicado en la Fig. 9. La proporción relativa y la estructura isomérica de estas mezclas de porfirinas depende en gran manera de las diferentes condiciones estudiadas: tiempo de incubación, temperatura, fracciones subcelulares, sustratos, etc.

Estos resultados permiten demostrar la presencia de los diferentes sistemas enzimáticos que participan en este camino metabólico.

Tiempo

Un análisis porcentual de las porfirinas presentes en los ensayos correspondientes a los diferentes tiempos de incubación se representa en la Fig. 11. Puede verse que, después de 2 horas de incubación aparecen cantidades significativas de uro y firiaporfirina, formándose también copro y protoporfirina. Después de 6 horas se detectan intermediarios con 6 y 5 grupos carboxilos, además de los de 8 y 7 carboxilos, acumulándose copro y protoporfirinas.

Cuando los tiempos de incubación son mayores (16 a 24 hs) no hay incremento significativo en la formación total de porfirinas como se mencionó anteriormente, pero se observa que hay una disminución en el porcentaje de las porfirinas de mayor número de carboxilos, con un aumento concomitante de las porfirinas de 4- y 2-COOH

En los mayores tiempos de incubación se hace visible la banda correspondiente a la porfirina tricarboxílica, entre la proto y coproporfirina siempre en pequeña proporción. Además, porfobilinógeno se forma en cantidades significativas en los ensayos de tiempos de incubación cortos.

Se hace notar que en todos los gráficos de porcentajes de porfirinas la proporción relativa de la protoporfirina preexistente (parte rayada) va disminuyendo, puesto que la cantidad total de porfirinas biosintetizadas incrementa con los tiempos de incubación.

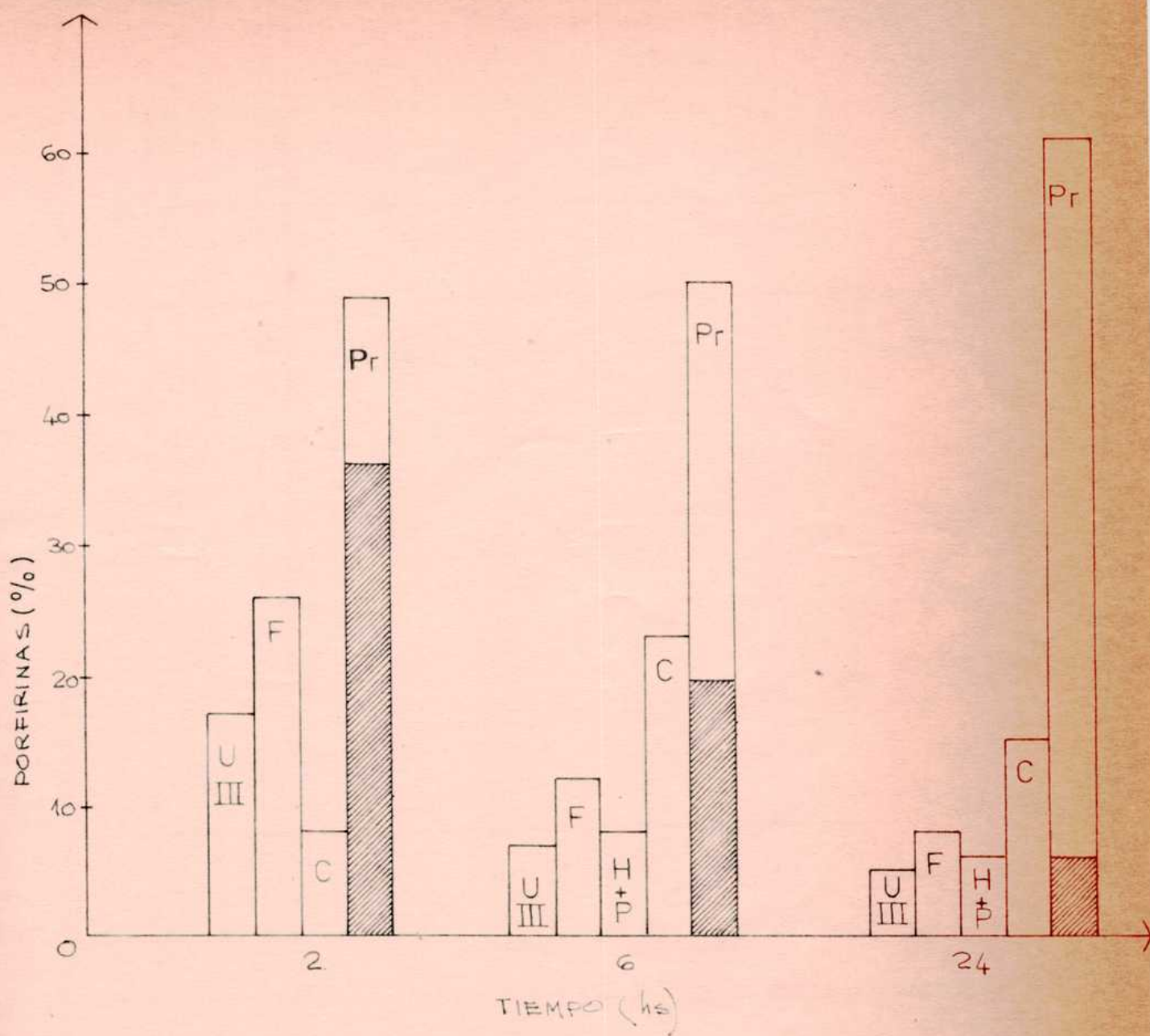


FIG. 11.- DISTRIBUCION DE PORFIRINAS A PARTIR DE SALA.

LAS CONDICIONES SON LAS DESCRIPTAS EN TABLA 9. LAS PORFIRINAS TOTALES SE ESTERIFICAN Y CUANTIFICAN. U:URO; F:FIRIA; H+P:HEXA + PENTA CARBOXI-PORFIRINAS; C: COPRO; Pr: PROTO.
 ▨ PREEXISTENTES □ BIOSINTETICAS.-

T a b l a 10

SINTESIS DE PORFIRINAS EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

Las mezclas de incubación standard se incuban a 37°C durante 3 horas en aerobiosis, con las cantidades de δ -ALA indicadas. Sistema enzimático: 1 ml de homogenato que corresponde a 36 mg de tejido glandular.

δ -ALA mM	Porfirinas totales nmoles
0,125	2,8
0,25	6,1
0,5	12,3
1,25	30,6
3,5	71
5,0	90
10,0	118

Concentración de δ -ALA

Se efectúan estudios de conversión de δ -ALA en porfirinas totales, cuyos resultados se resumen en la Tabla 10.

En un amplio rango de concentraciones de sustrato se logra una síntesis lineal de tetrapirroles.

A concentraciones mayores de 3 mM comienza a observarse una inhibición en la formación de porfirinas y concomitantemente aparece una acumulación de PBG. A concentraciones muy bajas - 10^{-5} M - la conversión a porfirinas es total.

Fracciones enzimáticas

Para examinar la capacidad de síntesis de tetrapirroles de las diferen-

Tabla 11

FORMACION DE PORFIRINAS POR DIVERSAS FRACCIONES ENZIMATICAS

Las mezclas de reacción standard se incuban 3 horas en aerobiosis, con las fracciones enzimáticas indicadas. Cada una de ellas equivale a 40 mg de tejido húmedo. Sustrato δ -ALA ($2,1 \times 10^5$ cpm).

Fracción subcelular	δ -ALA μ moles	Porfirinas	
		Coproporfirina nmoles	Protoporfirina nmoles
Homogenato total		trazas*	3,6*
	5	5,6	16,1
Sobrenadante de mitocondrias	0	-	2,9*
	5	19,6	3,1
Mitocondrias	0	-	1,1*
	5	-	1,0

* Son valores iniciales de porfirinas presentes en el sistema.

tes preparaciones enzimáticas se ensayan: homogenatos totales, sobrenadante libre de mitocondrias y suspensión mitocondrial analizándose las porfirinas biosintetizadas.

Los experimentos se realizan con sustrato radioactivo para detectar incrementos relativamente pequeños, puesto que las fracciones enzimáticas aportan porfirinas al sistema.

Los blancos correspondientes contienen todo el sistema standard y la proteína calentada. Los resultados están resumidos en la Tabla 11. Sólo la fracción correspondiente al homogenato total biosintetiza protoporfirina, puesto que posee los sistemas enzimáticos "solubles" y asociados a partículas.

Los sobrenadantes carentes de mitocondrias convierten también, δ -ALA a tetrapirroles pero solamente lo hacen hasta coproporfirina. La fracción mitocondrial no es capaz de sintetizar porfirinas desde δ -ALA, puesto que no se encuentra incremento de las porfirinas basales.

Estos resultados demuestran que en el tejido glandular la conversión de Copro a protoporfirina está también asociada a mitocondrias.

Anaerobiosis

Se analiza el efecto del oxígeno sobre la formación de porfirinas tanto en homogenato total como en sobrenadantes de mitocondrias.

En los ensayos anaeróbicos, con burbujeo continuo de nitrógeno, se observa un mayor incremento de la cantidad de porfirinas totales biosintetizadas, respecto de las experiencias aeróbicas, como puede verse en la Tabla 12.

Los análisis cromatográficos revelan además, que coproporfirina es el producto final en esos ensayos, con cantidades menores de uro y firiaporfirina y trazas de hexa y penta carboxil porfirinas, mientras que la cantidad de protoporfirina concuerda con la de los ensayos testigos.

Estos hallazgos revelan, por consiguiente, que el oxígeno es un factor necesario para la transformación de copro a protoporfirina llevada a cabo por las fracciones particuladas de la glándula de Harder de rata.

Temperatura

El efecto que la temperatura de incubación ejerce sobre la biosíntesis de los tetrapirroles se ve en las Figuras 12 y 13. La cantidad de porfirinas formadas se incrementa con la temperatura hasta alcanzar un máximo en el rango de 55 a 65°C, triplicando el valor de las porfirinas sintetizadas a 37°C.

A esas temperaturas sólo se demuestra la presencia del isómero I de la uroporfirina, como se ilustra en el gráfico 13, donde están representados los porcentajes de las porfirinas obtenidas a 3 diferentes temperaturas.

En todos los ensayos se encuentra formación de PPG, pero nunca en cantidades excesivas.

A 0°C no se detecta síntesis de porfirinas significativa y a 85°C se ob-

Tabla 12

EFFECTO DEL OXIGENO SOBRE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

Las mezclas de incubación contienen además del sistema standard en exp. nº 1: homogeato total en exp. nº 2: sobrenadante de mitocondrias (ambos corresponden a 22 mg de tejido hémico). Atmósfera y sustrato según se indica. La incubación a 37°C durante 4 horas. Las porfirinas presentes se determinan según lo descrito en Métodos.

Condiciones de Incubación	Sustrato μ moles	Porfirinas (nmoles)		
		Coproporfirina	Protoporfirina	Total
Nº 1 Aire	-	trazas	2,3*	2,45*
Aire	δ -ALA 5 μ m	1,0	4,3	5,6
N ₂	"	5,4	2,4	12,5
Nº 2 Aire	-	-	1,9*	1,9†
Aire	δ -ALA 5 μ m	5,9	1,9	3,4
N ₂	"	6,1	1,8	11,3

* Son valores iniciales de porfirinas presentes en el sistema.

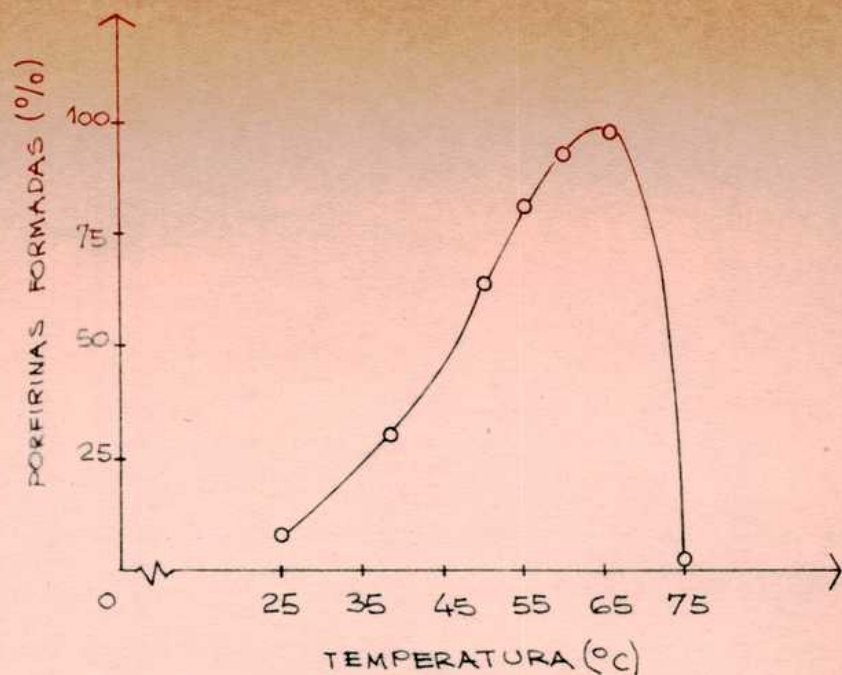


FIG. 12.- BIOSINTESIS DE PORFIRINAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

EL SISTEMA STANDARD SE INCUBA POR 3 HORAS A LAS TEMPERATURAS INDICADAS CON HOMOGENATO TOTAL (22 mg. DE TEJIDO)

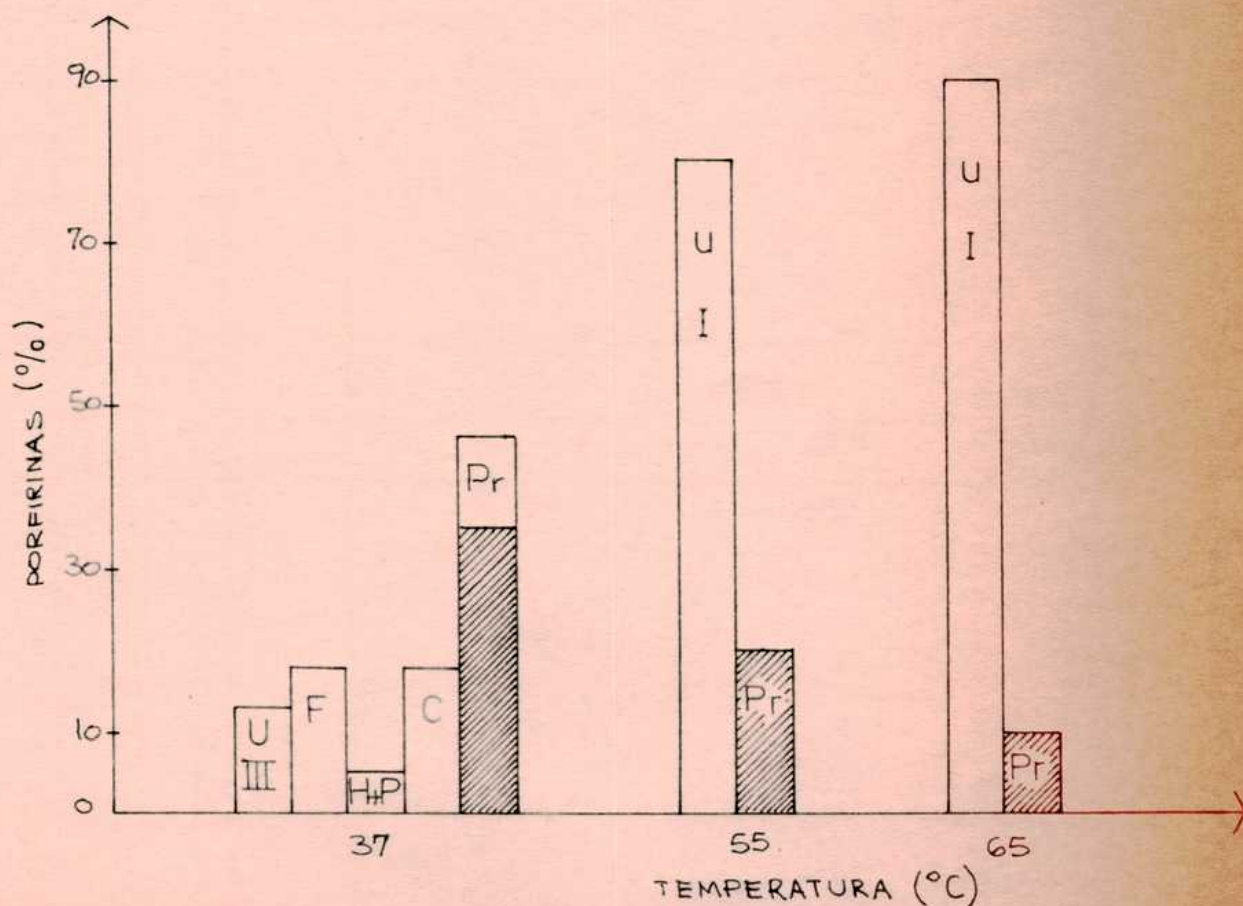


FIG. 13.- DISTRIBUCION DE PORFIRINAS FORMADAS A DIVERSAS TEMPERATURAS

LAS CONDICIONES SON LAS DESCRIPTAS EN FIG. 12.-

▨ PORFIRINAS PREEXISTENTES ; □ PORFIRINAS BIOSINTETICAS

rva destrucción de las porfirinas pre-existentes.

PBG como sustrato

El monopirrol es convertido activamente a porfirinas cuando se lo incubaba en homogenato total.

La síntesis tiene lugar a una velocidad que es lineal con el tiempo por así 10 horas, cuando se trabaja a concentraciones de sustrato no limitantes.

A concentraciones molares equivalentes a las de δ -ALA utilizadas, el rendimiento en la síntesis de porfirinas desde PBG, es mucho mayor. El incremento fue entre 6 y 8 veces el valor de δ -ALA (Tabla 13). Este alto rendimiento se debe fundamentalmente a la fracción uroporfirina.

T a b l a 13

BIO-SÍNTESIS DE PORFIRINAS PARTIR DE PBG

Los sistemas de reacción contienen en un volumen de 4 ml, buffer Tris pH 7,2 (10 μ moles) KCl (60 μ moles) MgCl₂ (12 μ moles), PBG en las concentraciones indicadas y 1 ml de homogenato total que corresponde a 22 mg de tejido glandular. Después de incubarse a 37°C en aerobiosis durante los tiempos señalados, las porfirinas libres presentes se determinan cuantitativamente.

PBG	Porfirinas totales (μ moles)		
	3 hs.	6 hs	20 hs.
0,5 μ moles	71	149	318
0,625 μ moles	92	191	430

El análisis de las diferencias en la composición de las porfirinas sintetizadas después de diferentes periodos de incubación se grafica en la Fig.15.

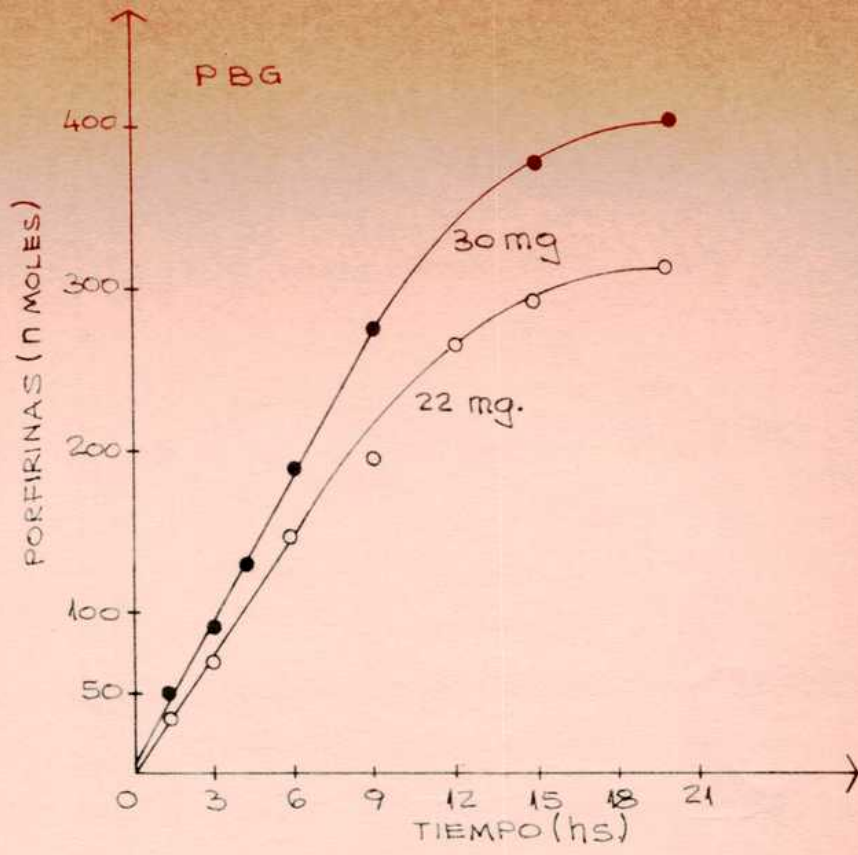


FIG. 14._ BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN FUNCION DEL TIEMPO

LAS CONDICIONES SON LAS DESCRIPTAS EN LA TABLA 13.

○—○ 22 mg. DE TEJIDO ; ●—● 30 mg. DE TEJIDO

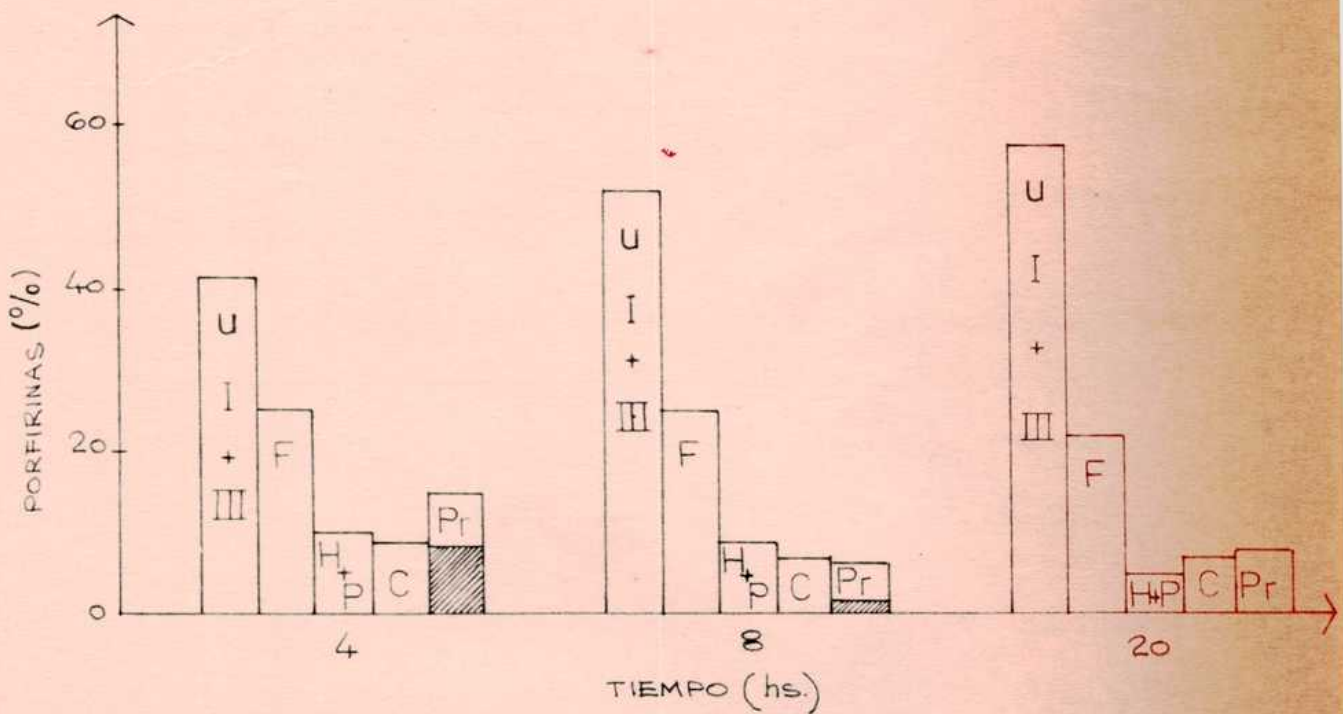


FIG. 15._ DISTRIBUCION DE PORFIRINAS FORMADAS A PARTIR DE PBG.

LAS CONDICIONES SON LAS DESCRIPTAS EN TABLA 13 Y LAS PORFIRINAS SE ANALIZAN SEGUN SE DESCRIBE EN METODOS.

▨ PORFIRINAS PREEXISTENTES ; □ PORFIRINAS BIOSINTETICAS

Puede verse que la fracción principal corresponde en todos los casos a uroporfirina, puesto que las otras porfirinas intermedias aparecen en cantidades menores. La fracción octa-carboxílica corresponde a una mezcla de los isómeros I y III, predominando el del tipo isomérico I en largos tiempos de incubación.

En estos ensayos la conversión de PPG en porfirinas llega a un 70% de rendimiento.

Se sabe que el porfobilinógeno forma fundamentalmente Uro III en medio neutro. Por ello, se realizaron diferentes controles para corregir la cantidad de porfirinas formadas no enzimáticamente, encontrándose que:

- 1) sistemas que contienen todos los componentes de rutina pero sin el sustrato (PPG) después de ser incubados, solamente dan los valores de porfirinas preexistentes en el sistema enzimático.
- 2) controles con el sistema standard pero con el homogenato total hervido contiene casi el 25% del PPG inicial a la terminación del ensayo.

Bajas concentraciones de sustrato (0,2 μ M) forman una cantidad considerable de porfirinas parcialmente descarboxiladas, además de la fracción uro las que son convertidas en copro y protoporfirinas si se prolonga el período de incubación. En estos ensayos el % de uroporfirina I es notoriamente menor.

Para estudiar directamente la termolabilidad del sistema enzimático "porfobilinogenogenasa", se calienta la fracción proteica durante 15 minutos a 60°C, enfriándose la inmediatamente y se la agrega al sistema de incubación.

Los resultados están sintetizados en la Tabla 14.

Al analizarse las porfirinas formadas en los ensayos con enzima precalentada, se comprueba que sólo se biosintetiza uroporfirina del tipo isomérico I. Además, se observa un leve incremento en la síntesis total de porfirinas. Se demuestra por lo tanto, que la capacidad de biosintetizar uro III se pierde por el tratamiento térmico.

T a b l a 14

EFEECTO DEL PRECALENTAMIENTO DEL SISTEMA ENZIMÁTICO

La mezcla de incubación es similar a la de la Tabla 13 y contiene como preparación enzimática en Exp. 1: homogenato total (1 ml) y la misma fracción precalentada durante 15 min. a 60° C en Exp. 2 (1 ml) y en Exp. 3 (1,5 ml). Las cantidades agregadas equivalen a 20 mg en Exp. 1 y 2 y de 30 mg de tejido glándular en Exp. 3.

Sistema enzimático	Porfirinas formadas	
	Totales nm	Uro I %
Exp. 1 Normal	90	23
Exp. 2 Calentado	105	100
Exp. 3 Calentado	180	100

3.- GLICOCOLA como sustrato

La funcionalidad de todo el sistema enzimático de biosíntesis de protoporfirina a partir de sus precursores primarios, es posible demostrarla mediante el uso de un sustrato radioactivo. Las glándulas de Harder homogeneizadas con la misma solución que la descripta en "Métodos" para la suspensión mitocondrial se centrifugan y las diferentes fracciones se incuban con Gli 2-C¹⁴, succinil CoA y cofactores durante 4 horas, en aerobiosis. Se aísla la protoporfirina y se mide su radioactividad. Los datos del porcentaje de incorporación promedio de varias experiencias se ilustran en la Tabla 15.

Estos resultados indican una síntesis pequeña pero definida de protoporfirina 9 a partir de los más simples precursores por el homogenato total, con-

T a b l a 15
INCORPORACION DE GLI 2-C¹⁴ EN PROTOPORFIRINA 9

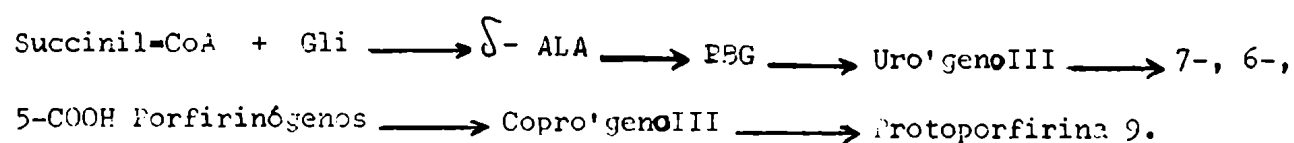
Las mezclas de reacción son similares a las de la Tabla 3, excepto las fracciones enzimáticas que son las que se indican. Después del agregado del sustrato Gli 2-C¹⁴ 0,02 M (5,97 x 10⁵ cpm se incuban durante 4 hs en aerobiosis, a 37°C. La protoporfirina se identifica, aísla y evalúa como se describe en Métodos.

Fracción subcelular	C ¹⁴ incorporado en protoporfirina 9	
	Cuentas/minuto	Incorporación %
Homogenato total (7,2 mg)*	240	0,14
Sobrenadante de mitocondrias (5,6 mg)*	10	0

* Los valores expresan mg de proteínas agregados.

firmando así la presencia de todas las enzimas de este camino metabólico en la glándula de Harter de rata.

Por lo tanto, podemos concluir que, en este tejido, la síntesis de tetrapirroles es similar a la descrita para otros sistemas de vida, tanto vegetal como animal o microorganismos y que podemos esquematizarla según el siguiente diagrama:



CONCLUSIONES Y DISCUSION

Las porfirinas que se encuentran presentes en la glándula de Harder de ratas blancas son: protoporfirina 9 en mayor proporción, un dato que ratifica observaciones previas de muchos investigadores, coproporfirina III y una porfirina que se comporte como tricarbóxilica en cromatografía sobre papel.

El contenido de porfirinas libres hallado en la glándula de ratas adultas es aproximadamente de 0,15 μg por mg de tejido fresco.

Observaciones preliminares realizadas en glándulas de ratas porfiricas, inducidas experimentalmente con diversas drogas, demuestran variaciones tanto en el contenido como en la proporción relativa de las porfirinas intermedias existentes.

Si se cotejan los pasos secuenciales de la biosíntesis de protoporfirina, las enzimas relacionadas y sus características principales, tales como localización intracelular, requerimientos de sustratos y cofactores, etc., los resultados obtenidos permiten deducir que en este tejido existe una funcionalidad similar a la encontrada en las diversas células estudiadas (46, 103,106).

Así, el tejido glandular es capaz de sintetizar tetrapirroles partiendo de los precursores primarios: glicocola y succinil CoA, es decir, posee todas las enzimas relacionadas con esta secuencia metabólica.

Este hecho confirma la naturaleza secretora de porfirinas de la glándula de Harder (35).

La primera enzima de este camino, δ -ALA sintetasa, está asociada, fundamentalmente, a la fracción mitocondrial, un hallazgo semejante a lo demostrado en diversos sistemas animales (109, 113-6, 119,20). En microorganismos se la encuentra en extractos libres de células, es decir, en forma soluble, pero después que las células bacterianas han sido rotas por sonicación (87,88).

El congelamiento y descongelamiento de las partículas subcelulares - un tratamiento que ha sido utilizado por varios investigadores para medir la formación de δ -ALA o porfirinas (86, 116) - no favoreció la actividad de la δ -ALA sintetasa en este tejido glandular. Por consiguiente, se realizaron estudios sobre las condiciones de extracción e incubación para lograr una preparación activa y estable de dicha enzima.

Sólo se logra demostrar su presencia, cuando las mitocondrias son pre-tratadas con una solución que contiene tioglicolato, EDTA y buffer Tris durante 30 minutos, antes de ser incubadas.

Diferentes grupos de investigadores han encontrado que EDTA favorece la actividad de la sintetasa. Así, el grupo de Neuberger demuestra que el agente quelante incrementa la formación de δ -ALA, cuando utiliza partículas de glóbulos rojos de pollos anémicos (85), lo que se confirma también para homogenatos de hígado de rata porfírica.

Tschudy y colab. logran obtener valores mucho más altos de la actividad de sintetasa, midiéndola en presencia de EDTA, compuesto que afecta la posterior utilización del producto sintetizado (δ -ALA) tanto en suspensiones mitocondriales como en homogenatos de hígado de ratas porfíricas (113, 118).

Granick y Urata, trabajando con partículas mitocondriales de hígado de cobayos con porfiria experimental, comprueban que el EDTA incrementa la producción del primer intermediario y sugieren que el efecto estimulante se debe a su capacidad para estabilizar las mitocondrias (116).

Por otra parte, Burnham y Lascelles en sus intentos de purificación de la enzima de Rh. spheroides, utilizan un agente reductor β -mercaptoetanol y agentes quelantes: o-fenantrolina y EDTA.

Con su metodología logran una purificación de la sintetasa de 10 veces y aducen que la enzima bacteriana es muy lábil, la que puede ser protegida, en algún grado, por los agentes tiólicos y quelantes. Con fracciones más pu-

rificadas no consiguen resultados muy confiables (erráticos).

Nuestra propia experiencia establece que ambos compuestos: tioglicolato y EDTA son efectivos agentes estabilizantes y requisitos imprescindibles para determinar la actividad de Σ -ALA sintetasa glandular.

El sistema enzimático utiliza glicocola y succinil CoA como sustratos primarios. Cuando se emplea succinato, CoASH y cofactores, el rendimiento es bastante más bajo.

Los estudios de requerimiento del sistema mitocondrial glandular demuestran la necesidad de fosfato de piridoxal, CoASH, ATP y iones magnesio, confirmando a estos compuestos como cofactores de la reacción. El oxígeno es también imprescindible para la actividad en cuanto permite la activación del succinato.

Si bien el ATP es un cofactor necesario para la formación de succinil CoA, el efecto inhibitorio observado a concentraciones mayores de 10^{-3} M del nucleótico, puede ser explicado por una inhibición tipo "feed-back", relacionando el ciclo de Shemin con el de la síntesis de porfirinas (75, 342).

El ácido Σ -aminolevúlico es el intermediario común en los caminos metabólicos que divergen hacia la síntesis de porfirinas y purinas.

Como en otros caminos ramificados regulados por una retro-inhibición parece razonable postular que un exceso de ATP, un producto final de la biosíntesis de nucleótidos purínicos puede inhibir la enzima que cataliza la primera etapa de estas secuencias divergentes.

El producto de la reacción - Σ ALA - inhibe significativamente la actividad enzimática que lo genera. Este hecho apoya la idea de Kikuchi y colab. de que los sustratos, glicocola y succinato ambos activados, forman el ácido α amino β ceto alípico el que se descarboxilaría aún unido a la enzima (89). Es decir que las reacciones de condensación y descarboxilación serían simultáneas y se realizarían sobre la proteína.

La biosíntesis del segundo intermediario de este camino metabólico

- PPG - es catalizada en este tejido glandular por la enzima δ -ALA dehidratasa, que similarmente a lo hallado en todos los sistemas de vida investigados, está localizada en el citoplasma, no asociada a partículas (46, 103, 106, 209).

Se demuestra que es una enzima sulfhídrica y que incrementa su actividad en anaerobiosis (Tabla 8).

Los estudios de caracterización de la δ -ALA dehidratasa de la glándula de Harber se discutirán en la segunda parte de esta presentación.

La existencia de las etapas subsiguientes como de las enzimas relacionadas se establecen indirectamente, por estudios con diversos precursores y variaciones en las condiciones de los sistemas de reacción.

Así, la fracción sobrenatante libre de mitocondrias, de homogenato de la glándula de Harber, cuando se lo incuba con δ -ALA o PPG es capaz de catalizar la formación de los porfirinógenos conocidos como intermediarios, es decir, los tetrapirroles reducidos que poseen 8-, 7-, 6-, 5- y 4- grupos carboxilos en las cadenas β , β' laterales de los monopirroles.

Estas observaciones demuestran concluyentemente que el sistema sintetizante de uro y coproporfirinógeno, es decir, los complejos enzimáticos "porfobilinógenasa" y "descarboxilasa" son también solubles y están localizados en el citoplasma.

Hallazgos que son semejantes a los informados por otros investigadores en muy diversos tejidos (46, 109, 213).

Cuando el precursor utilizado es δ -ALA, sólo se biosintetizan porfirinas de la serie isomérica III, siempre que se trabaje a temperaturas fisiológicas (25-38°C). Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura a valores de 50-60°C, si bien el rendimiento es mayor, - para períodos cortos, 3 horas - sólo se logra sintetizar el isómero I de la uroporfirina, lo que indica la labilidad del sistema formador del isómero III, así como del sistema descarboxilante que lleva a coproporfirinógeno.

Consiguientemente, queda demostrado que la δ -ALA-D y la Uro'gen sintetasa son enzimas termoestables.

La disminución en la formación de porfirinas totales por altas concentraciones de δ -ALA (Tabla 10), presupone una inhibición por sustrato.

Con homogenatos no calentados y PBG como sustrato en cantidades no limitantes, se forma conjuntamente con el isómero III, el isómero I del uroporfirinógeno, siendo el que se acumula en mayor proporción después de largos períodos de reacción. Hallazgos similares han sido informados para otros sistemas biosintéticos (195, 213, 221). Estos resultados hacen presuponer que la Uro'gen cosintetasa, enzima que controla la formación del tipo isomérico III se inactiva durante el curso de la reacción o que el producto la inhibe selectivamente.

Por otra parte, la sobreproducción de uro I, en tiempos menores, puede ser explicada por un exceso de sustrato que sobrepasa la capacidad de sintetizar Uro'gen III.

Para convalidar la tesis de la susceptibilidad diferencial al calor del complejo Uro'gen sintetasa-cosintetasa y descartar la posibilidad de considerar la aparición del tipo isomérico I, como un artefacto de la reacción, se preincubó la preparación enzimática sin sustrato a 60° C. Se encuentra que incubando aún en concentraciones de PBG limitantes, sólo aparece como producto uroporfirina I, confirmando así la termolabilidad de la Uro'gen III cosintetasa.

El hecho de que aparezcan porfirinas con 8-, 7-, 6- 5- y 4- grupos carboxilos como productos acumulados en la transformación enzimática, indicaría que un mecanismo de descarboxilación secuencial similar al que opera en glóbulos rojos y en *Chlorella* tiene también lugar en esta glándula (195,266).

Los estudios de síntesis de tetrapirroles en función de diferentes fracciones subcelulares del tejido glandular permiten deducir que el sistema que cataliza la conversión de copro'gen III a protoporfirina 9 está localizado en

mitocondrias, por cuanto el sobrenatante carente de dichas partículas, sólo acumula coproporfirina.

Además, la coproporfirinogenasa de la glándula de Harder presenta un requerimiento absoluto por el oxígeno, observación que avala lo demostrado para la misma enzima de otras fuentes (103, 106).

La presencia de una porfirina, tanto en el tejido glandular como en los productos biosintéticos, que se comporta cromatográficamente como una tri-carboxílica, permite sugerir su existencia como intermediario real entre el coproporfirinógeno y la protoporfirina.

Muy recientemente, Kennedy y colab. han logrado determinar la estructura de esta porfirina tricarboxílica como el derivado 4,6,7-tri (β-carboxietil) 1,3,5,8 tetrametil 2 vinil porfirina (37).

Los datos aquí presentados demuestran que la producción de porfirinas por homogenatos de la glándula de Harder es mucho más eficiente cuando se utilizan δ-ALA o PEG como precursores, que a partir de glicocola y succinil CoA (Tablas 3,9,13).

Alrededor de un 0,1% de la radioactividad agregada en el sustrato glicocola es encontrada en la protoporfirina, después de la incubación, mientras que se observa muy buena formación de porfirinas con cualquiera de los otros dos sustratos (10 a 50% de transformación).

Por otra parte, debido a las cantidades pequeñas de δ-ALA que se miden, se debió adaptar los métodos existentes y poder así, medir variaciones de la actividad enzimática.

Varias hipótesis pueden ser planteadas para explicar el comportamiento diferencial de las preparaciones enzimáticas frente a los diversos sustratos.

Se ha visto que la síntesis de δ-ALA está asociada a partículas mientras que la de los intermediarios subsiguientes hasta copro'gen tiene lugar en el citoplasma, el que se convierte en protoporfirina nuevamente en la mitocondria.

Nuestros resultados evidencian que no hay problemas de permeabilidad, considerando la compartimentalización existente, para el copro'gen generado endógenamente.

En cambio, se puede admitir que una de las causas del bajo rendimiento de la primera etapa sería la existencia de barreras de permeabilidad para la succinil CoA agregada al sistema. Para descartar esta posibilidad se ensayó la técnica de congelar y descongelar mitocondrias, pero no se obtuvieron buenos resultados, quizás, por inactivación del sistema activante.

Sí, en cambio, dió resultados satisfactorios un pretratamiento con una mezcla compleja que contiene al agente quelante EDTA como ya se comentó.

Un factor muy relacionado con el supuesto anterior, sería también la presencia de una enzima deacilante muy activa, lo que determinaría una hidrólisis muy rápida del sustrato agregado.

Granick y Urata encuentran en sus preparaciones mitocondriales de hígado de cobayos porfiricos, una potente actividad de deacilasa, justificando así la baja capacidad catalítica observada (116).

La presencia de esta enzima en nuestro tejido no ha sido valorada.

Es posible admitir también una labilidad acentuada del sistema que activa al succinato como lo demuestran los resultados de la Tabla 5.

El hecho de que la adición de un extracto de levadura hervido favorece la reacción, señalaría la presencia de algún cofactor necesario para la tioquinasa o sintetasa, o bien la de un inhibidor de la deacilasa.

Por otra parte, la baja actividad detectada en la glándula de Harder en nuestras condiciones de trabajo puede deberse también, a factores directamente relacionados con la δ -ALA sintetasa.

Así, una extrema labilidad de la proteína, la presencia de un inhibidor, una vida media muy corta de la misma (rápido turnover) justificarían dicha consideración.

Burnham y Lascelles aducen que la δ -ALA sintetasa bacteriana es muy inestable (121) y varios investigadores; entre ellos Tschudy y Kikuchi determinan que la vida media de la enzima mitocondrial de hígado de rata es aproximadamente de 70 minutos (118,123).

Otra plausible explicación para nuestros resultados "in vitro" es que la porfirina presente en alta proporción en los sistemas de incubación, ejerciera un efecto "feed-back". Es decir, que el producto - protoporfirina 9 - inhibie-

ra la sintetasa que es la primera enzima de esta secuencia metabólica.

Diversos intentos realizados - al iniciar el trabajo - para eliminar las porfirinas del sistema enzimático, resultaron infructuosos. Se probaron fundamentalmente, descripciones selectivas con diferentes adsorbentes (celita, florisil, etc.).

Apoyando esta hipótesis se ha señalado que la enzima es inhibida por hemo principalmente, aunque Lascelles encuentra también una disminución de la actividad de la enzima de Rh. spheroides con otros tetrapirroles (121-2,144).

Todas las formas de vida pueden controlar la síntesis de los metabolitos para satisfacer los requerimientos del medio que la rodea.

Esta premisa implica la existencia de mecanismos regulatorios que mantienen el flujo de los precursores a las velocidades apropiadas.

Bajo condiciones normales, en los sistemas naturales, sólo se encuentran pequeñas cantidades de porfirinas, lo que da idea de la eficiencia del mecanismo de control que opera en la biosíntesis de los tetrapirroles.

La glándula de Harder sólo necesita suplir la pequeña cantidad de hemo requerido en el recambio de las propias hemoproteínas, tales como catalasa, peroxidasa y citocromos.

¿ Por qué, entonces, acumula protoporfirina?

Más aún, no conociéndose hasta el momento una función biológica para el acúmulo de dicho metabolito en este tejido.

Nuestros datos no nos permiten explicar el mecanismo responsable de la acumulación.

Uno podría suponer, especulativamente, la existencia de una falla en el sistema regulador de la biosíntesis de porfirinas en la glándula de Harder de los roedores, que conduce a una sobreproducción de protoporfirina 9. Una acumulación similar de porfirinas se observa en la protoporfiria eritropoyética humana (343,344).

Otra justificación plausible, sería una deficiencia en la captación del hierro, en la molécula de protoporfirina. Entre los varios factores que podrían prevenir esta incorporación podemos nombrar: una defectuosa incorporación del hierro a la porfirina por la enzima quelante, una deficiencia de Fe en el te-

jido, un mecanismo defectivo de la absorción, transferencia o movilización del metal dentro de la célula.

Los estudios histoquímicos de Cohn, quien obtuvo resultados negativos de la presencia de hierro en la glándula, estarían en concordancia con esta última suposición (28).

Muy recientemente, Wetterberg y colab. encuentran que la aparición de las porfirinas coincide con la maduración de respuestas corticales evocadas a estímulos visuales. Sin embargo, desconocen si hay una relación funcional entre la maduración del sistema visual y el contenido porfirínico de la glándula o si es simplemente una coincidencia.

Sus observaciones les hacen sugerir que la glándula de Harder podría actuar como un fototransductor secundario (extraretinal) en ratas ciegas. Una posibilidad sería que las porfirinas de la glándula permitan la conversión de frecuencias ultravioletas por debajo del umbral perceptivo a frecuencias dentro del rango visual (345-385 m μ).

Ciertamente, es necesario un mayor cúmulo de información acerca de la síntesis del hemo en este tejido, para establecer el mecanismo real de su regulación, y explicar el porqué y el para qué de esta acumulación.

RESULTADOS

Parte II

§- ALA DEHIDRATASA

Obtención, purificación y propiedades

δ-AMINOLEVULINICO DEHIDRATASA

En la primera parte de Resultados presentamos evidencias experimentales que demuestran que el camino biosintético de los tetrapirroles en la glándula de Harder de ratas es similar al descrito en otras fuentes naturales.

Con el objeto de clarificar el mecanismo responsable de la acumulación de protoporfirina en este tejido, consideramos interesante efectuar estudios sobre las actividades catalíticas de las enzimas involucradas en su camino metabólico. Para ello, y como parte de un trabajo comparativo, efectuamos la aislación y purificación de la δ-ALA dehidratasa, enzima que cataliza la condensación de dos moléculas de δ-ALA para formar porfobilinógeno, la primera estructura cíclica y el más simple de los pirroles de esta secuencia.

Esta enzima tiene asignado el nombre de 5 aminolevulinato hidrolasa (adicionante del ácido 5 aminolevúlico y ciclizante (EC 4.2.1.24) por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, aunque se la conoce como δ-ALA dehidratasa o más simplemente "dehidratasa", denominaciones que elegimos por razones de conveniencia.

Se sabe que esta enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza. Ha sido purificada de hígado de buey (163), eritrocitos de pollo (166), Kh. spheroides (121), bacteria propiónica (171), eritrocitos humanos (174), hígado y bazo de ratones (175), hojas de trigo (162), conjuntamente con la de este trabajo, de levadura (111), hígado de vaca (173), y más recientemente de callos de semillas de soya (182), hongos Ustilago sphaerogena (181) y hojas de tabaco (177). Existentes diferencias entre las numerosas dehidrasas informadas de acuerdo a su origen, por lo que los estudios realizados con la de este material permite su comparación.

ACTIVIDAD DE δ-ALA DEHIDRATASA

La velocidad de la reacción enzimática se determina por el método colorimétrico, con el reactivo de Ehrlich modificado (108), midiendo la absorción a 555 nm producida por el producto formado.

Este reactivo que contiene p-dimetil-amino-benzaldehído en medio ácido forma un compuesto rojo de condensación con sustancias monopirrólicas que poseen una posición λ' no sustituida que absorbe a 555 nm.

El sistema de reacción, descrito en Métodos, se preincuba generalmente 1 hora con el activador tiólico y luego de incubar con el sustrato se efectúa la colorimetría y se expresan los resultados utilizando el coeficiente de extinción molar determinado según Métodos (sección VI-b).

Unidad enzimática

Se expresa como la cantidad de enzima requerida para catalizar la formación de 1 nmol de porfobilinógeno (PBG) por hora, en las condiciones experimentales detalladas.

Actividad específica

Se expresa como unidades por mg de proteína, en las condiciones standards.

P U R I F I C A C I O N

El procedimiento tipo que se siguió en los ensayos de purificación para la obtención de las diferentes fracciones enzimáticas así como los resultados, son los que se detallan y resumen.

Todas las operaciones se realizan en un rango de temperatura que oscila entre 0 y 40°C, salvo mención especial.

I.- Extracto crudo

Se parte de 12 g de peso húmedo de tejido glandular, recientemente disectado o conservado en congeladora a -16°C, y que provienen de aproximadamente 50 ratas. Se usan en la mayoría de los casos, ratas machos de 300 g de peso, por cuanto la presencia de esta enzima no es función de la edad en los animales adultos, lográndose así mayor cantidad de material.

El tejido se homogeneiza en mortero y pilón, con sacarosa 0,25 M en una relación de 1:10 (p/v) como se describe en Métodos. La suspensión se centrifuga a 700 x g durante 10 min, descartándose el precipitado que contiene núcleos, células enteras, restos celulares y arena. La actividad ca-

talítica de la fracción sobrenadante que se designa como "extracto crudo", se toma como punto de partida del proceso de purificación.

II.- Centrifugación diferencial

El extracto crudo de la etapa anterior se somete a una centrifugación diferencial siguiendo esencialmente la metodología de Hogeboom-Schneider (315). El sobrenadante de 700 x g se centrifuga a 10000 x g durante 30 minutos y el sedimento de mitocondrias obtenido se lava 2 veces con la misma solución de sacarosa. En esta etapa, trabajando a bajas temperaturas, entre 0 y -2°C, es posible descartar una capa lipídica congelada que aparece en la superficie del líquido. Su eliminación es muy conveniente, por cuanto su presencia interfiere en las centrifugaciones del fraccionamiento salino que se llevan a cabo posteriormente. Cuando se prueba actividad en la fracción mitocondrial las partículas se suspenden en buffer fosfato 0,134 M pH 6,8 en un volumen tal que 1ml de la suspensión resultante contiene las mitocondrias correspondientes a 0,5 g de glándula. El sobrenadante del homogenato libre de mitocondrias (sobrenadante de 10.000 x g) es a veces centrifugado a 78.000 x g por 60 minutos en una ultracentrífuga preparativa (Spinco model L. rotor 30). En los sobrenadantes como en los sedimentos de ambas centrifugaciones se determina actividad enzimática.

Los precipitados, partículas mitocondriales y microsomas obtenidos por centrifugación a 10.000 y 78.000 x g respectivamente, no muestran actividad de dehidrasa y por lo tanto se descartan. Los resultados pueden verse en la Tabla 7, correspondiente a la primera parte de resultados. La medición de actividad en ambos sobrenadantes permite evaluar más de un 95% de la actividad inicial, ratificando así que en este tejido la δ -ALA dehidratasa es una enzima "soluble"

III.- Fraccionamiento salino

Para delimitar la zona de precipitación de esta enzima con sulfato de amonio se efectuaron ensayos previos probando diversos rangos de fraccionamiento. Se ensayaron primeramente, zonas amplias 0-35, 35-50, 50-70,

70-90, que luego se acotaron en rangos de 10 en 10% de saturación. En función de los resultados que se presentan en Tabla 16 y Fig. 16 se adopta el procedimiento que se detalla.

El sobrenadante libre de mitocondrias se lleva a 30% de saturación con sulfato de amonio sólido. Este agregado se hace lentamente, para prevenir co-precipitaciones, con agitación mecánica. Se deja reposar 30 min, para completar la precipitación y se centrifuga a 10.000 x g durante 10-15 minutos. A la solución sobrenadante se agrega sulfato de amonio sólido para obtener una saturación final de 55% y luego se estaciona y centrifuga 30 min, el sobrenadante remanente se lleva a 70% de saturación, descartando se el sobrenadante.

A lo largo de todo el fraccionamiento, el pH se controla y mantiene a neutralidad por el agregado de gotas de KOH 2 N.

Todos los precipitados se guardan congelados y cuando se ensayan para actividad se suspenden en el mínimo volumen de buffer fosfato 0,134 M pH 6,8. El material insoluble, si presente, se elimina por centrifugación.

La medición de la actividad en cada uno de éstos precipitados demuestra que la fracción más activa corresponde al rango 30-55% de saturación. Se decidió descartar el precipitado entre 0 y 30% puesto que si bien muestra alrededor de un 15% de la actividad original la gran cantidad de proteína presente disminuye sensiblemente el grado de purificación. El precipitado de más de 55% de saturación, mucho menor, no presenta actividad enzimática significativa, por lo que el sobrenadante de la segunda precipitación salina se descarta también, en la metodología habitual.

IV.- Adsorción y elución-Gel de fosfato de calcio

Para llevar a cabo esta etapa de purificación la concentración de proteínas de la solución enzimática que precipita entre 30 y 55% de saturación se regula siempre a alrededor de 6-8 mg/ml con el mismo buffer fosfato.

A cada volumen de solución enzimática se le añaden 0,5 volúmenes de gel de fosfato tricálcico envejecido. El adsorbente usado tiene una concentración de 30 mg/ml. En ensayos pilotos se había encontrado que cuando se

Tabla 16

FRACCIONAMIENTO SALINO DE LA δ -ALA DEHIDRATASA

En las diferentes fracciones suspendidas en buffer fosfato 0,134 M pH 6,8 se mide actividad segun se describe en Método. La actividad en cada una de las fracciones se expresa como por ciento de la actividad total recuperada.

Fracción de saturación:	Actividad	Actividad específica Unidades/mg
0,00 - 0,30	15	0,8
0,30 - 0,40	39	12,3
0,40 - 0,50	22	27,7
0,50 - 0,60	14	12,1
0,60 - 0,70		,4

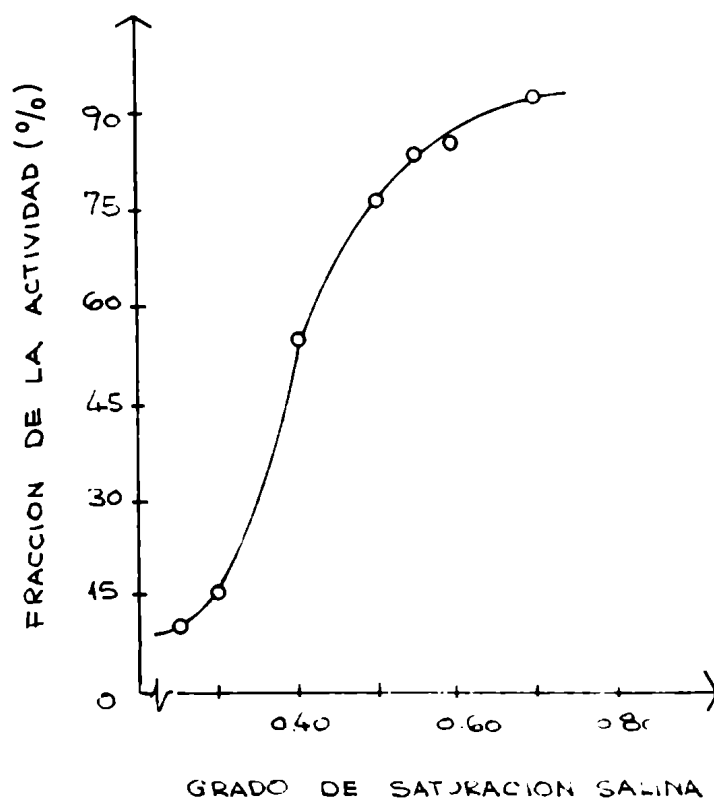


FIG. 16.- PRECIPITACION DE LA δ -ALA DEHIDRATASA.-

FRACCION DE LA ACTIVIDAD (%) QUE TIENE EN CADA UNO DE LOS RANGOS DE SATURACION. LAS CONDICIONES SON LAS DE LA TABLA 16.-

usa gel de fosfato de calcio envejecido (3 meses a 1 año), la proteína es adsorbida efectivamente por el gel.

La mezcla se agita mecánicamente durante 10 min, y el gel se recolecta por centrifugación a 10.000 x g por 10 min. Este proceso se repite dos veces y los sedimentos se reúnen para proceder a la elución.

Después del tercer tratamiento consecutivo no se detecta actividad en el sobrenadante. La proteína enzimática selectivamente adsorbida, se eluye por sucesivos agregados de pequeños volúmenes (2-4 ml) de buffer de fosfato 0,134 M conteniendo sulfato de amonio en cantidad equivalente a 5% de saturación. Las suspensiones se agitan durante 15 min y se centrifugan. Generalmente 3 eluciones son suficientes para lograr máxima desorción en el menor volumen. Este proceso puede seguirse por lectura espectrofotométrica de las proteínas a 280 nm en los eluidos. La recuperación de la actividad enzimática respecto de la etapa anterior es muy buena lográndose hasta un 95% de rendimiento cuando se efectúa una cuarta elución. Sin embargo, se prefiere tener eluciones más concentradas, alcanzando un rendimiento promedio del 80%.

La purificación que se obtiene es aproximadamente de 25 veces respecto del extracto crudo.

En esta etapa resulta conveniente combinar varias preparaciones para su posterior tratamiento. Los eluidos reunidos se concentran por precipitación con sulfato de amonio a 55% de saturación o por presión reducida a través de membranas viscosas a 0°C (tubos de diálisis). Las preparaciones enzimáticas son estables por lo menos 30 días cuando se las conserva en congeladora a -16°C.

V.- Filtración por gel

Los eluidos del gel de fosfato de calcio se someten a continuación a una separación cromatográfica sobre geles. Para ello, los eluidos concentrados se aplican a una columna de Sephadex G-100 preparada según se describe en Métodos. Ensayos previos, mostraron que, bajo nuestras condiciones de trabajo, soluciones enzimáticas de 2 ml conteniendo 10 a 14 mg de proteínas son necesarias para obtener una buena separación por gel.

Con esta concentración de proteínas se logra máxima purificación. Cuando se usan concentraciones menores, el rendimiento logrado es también menor, mientras que a mayores concentraciones no se obtienen buenas resoluciones. La elución de la columna se realiza con el mismo buffer de equilibrio, es decir, buffer fosfato conteniendo ClK 0,1 M a pH 6,8 recogiéndose fracciones de 3 ml. El flujo se regula usualmente a 12 ml por hora. La elución de las proteínas se controla midiendo la absorción en la zona ultravioleta a 260 y 280 nm y la actividad enzimática.

Las proteínas eluidas presentan una distribución que está representada en la Fig. 17.

La fracción activa se eluye en un único pico proteico (fracciones 42 a 57 ml) que es, además, el mayor en cantidad, apareciendo un contaminante proteico inactivo con el frente del solvente y en algunas oportunidades otro más pequeño después del pico principal.

Se reúnen aquellas fracciones que contienen buena actividad de δ -ALA dehidratasa -las que están señaladas en el gráfico con una línea entre flechas - se evalúan y concentran.

La actividad específica que se obtiene varía entre 790 a 890 unidades por mg de proteínas en diversas preparaciones. La actividad específica máxima que se logra en fracciones únicas es de 1,100 y representa aproximadamente 190 veces la purificación.

El dato que figura en la tabla general para esta etapa constituye un valor promedio de varias columnas realizadas con diferentes cantidades de proteínas. En esta etapa se recupera aproximadamente el 60% de la actividad sembrada en la columna.

Una recopilación de los datos y resultados de un proceso de purificación tipo puede verse en la Tabla 17.

Resumiendo, podemos concluir que se logra una purificación de la enzima δ -ALA dehidratasa de aproximadamente 150 veces el extracto crudo de la glándula de Harder de rata, con un rendimiento del 26%.

Después de la última etapa descrita no se intentaron otros procedimientos de purificación debido a la limitación en la cantidad de proteínas.



FIG. 17. DISTRIBUCION CROMATOGRAFICA DE UNA PREPARACION ENZIMATICA DE SALA-DEHIDRATASA.-

- ETAPA IV - SOBRE SEPHADEX 6-100. LAS CONDICIONES DE TRABAJO Y ANALISIS SON LAS DESCRIPTAS EN MATERIALES Y METODOS. -
 (↔) FRACCION ENZIMATICA QUE SE REUNE - ETAPA V -

T a b l a 17

PURIFICACION DE LA δ -ALA DEHIDRATASA

Se obtienen las preparaciones enzimáticas partiendo de 12 g de tejido fresco según lo descrito. Las diferentes fracciones se preactivan e incuban en la mezcla de reacción que contiene buffer fosfato pH 6,8 (134 μ moles), cisteína (20 μ moles) y δ -ALA (5 μ moles) en un volumen final de 2 ml como se detalla en Métodos. Las unidades de actividad se expresan como nmoles de PEG formados por hora.

Etapa	Fracción	Proteínas mg	Actividad Unidades	Actividad específica U/mg	Recimiento %	Pureza relativa
I	Extracto crudo	1.010	10.620	5,9	100	1
II	Sobrenadante de 10.000 -7%.000 x g	855	10.388	11,8	98	2
III	Precipitado de $SO_4 (NH_4)_2$ 30-55%	152,8	7.205	47,1	69	8
IV	Eluido de PO_4Ca_3	31,8	4.886	153	46	26
V	Filtrado por Sephadex G-100	3,2	2.764	860	25	146

En el curso de estos estudios se probaron además, otras técnicas de purificación.

Desnaturalización térmica diferencial

El sobrenadante libre de mitocondrias se somete a un calentamiento en el rango 56-60°C durante 5 minutos. Inmediatamente se enfría en baño de hielo, se centrifuga 10 min y se determina actividad. Si bien se encuentra que hay purificación -alrededor de $1\frac{1}{2}$ vez- el rendimiento es muy bajo. La poca reproducibilidad de este paso y la inactivación considerable que implica, determinaron la no elección de esta técnica.

Diálisis

Los sobrenadantes de 10,000 o 78.000 x g se dializan durante 24 a 48 hs. contra agua destilada. Se observa precipitación y buena pérdida de actividad ($\pm 50\%$) por lo que también se la desecha.

PROPIEDADES DE LA δ -ALA DEHIDRATASA

En el estudio de las propiedades de la enzima se utilizan las fracciones eluidas de las etapas IV y V de purificación, salvo que se indique especialmente.

I.- PUREZA

El único producto formado por la enzima es PPG, como se demuestra por el cromógeno que da con el reactivo de Ehrlich, su R_f característico de 0,48 en el sistema butanol:acético:agua y la carencia total de porfirinas detectadas por fluorescencia en el sistema de incubación.

Los diferentes extractos enzimáticos obtenidos en cada una de las etapas del proceso de purificación se someten a un estudio electroforético sobre columnas de gel de poliacrilamida para determinar el grado de purificación (Fig. 18). Antes de ser corridas electroforéticamente, tanto en gel de poliacrilamida como en gel de almidón, las fracciones enzimáticas de la última etapa de purificación con actividad específica mayor de 600 U se reúnen y concentran por diálisis inversa contra Carbowax 20 M, según metodología de Kohn (340). Las soluciones se colocan en tubos de diálisis o papel

de celofán y las bolsitas cerradas se recubren con polvo seco de polietilenglicol, hasta que se logra la concentración deseada, generalmente 10 veces.

Todas las muestras, en sacarosa 0,5 M, se aplican sobre los geles de poliacrilamida, se corren, tiñen, y decoloran según se indicara en Métodos (sección XVI-a). En la figura 18 se ven los corrimientos de tres preparaciones correspondientes a las etapas II, IV y V. La enzima más purificada (etapa V) demuestra ser monodispersa en gel de poliacrilamida y migra hacia el ánodo también como un único componente, en gel de almidón a diferentes pH. Ambos resultados son coherentes con el comportamiento de una proteína homogénea.

Cuando a la proteína enzimática de la última etapa concentrada se la recromatografía sobre columna de Sephadex G-100, se obtiene un solo pico neto de proteína que coincide con la actividad enzimática, no habiendo incremento significativo de la actividad específica. Todos estos resultados apoyan el criterio de pureza de la proteína aislada.

Es de hacer notar que la α -ALA dehidratasa de la glándula de Harder así obtenida, muestra la misma movilidad electroforética en gel de almidón que las provenientes de hígado de vaca (178) y de callos de semilla de soya (182).

II.- ESTABILIDAD

a) Conservación: La actividad catalítica de la dehidrasa glandular no se afecta apreciablemente por conservación en congeladora. La preparación que se obtiene después del fraccionamiento salino es estable durante 3 meses cuando se guarda el precipitado a -16°C . Como la disponibilidad del material de partida (ratas) no era regulable se la conserva en ese estado, siendo luego purificada para su ulterior uso. Sin embargo, cuando el precipitado es sometido a congelamientos y descongelamientos sucesivos, la preparación pierde actividad, cerca del 40%, después de 5 tratamientos.

La fracción enzimática más purificada es inestable en soluciones diluidas. En soluciones concentradas, tanto esta preparación como la de la etapa IV, conservan actividad sin mayores pérdidas, durante 2 semanas, guardadas en congeladora.

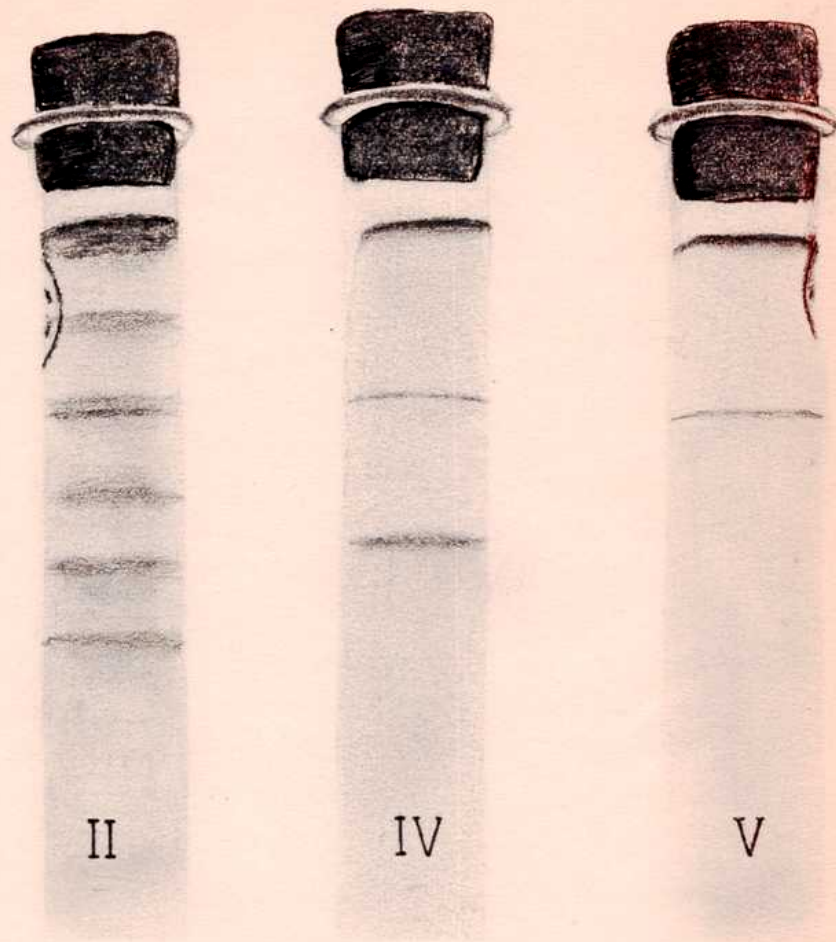


FIG. 18. - ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

II - SOBRENADANTE DE 10.000 Xg

IV - ELUIDO DE GEL DE FOSFATO DE CALCIO.

V - ELUIDO DE SEPHADEX G-100 - ZONA DE PICO.

b) Estabilidad térmica: Se realizan estudios de estabilidad térmica enzimática, precalentando la enzima a varias temperaturas por períodos de 15 y 30 minutos (Tabla 18)

La actividad residual después de los calentamientos se determina en las condiciones normales. Si se toma como valor control el de la enzima precalentada a 38° C se puede apreciar que la lehidratasa glandular es poco afectada por la temperatura. Calentada a 75° C aún retiene muy buena actividad. Un calentamiento a 85° C produce la inactivación total de la enzima ya a los 5 minutos.

T a b l a 18
E S T A B I L I D A D T E R M I C A D E L A
L E H I D R A T A S A

Las mezclas de reacción habituales conteniendo la fracción enzimática de etapa IV (0,6 mg) se precalientan a las diferentes temperaturas y por los tiempos indicados. Luego de incubar se determina la actividad residual y se expresa como nmoles de PEG formados por hora.

Temperatura °C	Tiempo min.	Actividad residual nmoles/h
38	15	83
	30	86
60	15	76
	30	71
75	15	69
	30	57
85	15	0

c) Diálisis: Cuando los sobrenadantes de 78.000 x g se dializan contra agua destilada por más de 24 horas se comprueba un efecto de agregación y precipitación de la enzima activa. La actividad, además, disminuye significativamente.

III.-CURSO DE REACCION

La formación de PBG a partir de δ -ALA se mide como una función del tiempo de incubación tanto en preparaciones crudas como en muy purificadas (Etapa V). Ambas fracciones muestran velocidades lineales por al menos 90 minutos que es el tiempo máximo estudiado como puede verse en la Fig. 19.

IV.- CONCENTRACION ENZIMATICA

Se estudia la velocidad de la reacción en función de la concentración de enzima en un amplio rango. Los resultados están representados en la Fig. 20 e indican que la cantidad de PBG formado es directamente proporcional a la cantidad de enzima agregada. El rango estudiado comprende desde 0,1 mg hasta 1 mg de proteína proveniente de la etapa IV de purificación.

V.- PREINCUBACION CON CISTEINA

Para comparar con δ -ALA dehidratasa de diversos tejidos animales que son activadas por reactivos sulfhidrúlicos, se estudia el efecto de estas sustancias sobre la enzima glandular.

Se observa que el incremento de la actividad catalítica es mayor cuando se preincuba la enzima con el reactivo tiólicico, que cuando dicho compuesto es adicionado simultáneamente con el sustrato a la mezcla de reacción.

En la Fig. 21 se representa el curso de reacción de la preactivación de la enzima por cisteína 0,01 M. El aumento es lineal hasta los 15 min y se obtiene completa activación a los 60 minutos de preincubación.

El efecto de la concentración de cisteína sobre la activación enzi-

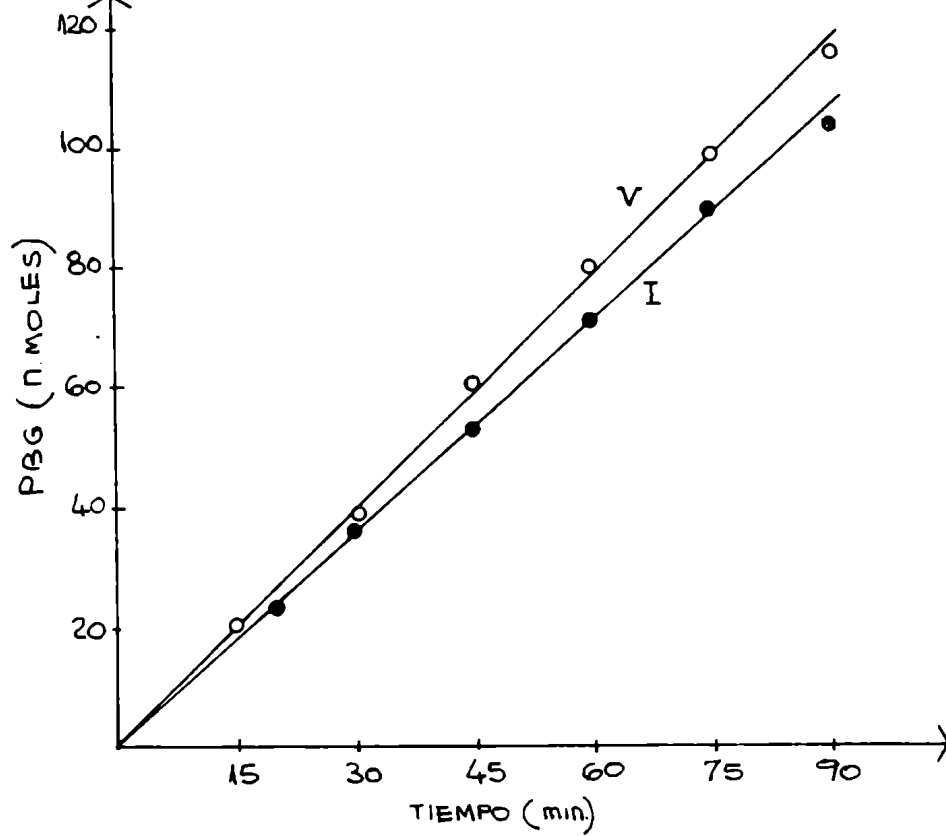


FIG. 19. CURSO DE REACCION

LAS MEZCLAS DE REACCION SE INCUBAN LOS TIEMPOS INDICADOS EN LAS CONDICIONES NORMALES, CON ENZIMA ●—● ETAPA I: 12 mg. ○—○ ETAPA V: 0.1 mg. —

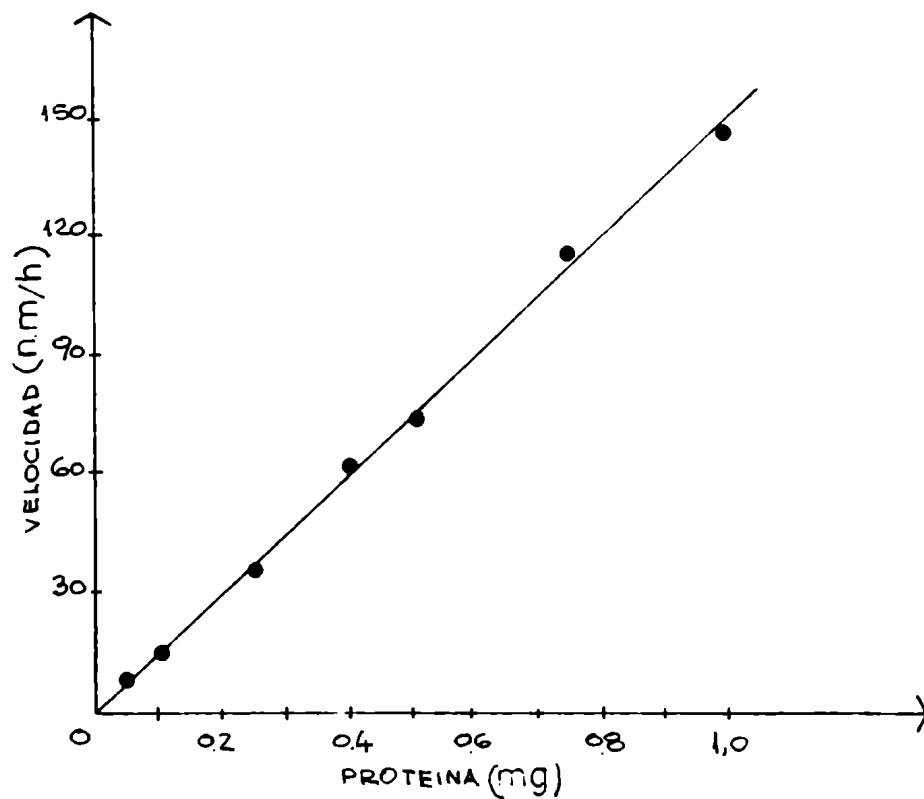


FIG. 20. CONCENTRACION DE ENZIMA. —

LAS MEZCLAS DE REACCION Y LAS CONDICIONES SON LAS USUALES CON EL AGREGADO DE DIFERENTES CANTIDADES DE ENZIMA (ETAPA IV) CONCENTRACION 2 mg/ml. —

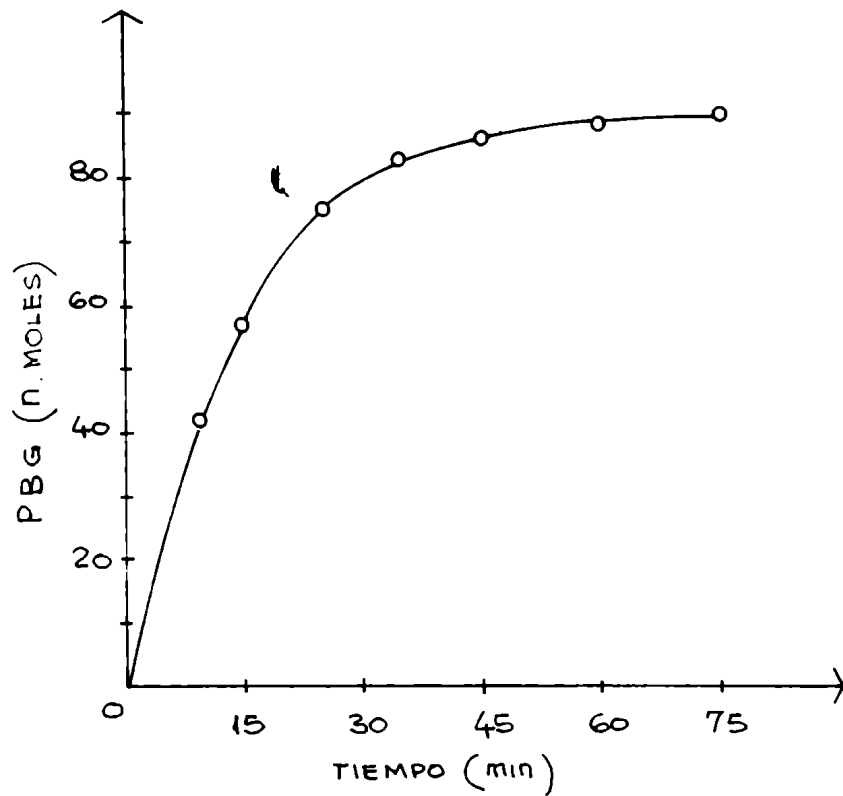


FIG. 21_ PREINCUBACION CON CISTEINA_

EL SISTEMA DE REACCION STANDARD SE PREINCUBA A LOS DIFERENTES TIEMPOS CON CISTEINA 0.01 M. LUEGO SE AGREGA EL SUSTRATO Y SE INCUBA EN CONDICIONES NORMALES. ENZIMA: 0.6 MG. - ETAPA IV

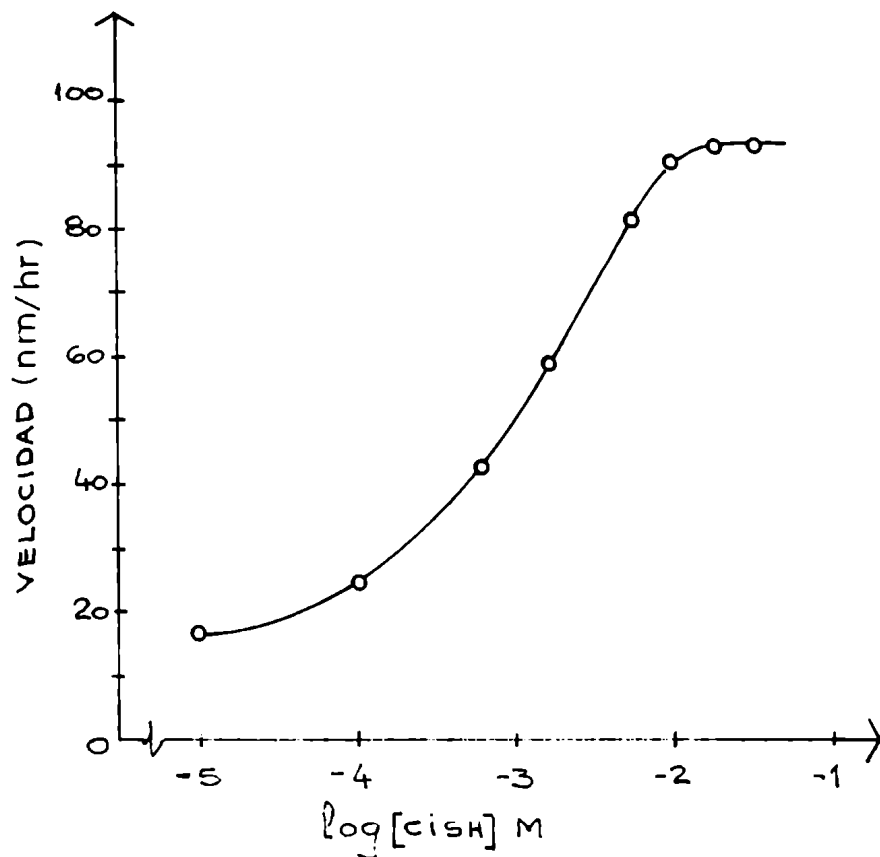


FIG. 22_ EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CISTEINA_

LAS MEZCLAS DE REACCION SE PREINCUBAN 60 MIN. CON LAS CONCENTRACION DE CISTEINA INDICADAS. LUEGO SE DETERMINA ACTIVIDAD. ENZIMA: 0.6 MG. DE ETAPA IV.-

mática puede verse en la Fig. 22. Hay un incremento de la velocidad de preactivación con el aumento de la concentración del reactivo tiólico, que se hace máxima a una concentración aproximada de cisteína 0,01 M.

El glutation reducido tiene la misma efectividad. De estos resultados se selecciona el tiempo de preincubación de 60 min con cisteína 0,01M para todos los ensayos de rutina.

VI.- TEMPERATURA

Para examinar el efecto de la temperatura de incubación sobre la velocidad de reacción, los sistemas a ensayar se activan con cisteína durante 1 hora y luego de agregar el sustrato se incuban a las diferentes temperaturas. En cada ensayo se determina el producto formado en estas condiciones (Fig.23). Se observa máxima actividad a los 55° C y el gráfico de Arrhenius de los datos obtenidos, consigna una energía de activación de 11.000 calorías por mol. (Fig. 24).

VII.- pH OPTIMO

Se utilizan diversas series de mezclas de reacción a diferentes concentraciones de ión hidrógeno para estudiar la dependencia de la reacción enzimática con el pH. En cada caso 1 ml de los siguientes buffers: fosfato 0,134 M con valores de pH entre 5,8 a 7,8; acetato 0,1 M- pH 4,8 a 5,6 - y Tris-HCl 0,1 M -pH: 6,6 a 7,8- sustituye el buffer usual en la mezcla de incubación. El pH real de cada ensayo se mide después de agregada la preparación enzimática.

Se obtiene una curva típica de dependencia de la velocidad de reacción con el pH. El valor máximo de actividad catalítica corresponde a pH 6,8 en buffer fosfato (Fig. 25). A pH 7,8 la enzima retiene más de un 60% de su actividad, mientras que a pH ácidos se encuentra una declinación mucho más marcada de la velocidad de reacción.

En buffer Tris 0,05 M la actividad máxima se halla también al mismo pH pero se observa una inhibición de aproximadamente 30%. En este buffer a pH 7,4 la enzima se inactiva casi completamente.

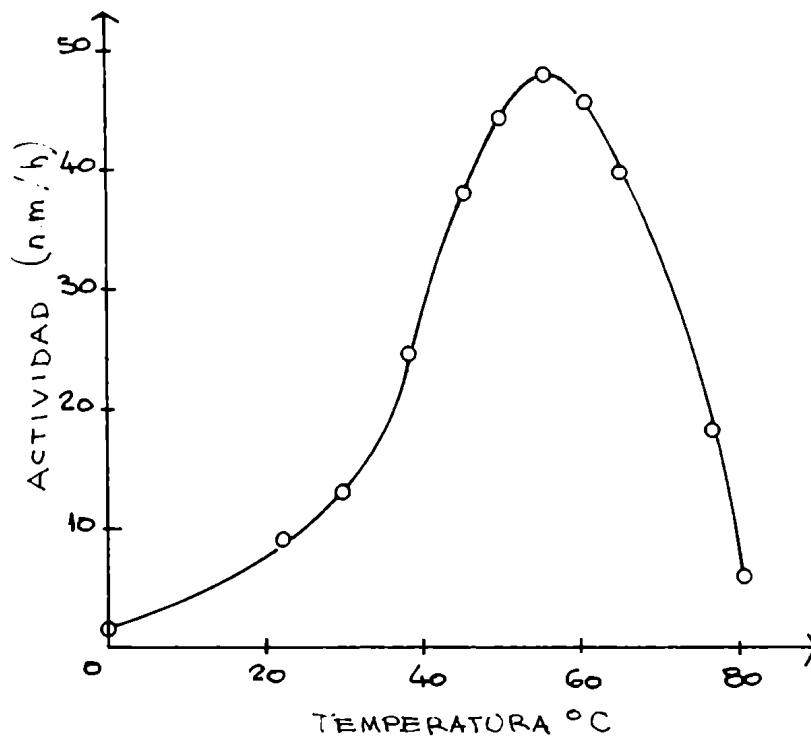


FIG. 23.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

LAS MEZCLAS DE REACCION DESPUES DE LA PREAMBIVACION SE INCUBAN A LAS TEMPERATURAS INDICADAS. ENZIMA: 0.4 mg. DE ETAPA IV.---

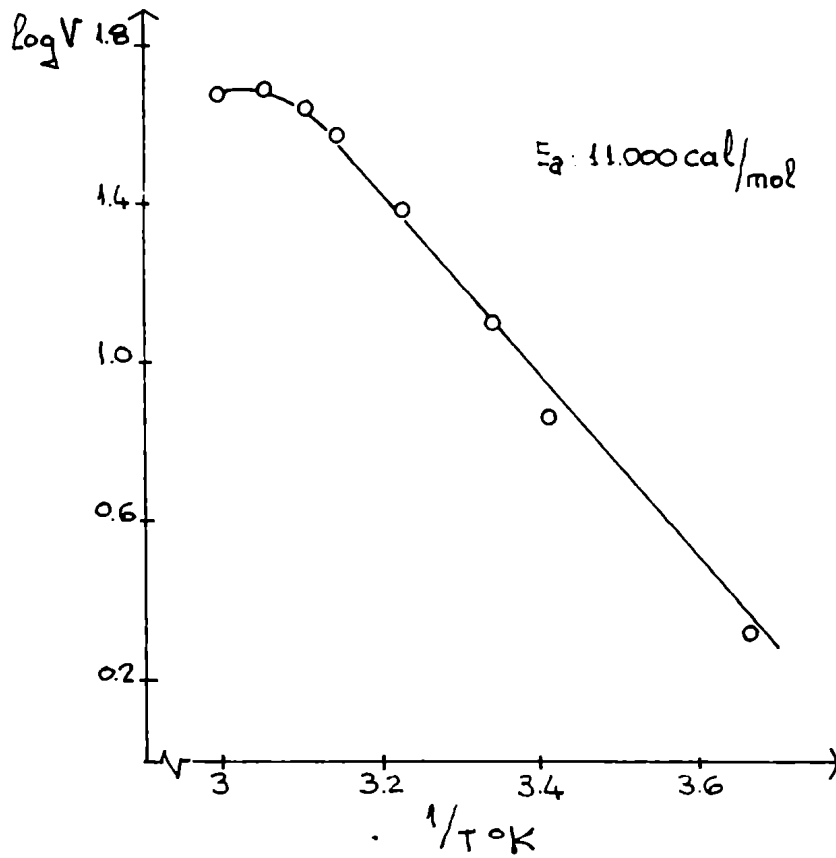


FIG. 24.- GRAFICO DE ARRHENIUS

LOS DATOS CORRESPONDEN A LOS DE LA FIG. 23.---

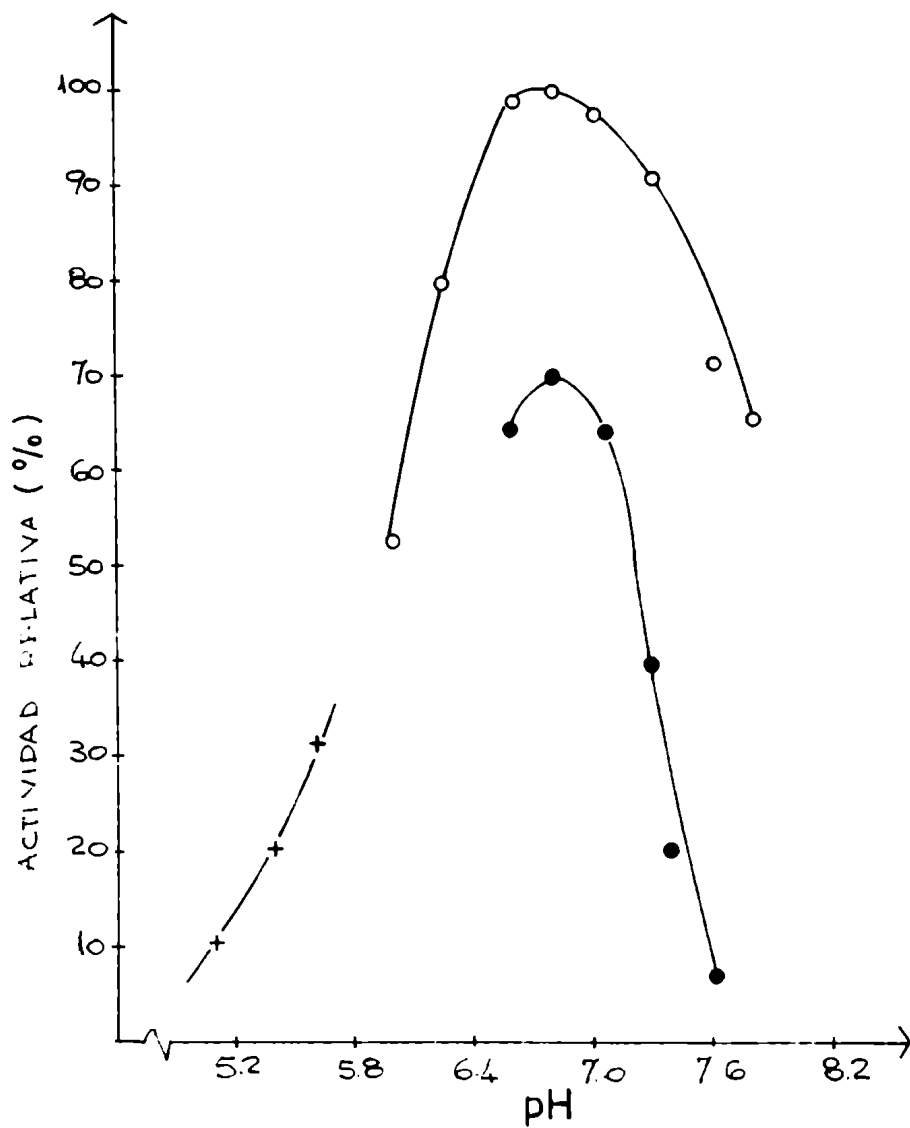


FIG. 25.- EFECTO DE LA $[H^+]$

LAS MEZCLAS CONTIENEN O—O BUFFER FOSFATO 0.134 M.
 ●—● BUFFER TRIS 0.1 M. y +—+ BUFFER ACETATO 0.1 M.
 Y ENZIMA DE ETAPA IV. LAS DEMAS CONDICIONES.
 SEGUN LO DESCRITO.

VIII.- CONCENTRACION DE SUSTRATO

Se analiza la dependencia de concentraciones variables de sustrato sobre la velocidad de reacción de la dehidratasa. Los estudios se llevan a cabo con enzima purificada (etapa V), preactivada y con concentraciones iniciales de sustrato que varían entre 10^{-4} M y 10^{-3} M. Se mide la formación de PBG en función del tiempo y se extrapola gráficamente la velocidad inicial. Los valores obtenidos y graficados según Michaelis-Menten nos muestran una relación hiperbólica normal para el rango de concentraciones usado en buffer fosfato 0,067 M pH 6,8 y 38°C y cuya representación puede verse en la Fig.26.

Por la aplicación del método de Lineweaver y Burk (346), la graficación de las inversas de ambas variables: V y S establece un valor para la constante de Michaelis de $K_m = 3,6 \times 10^{-4}$ M y una V máx = 2,2 μ moles de PBG/mg.h. (Fig.27).

IX.- ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION

Se examina la conversión del δ -ALA en porfobilinógeno por la δ -ALA dehidratasa glandular midiendo la desaparición del sustrato y la formación del monopirrol.

La Tabla 19 representa los datos obtenidos, los que permiten ratificar que la reacción guarda una relación de 2 moléculas de δ -ALA consumidos por 1 molécula de PBG formado y que el único producto sintetizado es el porfobilinógeno, puesto que corrido cromatográficamente en 3 uOH: H₂O con PBG de referencia da una sola mancha, con un R_f característico de 0,48 similar al descrito en la literatura (323).

X.- EFECTO DE REACTIVOS SULFIDRILOS

Como todas las δ -ALA dehidratasas de diferentes tejidos y organismos presentan la característica común de ser enzimas sulfhidrúlicas se realizan diversos análisis de rigor en esta clase de estudios. Así se examina el efecto de compuestos que activan e inhiben proteínas enzimáticas que poseen grupos sulfhidrilos.

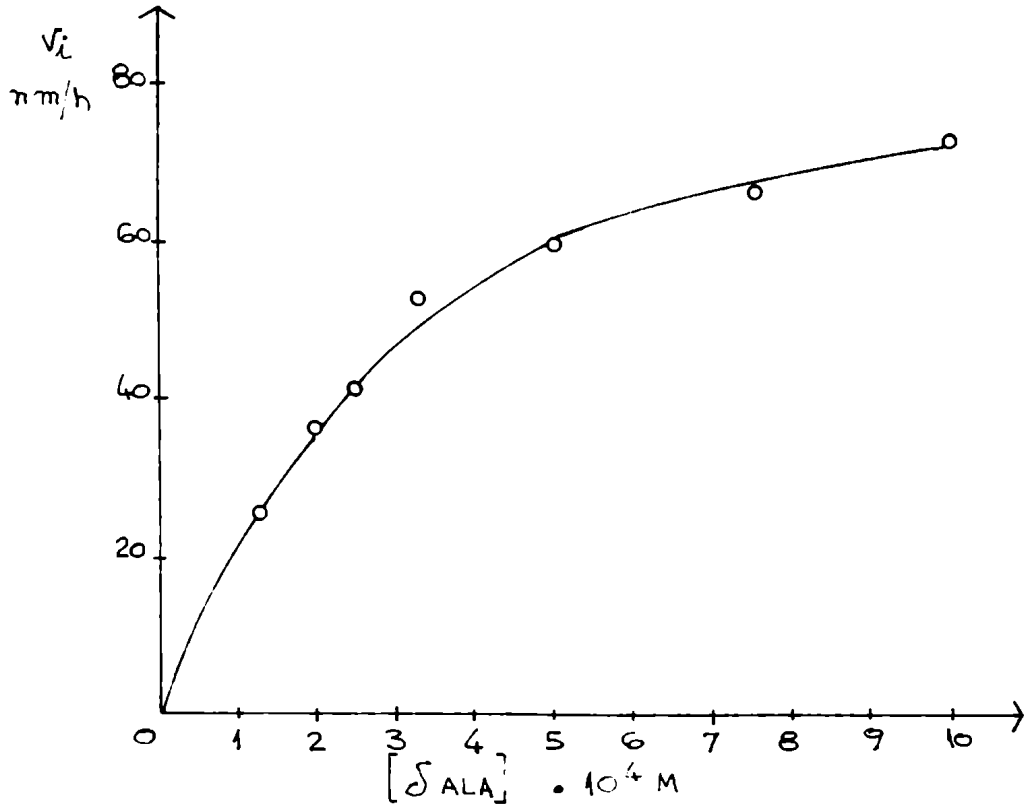


FIG. 26. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

CONDICIONES DE INCUBACION: BUFFER FOSFATO 0.067 M pH 6.8
 TEMPERATURA 35°C ENZIMA PURIFICADA ETAPA V. (0.2 mg) y
 LAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO INDICADAS. -

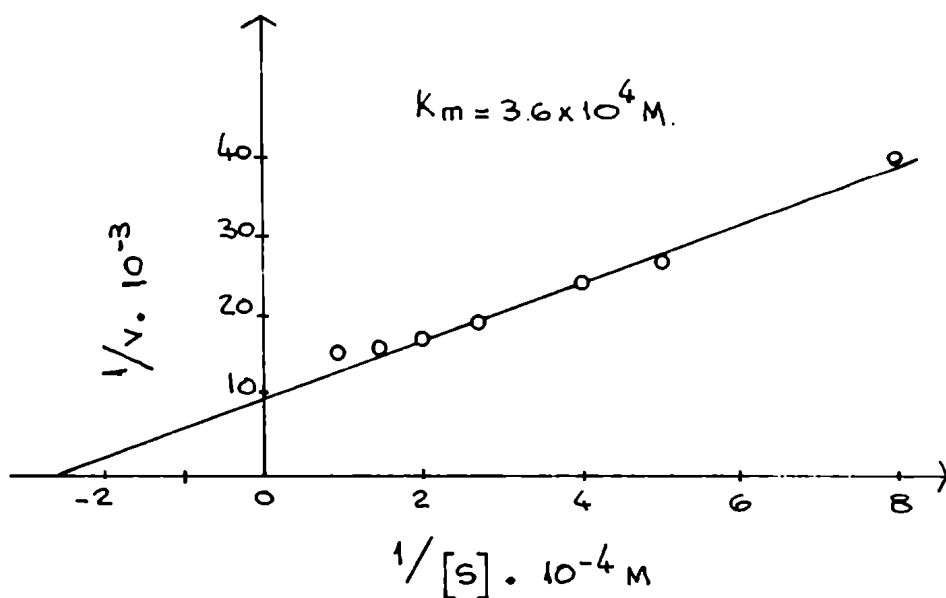


FIG. 27. GRAFICO DE LINEWEAVER - BURK

LOS DATOS CORRESPONDEN A LA FIG. 26. -

Tabla 19

ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION

La mezcla de reacción se activa e incuba en condiciones normales durante una hora a 38°C. Enzima utilizada: 0,7 mg de proteína de la etapa IV. El PBG sintetizado y el δ -ALA remanente, previa formación del pirrol correspondiente, se dosan con el reactivo de Ehrlich según lo descrito en Métodos.

Tiempo de incubación minutos	δ -ALA presente μ moles	PBG sintetizado μ moles
0	0,5	-
60	0,31	0,089
Diferencia	0,19	0,089

a) Activación :

Ya se ha mencionado que es posible medir actividad de δ -ALA dehidratasa en los extractos crudos de la glándula de Harder sin el agregado de activador alguno de grupos sulfhidrilos (Tabla 7 en la 1a. parte de Resultados). Sin embargo, cuando se prueba actividad de las preparaciones enzimáticas obtenidas después de la III etapa de purificación no es posible detectar actividad, salvo que se le adicionen y preincuben con un reactivo tiólico. El agregado de cisteína 0,01 M al medio de incubación y su preincubación con la enzima durante 60 minutos permite medir actividad en las fracciones más purificadas y produce además, un incremento del 25 al 30% del producto formado cuando se incuba con homogenatos (Tabla 20).

El efecto de diferentes concentraciones del reactivo sulfhidrónico

T a b l a 20
A C T I V A C I O N P O R P R E I N C U S A C I O N
C O N C I S T E I N A

El sistema de reacción con las fracciones enzimáticas indicadas se preincuban 1 hora con o sin reactivo tiólicico y luego de agregar el sustrato e incubar se mide el PPG formado. Las otras condiciones son las standards.

Fracción enzimática	Cisteína µmoles	Porfobilinógeno nmoles/h.
Extracto crudo (11 mg)*	0	50
	20	63
Sobrenadante de 10.0 x g (7 mg)*	0	60
	20	79
Eluido de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ (0,3 mg)*	0	0
	20	50

* Las cantidades expresan mg de proteínas incubadas.

y el curso de reacción de la preincubación han sido ya comentados y los resultados están representados en las Figs. 21 y 22.

Se examina no sólo la activación por cisteína sino también por otros protectores de grupos sulfhidrílicos, tales como glutation reducido y β -mercapto-etanol. Los compuestos tiólicicos presentan similar efectividad en este proceso de activación, lográndose el máximo valor a concentraciones entre 5×10^{-3} y $10^{-2}M$.

b) Inhibición

Se llevan a cabo estudios con compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrílicos. Para ello se utilizan reactivos de alta o mediana especifici-

dad que interactúan de diferente manera con dichos grupos, ya sea por alquilación, por formación de mercaptidas o por oxidación a uniones disulfuros (347-8). Considerando que las fracciones enzimáticas más purificadas no muestran actividad a menos que se las active previamente se decide trabajar con preparaciones menos puras. El sobrenadante de 10.000 x g de los homogenatos de la glándula es una de las fracciones que no necesitan preactivación y es la utilizada en todos estos ensayos.

Las mezclas de reacción conteniendo la enzima y sin sustrato se preincubaban durante diversos tiempos: 5- 15- 30 y 60 minutos a 38° C en presencia o ausencia de diversas concentraciones de reactivos tiólicos. Después de la preincubación se les agrega el sustrato, se incuban y se determina la actividad remanente.

En la Tabla 21 se presentan los resultados de ensayos preincubados 15 minutos, tiempo que se adopta como base para los posteriores estudios relacionados con los grupos -SH.

Todos los compuestos ensayados, inhiben la actividad catalítica de la enzima glandular. A concentraciones de 10^{-3} M lo hacen totalmente. Cuando se trabaja con concentraciones de 10^{-4} M de p-CMB y DTNB (alta especificidad) muestran ser aún potentes inhibidores, mientras que las mismas concentraciones de iodoacetamida y NEMI lo son, pero en menor grado.

Se efectúan también estudios de reversión de la inhibición producida por estos compuestos. Los resultados se resumen en la Tabla 22.

Se observa que la inhibición provocada por el p-CMB puede ser revertida completamente por la adición simultánea al sistema de incubación de una cantidad equimolar de cisteína. Además, se encuentra que si el agregado del activador se efectúa 15 min. después de la preincubación con el inhibidor, sólo se logra una reactivación de aproximadamente 45% (correspondiente al experimento señalado con asterisco).

En los ensayos con iodoacetamida, DTNB y NEMI el efecto es revertido parcialmente y en diferente grado según el inhibidor probado.

T a b l a 21

I N H I B I C I O N P O R R E A C T I V O S T I O L I C O S

Las mezclas de reacción conteniendo 4 mg de preparación enzimática de la etapa II en buffer fosfato 0,067 M se preincubaron con las concentraciones de inhibidor indicadas durante 15 min. Luego se incubaron y se mide la actividad remanente, la que se expresa como inhibición porcentual respecto de la actividad de la enzima que se preincubó en ausencia de reactivos tiólicos.

Inhibidor	Concentración Molar	Inhibición %
p-cloro-mercuri-benzoato (p-CMB)	10^{-3}	100
	10^{-4}	90
5-5 ditionio bis 2,4-nitrobenzoico (DTNB)	10^{-3}	100
	10^{-4}	84
n-etil-maleil-imida (NEMI)	10^{-3}	95
	10^{-4}	35
Iodoacetamida	10^{-3}	99
	10^{-4}	53
Glutation oxidado (GSSG)	10^{-3}	98
	10^{-4}	92

En cuanto al glutatión oxidado tanto a concentraciones de 10^{-3} M como 10^{-4} M, resulta un inhibidor potente, pero puede ser revertido totalmente por adición de cisteína.

Todas estas inhibiciones y reactivaciones diferenciales probablemente indican la afinidad relativa de los grupos -SH por los reactivos ensayados.

Es evidente, así, que la actividad incrementada por cisteína de las fracciones de sobrenatantes de homogenato, como la inhibición y la reversión provocada por diversos reactivos tiólicos establecen que esta enzima es también sulfhidrúlica.

T a b l a 22

INHIBICIÓN Y REVERSIÓN POR REACTIVOS SULFIDRILOS

La mezcla de reacción usual con 4 mg de proteína (etapa II) se preincuba por 15 min. con el inhibidor en presencia o ausencia del activador simultáneamente, antes del agregado del sustrato. Después de incubar se mide la actividad remanente. La inhibición producida se expresa como porcentaje, comparándose con un control sin agregado de reactivos tiólicos.

Inhibidor		Añición	Inhibición %
p- CMB	10^{-4} M		90
"	"	Cisteína 10^{-4} M	2
"	"	Cisteína 10^{-4} *M	53
DTNB	10^{-4} M	-	84
"	"	Cisteína 10^{-4} M	70
NEMI	10^{-4} M	-	35
"	"	Cisteína 10^{-4} M	10
Iodoacetamida	10^{-4} M	-	53
"	"	Cisteína 10^{-4} M	38
GSSG	10^{-4} M	-	92
"	"	Cisteína 10^{-4} M	0

* El activador se agrega 15 minutos después de la preincubación con el inhibidor.

XI.- EFECTO DE CATIONES Y ANIONES

Se analizan los efectos de diversas sales de metales pesados, alcalinos y alcalinos térreos, tanto en fracciones purificadas como en extractos crudos y se comparan sus resultados.

Varios iones de metales pesados inhiben la actividad catalítica de la Σ -ALA dehidratasa glandular y los resultados de su acción se presentan en la Tabla 23.

T a b l a 23

EFEECTO DE METALES Y QUELANTES

Las condiciones de ensayo son las descritas en Métodos, salvo el agregado de los diferentes compuestos. Enzima utilizada: 0,5 mg de etapa IV. Se toma como unidad comparativa el valor del ensayo control en condiciones standards.

Adición		Actividad relativa
Control	-	1
Cu ⁺⁺	10 ⁻³ M - 10 ⁻⁴ M	0
Hg ⁺⁺	10 ⁻³ M - 10 ⁻⁴ M	0
Pb ⁺⁺	10 ⁻³ M	0,1
Ag ⁺	10 ⁻³ M	0
EDTA	10 ⁻³ M	0,05
α, α' dipiridilo	10 ⁻³ M	1
8 HO-quinolina	10 ⁻³ M	1

Los iones Ag (I), Hg (II), Pb (II) y Cu (II) en concentraciones va-

riables entre 10^{-3} y 10^{-4} M demuestran ser potentes inhibidores de la δ -ALA dehidratasa, puesto que se observa un decremento prácticamente total de su actividad. Ca^{++} (II) no tiene efecto significativo.

La naturaleza sulfhidrónica de la enzima - demostrada en la sección anterior - podría explicar la inactivación de su actividad catalítica por estos metales pesados.

Sin embargo, las altas concentraciones de los compuestos usados no permiten asignar un significado específico único a ese efecto, que podría producirse por otros mecanismos que no involucran sulfhidrilos activos.

El ión Mg como cloruro presenta efecto inhibitorio en mucho menor grado y sólo se lo observa cuando se emplean concentraciones mayores que las ensayadas para los metales pesados (Tabla 24). Sin embargo, cuando este catión a concentración equimolar se usa como sal del anión sulfato se encuentra que el efecto es opuesto, es decir, de activación.

Resultados similares a los del ión Mg se obtienen cuando se analizan estos aniones con iones monovalentes (amonio y potasio).

De este comportamiento dual se deduce que a las concentraciones ensayadas, el efecto inhibitorio se produce por el anión cloruro, mientras que el sulfato activa, independientemente del catión que lo acompañe.

Respecto del efecto de los cationes a las concentraciones estudiadas, se ve que las diferencias en el poder inhibitorio de los diferentes cloruros son poco significativos, máxime si se consideran los cationes de carácter tan divergentes como el K^+ y el NH_4^+ frente al Mg^{++} ensayados.

XII.- EFECTO DE AGENTES QUELANTES

Si bien la enzima no parece requerir la presencia de los diversos metales ensayados para su actividad, y es inhibida por ciertos cationes divalentes, cuando se estudia el efecto del EDTA, se encuentra una disminución de su actividad. Así la adición de una solución milimolar de este agente quelante al medio de incubación, determina una inhibición casi total de la síntesis de PPG.

Se ensayan también otros agentes quelantes, tales como α , α' dipiri-

T a b l a 24

EFFECTO DE DIFERENTES SALES SOBRE LA α -ALA DEHIDRATASA

El sistema standard se incubó con una preparación enzimática de la etapa II (4 mg) sin activación y con las sales indicadas. Las demás condiciones son las normales.

Sal adicionada	Concentración del catión Molar	Actividad relativa
Control	-	1
Cl_2Mg	1×10^{-3}	0,98
"	3×10^{-3}	0,82
SO_4Mg	3×10^{-3}	1,16
ClNH_4	1×10^{-3}	0,88
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	1×10^{-3}	1,13
ClK	1×10^{-3}	0,90
SO_4K_2	1×10^{-3}	1,25

Edo, 8 hidroxiquinolina y batofenantrolina. Estos reactivos a concentraciones 10^{-3} M no tienen efecto sobre la actividad catalítica, ya sea que su adición se efectúe simultáneamente con la enzima y el sustrato o bien que se los preincube 5 minutos con la misma (Tabla 24).

No se realizaron otros experimentos para dilucidar la naturaleza del efecto del EDTA, ni su acción total a diversas concentraciones.

Aunque no se pudo demostrar el requerimiento de algún metal para la

actividad de la dehidratasa glandular, el efecto fuertemente inhibitorio del EDTA sugeriría su existencia en la proteína.

δ-ALA DEHIDRATASA EN ESTADOS PATOLÓGICOS

En una serie de ensayos preliminares y que continúan en estudio se observa que la dehidratasa glandular en diferentes estados patológicos presenta alteraciones significativas en su actividad. Estas mediciones se realizan en glándulas de animales con porfirias inducidas con diversos químicos como: alil-isopropil-acetamida (AIA), alil-isopropil-acetil-urea (Sedormid), hexa-clorobenceno, etc..

En porfirias inducidas con barbituratos o compuestos relacionados, la actividad de la δ-ALA dehidrasa llega en ocasiones a triplicar su valor normal.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Si se comparan las propiedades de la δ -ALA dehidratasa de la glándula de Harder con las de otras fuentes de vida, se puede comprobar una serie de similitudes y también de discrepancias tanto en sus requerimientos como en sus características catalíticas.

Los estudios de distribución intracelular de la enzima glandular permiten localizarla en el citoplasma, no asociada a partículas. Es por lo tanto, una "enzima soluble", un hallazgo similar a lo informado por Gibson, Granick y Coleman en tejidos animales (150,163,175). En tejidos vegetales y microorganismos se ha demostrado también su presencia en extractos libres de células (111, 121,160-2,171-3,177,181-2). Sin embargo, Nanli y Waywood informan que cloroplastos y "partículas remanentes" después de centrifugar a 20.000 x g de extractos de hojas de trigo, muestran también leve actividad catalítica (162).

La δ -ALA dehidratasa de la glándula de Harder se obtiene completamente libre de otras enzimas de este camino metabólico - sintetizante de porfirinas - con una purificación de aproximadamente 150 veces a partir del homogenato total y con un rendimiento del 25%.

Si bien no se tienen evidencias del grado de pureza por estudios de ultracentrifugación, por lo oneroso que resultaba el acopio de material, se la juzga homogénea por estudios electroforéticos en gel de poliacrilamida y en gel de almidón a diferentes pH.

Esta aseveración se ve apoyada por los resultados de cromatografías en gel de Sephadex, que no muestran incremento de su actividad específica, la que paralela al pico de elución proteica.

Es interesante destacar que la enzima glandular tiene la misma movilidad electroforética en gel de almidón cuando se la compara con la de hígado de vaca y callos de semilla de soya (178, 182).

Posee las propiedades de una globulina, puesto que precipita totalmente a 55% de saturación de sulfato de amonio y por eliminación de las sales de sus soluciones. Se observa que la enzima es inactivada por diálisis. Este hecho, juntamente con la inhibición por EDTA permiten suponer la existencia de un cofactor esencial.

Exhibe un pH óptimo de 6,8 en buffer fosfato y da una curva asimétrica típica que presenta una inactivación mayor en el lado ácido, similar a la observada para las dehidrasas de hígado vacuno, eritrocitos de aves y bacteria propiónica (163, 166, 171). Este valor de pH óptimo difiere notablemente de los informados en tejidos vegetales, levaduras y diversos microorganismos, que se encuentran en el rango alcalino, con valores entre 8 y 9,6 (11,121,176,182).

El buffer Tris produce una inhibición de su actividad catalítica que en diferente extensión también es observada en otros tejidos.

Gibson y colab. indican que la enzima es inhibida totalmente por este buffer a pH 7,4 y que este efecto se revierte por el agregado de buffer fosfato. Por comparación con dehidrasas de diferentes fuentes, dichos autores deducen que los efectos observados no se deberían exclusivamente a la valencia del anión del buffer -que actuaría activando- puesto que la enzima es funcional con buffers tan diferentes como bicarbonato, acetato y dietil-barbiturato (163).

Existen en la literatura múltiples informes de la acción inhibitoria del buffer Tris y por ende, hipótesis de su mecanismo (349).

Por analogía, la inactivación encontrada para la δ -ALA dehidratasa en estos tejidos podríamos suponer que se debe a una interacción del grupo amino primario: a) con el grupo carbonilo del sustrato, vía formación de una base de Schiff; b) con el grupo carboxilato para dar sales, o bien con algún metal requerido para la actividad enzimática (quelación con los grupos amino y oxidrilos del buffer).

La enzima presenta máxima velocidad de reacción, en las condiciones estudiadas a 55°C, incrementando su actividad a temperaturas mayores que las fi-

siológicas, un rasgo característico de las dehidrasas de todas las fuentes naturales informadas, así como su estabilidad térmica. El rango de temperatura de mayor actividad informado varía entre 45 y 65° C (111,171,175,178,182).

El valor de la constante de Michaelis, determinada en buffer fosfato 0,067 M, pH 6,8 y 38°C de $K_m = 3,6 \times 10^{-4}$, está dentro del rango de otros descritos en la literatura (121,163,166,171,175-6,182).

La enzima de la glándula de Harder muestra un requerimiento absoluto por compuestos sulfhidrúlicos después de la tercera etapa de purificación, e incrementa la actividad de los extractos crudos. Esta observación, similar a la hallada en hígado vacuno, difiere de la de levadura, eritrocitos humanos y callos de soya, que no necesitan el agregado de protectores de grupos sulfhidrúlicos (111,174,182).

Los homogenatos de la glándula presentan una estimulación de su actividad dehidratásica cuando se los preincuba con estos reactivos.

Es posible inhibirla reversiblemente por compuestos que interactúan con grupos -SH, tales como p-CMB, DTNB, GSSG, etc..

Si se compara la reactividad de los diferentes compuestos ensayados con la del p-CMB es posible suponer la presencia de grupos -SH "lentos" en la proteína. Esta menor velocidad de reacción sería producida por la estructura molecular de la proteína, respecto de esos grupos, que dificulta e impide el acceso de los diferentes reactivos. Pero puede deberse también al modo de acción o especificidad propia de los mismos.

Así, la inhibición y reactivación de la enzima se hace en diferente grado, y esta particularidad indicaría probablemente, la afinidad relativa de los grupos sulfhidrúlicos por los reactivos ensayados. En la literatura se han descrito inhibiciones similares con compuestos análogos para la mayoría de las dehidrasas estudiadas.

Los resultados de inhibición, la estimulación de los homogenatos y la reactivación por cisteína, establecen indubitablemente la naturaleza sulfhidrúlica de esta enzima.

Análogamente a la de otros tejidos animales, la enzima glandular es fuertemente inhibida por EDTA. Por lo tanto se ha sugerido, que la enzima debe tener un metal fuertemente unido, aunque no se pudo establecer el requerimiento, ni la presencia de metal alguno. Agentes quelantes específicos de iones ferrosos no muestran acción inhibitoria, lo que permitiría descartar la necesidad de estos iones para su integridad catalítica en la glándula de Harder.

Walerych encuentra que el ión Mg (II) en concentración de 10^{-3} M, activa la enzima bacteriana *P. shermanii* (171), y que la inhibición por EDTA puede ser salvada por el agregado de este ión. Co^{++} , Zn^{++} , y Mn^{++} tienen menor efecto. Estos hechos le permiten suponer la necesidad de la presencia de iones metálicos divalentes, en este caso Mg^{++} para la actividad plena de la enzima.

Nandi y Waygood han confirmado estos hechos trabajando con la enzima de vegetales (162), revirtiendo con iones Mn (II). Ellos encuentran que Ca^{++} y Mg^{++} son también activadores.

Lascelles, usó iones Mg^{++} para medir la actividad de la dehidratasa de *Rh. spheroides*, y cabe consignar que cuando los utiliza como sal sulfato presenta mayores valores, un efecto que hemos estudiado particularmente, y hemos demostrado que el anión sulfato produce un incremento en la actividad de la enzima glandular.

En estudios de requerimientos de metales, Burnham y cdab. encuentran activación por iones potasio, pero su enzima no es inhibida por EDTA (121).

En contraposición a estos hallazgos, Coleman, en hígado de ratones, encuentra activación por EDTA 10^{-2} M (175).

Recientemente, Komai y Neilands purifican la ALA-dehidratasa del hongo *Ustilago Sphaerogena* y demuestran su naturaleza metalo-proteica, mediante estudios de inhibición por agentes ligantes de diferentes metales de variada especificidad y por el análisis del contenido de iones metálicos en diversas preparaciones de su enzima. Ellos determinan que la enzima tiene Cu^{++} unido a la proteína, detectando también Fe^{++} y Zn^{++} . Sus resultados parecer implicar al Cu^{++} como un ión esencial para la actividad catalítica (181).

Iodice y colab. fueron en 1958, los primeros que informaron la presencia de Cu^{++} y Mg^{++} en δ -ALA dehidratasa purificada de hígado vacuno por observaciones espectroscópicas (167).

La dehidratasa de la glándula de Harder, es inhibida completamente por metales pesados, tales como Cu^{++} , Hg^{++} y Ag^{++} , un comportamiento análogo al exhibido por la mayoría de las dehidratasas estudiadas, a excepción de la informada por Coleman que es activada por Hg^{++} y Fe^{++} pero hay que hacer notar que las concentraciones usadas, bajas, son menores que las del activador sulfhidrúlico agregado (175).

Comparaciones de los estudios cinéticos realizados con esta enzima y otras de diferentes tejidos animales conducen a características, en términos generales, muy similares. Así los valores de K_m están dentro del rango usual informado para esta constante (10^{-4} M). Los valores de sus velocidades máximas por mg de proteína, son para la de hígado vacuno: 18 $\mu\text{moles/h}$ (178) y 2,2 $\mu\text{moles/h}$ para la glándula, en sus preparaciones más purificadas; mientras que la actividad específica en homogenato glandular (6 nmoles/h.mg) es más baja que la encontrada en hígado de vaca (18 nm/h mg). Por lo tanto, la acumulación de protoporfirina en este tejido no puede ser explicada sobre la base de una actividad mucho mayor de esta enzima y concurrentemente de las subsiguientes.

Recientemente, Nandi y Shemin en una serie de trabajos interesantes realizados sobre la δ -ALA-dehidratasa de *Rhodospseudomonas spheroides* (180) han sugerido un posible mecanismo para la condensación de las moléculas del sustrato para dar el monopirrol. Ellos demuestran que se forma una base de Schiff entre un grupo amino de la enzima y el átomo de carbono carbonílico de 1 molécula de δ -ALA. De esta manera se formaría un carbanión intermediario estabilizado, que favorecería el ataque nucleofílico al átomo de carbono carbonílico de una segunda molécula. Esta segunda molécula podría o no, estar también unida a la proteína por una base de Schiff. Paralelamente con la condensación aldólica, la enzima catalizaría la pérdida de agua entre el carbono que posee el grupo hidroxilo, recientemente formado, y el carbono metilénico de la molécula adyacente. Luego, un nuevo ataque nucleofílico del grupo amino de la segunda molécula de sustrato sobre el átomo de carbono de la primera molécula

altamente reactivo por estar formando una base de Schiff con la enzima, produciría una transiminación con formación del pirrol y liberación de la enzima.

Si el mecanismo total se lleva a cabo por la dehidratasa, ya que siempre se ha encontrado - como en esta fuente - una sola proteína, está todavía en el terreno de las especulaciones. Esta premisa es válida también para la participación de los iones metálicos y grupos -SH esenciales para su actividad.

Estudios efectuados con la enzima de levadura demuestran la interacción que puede tener lugar entre el grupo carbonilo del sustrato y altas concentraciones de grupos sulfhidrilos, formando tiohemiacetales y determinando una inhibición por disminución de la concentración de sustrato.

Si la formación de la base de Schiff es un paso obligado para esta catálisis, entonces, la disminución del sustrato por reacción con reactivos sulfhidrúlicos, sobre todo en aquellas enzimas que no necesitan preactivación con estos reactivos, podría explicar la inhibición observada por estos compuestos así como también, la inhibición por Tris.

Este buffer, a pH más ácidos podría estar también restando grupos carboxilatos libres, encontrados necesarios para la formación del pirrol.

Se ha especulado además sobre el rol y la presencia de iones metálicos para esta catálisis. Ellos facilitarían la condensación aldólica, aumentando la capacidad de enolización del grupo metileno, requerida para la reacción. Este hecho justificaría también la inhibición mostrada por el buffer Tris.

Todas estas similitudes y diferencias permiten concluir que la δ -ALA dehidratasa de la glándula de Harder, debido a su homogeneidad electroforética, hace que los dos procesos primordiales que participan en la formación del porfobilinógeno: base de Schiff con condensación aldólica y ciclización, se realizarían por esta única entidad proteica, presentando rasgos comunes a las dehidratasas de otras fuentes naturales.

R E S U M E N

R E S U M E N

El estudio del pigmento presente en la glándula de Harder de ratas blancas, demuestra que es una mezcla de porfirinas cuyo componente principal es protoporfirina, pero que contiene en cantidades mucho menores una porfirina tricarboxílica y coproporfirina de la serie isomérica III.

La concentración de porfirinas en la glándula de animales adultos es de 0,15 µg por mg de tejido fresco.

Se demuestra la presencia de todas las enzimas relacionadas con la biosíntesis de la protoporfirina 9, lo que avala la naturaleza secretora de porfirinas de esta glándula. Se estudian además algunas propiedades de los sistemas catalíticos.

La δ -ALA sintetasa, primera enzima de esta secuencia, está localizada en las mitocondrias. Utiliza como sustratos glicocola y succinil-CoA, siendo cofactores necesarios de la reacción fosfato de piridoxal, ATP, Mg^{++} y aerobiosis.

Diferentes condiciones ensayadas para obtener mayor actividad demuestran que es fundamental un pretratamiento de las partículas mitocondriales con agentes quelantes y sulfhidríficos. El producto de la reacción inhibe la actividad catalítica de la sintetasa.

La segunda enzima de este camino, la δ -ALA dehidratasa, se encuentra en la fracción citoplasmática, no asociada a partículas subcelulares. Se logra purificarla unas 150 veces respecto del extracto crudo, la que se comporta como homogénea en diferentes corridas electroforéticas.

Se establece su naturaleza sulfhidrífica, presentando actividad máxima en anaerobiosis. Es estable al calor, su acción es óptima en buffer fosfato a pH 6,8 y a temperaturas más altas que las fisiológicas (55°C).

No se determina requerimiento de metales pero es inhibida fuertemente por EDTA.

Sus propiedades cinéticas la incluyen dentro de las actividades de las otras δ -ALA dehidratasas de origen animal, y no justifican la acumulación de protoporfirina presente en este órgano, por un incremento excesivo de su actividad catalítica.

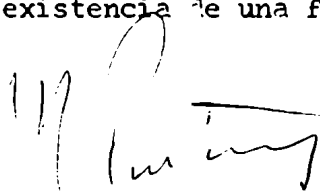
El complejo porfobilinogenasa-Uro'gen sintetasa y cosintetasa- es también "soluble". Se detectan ambas actividades y se comprueba la labilidad del sistema sintetizante de Uro'gen III, ya sea por precalentamiento del sistema como por estudios de estabilidad.

El sistema descarboxilante de los porfirinógenos, que lleva a coproporfininógeno III, está en el sobrenadante de mitocondrias y es inestable al calor.

Se detectan en esta etapa todos los intermediarios conocidos de la cadena biosintética, es decir, los porfirinógenos que poseen 7-, 6-, 5- y 4-COOH.

La coprogenasa, sistema que sintetiza el último de los intermediarios tetrapirrólicos comunes a los caminos divergentes de hemo, proteínas y clorofilas - la protoporfirina 9 - se encuentra localizada en mitocondrias y requiere oxígeno para su actividad.

Todos estos resultados demuestran la biosíntesis "de novo" de la proto 9 en la glándula de Harder de rata a partir de sus precursores primarios, la presencia de todos y cada uno de los sistemas enzimáticos relacionados, y, por ende, la existencia de una funcionalidad similar a la de otros sistemas de vida.



B I B L I O G R A F I A

1. Harder. J., Acta Eruditorum Lipsiae (1694).
2. Davis F.A., Trans. Am. Opth. Soc., 27, 401 (1929).
3. Greene E.C., Trans. Amer. Phil. Soc., 27, 86 (1935).
4. Giacomini G., Ati R. Accad. Science, Torino XXII (1887).
5. Loeventhal N., Anat. Anz., 7, 546 (1892).
6. Venable J. H. y Grafflin, A.L., J. Mammalogy, 21, 66 (1940).
7. Grafflin A. L., Am. J. Anat., 71, 43 (1942).
8. Derrien E. y Turchini J., Compt. Rend. Soc. Biol., 91, 637 (1924).
9. Kämmerer H., Arch. Expt. Pathol. Pharmacol., 88, 247 (1920).
10. Schumm O., Hoppe-Seyl. Z. Phys. Chem., 133, 309 (1923).
11. Fischer H. y Orth H., "Die Chemie des Pyrrols" Ed. Akad. Verlags. Leipzig. Tomo II (1937).
12. Thomas J., Bull. Soc. Chim. Biol., 20, 471 (1938).
13. Wolbach, S.W. y Hoxe P.K., J. Exp. Med., 69, 1 (1939).
14. Bessey O.A. y Wolbach S.W., J. Exp. Med. 64, 327 (1935).
15. Tashiro S. y Stix H., Biol. Bull. 64, 327 (1935).
16. Tashiro S, Smith C.C., Badger E. y Kezur E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 44, 658 (1940).
17. Smith S.G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49, 691 (1942).
18. Collins K. J., Quart. J. Exp. Phys. , 42 , 24 (1957).
19. Mc Elroy L W., Salomon K., Figge F.H.J. y Cowgill G.R., Science, 94, 467 (1941).
20. Chick H., Macrae T.F. y Worden A.N., Biochem. J., 34 , 580 (1940).
21. Barnard R.D., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 54, 254 (1943).
22. Towbin E. J., Fanta P.E. y Hodge H.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 60 228 (1945).
23. Strong L.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 50, 123 (1942).
24. Strong L.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 57, 78 (1944).
25. Figge F.H.J., Strong L.C., Strong L.C., Jr. y Shanbrom A., Cancer Res. 2 , 335 (1942).
26. Rohonyi B. y Kelenyi G., Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 13, 241 (1962).
27. Pittner J.J. y Watson C.J., Cancer Res., 6, 337 (1946).

28. Cohn S.A., J. Histochem and Cytochem, 3, 342 (1955).
29. Hais I.M., Strych A. y Chmelař V., J. Chromatog., 35, 179 (1963).
30. Arvy L., Compt. Rend. Soc. Biol., 153, 915 (1959).
31. Abou-Harb M. y Abou-Harb N., Compt. Rend. Soc. Biol., 158, 2268 (1964).
32. Davidheiser K.H. y Figge F.H.J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 90, 461 (1955).
33. Figge F.H.J. y Davidheiser K.H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 437 (1957).
34. Figge F.H.J. y Davidheiser K.H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103, 64 (1960).
35. Davidheiser K.H. y Figge F.H.J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 97, 775 (1958).
36. Eida K. y Kikutani M., Chem. Pharm. Bull., 17, 927 (1969).
37. Kennedy G.Y., Jackson A.H., Kenner G.W. y Suckling C.J., Febs Let., 6, 9 (1970).
38. Willstätter R. y Stoll A., "Investigations on Chlorophyll" Science Press, Lanc., Ohio, (1928).
39. Kuster W., Z. Physiol. Chem., 52, 463 (1912).
40. McDonald S.F. y Mich I.K.H., "Porphyrin biosynthesis and metabolism", Ed. Wolstenholme and Millar, Churchill, Londres (1955).
41. Lemberg R. y Legge J.W., "Haematin Compounds and Bile Pigments", Inter - science N.Y., (1949).
42. Rimington C., Ann. Rev. Biochem., 26, 561 (1957).
43. Mauzerall D., J. Am. Chem. Soc., 34, 2437 (1962).
44. Corvin A.H., "Organic Chemistry", Ed. Gilman H., Wiley N.Y., Vol.2 (1943).
45. Falk J.E., "Comprehensive Biochemistry", Ed. Florkin M. y Stotz E.H., Elsevier N.Y., Vol. 9, 3 (1963).
46. Granick S. y Levere R.D., "Progress in Hematology", Ed. Moore C. V. y Brown E.K., Grune and Stratton, N.Y., Vol. 4, 1 (1964).
47. Woodward R.P., Pure Appl. Chem., 2, 333 (1961).
48. Rittenberg D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 13, 173 (1948).
49. Fischer H. y Hofmann H., Hoppe-Seyl. Z, 246, 15 (1937).
50. Falk J.E., Brit. Med. Bull., 10, 211 (1954).
51. Shemin D., The Harvey Lect., 50, 253 (1956).

52. Muir H.M. y Neuberger A., *Biochem. J.*, 47, 97 (1950).
53. Westall R.G. *Nature*, 170, 614 (1952).
54. Cookson G.H. y Rimington C., *Nature*, 171, 875 (1953).
55. Neve R.A., Labbe, W.F. y Aldrich R.A., *J. Am. Chem. Soc.* 78,691 (1956).
56. Bogorad L., *Science*, 121, 878 (1955).
57. Granick S., *Absts. 128th Meeting, Am. Chem. Soc.* 69 C (1953).
58. Rimington C., *Endeavour XIV*, 126 (1955).
59. Bloch K. y Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, 159, 45 (1945).
60. Shemin D. y Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, 159, 567 (1945).
61. Shemin D. y Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, 166, 627 (1946).
62. Radin N.S., Rittenberg D. y Shemin D., *J. Biol. Chem.*, 184, 745-755(1950).
63. Altman K.I., Casarett G.W., Masters R.E., Noonan T.R. y Salomon K., *J. Biol. Chem.*, 176, 319 (1948).
64. Grinstein M., Kamen M.D. y Moore C.V., *J. Biol. Chem.*, 179, 359 (1949).
65. Wittenberg J. y Shemin D., *J. Biol. Chem.*, 185, 103 (1950).
66. Shemin D. y Wittenberg J., *J. Biol. Chem.*, 192, 315 (1951).
67. Shemin D. y Kumin S., *J. Biol. Chem.*, 198, 827 (1952).
68. Wriston J.C., Lack L. y Shemin D., *Fed. Proc.*, 12, 294 (1953).
69. Wriston J.C., Lack L. y Shemin D., *J. Biol. Chem.*, 215, 603 (1955).
70. Granick S., *J. Biol. Chem.*, 232, 1101 (1958).
71. Schulman M.P. y Richert D.A., *Fed. Proc.*, 14, 277 (1955).
72. Schulman M.P. y Richert D.A., *J. Biol. Chem.*, 226, 131 (1957).
73. Lascelles J., *Biochem. J.*, 66, 65 (1957).
74. Shemin D. y Russell C.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4873 (1953).
75. Shemin D., Russell C.S. y Abramsky T., *J. Biol. Chem.*, 215, 613 (1955).
76. Shemin D., Abramsky T. y Russell C.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1204 (1954).
77. Neuberger A. y Scott J.J., *Nature*, 172, 1093 (1953).
78. Dresel E.I. y Falk J.E., *Nature*, 172, 1185 (1953).
79. London I.M., Shemin D. y Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, 173, 797 (1949).
80. London I. M., Shemin D. y Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, 183,742 (1950).
81. Granick S., *Blood*, 4, 404 (1949).

82. Della Rosa W.J., Altman K.I. y Salomon K., J. Biol. Chem., 202, 771 (1953).
83. Lascelles J., Biochem. J., 62, 73 (1956).
84. Laver W.G. y Neuberger A., Biochem. J., 67, 22 P (1957).
85. Laver W.G., Neuberger A. y Udenfriend S., Biochem. J., 70, 4 (1958).
86. Gibson K.D., Laver W.G. y Neuberger A., Biochem. J., 70, 71 (1958).
87. Gibson K. D., Biochim. Biophys. Acta, 28, 451 (1958).
88. Shemin D. y Kikuchi G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 75, 122 (1958).
89. Kikuchi G., Kumar A., Talmage P. y Shemin D., J. Biol. Chem., 233, 1214 (1958).
90. Brown E.G., Biochem. J., 70, 313 (1958).
91. Dresel E.I.B. y Falk J.E., Biochem. J., 56, 156 (1954).
92. Schulman M.P. y Richert D.A., J. Am. Chem. Soc., 77, 6402 (1955).
93. Chick H., Macrae T.F., Martin A.J. y Martin C. J., Biochem. J., 32, 2207, (1938).
94. Gibson K.D., Matthei M., Neuberger A. y Tait G.H., Nature, 192, 204 (1961).
95. du Vigneaux V., Kuchinskas E.J. y Horvath A., Arch. Biochem. Biophys., 69, 130 (1957).
96. Brown E.G., Nature, 182, 313 y 1091 (1958).
97. Vogel W., Richert D.A., Pixley D. Q. y Schulman M.P., J. Biol. Chem. 235, 1769 (1960).
98. Marsh H. W., Evans H.J. y Matrone G., Plant Physiol., 38, 632 y 638 (1963).
99. Akhtar M. y Jordan P.M., Chem. Comm., 12, 1691 (1958).
100. Braunstein A.E. y Shemyakin M.M., Biokhimiya, 13, 393 (1953) c/"The enzymes", Ed. Boyer, Lardy y Mirback, Vol. 2, 113 (1958).
101. Metzler D.E., Ikawa M. y Snell E.E., J. Am. Chem. Soc., 76, 648 (1954).
102. Laver W.C., Neuberger A. y Scott J.J., J. Chem. Soc. p.1483 (1959).
103. Lascelles J. "Tetrapyrrole biosynthesis" Ed. W.A. Benjamin Inc. N.Y. (1964).
104. Stadman E.R., Overath P., Eggerer H. y Linnen F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2, 1, 1960.
105. Neuberger A., Biochem J., 78, 1 (1961).

106. Tait G.H., "Porphyrins and related compounds", Ed. T.W. Goodwin, Academic Press, N.Y. Vol. III, 19 (1968).
107. Nemeth A.M., Russell C.S. y Shemin D., J. Biol. Chem., 229, 415 (1957).
108. Urata G. y Granick S., J. Biol. Chem., 238, 811 (1963).
109. Bottomley S.S. y Smithee G.A., Biochim. Biophys. Acta, 159, 27 (1968).
110. Miller J. W. y Teng D., 7th. Congress of Biochemistry, Tokyo, p.1059 (1968).
111. Parreira O.C. de., Biochim. Biophys. Acta, 139, 479 (1967).
112. Granick S., J. Biol. Chem., 238, PC 2248 (1963).
113. Tschudy D.P., Welland F.H., Collins A. y Hunter G., Metabolism, 13, 396 (1964).
114. Narisawa K. y Kikuchi G., Biochim. Biophys. Acta, 99, 580 (1965).
115. Wada G., Sassa S., Takaku F., Yano Y., Urata G. y Nakao K., Biochim. Biophys. Acta, 148, 585 (1967).
116. Granick S. y Urata G., J. Biol. Chem. 238, 821 (1963).
117. Granick S., J. Biol. Chem., 241, 1359 (1966).
118. Marver H. S., Collins A., Tschudy D.P. y Rechcigl M., J. Biol. Chem., 241, 2803, 4323 (1966).
119. Zuyderhoudt F.M.J., Borst P. y Huijing F., Biochim. Biophys. Acta, 178, 408 (1969).
120. Mc Kay R., Druyan R., Getz G.S. y Rabinowitz M., Biochem. J., 114, 455 (1969).
121. Burhnam B.F. y Lascelles J., Biochem. J., 87, 462 (1963).
122. Scholnick R.L., Hammaker L.E. y Marver H.S., Proc. Natl. Acad. Sci., 63, 65 (1969).
123. Hayashi N., Yoda R. y Kikuchi G., Arch. Biochem. Biophys., 131, 83 (1969).
124. Granick S., "Biochemistry of Chloroplasts", Ed. T.W. Goodwin, Academic Press, N.Y., V. II, 373 (1967).
125. Narisawa K. y Kikuchi G., Biochim. Biophys. Acta, 123, 586 (1966).
126. Tschudy D.P., Waxman A. y Collins A., Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 1944 (1967).

127. Marver H.S., Schmid R. y Schützel H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 969 (1969).
128. Magasanik R., *J. Biol. Chem.*, 213, 557 (1955). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 249 (1961).
129. Barreiro O. L. C. de, *Biochem. Pharm.* 14, 1694 (1965).
130. Kappas G. y Granick S., *J. Biol. Chem.*, 243, 346 (1968).
131. Gajdos A. y Gajdos-Török M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17, 343 y 349 (1965).
132. Gajdos A., Gajdos-Török M., Palma-Carlos A. y Palma-Carlos M.L., *Nature* 211, 973 (1966), y 213, 1922 (1967).
133. Gajdos A. y Gajdos-Török M., *Biochem. Med.*, 2, 372 (1969).
134. Marriot J. Neuberger A. y Tait G.H., *Biochem. J.*, 111, 385 (1969).
135. Kappas A. y Granick S., *Trans. Assoc. Am. Phys.* L XXX, 323 (1967).
136. Hayashi N., Yoda R. y Kikuchi G., *J. Biochem.*, 63, 446 (1968).
137. Jacob F. y Monod J., *J. Mol. Biol.* 3, 318 (1961).
138. Granick S., y Kappas A., *J. Biol. Chem.*, 242, 4587 (1967).
139. Levere R.D., Kappas A. y Granick S., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58, 985 (1967).
140. Kappas A. y Granick S., *J. Biol. Chem.*, 243, 346 (1968).
141. Matsuoka T., Yoda R. y Kikuchi G., *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 530 (1968).
142. Marver H. S., Tschudy D.P., Perlnoth M.G. y Collins A., *Science*, 154, 501 (1966).
143. Lascelles J., *J. Gen. Microbiol.* 23, 487 (1960).
144. Clark-Walker G.D., Kittenberg B. y Lascelles J., *J. Bacteriol.* 94, 1648 (1967).
145. Neuwirt J., Poňka P. y Borová J., *European J. Biochem.*, 9, 36 (1969).
146. Townsley P.M. y Neilands J.B., *J. Biol. Chem.* 224, 695 (1957).
147. Lascelles J., "The bacteria", Ed. Gunsalus I.C. y Stanier L.Y., Academic Press, N.Y., Vol. III, 335 (1962).
148. Waxman A.D., Collins A. y Tschudy D.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 675 (1966).

149. Goto K., Higuchi M., Sakai H. y Kikuchi G., J. Biochem., 61, 186 (1967).
150. Lascelles J., y Hatch T., J. Bacteriol., 98, 712 (1969).
151. Waldenström J., Acta Med. Scand. Suppl. 80, 254 (1937).
152. Sachs E., Klin. Wochschr. 10, 1123 (1931).
153. Vahlquist B., Z. Physiol. Chem., 259, 213 (1939).
154. Watson C.J., y Schwartz S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 47, 393(1941).
155. Granick S. y Bogorad L., J. Am. Chem. Soc., 75, 3610 (1953).
156. Kennard G., Nature 171, 376 (1953).
157. Granick, S., Science, 129, 1105 (1954).
158. Granick S., Plant. Physiol. 34, XVIII (1959).
159. Granick S., J. Biol. Chem., 236, 1168 (1961).
160. Sisler E.G. y Klein W.H., Physiol. Plantarum, 16, 315 (1963).
161. Klein S. y Bogorad L., J. Cell. Biol. 22, 443 (1964).
162. Nandi D.L. y Waygood E.R., Can. J. Biochem. 15, 327 (1967).
163. Gibson K.D., Neuberger A. y Scott J.J., Biochem. J., 61, 618 (1955).
164. Schmid R. y Shemin D., J. Am. Chem. Soc. 77, 506,(1955).
165. Dresel E.I. y Falk J.E., Biochem. J., 63, 80-6 (1956).
166. Granick S. y Mauzerall D., J. Biol. Chem., 232, 1119 (1958).
167. Iodice A.A., Richert D.A. y Schulman M.P., Federation Proc. 17, 248, (1958).
168. Onisawa J. y Labbe R., Biochim. Biophys. Acta, 56, 618 (1962).
169. Russell R.L. y Coleman D.L., Genetics 49, 1033 (1963).
170. Gordon A. y Cooper G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 117, 314 (1964).
171. Walerych, W., Acta Biochim. Pol. 10, 243 (1963).
172. Komai H. y Neilands J. B., Arch. Biochem. Biophys. 124, 456 (1968).
173. Mueller G. y Bezold G., Z. Naturforsch B., 24, 47 (1969).
174. Calissano P., Cartascogna C. y Matteini M., Giorn. Biochim. 15, 18(1966).
175. Coleman D.L., J. Biol. Chem. 241, 5511 (1966).
176. Shemin D., "Methods in Enzymology" Ed. Colowick S.P. y Kaplan N.O. Acad. Press N.Y. Vol. V, 883(1962).
177. Shetty A.S. y Miller G.W., Biochem. J., 114, 331 (1969).

178. Batlle A.M.C., Ferramola A.M. y Grinstein M., *Biochem. J.*, 104, 244 (1967).
179. Nandi D.L., Baker-Cohen K.F. y Shemin D., *J. Biol. Chem.*, 243, 1224 (1968).
180. Nandi D. L. y Shemin D., *J. Biol. Chem.*, 243, 1231, 1236 (1968).
181. Komai H. y Neilands J.D., *Biochem. Biophys. Acta*, 171, 311 (1969).
182. Tigier H.A., Batlle A.M. C. y Locascio G.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 300 (1968).
183. Monod J. Changeux J.P. y Jacob F., *J. Mol. Biol.* 6, 306 (1963).
184. Vergnano C., Cartasegna C. y Consignore D., *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* 44, 692 (1968).
185. Barreiro C. L.C. de, *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 412 (1969).
186. Nandi D.L. y Shemin D., *Federation Proc.*, 24, 531 (1965).
187. Tschudy D.P., Collins A., Caughey W.S. y Kleinspehn G.C., *Science*, 131 1320 (1960).
188. Tancioni A., Tigier, H. A. y Grinstein M., *Biochem. Pharm.* 13, 1095 (1964).
189. Tschudy D.P. y Collins A., *Science*, 126, 168 (1957).
190. Kreimer-Birnbaum M. y Grinstein M., *Biochim. Biophys. Acta*, 111, 110 (1965).
191. Neuberger A. Muir H. M. y Gray C.H., *Nature*, 165, 948 (1950).
192. Waldenström J. y Wenit S. Z. *Physiol. Chem.* 259, 157 (1939).
193. Prunty F.T.G., *Biochem. J.*, 39, 446 (1945).
194. Falk J.E., Bresel E.I.B. y Rimington C., *Nature*, 172, 292 (1953).
195. Bogorad L. y Granick S., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 39, 1176 (1953).
196. Schwartz S. y Watson C. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 95, 216 (1957).
197. Heath H. y Hoare D.S., *Biochem. J.*, 72, 14 (1959).
198. Waldenström J. y Vahlquist B., *Hoppe-Seyl's Z.*, 260, 189 (1939).
199. Cookson G. H. y Rimington C., *Biochem. J.*, 57, 476 (1954).
200. Mauzerall D., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 2605 (1960).
201. Mauzerall D. y Granick S., *J. Biol. Chem.*, 232, 1141 (1958).
202. Bogorad L., *J. Biol. Chem.*, 233, 501, 506 (1958).
203. Mauzerall D., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1832 (1960).
204. Mauzerall D., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 2601 (1960).

205. Rimington C., *Acta Med. Scandinav.* 143, 177 (1952).
206. Heilmeyer L. "Disturbances in heme synthesis", Ed. W. H. Seegers, Thomas, Springfield-Illinois (1966).
207. Booiij H. L. y Rimington C., *Biochem. J.*, 65, 4 P (1957).
208. Fallois P., Canivet J., Mondet M. y Poizat, J., *Comp. Rend. Acad. Sci.* 242, 2668 (1956).
209. Bogorad L., "The Chlorophylls", Ed. Vernon y Selye, Academic Press p.481 (1966).
210. Hoare D. S. y Heath H., *Biochem. J.*, 73, 679 (1959).
211. Levin E. Y. y Coleman D.L., *J. Biol. Chem.*, 242, 4248 (1967).
212. Stevens E., Fridman R.D. y Fridman B., *Biochim. Biophys. Acta*, 158, 496 (1968).
213. Sancovich H. A., Batlle A. M. C. y Grinstein M., *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 130 (1969).
- 213a. Sancovich H. A., Batlle A.M.C. y Grinstein M., *Febs Let.*, 3, 223 (1969).
214. Bogorad L., *Plant Physiol.* 32 xli (1957).
215. Carpenter A.T. y Scott J.J., *Biochem. J.*, 71, 325 (1959).
216. Carpenter A. T. y Scott J.J. *Biochem. J.*, 52, 195 (1961).
217. Fridman R.D., Stevens E. y Fridman B., *Anales Asoc. Quim. Arg.*, 55, 287 (1967).
218. Bogorad L. y Marks G., *J. Biol. Chem.* 235, 2127 (1960).
219. Lockwood W. H. y Benson A., *Biochem. J.*, 75, 372 (1960).
220. Hoare D.S. y Heath H., *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 167 (1960).
221. Cornford, P., *Biochem. J.*, 91, 64 (1964).
222. Stevens E., Fridman B., *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 429 (1968).
223. Levin E. Y., *Biochemistry*, 7, 3781 (1968).
224. Bogorad L., *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 104, 676 (1963).
225. Margoliash E., *Ann. Rev. Biochem.*, 30, 549 (1961).
226. Mathewson J. H. y Corwin A. H., *J. Am. Chem. Soc.* 83, 135 (1961).
227. Dalton J. y Dougherty R.C., *Nature*, 223, 1151 (1969).
228. Romeo G. y Levin E. Y., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 63, 856 (1969).

229. Levin E.Y., *Science*, 161, 907, (1968).
230. Watson C. J., Kunge W., Tadeini L., Rossenmaier I. y Cardinal R., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52, 478 (1964).
231. Grinstein M., Kamen M.D., Wikoff H.M. y Moore C.V., *J. Biol. Chem.*, 182 715 (1950) .
232. Chu T.C. y Chu E.J., *J. Biol. Chem.*, 196, 463 (1952).
233. Salomon K., Richmond J.E., y Altman K.I., *J. Biol. Chem.*, 196, 463 (1952).
234. Watson C. J., Mimenta de Mello R., Schwartz S., Hawkinson V.E. y Rossenmaier I., *J. Lab. Clin. Med.*, 37, 831 (1951).
235. Bashour F., *J. Clin. Invest.* 35, 689 (1956).
236. Rogorad L., *J. Biol. Chem.*, 233, 516 (1958).
237. Batlle A.M. C. y Grinstein M., *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 197 (1962).
238. Batlle A. M. C. y Grinstein M., *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 13 (1964).
239. San Martín de Viale, L.C., Grinstein M. *Biochim. Biophys. Acta*, 158 , 79 (1968).
240. Urata G. y Kimura H., *J. Biochem.* 47, 150 (1960).
241. San Martín de Viale, L.C., García R.C., Pisarev D. L. K. de, Tomio J.M. y Grinstein M., *Febs Let.*, 5 , 149 (1969).
242. Tomio J. M., García R.C., San Martín de Viale, L.C. y Grinstein M., *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 353 (1970).
243. Mauzerall D. y Feher H., *Biochim. Biophys. Acta*, 79, 430 (1965).
244. Granick S. y Mauzerall D., *Fed. Proc.* 17, 233 (1958).
245. Granick S. y Mauzerall D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 75, 115 (1958).
246. Bénard H., Gajdos A. y Gajdos-Török M., *Compt. Rend. Soc. Biol.* ,145, 538 (1951).
247. Rimington, C. y Booiij H. L., *Biochem. J.*, 65, 3 P (1957).
248. Sano S., Inoue S., Tanabe Y., Sumiya C. y Koike S., *Science*, 129, 275 (1959).
249. Sano S., *Acta haemat. jap.*, 21, 337 (1958).
250. Carell E. F. y Kahn J. S., *Arch. Biochem. Biophys.* , 108, 1 (1964).
251. Ehteshamuddin A.F.M., *Biochem. J.*, 107 ,446 (1968).
252. Mori M. y Sano S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 610 (1968).

253. Miyake S y Sugimura T., *J. Bact.*, 96, 1997 (1968).
254. Tait G.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 116 (1969).
255. Sano S. y Granick S., *J. Biol. Chem.* 236, 1173 (1961).
256. Porra R. J. y Falk J. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 5, 179 (1961).
257. Rimington C. y Tooth B.E., *J. Biochem.*, Tokyo, 49, 456 (1961).
258. Porra R. J., y Falk J.E., *Biochem. J.*, 90, 69 (1964).
259. Batlle A. M. G., Benson A. y Rimington C., *Biochem. J.*, 97, 731(1965).
260. Lascelles J., *J. Gen. Microbiol.* 15, 404 (1956).
261. Mauzerall D., *Abst. Pap. Amer. Chem. Soc. 135th. Meet.* 54 c.
262. Batlle A.M. G. y Rimington C., *Ciencia e Invest.* 22, 369 (1966).
263. Granick S. y Sano S., *Federation Proc.*, 20, 376 (1961).
264. Sano S., *J. Biol. Chem.*, 241, 5276 (1966).
265. Schieffer H.G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350, 921 (1969).
266. Granick S. y Mauzerall D., "Metabolic Pathways ", Ed. Greenberg D., Academic Press, N. Y., Vol. II (1960), 526
267. Heikel T., Lockwood W.H. y Rimington C., *Nature*, 182, 313 (1958).
268. Nishida G., y Labbe R.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 519 (1959).
269. Labbe R.F. y Hubbard N., *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 185 (1960).
270. Krueger R.C., Melnick I. y Klein J.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 64, 302, (1956).
271. Labbe R.F. y Hubbard N., *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 130 (1961).
272. Schwartz H.G., Goodsmi R., Hill E.L., Cartwright G.E. y Wintrobe M.M., *J. Chim. Invest.*, 40, 188 (1961).
273. Yoneyama Y., Chyama H., Sugita Y. y Yoshikawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 261 (1962).
274. Yoneyama Y., Tamai A., Yasuda T. y Yoshikawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 100 (1965).
275. Neuberger A., Tait G.H., *Biochem. J.*, 90, 607 (1964).
276. Porra R.J., y Jones T.G., *Biochem. J.*, 87, 181 y 186 (1963).
277. Porra R.J. y Lascelles J., *Biochem. J.*, 94, 120 (1965).
278. Porra R.J. y Moss P.D., *Biochem. J.*, 94, 557 (1965).

279. Granick S. y Giller H., J. Gen. Physiol., 30, 1 (1946).
280. Reithmuller G. y Toppo H., Biochem. Z., 340, 313 (1964).
281. Mazanowska A.M., Neuberger A., Tait G.H., Biochem. J., 98, 117 (1966).
282. Labbe R., Volland C. y Chaix P., Biochim. Biophys. Acta, 159, 527 (1968).
283. Jones O.T.G., Biochem. J., 107, 113 (1968).
284. Porra R.J. y Lascelles J., Biochem. J., 108, 343 (1968).
285. King R.F.G.J. y Page E.R., Biochem. J., 110, 45 P (1968).
286. Jones M.S. y Jones O.T.G., Biochem. J., 113, 507 (1969).
287. Pretlow T.P. y Sherman C., Biochim. Biophys., 148, 629 (1967).
288. Sugita Y., J. Biochem., Tokyo, 51, 436 (1962).
289. Yoneyama Y., Sawada H., Takeshita M., Sugita Y., Lipids, 4, 321 (1969).
290. Granick S., J. Biol. Chem., 172, 717 (1948).
291. Granick S., J. Biol. Chem., 236, 1168 (1961).
292. Falk J. E., Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Eng.) 12, 17 (1954).
293. Rimington C. y Kennedy G.Y., "Comparative Biochemistry", Ed. Florkin, y Mason, Academic Press, N.Y. Vol. IV, 557 (1962).
294. Klüver H., J. Psychol. 25, 331 (1948).
295. Falk J.E., Appleby C.A. y Porra R.J., Soc. Exptl. Biol. Symp., 13, 73 (1959).
296. Comfort A., Science, 112, 279 (1950).
297. Kennedy G.Y. y Vevers H.G., Nature, 171, 81 (1953).
298. Comfort A., Biol. Revs. 26, 285 (1951).
299. Cooper R., Biochem. J., 89, 100 (1963).
300. Sugimura T., Okabe K., Nagao M. y Gunge N., Biochim. Biophys. Acta, 115, 267 (1966).
301. Rudzinska M.A. y Granick S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 83, 525 (1953).
302. Church A., Phil. Trans. Roy. Soc., 154, 627 (1968).
303. Rimington C., Proc. Roy. Soc. B 127, 106 (1939).
304. Nicholas R.E.H. y Rimington C., Biochem. J., 50, 194 (1951).
305. Watson C.J. y Berg M., J. Biol. Chem., 214, 537 (1955).
306. With T.K., Scand. J. Clin. y Lab. Invest., 9, 398 (1957).

307. Borg D.C. y Cotzias G.C., *Nature*, 182,1677 (1958).
308. Simon G.J. y Shemin D., *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2520 (1953).
309. Vogel A. I., *A text-book of practical organic chemistry*, Longmans Green and Co., London, p.375 (1957).
310. Grunert R.R. y Phillips P.H., *Arch. Biochem.* 30,217 (1951).
311. Lipmann F. y Tuttle L.C., *J. Biol. Chem.*,159,21 (1945).
312. Grinstein M., *J. Biol. Chem.*, 167, 515 (1947).
313. Nacht S., Tesis-F.C.E.yN., U.B.A. (1963).
314. Falk J.E., "Porphyrins and Metalloporphyrins", P.R.A., Library, Elsevier, Amsterdam, Vol. 2 (1964).
315. Schneider W.C. y Hogeboom G.H., *J. Biol. Chem.*, 183, 123 (1950).
316. Kaufman S. y Alivisatos S.G.A., *J. Biol. Chem.*, 216,141 (1955).
317. Umbreit W.W., Burris R. H. y Stauffer J. F., "Manometric Techniques", Burgess Pub. Co., Minneapolis (1957).
318. Bonner W.D., "Methods in Enzymology", Ed. Colowick y Kaplan., Academic Press, N.Y., Vol. 1, 722 (1955).
319. Lowry O.H. Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 193,265 (1951).
320. Warburg O. y Christian W., *Biochem. Z.*, 310,384 (1942).
321. Mauzerall D. y Granick S., *J. Biol. Chem.*, 219, 435 (1956).
322. Shuster L., *Biochem. J.*, 64,101 (1956).
323. Berlin N.I., Neuberger A. y Scott J.J., *Biochem. J.*, 64,80 (1956).
324. Watson C.J., y Schwartz S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 47, 393 (1941).
325. Dresel E.I.B. y Tooth, *Nature*, 174, 271 (1954).
326. Dresel E.I.B. y Falk J.E., *Biochem. J.*, 63, 72 (1956).
327. Salum J., Batlle A.M.C. y Grinstein M., *Anales Asoc. Quím.Arg.*, 49,3 (1961).
328. Grinstein M., Schwartz S. y Watson C.J., *J. Biol. Chem.*, 157,323(1945).
329. Nicholas R.E.H., *Biochem. J.*, 48, 309 (1951).
330. Lederer E. y Lederer M., "Chromatography: A review of principles and applications", Amer. Elsevier Publishing Co., N.Y. 1957.

331. Falk J. E. y Wenson A., Biochem. J., 55,101 (1953).
332. Ericksen L., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 10,319 (1958).
333. Batlle A.M.C. y Grinstein M., 8º Congreso Lat.Americano Qca., Bs.As., p.107 ,1962.
334. Vogel A. I. "Química Analítica Cuantitativa", Ed. Kapelusz, Bs.As., p.339 (1957).
335. Brockmann A. y Schodder H., Chem. Ber. 74, 73 (1941).
336. Keilin D. y Hartree E.F., "Methods in Enzymology", Ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan, Academic Press, N.Y. Vol. I.,98 (1955).
337. Flodin P. y Porath J. "Chromatography", Ed. Heftman, Reinhold Publ Co. New York p.32 (1961).;
338. Raymond S. y Weintraub L., Science,130,711 (1959).
339. Castagnino J. M., "Electroforesis", EUDEBA, Bs.As. (1968).
340. Kohn J., Nature, 183 ,1055 (1959).
341. Rodman J., "Chromatographic and electrophoretic techniques", Ed. Smith y Heinemann Interscience Pub. Inc., V. 2,127 (1960).
342. Gajdos A. y Gajdos-Török M., Bull. Soc. Chim. Biol. , 45, 1227 (1963).
343. Gajdos A., Panminerva Med., 8, 258 (1966).
344. Magnus I.A., Jarret A., Frankerd T.A.J. y Rimington C., Lancet, 2,448 (1961).
345. Wetterber L., Geller E. y Yuwiler A., Science, 167, 884 (1970).
- 345 a.Wetterber L., Yuwiler A., Geller E. y Schapiro S., Science,168,996, (1970).
346. Lineweaver H. y Burk D., J. Am. Chem. Soc. ,56,658 (1934).
347. Guzman Barron E. S., "Advances in enzymology", Ed. F.F. Nord Interscience Pub. Inc. Vol. 11, 201 (1951).
348. Boyer P.D., "The enzymes", Ed. Boyer P.D., Lardy H. y Myrback K., Academic Press Inc. New York, Vol. I.,511 (1959).
349. Mahler H.R., Ann. N.Y. Acad. Sci.,92,426 (1961).

I N D I C E

	pág.
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	
Glándula de Harder	2
Biosíntesis del hemo	9
1.- Biosíntesis del ácido δ -aminolevúlico. δ -ALA sintetasa	11
2.- Biosíntesis de porfobilinógeno. δ -ALA- dehidratasa.	21
3.- Biosíntesis de uroporfirinas. Porfobilinogenasa.	25
4.- Biosíntesis de coproporfirinógeno. Descarboxilasa	30
5.- Biosíntesis de protoporfirina. Coproporfirinogenasa	33
6.- Biosíntesis de hemo. Quelatasa	37
7.- Distribución de porfirina en la naturaleza	40
PROPOSITOS	43
MATERIALES Y METODOS	
I.- Sustratos, Productos y Sustancias Patrones	
Preparación de succinil CoA	44
Porfobilinógeno.	45
Porfirinas	45
II.-Obtención de porfirinas	45
III.-Animales.	46
IV.-Obtención de material glandular	47
V.-Preparación de los sistemas enzimáticos	
a) Homogenato total	48
b) Mitocondrias	48
c) Microsomas	
d) Sobrenadante libre de mitocondrias	
e) Preparación de succinil-CoA sintetasa	
VI.-Sistemas de incubación	
a) Actividad de δ -ALA sintetasa.	49

b) Actividad de δ -ALA-dehidratasa.	49
c) Actividad biosintética de porfirinas	50
d) Actividad total de la cadena biosintética	50
e) Actividad de succínico deshidrogenasa	50
VII.-Medición e identificación de productos	
a) Determinación de proteínas	51
b) Determinación de δ -ALA	51
c) Determinación de PPG.	52
d) Identificación y separación cromatográfica de ALA y pirroles.	54
e) Análisis de porfirinas I libres	55
II Esterificadas	56
1. Adsorción de porfirinas	56
A. Talco.	57
B. Al_2O_3	57
C. Florisil	57
2. Esterificación de porfirinas	58
Extracción de porfirinas	59
VIII.-Hidrólisis de porfirinas esterificadas	59
IX.- Separación e identificación de porfirinas por cromato- grafía	
a. Cromatografía de adsorción en columna.	59
b. Cromatografía sobre papel	
Porfirinas esterificadas	60
Porfirinas libres.	61
X.- Análisis individual cuantitativo de las porfirinas	62
XI.- Determinación de radioactividad.	62
XII. Espectros de absorción	63
XIII. Puntos de fusión.	64
XIV.- Reactivos, solventes y absorbentes	64

	pág.
XV.-Geles	65
XVI. Electroforesis	65
a) Gel de poliacrilamida	65
b) Gel de almidón	66
RESULTADOS. Parte I	
Naturaleza de las porfirinas presentes en la glándula de Harder	67
Biosíntesis de δ ALA	
Actividad de δ -ALA-sintetasa	70
Biosíntesis de PBG	
Actividad de δ ALA-dehidratasa	76
Biosíntesis de porfirinas	
1. δ ALA como sustrato	78
Tiempo.	80
Conc. de δ ALA	81
Fracciones enzimáticas	82
Anaerobiosis	83
Temperatura	83
2. PBG como sustrato.	85
3. Glicocola como sustrato.	87
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN Parte I	89
RESULTADOS Parte II	
δ ALA-dehidratasa.	95
Actividad enzimática	
Purificación	99
Propiedades de la δ ALA-dehidratasa	
I. Pureza	105
II. Estabilidad	106
III. Curso de reacción	106

	pág.
IV. Conc. enzimática	108
V. Preincubación con cisteína	108
VI. Temperatura	109
VII. pH óptimo	109
VIII. Concentración de sustrato	110
IX. Estequiometría de la reacción	110
X. Efecto de reactivos sulfhidrúlicos	
a) Activación	111
b) Inhibición	112
XI. Efecto de cationes y aniones	116
XII. Efecto de agentes quelantes	117
¿ALA Dehidratasa en estados patológicos	119
CONCLUSIONES Y DISCUSION Parte II	120
RESUMEN	126
BIBLIOGRAFIA	128
INDICE	142